

化学物質の暴露によるマウス胎仔の下垂体および生殖腺における遺伝子発現の変動

○水谷滋利¹、高嶋良吉¹、辻本善政¹、榎 由樹¹、近藤昭宏²、加藤郁之進¹

¹タカラバイオ(株)、²大阪大学(医)

【はじめに】我々はこれまでに DNA chip を用いて遺伝子の発現の亢進や抑制のパターンを解析することにより、微量の化学物質による内分泌攪乱作用のリスク評価の試験法を提案してきた。昨年度の本学会において化学物質を妊娠マウスに投与し、雄の胎仔の脳で発現の変化する遺伝子について報告した。今回はさらに焦点を絞り、胎仔の性分化において大きく影響を受けると考えられる脳下垂体と生殖腺において化学物質の投与により発現の変化する遺伝子について解析した。【方法】マウスの胎仔の発生の過程ではこれまでの報告にもあるように、受精後 11.5 日から 12.5 日目にかけて性分化に関わる重要な時期がある。この時期の BALB/c 母獣にエチニルエストラジオール(EE)あるいはビスフェノール A(BPA)を投与(10.5 日目)し、11.5 日目あるいは 12.5 日目に胎仔を採取し、雄だけを選別して凍結切片を作成した。凍結切片からの下垂体および生殖腺の分離は Laser Capture Microdissection (LCM) System PixCell II を用いて行なった。それぞれの組織は 8 枚ずつの凍結切片より回収し、PicoPure RNA Isolation Kit を用いて total RNA を抽出した。さらに T7 RNA polymerase を用いた RNA 増幅反応により、DNA chip 解析に充分量の aRNA を得た。DNA chip の解析には、IntelliGene Mouse CHIP Set 1 Ver.1.0 を用いた。【結果と考察】生殖腺においては 11.5 日目に EE の投与によってコントロールに比べて 2 倍以上に発現量が亢進した遺伝子数は 32、1/2 以下に発現量が抑制された遺伝子数は 11 であった。BPA の投与によって発現量が亢進したものは 4、抑制されたものは 28 であった。また、12.5 日目に EE の投与によって発現量が亢進した遺伝子数は 97、抑制された遺伝子数は 28 であった。BPA の投与によって発現量が亢進したものは 11、抑制されたものは 5 であった。一方、脳下垂体においては 11.5 日目に EE の投与によって発現量が亢進した遺伝子数は 15、抑制された遺伝子数は 258、BPA の投与によって発現量が亢進したものは 0、抑制されたものは 155 であった。また、12.5 日目に EE の投与によって発現量が亢進した遺伝子数は 5、抑制された遺伝子数は 7 であった。BPA の投与によって発現量が亢進したものは 15、抑制されたものは 70 であった。生殖腺においては発現が亢進する遺伝子が多いのに対し、脳下垂体では発現に変動がみられたものはほとんどが抑制されていた。中でも脳下垂体では BPA を投与した際 11.5 日目および 12.5 日目の両方で発現が抑制されていたものは、EE の 11.5 日目でも抑制されていた。LCM を用いる方法で遺伝子の発現量の変動が測定できることが分かった。今後、他の内分泌攪乱作用の疑いのある化合物について調べるつもりである。(本研究は平成 13 年度の環境省のプロジェクトの一環として行われた)

Regulation of gene expression in murine pituitary and gonad exposed to EDCs

Shigetoshi Mizutani,¹⁾ Ryokichi Takashima,¹⁾ Yoshimasa Tsujimoto,¹⁾ Yuki Enoki,¹⁾ Akihiro Kondo²⁾ and Ikunoshin Kato¹⁾

1) Takara Bio Inc. 2) Osaka University School of Medicine

We investigated which genes are expressed or repressed during fetal sex-differentiation in the pituitary or the gonad, and the effects of endocrine disrupting chemicals administered to pregnant mammals. Ethynyl estradiol (EE) or bisphenol A (BPA) was subcutaneously given to pregnant BALB/c mice on gestation day (GD) 10.5. Pituitary and gonad tissue were collected from eight frozen sections of male fetuses using the Laser Capture Microdissection method. Total RNA was extracted with a PicoPure RNA Isolation Kit and aRNA was amplified using the T7-based RNA amplification method. The IntelliGene Mouse CHIP Set1 Ver.1.0 was used for DNA chip analysis. In the fetal gonad, numerous genes were expressed on GD12.5 rather than GD11.5. On the other hand, genes altered in the pituitary were mostly repressed. Genes repressed on GD11.5 and 12.5 in the pituitary when BPA was administered were also repressed on GD11.5 when EE was administered.