

自己評価報告書

平成23年 4月 5日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20710051

研究課題名 (和文) 甲状腺系攪乱化学物質応答遺伝子の網羅的探索及び転写制御機構の解明

研究課題名 (英文) The effects of endocrine disrupting chemicals on genome wide gene expression of thyroid hormone responsive gene and analysis of molecular mechanism of transcriptional regulation.

研究代表者

石原 顕紀 (ISHIHARA AKINORI)

静岡大学・理学部・助教

研究者番号：70432193

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：内分泌かく乱物質

1. 研究計画の概要

(1) 網羅的遺伝子発現解析による甲状腺ホルモン作用攪乱物質の影響の評価

本研究における目的は甲状腺ホルモン作用を遺伝子発現レベルで攪乱する化学物質の作用メカニズムを検討する事にある。ほ乳類周産期にある種の水酸化 PCB に曝露された場合、脳機能の発達に重大な影響を及ぼすことが報告されている。そこで、モデル生物として変態期アフリカツメガエルを用いて、水酸化 PCB によってホルモン応答作用が攪乱される遺伝子群のゲノムワイドな検索を行う事が第一段階としてあげられる。

(2) 標的遺伝子の転写制御における化学物質の作用メカニズムの解析

上記 (1) で抽出された“甲状腺ホルモン応答遺伝子で、かつ水酸化 PCB によって遺伝子発現が攪乱される”遺伝子群の転写制御が水酸化 PCB によってどのように攪乱されるかを検討する。具体的にはヒストンのアセチル化状態などを水酸化 PCB 共存下で検討し、クロマチン構造の変化等を追跡する。

2. 研究の進捗状況

研究の第一段階として、個体レベルでの水酸化 PCB の影響を検討した。この結果、変態期に化学物質曝露されたアフリカツメガエル幼生は、非曝露群と比べて有意に変態が遅延する事を見いだした。なお、培養細胞ではこのような抗甲状腺ホルモン作用は確認できなかったため、個体を用いた実験系は有用である事が示唆された。この現象の分子機構を明らかにするために、曝露群で発現が変動

する遺伝子群の探索をマイクロアレイを用いて行う事とした。マイクロアレイに先立ち、影響が出る事が想定される抗甲状腺ホルモン作用を検証するために、ホルモン応答遺伝子群の発現に及ぼす化学物質の影響を検討し、実際に影響が見られたサンプルを用いてマイクロアレイ解析を行った。データ解析には、解析用のプログラムを Perl 言語によって作成し、ゲノムワイドな化学物質の影響を明らかにした。これにより、化学物質曝露による変態遅延は、甲状腺ホルモン応答遺伝子の発現が部分的に阻害されることにより生じる事を明らかにし、またこの遺伝子群には組織の再構築に関与するものが含まれる事を見いだした。さらに、マイクロアレイ解析の結果を定量的 PCR によって確認し、アレイ解析の結果と定量 PCR の結果が相関している事を明らかにした。本成果は研究成果 (雑誌論文) ①に示す通り論文として発表した。次に、この遺伝子発現がどのように調節されているかを検討するために、クロマチン免疫沈降法を行う予定であるが、この実験系の導入を行った。現在、実験系の確立が終了し、実際のサンプルを用いての検討を行うところである。

3. 現在までの達成度

③やや遅れている。本研究はマイクロアレイによるゲノムワイドな抗甲状腺ホルモン作用を検討するものであるが、アレイに用いるサンプル調製用の個体曝露が、動物個体差と、脳組織の小ささからくる調製の難しさにより若干の遅れを生じたためである。しかしながら、この問題点は克服済みであり、データ解析まで終了しているため、今後の予定は計画通り進める事が可能であると考える。

4. 今後の研究の推進方策

研究計画概要(2)を推進していく。実際にはクロマチン免疫沈降法を用いて複数遺伝子の転写制御を検討することとなる。加えて、本研究で細胞外マトリックスを分解する酵素群が水酸化PCBによって発現攪乱を受ける事が示唆されたため、これらの遺伝子の脳内における発現局在を明らかにし、より詳細な作用メカニズムの検討を望みたい。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Ishihara A, Makita Y, Yamauchi K. Gene expression profiling to examine the thyroid hormone-disrupting activity of hydroxylated polychlorinated biphenyls in metamorphosing amphibian tadpole. *J Biochem Mol Toxicol*. 2011 in press. (査読有)
- ② Matsumoto E, Ishihara A, Tamai S, Nemoto A, Iwase K, Hiwasa T, Shibata S, Takiguchi M. Time of Day and Nutrients in Feeding Govern Daily Expression Rhythms of the Gene for Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP)-1 in the Mouse Liver. *J Biol Chem*. 2010 285(43):33028-36. (査読有)
- ③ Yamauchi K, Ishihara A. Evolutionary changes to transthyretin: developmentally regulated and tissue-specific gene expression. *FEBS J*. 2009 276(19):5357-66. (査読有)
- ④ Ishihara A, Rahman FB, Leelawatwattana L, Prapunpoj P, Yamauchi K. In vitro thyroid hormone-disrupting activity in effluents and surface waters in Thailand. *Environ Toxicol Chem*. 2009 28(3):586-94. (査読有)
- ⑤ Eguchi R, Ishihara A, Yamauchi K. Interaction of diethylstilbestrol and ioxynil with transthyretin in chicken serum. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2008 147(3):345-50. (査読有)

[学会発表] (計5件)

- ① 石原顕紀, 蒔田優, 山内清志: 網羅的遺伝子発現解析による化学物質応答メカニズムの検討 日本比較内分泌学会第35回大会(2010, 11月18日~20日) 静岡
- ② 山内清志, 秋吉さくら, 崔語旻, 石原顕紀: 血清蛋白質は種特異的に化学物質の甲状腺ホルモン攪乱作用を抑制する 日本比較内分泌学会第35回大会(2010, 11月18日~20日) 静岡
- ③ 蒔田優, 石原顕紀, 山内清志: 変態期アフリカツメガエル脳における甲状腺ホルモン作用に及ぼす水酸化PCBの影響 日本動物学会第81回大会(2010, 9月23日~25日) 東京
- ④ 秋吉さくら, 江口良二, 石原顕紀, 山内清志: 甲状腺系攪乱化学物質と血清タンパク質の相互作用 日本動物学会第81回大会(2010, 9月23日~25日) 東京
- ⑤ 石原顕紀, ラハマン ファルハナ, 山内清志: タイ王国環境水中に含まれる甲状腺攪乱活性のバイオアッセイによる検出 日本動物学会第79回大会(2008, 9月5日~7日) 福岡

[図書] (計1件)

Yamauchi, K., Ishihara, A. TTR and Endocrine Disruptors. In: *Recent Advances in Transthyretin Evolution, Structure and Biological Functions*.

[その他]

ホームページ

<http://www.ipc.shizuoka.ac.jp/~sbkyama/>