

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310047

研究課題名（和文）

投射神経可視化マウスを用いた周生期ビスフェノール曝露影響の解析

研究課題名（英文）

Study of Bisphenol A effect on neonatal mouse using genetically modified mouse

研究代表者

渡邊 肇 (WATANABE HAJIME)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：80212322

研究成果の概要（和文）：ビスフェノールなどのエストロゲン様化学物質を胎児期や新生児期に曝露した個体では成熟時に様々な影響が生じることが知られている。本研究では、新生児へのビスフェノール曝露が神経系に及ぼす影響について、投射神経可視化マウスを用いた解析とゲノムレベルからのエピジェネティックな解析を進めることにより、その分子機構を解明することとした。エストロゲン受容体が発現している神経線維においてマーカー遺伝子が発現するトランスジェニックマウスを作製し、現在複数の系統について解析を進めている。

研究成果の概要（英文）：It has been known that neonatal exposure of Bisphenol A cause adverse effects on mice. Especially effect on nervous stem is one of the great concerns. In this study, I made transgenic mice expressing a marker gene under the control of regulatory region of estrogen receptor alpha and examined the effect of Bisphenol A. In addition, I also examined the effect of Bisphenol A from epigenetic point of view by immunoprecipitation of methylated genome DNA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：分子生物学、毒性学、環境生物学

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：マウス、エピジェネティクス、ビスフェノール

## 1. 研究開始当初の背景

化学物質影響における重要な問題の1つに、胎児や新生児における化学物質曝露影響があげられる。胎児期や新生児期の化学物質曝露においては、かねてより脆弱性が指摘されているが、特に問題となるのは、一時的な曝露長期的に成熟後まで影響を及ぼす懸念である。これは、疫学的なアプローチと実験的なアプローチから示されてきている。

疫学的なアプローチからは、大人になってから発症する様々な疾患について、その起源が胎児期や新生児期の環境に起因するという考えが疫学調査などから提唱されおり、胎児起源による成人疾患の発症 (Fetal origins of Adult Disease) と呼ばれている。こうした考えが提唱されるに至り、胎児期や新生児期の化学物質曝露もまさに成人疾患の発症に関与しているのではないかという懸念が生じている。特に近年になり、遺伝子多型 (SNPs) と疾患の関連の解析がすすむにつれて、遺伝子多型だけでは説明しきれない疾患についてももう1つの重要な要因である環境影響に関心が高まりつつある。胎児期や幼若期における曝露の影響については、内分泌かく乱にとどまらず<sup>1)</sup>、神経疾患、アレルギー性疾患などの免疫疾患を胎児、幼若時起源の肥満などの様々な疾患との関連性についても懸念されるに至っており、重要な問題の1つになってきている。

## 2. 研究の目的

周生期にエストロゲン様化学物質を曝露した個体は、成熟時に膈上皮がエストロゲン非依存的な増殖をはじめ、腫瘍化に至ることが

知られている。曝露自体は終了しているにもかかわらず、その影響がなぜ成熟期までの長期にわたるのかは、長い間不明であった。化学物質は排出され、細胞はターンオーバーしていく中で、曝露影響を長期的に維持できるのはゲノム DNA のエピジェネティックな変化である。そこで、本研究では、新生児への曝露影響が長期的に続く原因をエピジェネティックな変化から解析し、その分子機構を解明する。

## 3. 研究の方法

新生児期の曝露により長期的な影響が誘起されることが知られているエストロゲン様化学物質をモデルとして、その作用メカニズムの解明を行った。曝露により誘起される長期的な遺伝子発現状態の変化とエピジェネティックなプログラムの変化について、クロマチン免疫沈降と DNA マイクロアレイを用いてゲノムワイドに解析した。またこれらの解析からエピジェネティックな影響により遺伝子発現が変化したゲノム領域を抽出し、曝露によるエピジェネティックなプログラムへの影響を解析した。

## 4. 研究成果

ビスフェノールなどのエストロゲン様化学物質を胎児期や新生児期に曝露した個体では成熟時に様々な影響が生じることが知られている。数多くの報告がなされながらも明確な結論が出ず、その影響が懸念される問題の1つにビスフェノール曝露による性成熟や性周期への影響がある。本研究では、新生児へのビスフェノール曝露が神経系に及ぼす影響について、投射神経可視化マウスを用

いた解析とゲノムレベルからのエピジェネティックな解析を進めることにより、その分子機構を解明した。ビスフェノール A を新生児期に暴露したマウスからゲノム DNA を調整し、メチル化 DNA 特異的な抗体で免疫沈降を行い、チップオンチップ法により、ゲノムのメチル化部位を特定し、未暴露のゲノムメチル化部位との比較を行った。その結果、複数の遺伝子において新生児期暴露特異的に DNA のメチル化状態が変化していることを見出した。一方、エストロゲン応答性の神経線維を標識するために、エストロゲン受容体が発現している神経線維において蛍光を発するマウスを作製するための DNA コンストラクトを作製し受精卵への注入を行った。入手した BAC クローンが想定外の構造をとっていたために、予定より時間がかかったため、論文発表にまで至らなかったものの、現在トランジェニックラインを複数得て解析を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 10 件)

(1) Kato, Y., Shiga, Y., Kobayashi, K., Tokishita, S.I., Yamagata, H., Iguchi, T. & Watanabe, H.

Development of an RNA interference method in the cladoceran crustacean *Daphnia magna*. *Dev Genes Evol*, 査読有, 20, (2012), 337 - 345

(2) Kato, Y., Kobayashi, K., Watanabe, H., & Iguchi, T.

Environmental Sex Determination in the

Branchiopod Crustacean *Daphnia*

*magna* :Deep Conservation of a Doublesex Gene in the Sex-Determining Pathway.

*Plos Genet*, 査読有, 7, (2011), e1001345

(3) Kato, Y., Kobayashi, K., Watanabe, H. & Iguchi, T.

Introduction of foreign DNA into the water flea, *Daphnia magna*, by electroporation.

*Ecotoxicology*, 査読有, 19, (2010), 589-592.

(4) Kato, Y., Kobayashi, K., Oda, S., Tatarazako, N., Watanabe, H. & Iguchi, T.

Sequence divergence and expression of a transformer gene in the branchiopod crustacean, *Daphnia magna*.

*Genomics*, 査読有, 95, (2010), 160-165.

(5) Hikake, T., Hayashi, S., Chambon, P., Watanabe, H., Iguchi, T. & Sato, T.

Differential involvement of insulin-like growth factor-I and estrogen on prolactin cells in the mouse anterior pituitary.

*Exp Biol Med (Maywood)*, 査読有, 235, (2010), 974-980.

(6) Kirigaya, A., Kim, H., Hayashi, S., Chambon, P., Watanabe, H., Iguchi, T. & Sato, T.

Involvement of Estrogen Receptor beta in the Induction of Polyovular Follicles in Mouse Ovaries Exposed Neonatally to Diethylstilbestrol.

*Zoological Science*, 査読有, 26, (2009), 704-712.

(7) Kim, H., Nakajima, T., Hayashi, S., Chambon, P., Watanabe, H., Iguchi, T. & Sato, T.  
Effects of diethylstilbestrol on programmed oocyte death and induction of polyovular follicles in neonatal mouse ovaries.  
Biol Reprod, 査読有, 81, (2009), 1002-1009.

(8) Kim, H., Hayashi, S., Chambon, P., Watanabe, H., Iguchi, T. & Sato, T.  
Effects of diethylstilbestrol on ovarian follicle development in neonatal mice.  
Reproductive Toxicology, 査読有, 27, (2009), 55-62.

(9) Kakuta, H., Tanaka, M., Chambon, P., Watanabe, H., Iguchi, T., & Sato, T.  
Involvement of gonadotropins in the induction of hypertrophy-hyperplasia in the interstitial tissues of ovaries in neonatally diethylstilbestrol-treated mice  
Reproductive Toxicology, 査読有, 33, (2012), 35-44

(10) Nakamura, T., Miyagawa, S., Katsu, Y., Watanabe, H., Mizutani, T., Sato, T., Morohashi, K.I., Takeuchi, T., Iguchi, T., & Ohta, Y  
Wnt family genes and their modulation in the ovary-independent and persistent vaginal epithelial cell proliferation and keratinization induced by neonatal diethylstilbestrol exposure in mice

Toxicology, 査読有, 296, (2012), 13-19

[学会発表] (計 12 件)

- (1) 加藤泰彦、渡邊肇、「オオミジンコにおける RNA 干渉法の開発」  
第 34 回日本分子生物学会年会 (2011 年 12 月 13 日～16 日) パシフィコ横浜
- (2) 渡邊肇、「甲殻類における核内受容体の機能」、環境ホルモン学会、第 14 回講演会シンポジウム (2011 年 12 月 1 日～2 日)  
東京大学山上会館
- (3) Kato, Y., Shiga, Y., Tokishita, S., Kobayashi, K., Yamagata, H., Iguchi, T., & Watanabe, H. 「Development of an RNA interference method in the cladoceran crustaceans, *Daphnia magna*」, 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011 年 12 月
- (4) 加藤泰彦, 渡邊肇 「環境によるミジンコの性決定機構」, 第 13 回日本進化学会大会, 京都 (2011)
- (5) Kato, Y., Shiga, Y., Tokishita, S-I., & Watanabe, H. 「Development of an RNA interference method in the cladoceran crustacean *Daphnia magna*.」 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, Nagoya, Japan (2011)
- (6) 豊田賢治、宮川一志、小田重人、宮川信一、萩野由紀子、加藤泰彦、渡邊肇、鏑迫典久、井口泰泉「オオミジンコ *Daphnia magna* の性決定期における幼若ホルモン応答遺伝子の網羅的解析」, 第 82 回日本動物学会大会, 旭川, 2011 年 9 月

(7) Toyota, K., Kato, Y., Miyagawa, S., Ogino, Y., Kobayashi, K., Oda, S., Watanabe, H., Tatarazako, S., & Iguchi, T. 「Effects of Juvenile Hormone Agonists for Embryonic Development of *Daphnia magna*」, 環境ホルモン学会第13回研究発表会, 東京, 2010年12月

(8) Kato, Y., Kobayashi, K., Oda, S., Tatarazako, N., Watanabe, H. & Iguchi, T. 「Sequence divergence and expression of a transformer gene in the branchiopod crustaceans, *Daphnia magna*」 *Daphnia Genomics Consortium 2010*, Leuven University, (Belgium), March 26-30, 2010.

(9) Iguchi, T., Kato, Y., Miyagawa, S., Kobayashi, K., Oda, S., Tatarazako, N., & Watanabe, H. 「Molecular impact of juvenile hormone agonists on neonatal *Daphnia magna*」 *Daphnia Genomics Consortium 2010*, Leuven University, (Belgium), March 26-30, 2010.

(10) 加藤泰彦、小林かおる、小田重人、鎌迫典久、渡邊肇、井口泰泉「エレクトロポレーションを用いたオオミジンコにおけるGFP遺伝子の異所的発現」, 環境ホルモン学会第12回研究発表会, 東京, 2009年12月

(11) Iguchi, T., Kato, Y., Watanabe, H., Oda, S., Tatarazako, N. 「Modulation of sex determination by juvenile hormones and their analogs in *Daphnia magna*.」 *International Conference on Comparative Endocrinology, Symposium*

*Environmental Toxicology and Endocrine Disruption*, Hong Kong, China (2009)

(12) 加藤泰彦、小林かおる、渡邊肇、井口泰泉「エレクトロポレーションを用いたオオミジンコへの遺伝子導入」, 第80回日本動物学会大会, 静岡, 2009年9月

〔図書〕(計2件)

(1) Watanabe, H., Kato, Y., and Iguchi, T. In: *Handbook of Systems Toxicology*. Eds. Casciano, D.A. and Sahu, S.C., John Wiley & Sons, Ltd., Application of ecotoxicogenomics for understanding mode of action of chemicals and species extrapolation. 2011, 67-72

(2) 渡邊肇, 加藤泰彦 (東海大学出版会) 「ミジンコのゲノム情報を利用した脱皮メカニズムの解析」, *脱皮と変態の生物学*, (2011), p457-473

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡邊 肇 (WATANABE HAJIME)  
大阪大学・工学研究科・教授  
研究者番号: 80212322