

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 4月25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）A genome-wide expression analysis to study the effects of thyroid-disrupting chemicals on the expression of the hormone responsive genes.

研究代表者

石原 顕紀 (ISHIHARA AKINORI)

静岡大学・理学部・講師

研究者番号：70432193

研究成果の概要（和文）：

本研究は、甲状腺系攪乱化学物質が、遺伝子発現レベルでの甲状腺ホルモン作用に及ぼす影響を、モデル生物であるアフリカツメガエルを用いて検討することを目的とした。水酸化 PCB 処理による、ホルモン依存性変態の抑制効果を見だし、その背景に、「甲状腺ホルモン処理によって幼生型の細胞が壊され、成体型の細胞が接着してくる」ということ、かつ「それらの組織の再構築が水酸化 PCB によって攪乱されている可能性があることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Hydroxylated polychlorinated are suspected to disrupt post-embryonic neural development in the brains of mammals including humans. Because thyroid hormones play a role in the perinatal development of the central nervous system, the thyroid system is thought to be one of the important endpoints affected by several endocrine-disrupting chemicals including PCBs. We studied the effects of these compounds on thyroid hormone function in the brain by using metamorphosing tadpoles of the African clawed toad as a model for mammalian post-embryonic development. The metamorphosis assay revealed that these compounds inhibit thyroid hormone-induced metamorphosis. Genome-wide gene expression analysis in the brain following short-term exposure demonstrated that delayed metamorphosis could partially be caused by disruption of thyroid hormone-induced gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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. 研究開始当初の背景

女性ホルモン核内受容体に結合し、擬似性ホルモン作用を示す化学物質が数多く存在する一方で、甲状腺ホルモン受容体に結合する

化学物質は数も少なく、結合も弱い傾向がある。当研究室では、甲状腺系における化学物質の影響に関して、血中ホルモン結合タンパク質トランスサイレチン (TTR) と甲状腺ホ

ルモン受容体の結合に及ぼす影響、細胞への取り込みに及ぼす影響、甲状腺ホルモン受容体 (TR) と甲状腺ホルモンの結合に及ぼす影響、レポーターアッセイ系を用いた遺伝子発現に及ぼす影響について検討を行ってきた。化学物質がこれらのステップに及ぼす影響が重要である一方、TR との結合を介さず遺伝子発現に影響を及ぼす物質の存在が明らかとなり、核内転写制御メカニズムを詳細に検討することが非常に重要である可能性が示唆された。また、いくつかの脂溶性化学物質が培養細胞中に組織、時間、濃度依存的に蓄積すること、水酸化 PCB が TR-RXR ヘテロ二量体と甲状腺ホルモン応答配列 TRE の結合を阻害すること、ビスフェノール A がコリプレッサーである NCoR と TR の結合を促進すること、標的遺伝子の種類によってコファクターの結合状態やヒストンのアセチル化の状態が異なること、甲状腺ホルモンの作用はステージ特異的であることなどが報告され、ステージ特異的に化学物質応答遺伝子のゲノムワイドな検索を行うこと、およびプロモーターを同定すること、プロモーター上での受容体、コファクター、RNA ポリメラーゼ II の結合状態およびヒストンのアセチル化状態に及ぼす化学物質の影響の検討、応答遺伝子プロモーター間での化学物質の影響の比較を各ステージで行うことが重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、化学物質による転写制御メカニズムの全体像を鳥瞰すること、核内転写制御に及ぼす影響を検討することである。具体的には、TR との結合を介さず遺伝子発現を調節する化学物質に応答する遺伝子群をステージ特異的にゲノムワイドに検索し、公開されている cDNA、ゲノム配列の情報をもとに、化学物質応答遺伝子のプロモーター領域を *in silico* で同定すること、TR-RXR ヘテロ二量体の TRE への結合に及ぼす化学物質の影響を検討すること、ポリメラーゼ II のプロモーターへの結合に及ぼす化学物質の影響を検討すること、ヒストンのアセチル化状態に及ぼす化学物質の影響を検討すること、コファクターの転写複合体への結合に及ぼす化学物質の影響を検討すること、応答遺伝子間で転写調節に及ぼす化学物質の影響に差があるか検討することである。

3. 研究の方法

(1) 個体、培養細胞において化学物質に 応答する遺伝子群のゲノムワイドな検索

過去の研究で、TR との結合を介さず遺伝子発現を撓乱する化学物質が明らかになっているので、アフリカツメガエル個体、培養細

胞において、DNA マイクロアレイを用いて化学物質に応答する遺伝子群をゲノムワイドに検索する。ステージ特異的な応答を検討するため、変態期のいくつかのステージの個体を用い、培養細胞での応答と比較し、同様の発現変動を示す遺伝子群を応答遺伝子として同定する。個体間の差を少なくするため、数個体をまとめて 1 サンプルとし、1 ステージあたり 3 回以上の検討を行う。

(2) マイクロアレイのデータ解析及び 発現変動の検証

クラスター解析、Gene Ontology による分類などの解析を行い、化学物質による転写制御の全体像を捉える。また、データを統計解析し、個体、培養細胞両実験において有意に発現変動を示す遺伝子を応答遺伝子として同定する。応答遺伝子の発現変動をリアルタイム PCR を用いて定量的に検証する。

(3) プロモーター領域の同定

本研究では、アフリカツメガエル *Xenopus laevis* を用いるが、現在 NCBI の UniGene データベースに約 50 万、基礎生物学研究所の XDB に 24 万、ナショナルバイオリソースプロジェクトに 14 万の EST クローンの情報が管理されている。また、国際的なゲノムデータベースである UCSC で近縁種の *Xenopus tropicalis* の全ゲノム情報が公開されている。これらの情報を

もとに、(1) (2) で同定した化学物質応答遺伝群のプロモーター領域を *in silico* で同定する。プロモーター領域の情報が得られない遺伝子については、適宜クローン化を行い、塩基配列を決定する。

(4) 各種抗体を用いた免疫沈降法

同定した化学物質応答遺伝子群のプロモーター上における転写制御メカニズムに及ぼす化学物質の影響について検討を行う。具体的には TR の結合状態に及ぼす影響、RXR の結合状態に及ぼす影響、RNA ポリメラーゼ II の結合状態に及ぼす影響、コファクターの結合状態 (コリプレッサーとして SMRT、NCoR、HDAC3、コアクチベーターとして SRC-1、CBP/p300、TRAP220、GRIP1、p/CAF などの抗体を用いる) に及ぼす影響、ヒストンのアセチル化状態に及ぼす影響を検討する。これらの検討はリガンド無し、甲状腺ホルモン (T3) 存在下、化学物質存在下、T3、化学物質共存下で、処理後様々な時間点における影響について調べる。応答遺伝子ごとに同様の実験を繰り返し、またステージごと同様の実験を繰り返す。さらに遺伝子特異的、ステージ特異的に転写複合体の形成過程に差が見られるか比較する。これにより、各遺伝子の転写制御に及ぼす化学物質の影響を解明すること

が可能であるだけでなく、ステージ依存的な化学物質による影響、そのステージ依存的な影響における各遺伝子の寄与の度合いを知ることができ、転写複合体形成に及ぼす化学物質の影響の全容解明が期待できる。

4. 研究成果

ポリ塩化ビフェニル (PCB) は工業等で多量に用いられて来た脂溶性の化学物質で、ヒトを含む生物に様々な影響を及ぼす事が知られており、特に脳の発達などへの影響が懸念されている。幼児期の脳の発達過程において、甲状腺ホルモンが重要な役割を果たしていると考えられているため、PCB の攪乱作用点として甲状腺系が注目されている。従って、PCB や水酸化 PCB を含む多くの化学物質の脳への影響を検討する事は非常に重要なことである。しかしながら、ヒトやラットはほ乳類であり、胎児に直接化学物質曝露させることは困難である。そのため、PCB や水酸化 PCB が個体レベルで及ぼす作用の背景にあるゲノムワイドなメカニズムについてはほとんど明らかになっていない。

両生類の変態は、甲状腺ホルモンによって引き起こされる最も劇的な生命現象の一つである。この変態期はほ乳類での出生後の時期に当たり、甲状腺ホルモンが重要な役割を担っている事は言うまでもない。この変態は甲状腺ホルモン様作用や、抗甲状腺ホルモン様作用を検討する上で非常に有用なモデルとなりうる。従って、変態期両生類は、甲状腺ホルモン様作用、抗甲状腺ホルモン様作用を個体レベルで検討し、遺伝子発現解析と関連づける事で原因解明の一端を担う事ができる優れたシステムであると言える。

本研究では、ラット培養細胞で甲状腺ホルモン様作用、抗甲状腺ホルモン様作用を示す事が報告されている水酸化 PCB106 とさらに塩素が一つ多い水酸化物である水酸化 PCB159 を用いて、このような甲状腺ホルモン攪乱作用が *in vivo* で確認できる事を示し、この減少の背景にあるメカニズムをマイクロアレイ解析によって解明する事を目的とした。

まず、これらの水酸化 PCB が甲状腺ホルモンによって誘導されるアフリカツメガエルオタマジャクシの成体への変態に及ぼす影響について検討した (図 1)。コントロール群では、処理 0 日では 10 個体の平均がステージ 52.7 であったのに対して 15 日後では 53.4 であり、顕著な変態の進行は見られなかった。甲状腺ホルモン処理群では 15 日後に 58.2 まで変態が進行した。混合処理群では、甲状腺ホルモンと 40H-CB106 では 56.7、甲状腺ホルモンと 40H-CB159 では 56.3 であり、甲状腺ホルモン単独処理群と比較して、有意に変態進行の遅れが見られた。

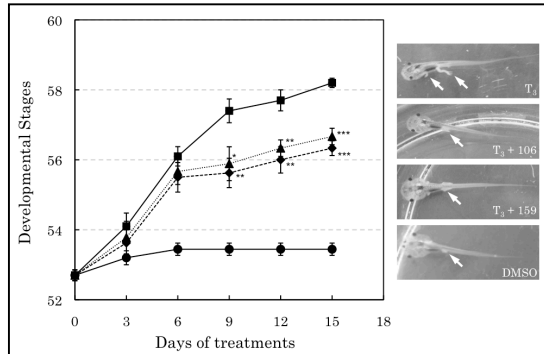


図 1 水酸化 PCB が甲状腺ホルモンによって誘導される変態に及ぼす影響

次に、4日間水酸化 PCB で処理した個体から摘出した脳を用いて遺伝子発現解析を行った。40H-CB106 処理群においては甲状腺ホルモン応答遺伝子として $TR\beta$ 、BTEB を用いた (図 2 パネル A)。 $TR\beta$ ではコントロールと比較して、甲状腺ホルモン処理で 2.19 倍の発現誘導が見られた。この発現誘導は 0.05nM, 5nM, 500nM の 40H-CB106 共存下で、コントロールに対してそれぞれ 1.93, 1.51, 1.42 倍の値を示し、処理濃度依存的かつ有意に甲状腺ホルモンによる発現誘導の阻害を示した。同じサンプルを用いて BTEB の発現を検討したところ、コントロールと比較して、甲状腺ホルモン処理で、27.8 倍の発現誘導が見られた。この発現誘導は 0.05nM, 5nM, 500nM の 40H-CB106 共存下で、コントロールに対してそれぞれ 26.3, 19.8, 10.8 倍の値を示し、処理濃度依存的かつ有意に甲状腺ホルモンによる発現誘導の阻害を示した。 $TR\beta$ と比較して BTEB の方が甲状腺ホルモンによる発現誘導が大きく、抗甲状腺ホルモン様作用の検討に適しているため、40H-CB159 処理においては BTEB の発現のみ検討した (図 3 パネル B)。40H-CB159 処理に関して、コントロールと比較して、甲状腺ホルモン処理で 3.91 倍の発現誘導が見られた。この発現誘導は 0.05nM, 5nM, 500nM の 40H-CB106 共存下で、コントロールに対してそれぞれ 3.27, 3.89, 2.70 倍の値を示し、処理濃度依存的に甲状腺ホルモンによる発現誘導の阻害を示した。濃度依存性は顕著には見られなかったが、500nM の 40H-CB159 存在下で有意に抗甲状腺ホルモン作用が見られた。

さらに、この時期の幼生脳で甲状腺ホルモンに応答し、水酸化 PCB によってその応答が攪乱される遺伝子群をゲノムワイドに網羅的に探索した。マイクロアレイ解析はコントロール (DMSO) 群、1nM 甲状腺ホルモン処理群、1nM 甲状腺ホルモン+500nM 40H-CB106 混合処理、1nM 甲状腺ホルモン+500nM 40H-CB159 混合処理の 4 群に分けて行った。各処理群少なくとも 3 アレイを用いて ANOVA で有意に発

現変動し、かつ変動が1.5倍以上である遺伝子群を抽出した。コントロールと甲状腺ホルモン処理した群の比較では、2139 遺伝子が抽出された。同様に、甲状腺ホルモン処理群と、甲状腺ホルモン+4OH-CB106 混合処理群との比較では 672 遺伝子、甲状腺ホルモン処理群と、甲状腺ホルモン+4OH-CB159 混合処理群との比較では 314 遺伝子が抽出された(図3)。これら3種類の比較の重複領域から 526 遺伝子を抽出した(図3、 $89+109+247+81=526$ 遺伝子)。この遺伝子群は、「甲状腺ホルモンによって発現が変動し、かつ4OH-CB106, 4OH-CB159 少なくともいずれかによって甲状腺ホルモンによる発現応答が変化する」遺伝子群である。

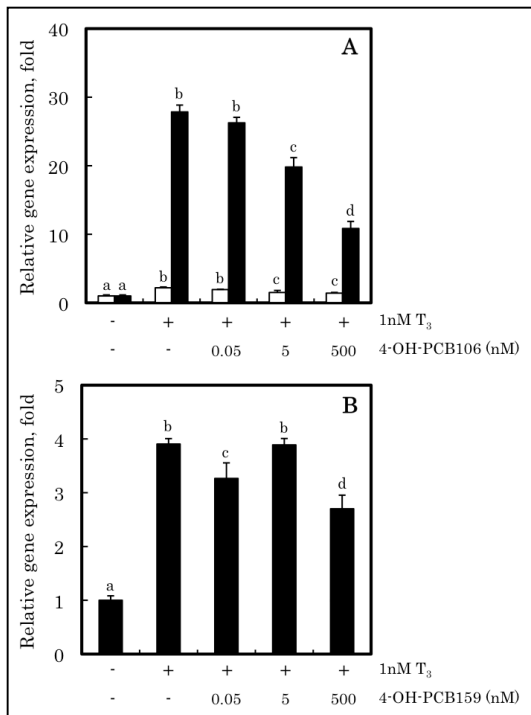


図2 水酸化PCBが甲状腺ホルモン応答遺伝子発現に及ぼす影響

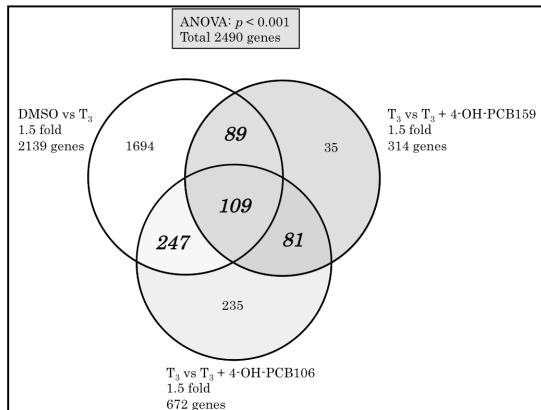


図3 ベン図を用いた目的遺伝子の抽出

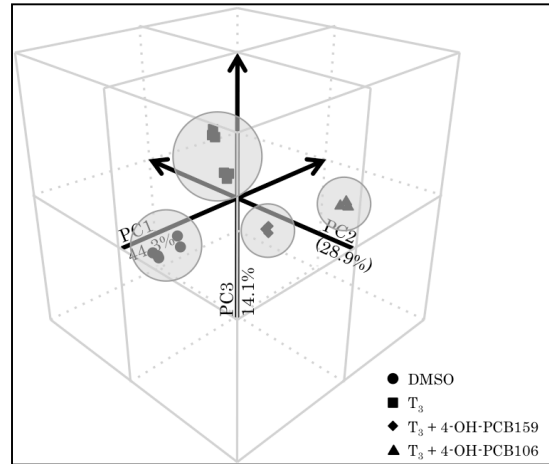


図4 主成分分析によるマイクロアレイ解析結果の視覚化

この526 遺伝子の妥当性を検証するため、かつマイクロアレイデータを俯瞰するために主成分分析を行った(図4)。主成分1~3を3次元にプロットした結果、それぞれの処理群は明確にクラスターを形成した。このことより、抽出した526 遺伝子は、各処理群を明確に規定する遺伝子群であることが明らかになった。次にこの遺伝子群がどのような機能を持つものであるかを検証するため、Gene ontology enrichment analysisを行った。Gene ontologyの「molecular function」「cellular component」「biological process」の3種のrootのうち、biological processにおいて526 遺伝子に関連づけられ、統計的に有意にenrichされているtermの中には、growth, cell proliferation, brain development, cell adhesion, neuron differentiation, apoptosisなどに関連する語が有意に含まれており、甲状腺ホルモンによって誘導される変態過程において、脳内で組織の再構築が起こり、そのプロセスが水酸化PCB類によって攪乱される可能性が示唆された。

今回我々は変態期のアフリカツメガエル幼生を用いて、甲状腺系攪乱作用が疑われている水酸化PCBの影響を検討し、このアッセイ系が非常に有用である事を示した。近年、ラットの培養細胞を用いた実験で、本実験で用いたものと同じ水酸化PCB106が、甲状腺ホルモンによって誘導される遺伝子発現を阻害する事が報告されている。水酸化PCBを加えた水中で飼育した幼生を用いて、in vivoでの影響を検討した(図1)ところ、甲状腺ホルモンによって誘導される変態が、水酸化PCB共存下では有意に抑制された。このことは、水酸化PCBが個体レベルで抗甲状腺ホルモン作用を示している事を意味している。両生類の変態は、ほ乳類等の胎児期の発達過程に相当するものであり、このアッセイ系を用いる事は、高等動物にある知見をフィードバ

ックするものとして有用である。
本研究では、個体レベルでの変態遅延の背景のメカニズムをマイクロアレイ解析によって検討した。発現変動を示した遺伝子は、非常に様々であり、その発現パターンもそれぞれの遺伝子によって様々である。
両生類の変態は、甲状腺系を攪乱する化学物質の個体レベルでの影響を検討する上で非常に有用なモデルである事は言うまでもないが、この現象をゲノムワイドな遺伝子発現解析とカップリングさせる事によって全体像を明らかにしようとする研究は数少ない。今回我々は、個体レベルでの水酸化PCBの影響を、遺伝子発現と関連づけて検討する事を目的としたが、このような研究背景の中で、特筆すべき点は、体系的に整備されて来ている機能的注釈付けのデータベースである Gene Ontology と発現変動を関連づけ、統計的に解析している事と考える。本研究では、甲状腺ホルモンで発現が変動する遺伝子のうち、2種類の水酸化PCB共存下でさらに発現変動を示した526遺伝子をピックアップしている。この遺伝子群をパラメータとしてサンプル群の主成分分析を行うと、それぞれの処理群が非常にきれいにクラスターを形成する事が明らかとなった。このことは、ピックアップされた526遺伝子は、それぞれの処理群を特徴づけるものとして適当である事を意味している。したがって、この遺伝子セットは水酸化PCBの影響を検討する際の遺伝子マーカーとして使用することができる可能性をはらんでいる。
サンプル群をよく特徴づける526遺伝子にGO termを割り付け、Fisherの正確確率検定で、有意に変動しているGO termを調べたところ、growth, cell proliferation, cell migration, brain development, neuron differentiation, apoptosisなどの機能が有意にピックアップされている事が分かった。さらに、発現変動を示した遺伝子群のリストとGOの機能とを比較してみると、collagenase, cadherin, larval keratin, matrix metalloproteinase (MMP)など、組織の再構築に関与すると思われる遺伝子群が多数含まれている事が分かった。ツメガエル幼生は甲状腺ホルモン処理によって成体型のカエルに変態するが、これは組織の再構築を含め非常にダイナミックな現象である。マイクロアレイの結果を機能と関連づける事で、「甲状腺ホルモン処理によって幼生型の細胞が壊され、成体型の細胞が接着してくる」ということ、かつ「それらの組織の再構築が水酸化PCBによって攪乱されている可能性がある」という全体像が見えてくる。従って、ゲノムワイドな網羅的発現解析は、機能の注釈付けを行う事で非常にパワフルなツールとして用いる事ができるものとして考

えられる。
また、発現変動を示す遺伝子が、転写調節レベルでどのような制御を受けているか詳細に検討するため、クロマチン免疫沈降法による解析を行った。その後、ホルモン処理によって発現変動を示す遺伝子の転写制御が、ヒストンのアセチル化レベルの変化、メチル化レベルの変化、RNAポリメラーゼIIのリン酸化状態の変化によるものであることを明らかにした。このことは、ホルモン処理に酔ってRNAポリメラーゼIIによるmRNA(前駆体)の伸長反応を制御していることを示唆している。今後、水酸化PCBによる遺伝子発現攪乱作用が、転写調節レベルでどのように行われているか検討して行く予定である。

5. 主な発表論文等

(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6件)

① Mochizuki K, Ishihara A, Goda T, Yamauchi K. (査読有)

RNA polymerase II phosphorylation at serine 2 and histone H3 tri-methylation at lysine 36 are key steps for thyroid hormone receptor β gene activation by thyroid hormone in *Rana catesbeiana* tadpole liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 417(3):1069-73.

② Ishihara A, Makita Y, Yamauchi K. (査読有)

Gene expression profiling to examine the thyroid hormone-disrupting activity of hydroxylated polychlorinated biphenyls in metamorphosing amphibian tadpole. *J Biochem Mol Toxicol.* 2011 25(5):303-11.

③ Matsumoto E, Ishihara A, Tamai S, Nemoto A, Iwase K, Hiwasa T, Shibata S, Takiguchi M. (査読有)

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.

④ Yamauchi K, Ishihara A. (査読有)

Evolutionary changes to transthyretin: developmentally regulated and tissue-specific gene expression. *FEBS J.* 2009 276(19):5357-66.

⑤ Ishihara A, Rahman FB, Leelawatwattana L, Prapunpoj P, Yamauchi K. (査読有)

In vitro thyroid hormone-disrupting activity in effluents and surface waters in Thailand. *Environ Toxicol Chem.* 2009 28(3):586-94.

⑥ Eguchi R, Ishihara A, Yamauchi K. (査

読有)

Interaction of diethylstilbestrol and ioxynil with transthyretin in chicken serum.

Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2008 147(3):345-50.

[学会発表] (計10件)

- ① Akinori Ishihara, Yu Makita, and Kiyoshi Yamauchi. : The Availability of Genome-wide Expression Analysis as a Powerful Tool to Detect the Effects of Environmental Chemicals on Thyroid System. Shizuoka University International Symposium 2011 - Initiatives for Crossing Boundaries within Science and Technology- (2011年11月28日~11月29日) Shizuoka, Japan.
- ② Sakura Akiyoshi, Gobun Sai, Akinori Ishihara, and Kiyoshi Yamauchi. : Modulation of the Effect of Phenolic Compounds by Their Interaction with Serum Protein. Shizuoka University International Symposium 2011 - Initiatives for Crossing Boundaries within Science and Technology- (2011年11月28日~11月29日) Shizuoka, Japan.
- ③ Yu Makita, Akinori Ishihara, and Kiyoshi Yamauchi. : The Effects of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls on the Expression of Thyroid Hormone Response Genes. Shizuoka University International Symposium 2011 - Initiatives for Crossing Boundaries within Science and Technology- (2011年11月28日~11月29日) Shizuoka, Japan.
- ④ Akinori Ishihara, Yu Makita, and Kiyoshi Yamauchi. : A genome-wide expression analysis revealed the effects of hydroxylated polychlorinated biphenyls on the thyroid hormone function in metamorphosing African clawed toad *Xenopus laevis*. ICCPB2011 (2011年5月31日~6月5日) Nagoya, Japan.
- ⑤ Kiyoshi Yamauchi, Gobun Sai, Sakura Akiyoshi, and Akinori Ishihara. : Modulation of the extracellular distribution, cellular uptake, and cellular action of phenolic compounds with thyroid hormone disrupting activity by serum proteins. ICCPB2011 (2011年5月31日~6月5日) Nagoya, Japan.

- ⑥ 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年11月18日~11月20日) 静岡
- ⑦ 山内清志, 秋吉さくら, 蒔田優, 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年11月18日~11月20日) 静岡
- ⑧ 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年9月23日~9月25日) 東京
- ⑨ 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年9月23日~9月25日) 東京
- ⑩ 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年9月5日~9月7日) 福岡

[図書] (計1件)

- ① Yamauchi, K., Ishihara, A. TTR and Endocrine Disruptors. In: Recent Advances in Transthyretin Evolution, Structure and Biological Functions. Springer, pp.159-171 (2009).

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原顕紀 (ISHIHARA AKINORI)

研究者番号: 70432193

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし