

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658237

研究課題名(和文) 環境適応プログラム形成の分子メカニズム 生殖系列内エピゲノム修飾変異の探索

研究課題名(英文) Molecular mechanism of programming of the adaptation to environment: search for the epigenomic modification alteration in the germ line

研究代表者

大迫 誠一郎(Ohsako, Seiichiroh)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00274837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ダイオキシン(TCDD)曝露させ雄産仔を正常な雌に交配させ生まれた雄のエピゲノムを比較したが、どの組織でもCyp1a1プロモーター領域(転写開始点-500) CpGのメチル化頻度は対照群とほぼ同じであった。このことから後世代影響を示唆するデータは得られないと判断された。次にHep1c1c7細胞で低メチル化を検討したが、Cyp1a1 CpGは全くメチル化されていなかった。そこで、C57BL/6J F1の肝臓低メチル化に焦点を当てた。TCDDによる低メチル化は出生3日で生じ始め、ChIPアッセイによりDNAメチル化転移酵素3種のうちDnmt1とDnmt3bの結合がTCDDで低下することがわかった。

研究成果の概要(英文)：As a preliminary experiment, epigenomes of the male offspring born from the non-exposed females mated to F1 males exposed to dioxin (TCDD) during fetal stage. The methylation frequency of CpG of Cyp1a1 promoter region located on -500 of transcription start site of exposed animals was similar with that of the control in an epididymis sperm, liver, and kidney. Thus, it was suggested that trans-generational effects were not obtained. Next, hypomethylation was examined in the hepatoma Hep1c1c7 cells, but any methylation were not observed in CpGs of Cyp1a1 promoter region. Therefore we decided to focus on the hypomethylation of the liver in the C57BL/6J F1 mice exposed TCDD on E12.5. Hypomethylation of CpG was found to begin to occur from birth day 3 in the liver. Using these neonatal liver samples, ChIP assay with three types of DNA methyl-transferases were carried out. The binding of Dnmt1 and Dnmt3b to Cyp1a1 promoter region was found to significantly decrease by TCDD exposure.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：エピジェネティクス 化学物質 後世代影響 メチル化

1. 研究開始当初の背景

中立説が強調したことの一つに、「遺伝子と表現型は必ずしも一致せず、表現型は環境によって影響され、全く同じ遺伝子でも表現型は異なる」というものがある。個体発生あるいは成熟後においても環境の作用で表現型に差が生じることは、獣医畜産領域の研究者にとっては周知の事柄だが、どのようにしてその差が生じるか分子機構は定かでない。

エピジェネティクスはその問題を解く鍵だが、表現型-エピゲノム変化をセットで検証出来る実験モデルはまだ少なく、報告の多くは再現性に欠けると言われている。米国のスキナーらのグループは、変異原性のない抗菌剤のピンクロゾリンを妊娠 SD ラットに投与し、生まれた雄の子孫の継世代影響を長期にわたり観察、精子数減少や生殖細胞アポトーシスレベルが F2, F3, F4 でも上昇し、さらに精子 DNA メチル化パターンの変化が F1 世代における変化と同じように継承されると報告した (Anway et al., Science, 308, 1466-1469, 2005)。さらに雌からの交配指向性低下も後世代まで認められたという (Crews et al., PNAS, 104, 5942-5946, 2007)。かりにこの現象が真実であるなら、環境因子が進化の道筋を変える可能性を示唆しているが、彼らの報告には否定的見解が多く、このようなエピジェネティック変化の生殖細胞系譜における伝達が起こりうるのかの明確な証明は現在なされていない。

2. 研究の目的

本研究では申請者が保持している環境因子によりエピゲノム変動を起こすモデルとして、環境汚染化学物質曝露ならびに低栄養環境飼育下で CpG メチル化変動を起こすマウス実験系と、独自開発の高感度ゲノムメチル化網羅的解析法を駆使して、生殖系列を介した後世代へのエピゲノムインヘリタンスの実証を試みる。

3. 研究の方法

サブテーマ) 後世代インヘリタンスの検出の試み (生殖系列エピゲノム解析)

目的: 再現性のある継世代影響モデル確立のため、標的と考えられる生殖細胞のエピゲノム変化のプロファイルを明確にする。

第2世代以降の生殖細胞にエピゲノム変化 (CpG メチル化パターンの変化) が残る可能

性を Anway らは報告しているが再現性がないとの指摘が多い (Anway et al., Science, 2004)。ここでは、DNA メチル化に焦点を当て、我々の維持する近交系マウスモデルと新規網羅的解析手法を駆使して、再現性のあるエピゲノムインヘリタンスを示す遺伝子を探索する。

方法: 使用するマウスは生殖細胞のみを高純度に分離できるよう、生殖細胞特異的に発現する遺伝子プロモーターで GFP を発現させる Oct4-GFP マウス (始原生殖細胞、精祖細胞、卵祖細胞) または Acro-GFP マウス (半数体精子細胞、精子) を移入する (Yoshimizu et al., Dev Growth Differ 41, 675-684, 1999; Nakanishi et al., FEBS Lett 449, 277-283, 1999)。各々のコロニーにおいて、妊娠中にダイオキシン (TCDD, 3 µg/kg 母体重) を単回投与する。(TCDD に変異原性はない。) または低亜鉛食 (クレア、T-08472, Zn=500ppm) を妊娠 10 日から分娩まで与える。非処理の対照群も準備する。生まれた F1 雄または F1 雌から精巢あるいは卵巣を摘出し、核相と GFP をマーカーに各ステージの雌雄生殖細胞を分取型セルソーターで分離し DNA を精製する。この F1 (雄または雌) と正常非処理対照群個体 (雄または雌) を交配し、F2 で同様の生殖細胞分離を行う。これを F3, F4 と後世代まで続ける。対照群 (F0 交配時非処理群) の DNA とメチル化ステータスで変化があるか各世代で解析する。この際、はじめに標的遺伝子として、薬物代謝酵素 (CYP1A1) ならびに MT2 遺伝子プロモーターをバイサルファイト法で検索する。さらに独自に開発した網羅的解析法でも検討する。

サブテーマ) 環境適応プログラム形成の方向性に関する分子機構解明

目的: 生殖細胞内で生じたエピゲノムの変化が生じる過程に関与する因子の解析を行う。

DNA メチル化維持の機構として、DNA メチル転移酵素の Dnmt1 があるが、この酵素は HDAC1 と HP1 とコンプレックスを形成し CYP1A1 上流でも遺伝子非活性化状態で恒常的に結合しており、AhR-リガンド複合体の結合によりそれが解離することが近年報告された (Schnekenburger et al., Biochim Biophys Acta, 1769, 569-578, 2007)。個体が成長過程の細胞では、細胞分裂の際、受容体に結合した領域において複製工場 (Replication factory) に存在する Dnmt1 機能が部位特異的にブロックされるため、娘細胞における維持メチル

化が阻害される可能性が考えられる。また、de novo Dnmts である Dnmt3a, Dnmt3b も同様の機能阻害を受ける可能性もある。また、近年ヒストンメチル転移酵素である SET7 が Dnmt1 のメチル化を促進することによりプロテアゾーム分解を促進、またその逆にヒストン脱メチル化酵素である LSD1 が Dnmt1 を安定化することが発見され、これまで未知だった細胞のメチル化制御機構の一端が明らかとなりつつある (Esteve et al., PNAS, 106, 5076-5081, 2009)。SET7 のようなヒストン修飾酵素の機能亢進も転写因子との共役により部位特異的に生じている可能性がある。申請者は CYP1A1 プロモーター上に特定のメチル化 CpG を持つルシフェラーセレポーター遺伝子導入系で、標的のメチル化を起こさせたマウスヘパトーマ (Hep1c1c7) 細胞株作成に成功しており、この細胞および胎児期あるいは新生児ヘパトサイトのプライマリーカルチャー系で、TCDD 曝露による標的 CpG の低メチル化モデル系を確立する。この両実験系を用いることで、siRNA によるノックダウン、免疫共沈降実験、ChIP アッセイで上記のようなメチル転移酵素 (Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b) の低メチル化への関与を明らかにし、また、その機能阻害機構として SET7 や LSD1 などの関与も明らかにする。

4 . 研究成果

サブテーマ) 後世代インヘリタンスの検出の試み (生殖系列エピゲノム解析)

予備試験として野生型マウスを用いて胎生期にダイオキシン (TCDD, 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 母体重) を曝露させ、生まれた仔が成熟したのち、正常な雌に交配させて生まれた雄個体のエピゲノムを比較した。精巣上体精子、肝臓、腎臓の比較を行ったが、解析した Cyp1a1 プロモーター上流約 500 に位置する CpG のメチル化頻度は対照群とほぼ同じであった。このことから後世代影響を示唆するデータは得られないと判断された。なお、細胞分取技術での生殖細胞を回収する計画は、当研究室の組換え動物室施設の問題で遺伝子改変動物導入に大幅な遅れが生じたこと、本研究課題の交付予算額では困難であると判断したため、二年目の計画以降削除した。

サブテーマ) 環境適応プログラム形成の方向性に関する分子機構解明

生殖細胞内で生じたエピゲノムの変化が生じる過程に関与する因子の機能解析を、ま

ずヘパトーマ細胞等で行い、分離した生殖細胞を用いて関与する因子の機能解析を試みた。

まず、ヘパトーマ細胞で低メチル化が起きるか検討したが、使用した Hep1c1c7 (マウスの肝臓癌細胞) では対象領域の CpG はほとんどメチル化されておらず、個体で観察されるメチル化頻度が観察されなかったため、モデルとして使用するのに適当でないことが判明した。そこで、C57BL/6J マウス F1 における肝臓の低メチル化に焦点を当てることにした。

まず、胎生期 TCDD 曝露によって観察される Cyp1a1 プロモーター領域の低メチル化に関して用量依存性を検討するため、胎生期に一連の用量の TCDD を単回投与して生後 35 日齢になった時点で肝臓の Cyp1a1 プロモーター領域の転写開始点上流-500bp に位置する CpG (-500 CpG) のメチル化頻度を MSRE-PCR で測定した。30 ng/kg TCDD 曝露群において対照群と比較して有意に高くなったが、300 ng/kg TCDD の曝露量から有意に低下し始め、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ならびに 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量ではともに対照群の約 1/4 に減少し、これまでの 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与実験による観察結果と一致していた。これらすべてのデータを用い、TCDD 曝露による DNA 低メチル化の ED50 を求めたところ 382 ng/kg だった (図 1)。

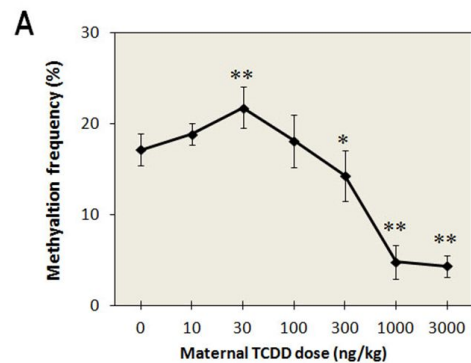


図 1 . 胎生期 TCDD 曝露による Cyp1a1 プロモーター領域の低メチル化の用量依存性 (n=7, mean \pm SEM , *p<0.05, **p<0.01)

次に、出生直後の肝臓において TCDD を曝露した場合の低メチル化を観察したところ出生 3 日目から差が生じ始めることがわかった。このサンプルを用い DNA メチル化転移酵素 3 種について結合レベルを ChIP アッセイで調べたところ、Dnmt1 とならびに Dnmt3b の結合が TCDD により有意に低下すること

がわかった (図 2)。

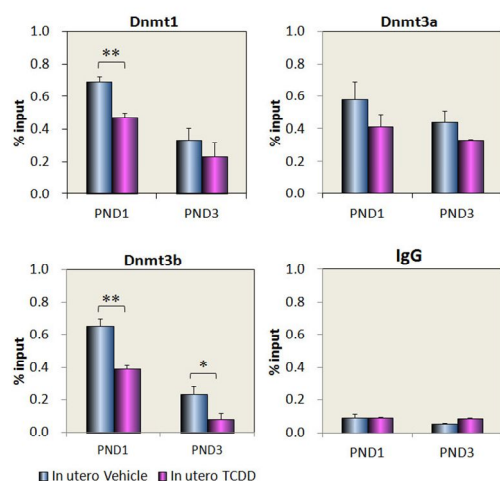


図2. 胎生期 TCDD 曝露による Dnmts の Cyp1a1 プロモーター領域への結合度変化 (n=6, mean±SEM, *p<0.05, **p<0.01)

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 10 件)

1. Shiizaki K, Ohsako S, Kawanishi M, and Yagi T. Identification of amino acid residues in the ligand-binding domain of the aryl hydrocarbon receptor causing the species-specific response to omeprazole: possible determinants for binding putative endogenous ligands. *Mol Pharmacol* 85, 279-289, (2013). mol.113.088856; published ahead of print November 21, 2013, doi:10.1124/mol.113.088856,,, doi: 10.1124/mol.113.088856. Epub 2013 Nov 21 (査読有り)
2. Alam MS, Ohsako S, Kanai Y, and Kurohmaru M. Single administration of butylparaben induces spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rats. *Acta Histochemical*, (in press) (2013).Nov 13. pii: S0065-1281(13)00194-3. doi: 10.1016/j.acthis.2013.10.006. [Epub ahead of print] (査読有り)
3. Aburatani S, Fujibuchi W, Yamane J, Nagano R, Sone H, Imanishi S, Ohsako S. Inference of Gene Regulatory Networks to Detect Toxicity-Specific Effects in Human Embryonic Stem Cells. *Intl J Adv Life Sci*, v5 n 1&2 (2013). (査読有り)
4. Sugai E, Yoshioka W, Kakeyama M, Ohsako S, and Tohyama C. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin modulates dysregulation of the lipid metabolism in mouse offspring fed a high-calorie diet. *J Applied Toxicol*, in press, (2013). (査読有り)
5. Kurita H, Ohsako S, Yoshinaga J, Hashimoto S, and Tohyama C. Prenatal zinc deficiency-dependent epigenetic alterations of mouse metallothionein-2 gene. *J Nutr Biochem* 24, 256-266, (2013). (査読有り) doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.05.013
6. Qin XY, Akanuma H, Wei F, Nagano R, Zeng Q, Imanishi S, Ohsako S, Yoshinaga J, Yonemoto J, Tanokura M, and Sone H. Effect of low-dose thalidomide on dopaminergic neuronal differentiation of human neural progenitor cells: A combined study of metabolomics and morphological analysis. *Neurotoxicology* 33, 1375-1380, (2012). doi: 10.1016/j.neuro.2012.08.016 (査読有り)
7. Akanuma H, Qin XY, Nagano R, Win-Shwe TT, Imanishi S, Zaha H, Yoshinaga J, Fukuda T, Ohsako S, and Sone H. Identification of stage-specific gene expression signatures in response to retinoic acid during the neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Front Genet.* 3:141. (2012). doi: 10.3389/fgene.2012.00141 (査読有り)
8. He X, Imanishi S, Sone H, Nagano R, Qin X-Y, Yoshinaga J, Akanuma H, Yamane J, Fujibuchi W, and Ohsako S. Effects of methylmercury exposure on neuronal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Toxicol Lett* 212, 1-10, (2012). (査読有り) doi:10.1016/j.toxlet.2012.04.011
9. Yoshioka W, Aida-Yasuoka K, Fujisawa N, Kawaguchi T, Ohsako S, Hara S, Uematsu S, Akira S, and Tohyama C. Critical role of

mPGES-1 in the pathogenesis of hydronephrosis caused by lactational exposure of mice to dioxin. *Toxicol Sci* 127, 547-554, (2012). doi: 10.1093/toxsci/kfs115 (査読有り)

10. Nagano R, Akanuma H, Qin X-Y, Imanishi S, Toyoshiba H, Yoshinaga J, Ohsako S, and Sone H. Multi-parametric profiling network based on gene expression and phenotype data: A novel approach to developmental neurotoxicity testing. *Int J Mol Sci* 13, 187-207, (2012). doi: 10.3390/ijms13010187 (査読有り)

[学会発表](計 6 件)

1. Junko Yamane, Sachiyo Aburatani, Satoshi Imanishi, Reiko Nagano, Hideko Sone, Seiichiroh Ohsako, and Wataru Fujibuchi, Prediction of Developmental Neurotoxic Effects using Human Pluripotent Stem Cells. The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences iPS Cells in Drug Discovery& Development, International Symposium 2014. p16-18. 2014年1月17日、京都、京都大学 iPS 研究所
2. Seiichiroh Ohsako. Generation of the human ES cell line driven by dioxin responsive reporter gene. The 11st Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. 2013年6月12日、Boston, USA.
3. Seiichiroh Ohsako, Junko Yamane, Chiharu Tohyama Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo -p-dioxin in the neuronal differentiation system using human embryonic stem cells. Dioxin2012, 2012年8月31日、Carinz, Australia.
4. Seiichiroh Ohsako, Junko Yamane, Satoshi Imanishi, Chiharu Tohyama Effects of Ahr agonist on neuronal cell differentiation from human ES cells. The 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, 2012年6月16日、Yokohama, Japan
5. 大迫誠一郎, 山根順子, 今西哲, 遠山千春. ヒト ES 細胞を用いた神経系誘導培養系における Ahr アゴニストの影響. 第

11 回日本再生医療学会総会、2012年6月12日、横浜、パシフィコ横浜

6. 大迫誠一郎. 環境汚染化学物質の周産期曝露による表現型変化 エピジェネティクスと環境毒性学 . 日本獣医学会、2012年3月28日、さいたま、大宮ソニックシティ

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大迫 誠一郎 (Seiichiroh Ohsako)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00274837