

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340046

研究課題名(和文) エピジェネティックメモリーを標的とした内分泌攪乱化学物質の作用機序に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of action mechanism of endocrine-disruptors targeting epigenetic memory

## 研究代表者

山内 清志 (YAMAUCHI, Kiyoshi)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

研究者番号：50201827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺ホルモン(TH)は、動物の成長・発生・分化・代謝に重要な役割を担っている。本研究では、環境化学物質によるTH攪乱作用の分子機構を明らかにする目的で、TH応答遺伝子上のヒストンとRNAポリメラーゼIIの修飾、及び同遺伝子制御部位のDNAメチル化状態を調べた。THは、標的遺伝子の転写を増大させるとともに、転写活性化マークであるヒストンとRNAポリメラーゼIIの修飾を誘導した。これらのマークの幾つかは両化学物質で抑制された。一方、標的遺伝子の制御部位は、高度にメチル化されており、TH処理により影響を受けなかった。

研究成果の概要(英文)：Thyroid hormones (THs) play important roles in growth, development, differentiation, and metabolism in vertebrates. To elucidate molecular mechanisms by which environmental chemicals exert TH-disrupting activity, we investigated their effects on the histone and RNA polymerase II (RNAPII) modifications and DNA methylation status in two direct TH-response genes in amphibian TH-responsive cultured cells. For both genes, TH enhanced the amounts of gene transcripts and increased the amounts of epigenetic marks of transcription activation. Treatment with the chemicals reduced the amounts of the gene transcript and suppressed some of the T3-induced epigenetic marks. However, the 5' regulatory region remained to be hypermethylated even with exposure to TH. Our results demonstrate that the chemicals affect TH-induced histone and RNAPII modifications in direct TH-response genes, in somewhat target gene-dependent and chemical-specific manners.

研究分野：環境内分泌学

キーワード：甲状腺ホルモン ホルモン応答遺伝子 攪乱化学物質 エピジェネティック作用 ヒストン修飾 RNAポリメラーゼII

1. 研究開始当初の背景

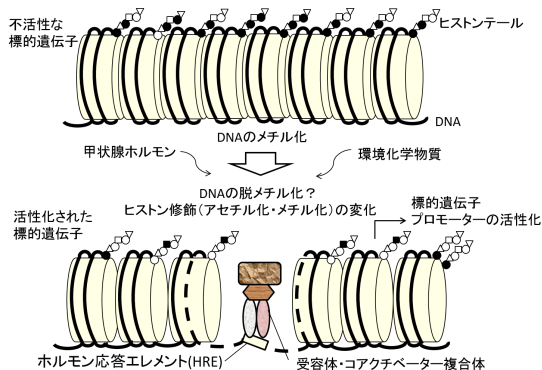
(1) 甲状腺ホルモン (TH) は、動物の成長・発生・分化・代謝に重要な役割を担っている。両生類の変態は、TH で制御されることから、TH 作用を攪乱する化学物質を評価するよいモデル系になっている。また、TH は、標的遺伝子の転写活性を増加させる際、ヒストンのアセチル化などのエピジェネティックメモリーを変化させることが知られている[1]。研究代表者等は、主に両生類を用いて、甲状腺系を攪乱する化学物質の研究を、特に受容体を介したホルモンシグナルの攪乱を中心に行ってきた。

(2) ヒ素やビスフェノール A などの甲状腺系を攪乱する化学物質は、DNA の遺伝情報ではなくエピジェネティックメモリーに作用し、ホルモン標的遺伝子の発現を変化させてしまうことが知られている。哺乳類ではこのような作用が、世代を超えて継承されることが指摘されており[2]、化学物質のエピジェネティックメモリーに及ぼす分子機構の解明が望まれている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、甲状腺系を攪乱する環境化学物質の TH 攪乱作用の分子機構を明らかにする目的で、受容体以降のシグナル伝達の攪乱に焦点を絞り、ホルモン応答遺伝子上のエピジェネティックメモリーがどのように変化するかを検討した。

(2) TH の作用の多くは、核内受容体を介して行われ、標的遺伝子の転写誘導または抑制を行う。この TH 作用に影響を与える化学物質の中には、受容体への TH 結合を阻害する物質(テトラプロモビスフェノール A, TBBPA) や、まったく影響しない物質(イオキシニル, IOX) があり、その作用機構に差異があることが予想される。そこで、本研究ではこの 2 物質を用いて、ヒストンと RNA ポリメラーゼ II の修飾、及び同遺伝子制御部位の DNA メチル化状態に与える影響を検討した(図 1)。



3. 研究の方法

(1) ホルモン応答性の培養細胞を用いて、環境

化学物質の TH 攪乱作用を、レポーターアッセイによって検出した。培養細胞は、研究代表者等が樹立した XL58-TRE-Luc 細胞を用いた [3]。細胞を未処理(コントロール)、TH 処理、TH+IOX 処理、TH+TBBPA 処理の 4 群に分けた。化学物質の攪乱作用は、ルシフェラーゼアッセイ法と TH 一次応答遺伝子である TH 受容体β(thrb)や転写因子(thibz)の発現レベルをリアルタイム PCR 法で評価した。

(2) 各種処理をした細胞からクロマチンまたはゲノム DNA を回収した。ヒストン及び RNA ポリメラーゼ II の修飾は、修飾特異抗体を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)法を用いて、DNA のメチル化レベルは、ダイサルファイトシークエンス法を用いて調べた。

(3) 培養細胞で行ったホルモン及び化学物質処理と同様の処理をツメガエル(*Xenopus laevis*)で行い、同様の操作によって、クロマチンまたはゲノム DNA を回収した。また、ヒストン及び RNA ポリメラーゼ II の修飾と、DNA のメチル化レベルの検討を行った。

4. 研究成果

(1) ホルモン応答遺伝子の発現を攪乱する化学物質の探索: 培養細胞 XL58-TRE-Luc を用いて、Luc アッセイ及び標的遺伝子のリアルタイム RT-PCR 法で行い、甲状腺系を攪乱する化学物質として、臭素化難燃剤 TBBPA とハロゲン系除草剤 IOX を選別した。また、解析対象遺伝子として、thrb と thibz を選別した。これらの遺伝子は、プロモーター上にある複数個の TH 応答エレメント (TRE) を介して、ホルモンにより直接制御されることが知られている。TH 処理で両遺伝子発現レベルは 3-7 倍増加するが、その増加は TBBPA または IOX を添加すると、有意に抑制された(図 2)。

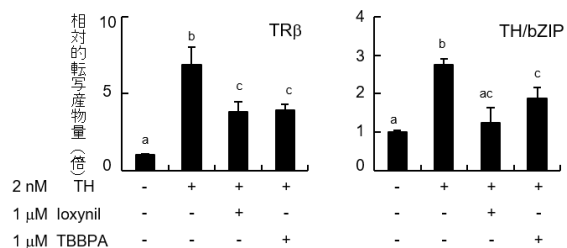


図2. 環境化学物質のTH標的遺伝子発現に及ぼす影響

(2) 培養細胞を用いたエピジェネティックメモリーに影響を及ぼす化学物質の作用機構の解析

転写の初期には、RNA ポリメラーゼ のプロモーター領域へのリクルート、およびそれに伴ってヒストンのアセチル化が起こる。ChIP アッセイの結果、thrb と thibz 遺伝子の 5' 領域で TH による RNA ポリメラーゼ のリクルートの増加とヒストン H4 のアセチル

化の増加が認められた。しかし、化学物質共存下でもその増加は抑制されなかった。用いた化学物質は、転写の初期段階には作用していないと思われる。

転写伸長の初期には、活性化される遺伝子の5'領域で、RNAポリメラーゼの5番目のセリンのリン酸化と、それに伴ってヒストンH3の4番目のリシンのトリメチル化が促進される。THは、これらのエピジェネティックマークを *thrb* と *thibz* 遺伝子の5'領域で増加させた。*thrb* 遺伝子では、両化学物質はこのエピジェネティックマークの増加を部分的に抑制した。しかし、*thibz* 遺伝子では、化学物質の影響は認められなかった。標的遺伝子によって、化学物質の影響に差があると考えられる。

転写伸長の後期には、活性化される遺伝子のコード領域で、RNAポリメラーゼの2番目のセリンのリン酸化と、それに伴ってヒストンH3の36番目のリシンのトリメチル化が促進される。THは、これらのエピジェネティックマークを *thrb* と *thibz* 遺伝子のコード領域で増加させた。しかし、化学物質の影響には遺伝子ごとに差異が認められた。*thrb* 遺伝子のコード領域では、両化学物質はこれらのエピジェネティックマークの増加を抑制した。しかし、*thibz* 遺伝子のコード領域では、TBBPAは、THによるヒストンH3の36番目のリシンのトリメチル化の増加にのみ抑制的に働いたが、RNAポリメラーゼの2番目のセリンのリン酸化の増加に対しては、効果を示さなかった。また、IOXは、両エピジェネティックマークには影響しなかった。

表1. <i>thrb</i> 遺伝子上のエピジェネティックマークへの化学物質の作用				
	転写開始	転写伸長初期	転写伸長後期	転写レベル
RNAPII	プロモーターへのリクルート ↑	5番目セリンのリン酸化 ↑ ↓ ↓ ↓	2番目セリンのリン酸化 ↑ ↓ ↓ ↓	↑ ↓ ↓ ↓
ヒストン	H4のアセチル化 ↑	H3の4番目リシンのトリメチル化 ↑ ↓ ↓ ↓	H3の36番目リシンのトリメチル化 ↑ ↓ ↓ ↓	
	↑ TH作用; ↓ IOXの作用; ↓ TBBPAの作用			
表2. <i>thibz</i> 遺伝子上のエピジェネティックマークへの化学物質の作用				
	転写開始	転写伸長初期	転写伸長後期	転写レベル
RNAPII	プロモーターへのリクルート ↑	5番目セリンのリン酸化 ↑	2番目セリンのリン酸化 ↑	↑ ↓ ↓ ↓
ヒストン	H4のアセチル化 ↑	H3の4番目リシンのトリメチル化 ↑	H3の36番目リシンのトリメチル化 ↑ ↓	
	↑ TH作用; ↓ IOXの作用; ↓ TBBPAの作用			

ここまでの結果をまとめて、表1、表2に示す。TH標的遺伝子である *thrb* と *thibz* は、どちらも複数個のTREを有しており、ホルモンは、TRE上の受容体を介して、遺伝子発現制御を行っている。しかし、化学物質の影響は、*thrb* 遺伝子の方が、より多くのステップに作用していることが伺える。また、テストした2つの化学物質の作用においても、差が

認められた。本研究では、*thibz* 遺伝子において、IOXがどのように作用して、転写レベルを抑制するのか、明確にできなかった。

(3) ホルモン処理によるDNAメチル化状態への影響を、*thrb* 遺伝子のプロモーター領域でバイサルファイトシークエンス法により解析を行った結果を図3に示す。*thrb* のプロモーター領域と5'非翻訳領域には、合わせて4つのTREと52個のCpG部位が存在する。本研究では、3つのTRE周辺の18個のCpGのメチル化状態を精査した。

TH応答性の培養細胞LC58-TRE-Luc細胞では、TH処理と未処理間でメチル化状態に差はなく、調べたCpG部位はすべてメチル化されていた。同様の実験をツメガエルのオタマジャクシ尾部を用いて行ったところ、わずかに脱メチル化部位が認められたが、ホルモン処理と未処理間に差はなかった。尾部組織の *thrb* 遺伝子の発現レベルは、THによって、10倍程度増加するため、この組織での *thrb* 遺伝子の発現誘導には、制御領域の脱DNAメチル化は関与しないものと思われる。

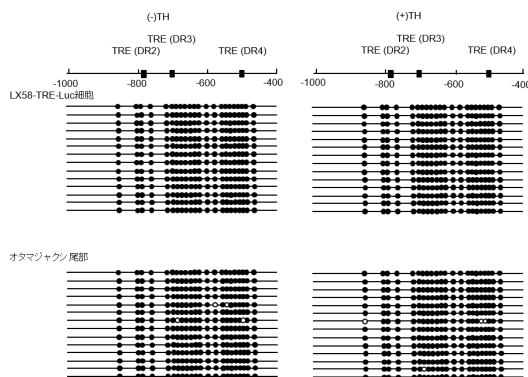


図3. ツメガエル *thrb* 遺伝子調節領域のDNAメチル化状態

(4) ツメガエルオタマジャクシを用いたエピジェネティックメモリーに影響を及ぼす化学物質の作用機構の解析：両生類オタマジャクシを未処理（コントロール）、TH処理、TH + IOX処理、TH + TBBPA処理を行い、*thrb* 遺伝子の発現レベルを検討した。TH存在下では発現誘導が認められ、IOX共存下ではさらに発現促進が、TBBPA共存下では、発現抑制が認められた。これらの結果のうち、IOXによる発現誘導は、培養細胞で行った結果と異なっており、細胞（組織）特異的にIOXの攪乱作用が異なる可能性を示唆した。

<引用文献>

Grimaldi, A., Buisine, N., Miller, T., Shi, Y. B., Sachs, L. M. Mechanisms of thyroid hormone receptor action during development: lessons from amphibian studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1830(7), 2013, 3882-3892.

Skinner M. K., Manikkam, M., Guerrero-

Bosagna, C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol. Metab.* 21(4), 2010, 214-222.

Sugiyama, S., Miyoshi, H., Yamauchi, K. Characteristics of a thyroid hormone responsive reporter gene transduced into a *Xenopus laevis* cell line using lentivirus vector. *Gen. Comp. Endocrinol.* 144(3), 2005, 270-279.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Tamaoki, K., Okada, R., Ishihara, A., Shiojiri, N., Mochizuki, K., Goda, T., and Yamauchi, K. Morphological, biochemical, transcriptional and epigenetic responses to fasting and refeeding in intestine of *Xenopus laevis*. *Cell Biosci.* 査読有 6(2). 2016, 1-15. DOI: 10.1186/s13578-016-0067-9

Kasai, K., Nishiyama, N., Izumi, Y., Otsuka, S., Ishihara, A., and Yamauchi, K. Exposure to 3,3',5-triiodothyronine affects histone and RNA polymerase II modifications, but not DNA methylation status, in the regulatory region of the *Xenopus laevis* thyroid hormone receptor  $\beta$ A gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 467(1) 2015, 33-38. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.09.132.

Otsuka, S., Ishihara, A., and Yamauchi, K. Ioxynil and tetrabromobisphenol A suppress thyroid hormone-induced activation of transcriptional elongation mediated by histone modifications and RNA polymerase II phosphorylation. *Toxicol. Sci.* 査読有 138(2), 2014, 290-299. DOI:10.1093/toxsci/kfu012.

〔学会発表〕(計 16 件)

Nishiyama, N., Kasai, K., Izumi, Y., Otsuka, S., Ishihara, A., Yamauchi, K. Effects of thyroid hormone on the epigenetic changes in the regulatory region of the *Xenopus laevis* thyroid hormone receptor gene. *CompBiol* 2015(第 40 回日本比較内分泌学会大会) 2015. 12. 11-13. JMS アステールプラザ、広島

Ishihara, A. and Yamauchi, K. Effects of environmental chemicals on thyroid hormone-dependent modifications of histone and RNA polymerase II. The 8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology, 2014.11.7-9. National Institute of Natural Sciences, Okazaki

泉勇志, 石原顕紀, 山内清志 環境化学物質がアフリカツメガエル甲状腺系に及ぼ

すエピジェネティック作用の検証 日本動物学会 第 85 回大会、2014.9.11-13. 東北大学、仙台

大塚駿介、石原顕紀、山内清志、甲状腺ホルモン依存的なヒストン修飾及び RNA ポリメラーゼ II 活性に及ぼす環境化学物質の影響 第 16 回環境ホルモン学会、2013.12.12-13. 東京大学山上会館、東京

大塚駿介、石原顕紀、山内清志、環境化学物質が甲状腺系に及ぼすエピジェネティックな影響の解析、日本動物学会第 84 回大会、2013.9.26. 岡山大学、岡山

〔図書〕(計 1 件)

Yamauchi, K. (2015) (Takei, Y., Ando, H. and Tsutsui, K. eds.), pp. 493-503. & pp. 591-597. The Japan Society for Comparative Endocrinology, Academic Press, Oxford, UK. Total 674 pages.

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山内 清志 (YAMAUCHI, Kiyoshi)  
静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授  
研究者番号：50201827

### (2) 研究分担者

石原 顕紀 (ISHIHARA, Akinori)  
静岡大学・理学部・講師  
研究者番号：70432193

西山 学即 (NISHIYAMA, Norihito)  
福島県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10315666

### (3) 連携研究者

望月 和樹 (MOCHIZUKI, Kazuki)  
山梨大学・生命環境学部・准教授  
研究者番号：80423838

### (4) 研究協力者

大塚 駿介 (OTSUKA, Shunsuke)  
泉 勇志 (IZUMI, Yushi)  
笠井 謙太郎 (KASAI, Kentaro)  
玉置 啓二 (TAMAOKI, Keiji)