

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25550039

研究課題名(和文) 化学物質曝露によるエピゲノム攪乱は脳で選択的スプライシング異常をもたらすか？

研究課題名(英文) Dose the fetal exposure to environmental chemicals have a impact on the alternative splicing profiles in post weaning brain via its epigenetic changes ?

研究代表者

矢追 毅 (YA01, Takeshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40311914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：日常使用される多くの化学物質に関して、胎児・幼児の脳神経系の発生・発達に及ぼす有害影響の知見は十分ではない。我々は、プラスチック製品等の原材料の一つビスフェノール A (BPA)の胎生期曝露によるマウス脳神経系異常を世界に先駆けて報告した。ところで塩基配列に拠らない遺伝情報(エピゲノム情報)は多くの遺伝子群の発現量を制御する。胎生期 BPA 曝露は、胎仔脳のエピゲノム情報と発現量の制御を攪乱した。本研究では、離乳期以降では発現量の変動が終息する一方、1つの遺伝子から複数種類の似た蛋白質を産生する仕組み(選択的スプライシング)が乱されていることを見だし、エピゲノム情報攪乱の関与が推察された。

研究成果の概要(英文)：Bisphenol A (BPA) is used mainly in the production of polycarbonate plastics and epoxy resins. BPA was detected in the serum of pregnant women as well as fetuses. The prenatal exposure to BPA at low doses has been demonstrated to affect brain development in mice. During vertebrate development it has been postulated that dynamic changes in epigenome are able to regulate tissue- and cell type-specific gene expression. We reported the genome-wide effect of maternal exposure to BPA on the epigenome and transcriptome in fetal mouse forebrain. The perturbed epigenetic states seemed to underlie the changed gene expression levels. The present study reveals that such levels was mostly restored in the post weaning mouse cerebral cortex maternally exposed to BPA. The exposure changed the selection efficiency of alternatively spliced exons encoding protein isoform. We also detected the changes of epigenetic marks around such representative alternatively spliced exons.

研究分野：分子神経生物学、分子生物学

キーワード：環境化学物質 選択的スプライシング エピゲノム 天然変性アミノ酸配列領域

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 数万種にのぼる化学物質による健康への有害影響については十分な知見に乏しく、特に胎児・幼児における神経系の発生・発達への悪影響が懸念されている。

我々は、ポリカーボネートやエポキシ樹脂製品の原材料中に含まれるビスフェノール A (BPA) の胎生期曝露による神経系の異常を世界に先駆けて報告した。すなわち妊娠マウスに胎齢 0 日から低用量 BPA を連日投与し、胎齢早期～中期の胎仔終脳における終脳神経細胞の分化/移動の促進、神経発生関連重要遺伝子の発現変動、その後の成熟脳においても残存する視床皮質路の形成異常を明らかにした。

さらに、胎仔脳において、約 2% の遺伝子種が BPA 曝露依存性発現変動を示すことも見出した。

ところでエピゲノムは発生・分化関連遺伝子の発現制御に重要な役割を担う。我々は中規模ながら環境化学物質で最初の網羅的メチローム解析結果を報告した。BPA 曝露された胎仔終脳での DNA メチル化異常は、遺伝子特異的・発生段階特異的メチル化変動を示す遺伝子群の転写開始点周囲において高率に生じていた。メチル化変動が発現と関連する遺伝子も見出し、胎生期 BPA 曝露がメチロームを攪乱しトランスクリプトームに変動をきたすと推察した。

最近我々は、生後に現れる胎生期曝露影響として、大脳皮質(体性感覚野)の神経細胞構築異常を見出した。ところがマイクロアレイによる発現解析では胎仔脳と異なり、転写開始点近傍のメチル化異常や発現変動を示す遺伝子数は予想外に少なかった。

(2) 大脳のメチル化変動部位の一つがエクソン内在性スプライシング制御モチーフ配列に位置していた。これを契機に、神経細胞に影響を及ぼす別の分子異常、すなわち BPA 曝露が、エピゲノム異常を介して、マイクロアレイ解析では捕捉しきれない選択的スプライシング制御を攪乱する可能性を着想した。

組織特異的または発生段階特異的に制御された選択的スプライシングにより、複数エクソンをもつヒト遺伝子の 95% は複数の mRNA を生成している。これは遺伝子数以上に機能的に多様なプロテオームの存在を意味する。

また、エクソン内在性スプライシング制御配列内のサイレント変異による家族性神経疾患や悪性腫瘍も報告されている。異常な選択的スプライシングが生じれば、表現形質に

影響を及ぼすことが予想される。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでに、ビスフェノール A (BPA) の胎生期曝露による神経系の異常や胎仔脳でのメチローム・トランスクリプトーム異常を報告してきた。

胎生期 BPA 曝露が生後大脳の神経細胞に影響を及ぼす分子機構として、エピゲノム異常を介した選択的スプライシングの攪乱を想定しその検証のため本研究を企図した。3 年間に以下の内容を遂行する。

(1) 胎生期 BPA 曝露を受けた生後マウス大脳で生じるエクソン選択の異常を次世代シーケンサーにより探索する。

(2) この異常とエクソン内在性スプライシング制御配列のゲノム DNA メチル化異常との相関を明らかにする。

(3) DNA・RNA の異常をリンクする分子機構としてクロマチン構造変換を想定し、検証する。質的な発現変動の重要性に着眼することで、広く化学物質影響の分子機構解明に新しい視座を与えることをめざす。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料

胎齢 0.5 日目から出産前日まで 1 日 1 回腹腔内投与により 500  $\mu\text{g/g}$  体重の BPA を投与した妊娠 C57B6 マウスより生まれた仔マウスを、胎生期 BPA 曝露群とする。BPA の溶媒に用いたエタノールを投与した妊娠マウスより生まれた仔マウスを、胎生期 BPA 非曝露群 (コントロール群) とした。

胎生期 BPA 曝露群および非曝露群の生後 3 週齢のマウスから大脳を摘出する。本研究では DNA メチル化と遺伝子発現状態を対応づけるため、個体ごとに大脳の溶解液から DNA と RNA を同時精製する。

我々は発現変動遺伝子やメチル化異常の雌雄差という既知情報をもとに、性サイクルの影響を考慮して雄のみを対象とし、事前に既知発現変動遺伝子の変動を RT-定量 PCR により確認できた個体サンプルのみを以後の解析に使用する。

(2) 次世代シーケンサーによる RNA-Seq 両群で 3 biological replicates について、HiSeq2000(pair-end sequencing, 100bp) で約 100M reads/サンプルのデータを得た。

ゲノム上にマッピングされたタグ・データから、両群間での差次的発現遺伝子を同定した。

選択的スプライシングによるエクソン選択効率の変動したエクソンを、2種類のプログラム SpliceR 及び Multivariate Analysis of Transcript Splicing (MATS)を用いて解析し抽出した。この際、選択的スプライシングイベントの様式ごとに抽出分類した。

(3) 選択的スプライシングによるエクソン選択効率の変動を RT-定量 PCR 法により確認した。

RNA-Seq に用いたのとは別のマウス個体において再現性を確認した。

マウス由来神経系細胞株 Neuro2a, mHippoE18 の2種類の細胞に 100nM での曝露の有無によっても選択効率の変動するエクソンに絞り込んだ。

(4) 選択効率の変動したエクソンの上流・下流各 500 塩基、エクソン内の 5' 端、3' 端各 100 塩基に着目し、配列特徴の抽出を行った。

GC 含有率プロファイル、CpG 配列のプロファイルの作成し比較した。

モチーフ配列の抽出を MEME により解析した。

(5) エクソン選択の変化がコードする蛋白の構造的特徴にどのような変化をもたらすか、以下の3つの点から各遺伝子産物ごとに検討を加えた。

蛋白をコードするかどうか

蛋白をコードする場合、ドメイン構造の構成に影響するかどうか

その他、どのようなアミノ酸配列の特徴に対応しているか

(6) (3) で用いた培養系により、クロマチン沈降 PCR 法 (ChIP-定量 PCR) をおこなった。その際、オープンもしくはヘテロクロマチンに対応する化学修飾を受けたヒストンに対する抗体をもちいて免疫沈降を行ない、共沈降してくるゲノム DNA を鋳型に各変動エクソン配列を増幅する primer セットにより定量 PCR を実施した。またバイサルファイト PCR により DNA メチル化状態を調べた。

(7) (3) で用いた培養系において、DNA メチル化阻害剤による影響の有無を RT-定量 PCR で比較した。

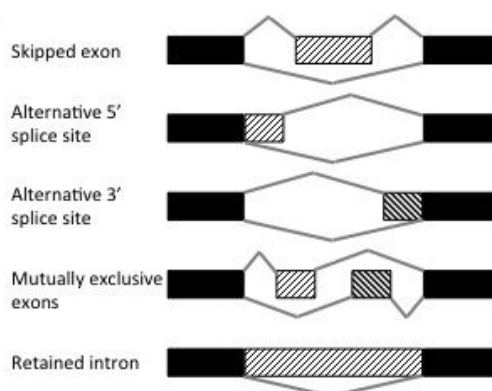
#### 4. 研究成果

(1) 発現変動する遺伝子の抽出

まず、曝露により脳で本来発現していない遺伝子の発現誘導は検出されなかった。また、マイクロアレイ解析で得ていた結果から予想されていた量的発現変動を示す遺伝子は4遺伝子と極めて限られ、いずれも 1.5~2 倍の幅にとどまった。

(2) 選択効率の変動するエクソン

4種類のスプライシング様式 (exon skipping, Intron retention, Alternative 5' donor or 3' acceptor sites, Mutually exclusive exons) に着目して解析した。



まず当初計画したように、Herb BR ら [*Nat Neurosci.* 15 1371-3 (2012)]の方法を用いた。すなわち、選択的スプライシング・バリエーションの情報を反映する exon junction を含むタグに着目し、両群間で差次的発現レベルを示すタグを抽出したのち、エクソン選択比率に差のあるスプライシング・バリエーションをリスト化するという手法である。

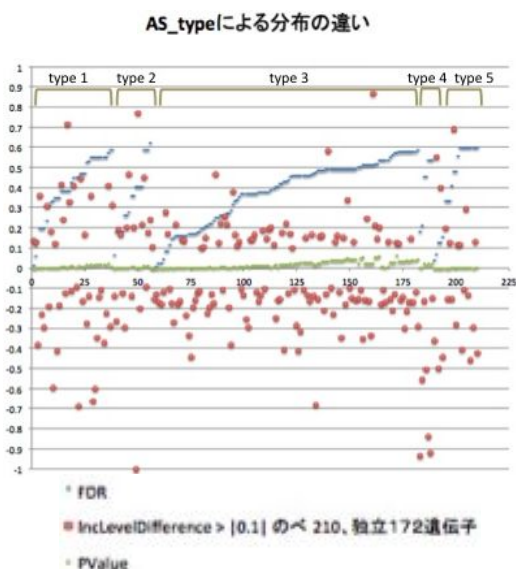
ところが、この手法では実際のところ、選択効率の変動するエクソンを抽出することができなかった。その原因は十分に検証できていないが、彼らの解析対象と異なり、比較する2群間で発現量の変動にほとんど差がない場合には十分な検出感度を得られない手法である可能性がある。

研究計画立案時とくらべ開始当初になると、次世代シーケンサーで得たデータをもとにスプライシング・バリエーションを検索するアルゴリズムが、種々相次いで発表されていた。そこで2つのアルゴリズムで検索し両者で一致する結果を採用することにした。

まず、MATS を用いた。これは、in silico での結果を wet の系で検証し、信頼性の高い FDR のカットオフ値が評価されていた手法である。FDR < 0.6 の統計的有意性を持って、エクソン取り込み率が 10% 以上変化したものは、172 遺伝子 210 エクソンにのぼった。

つぎに、使用した報告例が複数でていた Splice R を用いた場合の検出結果と比較した。両者で重複して検出されなかった遺伝子は

11個であった。すなわち、161遺伝子においては、それらの全 mRNA 発現量が変動することなく、選択的スプライシングによるエクソン選択率が変動していることが明らかとなった。



特定のスプライシング様式が強く影響を受け、選択効率が変動したエクソンのおよそ7割を占めた。一方、残りの様式は各々1~2割にとどまった。そして、このようなスプライシング様式間での比率は元々の様式間の比率と大きく異なっていたことから、特定のスプライシング様式に関わる分子機構が標的になっていることが推察された。

全ゲノム解析の結果から定常状態で選択的スプライシングを受けるエクソンについて、配列上の特徴がいくつか明らかにされてきた。例えば、1)イントロンの両端のコンセンサス配列(GT-AG)からずれることなどでエクソン認識効率が「弱い」配列となっている、2)エクソン-イントロン ジャンクションを境にエクソン配列のGC含有率が高いなどである。

胎生期BPA曝露をうけた離乳後のマウス大脳において選択効率が変動したエクソンでは、配列は必ずしもこれらの特徴に集約されることはなかった。共通の配列特徴をもつグループに分類することは可能であったが、各々のグループとエクソン選択効率の増減との間に一致性を見いだすにはいたらなかった。

エクソン内外には、スプライシング反応の際にエクソン認識に対して促進的もしくは抑制的に作用するエンハンサーもしくはサプレッサーと呼ばれる配列が存在する。こうした配列にはSR蛋白ファミリーなどのトランス因子が結合し、これらの蛋白が認識効率を制御していることが知られている。

これらエンハンサーやサプレッサーのコ

ンセンサス配列モチーフを抽出したエクソンおよび近傍イントロン配列を対象に検索した。これらの配列の有無や亢進もしくは抑制性という機能分類がエクソン選択効率の変動とどの程度、対応しているか検討した。胎生期BPA曝露をうけた離乳後のマウス大脳や神経細胞様株化細胞へBPA曝露実験系においてRT-定量PCR法で評価した結果、モチーフ配列の種類、それらの機能分類および見いだした配列特徴に基づくクラスター解析を行なった。

小さな複数のクラスターが存在したもののBPA曝露影響を統一して説明する要因を見いだすには至らなかった。これらの結果から、cis配列-trans因子の視点からは選択的スプライシング制御に関わる複数の分子機構が標的になっていることが推察された。

### (3) エピゲノム変化との対応

最近、遺伝子ボディーに局在するエピジェネティック因子による選択的スプライシング制御への関与について知見が集積し定量PCRは始めている。

例えば、fibronectin FN1やVEGFA1遺伝子に関する報告がある。エクソンやその近傍に位置するエクソン近傍に位置するDNA(CpG)部位がメチル化されると、そのヌクレオソーム中のヒストンH3では、9番目のリジン残基におけるトリメチル化が亢進する。このH3K9me3を認識し結合することによって、転写抑制に働く蛋白群がエクソン近傍へと局在化する。これらの蛋白群は上述のスプライシング制御因子群と結合能を有しているため、これら因子群をリクルートしてくる。その結果、エクソンの取り込みが促進または抑制される。

上述(2)の小さなクラスターのうち、スプライシング制御因子群の結合配列モチーフとCpG部位を併せ持つ変動エクソンではヒストン化学修飾の変化に着目すると、選択効率の変動方向が異なっても統一的に説明づけられる可能性がある。

そこでまず、これらエクソンに着目し培養細胞系でもエクソン選択効率の変動するものを検索した。Neuro2a細胞またはmHippoE18細胞を増殖培地で培養中、BPAに曝露し、BPA無添加の無血清培養により神経細胞様に分化させた。さらに、DNA脱メチル化剤の存在下での培養も行なった群を調整した。その後RNAを抽出し、RT-定量PCR法により、全mRNA量とエクソン取り込み率を評価した。この結果、取り込み率がBPA依存的に変動するもの、さらに脱メチル化剤に拠って変動するものをみいだした。

絞り込まれたエクソンに着目して、クロマチン免疫沈降-定量PCR法を実施した。その結果、クロマチン状態の変化とエクソン選択効率の変化さらにBPA曝露状態が見かけ上対応するエクソンが存在することを見いだした。

た。

抽出された変動エクソン及びその周囲の配列解析から明らかになったことは、予想に反して GC 含有率なかでも DNA メチル化の標的となる CpG 分布密度が極めて低いものが半数を占めていることであった。すなわち、標的エクソン周辺の DNA メチル化の変化が必ずしもエクソン選択効率変動の起因とは限らない場合が半数を占めていることを意味する。さらに、CpG 配列がエクソン内外に存在しないにもかかわらず、上述の培養系において DNA メチル化阻害剤の効果が現れた場合があった。

スプライシング制御に関わるエピジェネティックな分子機構への BPA の作用点は複数存在することが示唆された。今後は(2)のクラスターや培養細胞系での結果を元に得たグループごとに、より詳細なメカニズムの解析が必要であると考えらる。

#### (4) 対応する遺伝子の GO 解析

エクソン選択比率に曝露影響を受けた遺伝子群には、神経伝達関連やシナプス関連蛋白質および神経軸索伸長など神経発生・神経機能関連蛋白質をコードする遺伝子、RNA 代謝(スプライシングや mRNA 安定性)を司る遺伝子群、ついでクロマチン制御関連因子に富む傾向が明らかとなった。

#### (5) エクソン選択の変化がコードする蛋白質の構造的特徴

標的エクソンが各蛋白質の構造上においてどのような特徴と対応しているかを検討した。

標的エクソンは主にミニエクソンであった。多くは短いアミノ酸配列のインフレームでの挿入・欠失であり、ついでノンコーディングの mRNA へと変換するタイプのものであった。

挿入・欠失の場合、共通する特徴として、天然変性アミノ酸配列領域をコードしていることや既知の蛋白質相互作用機能を有するドメイン構造の近傍に存在する傾向を見いだした。それらの中には先行研究によって実際に蛋白質相互作用機能の発現に決定的な役割を果たすこと、あるいは近傍ドメイン機能の微調整を担うことが明らかにされているものを含んでいた。

#### (6) BPA 曝露が終了し遺伝子発現量プロファイルの攪乱が終息したあとも、選択的スプライシングのプロファイルの変化が維持されていることや行動異常などの表現型異常が残存する。

こうしたことに鑑みると選択的スプライシング異常の標的遺伝子機能が(4)で述べた

カテゴリーに濃縮されていることは大変興味深い。さらに(5)のような蛋白質の構造的特徴と蛋白質機能に与える影響をも考慮すると、今後、これらの蛋白質群が形成する機能ネットワークの異常を明らかにしていくことが重要課題となる。なぜなら、こうした蛋白質ネットワークの機能異常は、胎生期曝露の後までも残存する表現型異常を説明づける分子基盤として期待されるからである。

またこうした異常を引き起こす基盤として、スプライシング制御に関わるエピジェネティックな分子機構の攪乱が関与していることが示唆された。標的となる機構は複数存在し予想よりも複雑であると考えられた。しかしこのことは、種々の環境化学物質の作用点が多岐にわたって存在し得ることを示していると解釈できる。

従来、遺伝子発現を指標に化学物質影響を評価しようとする場合、着目するのが特定の化学物質であれ、多種多様な化合物であれ、遺伝子発現量に着目してきた。しかし、本研究から、トランスクリプトームの「量的」変動のみならず「質的」変動も重要な評価指標となる可能性があらかになったといえる。

#### 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 1 件)

矢追 毅、化学物質曝露によるエピゲノム攪乱は脳で選択的スプライシング異常をもたらすか?、BIO Clinica、北隆館/ニューサイエンス社、査読有、31 巻、2016、68-75

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

矢追 毅 (YA01, Takeshi)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40311914