

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870296

研究課題名(和文) 甲状腺ホルモン系に及ぼす内分泌攪乱化学物質のエピジェネティック作用の網羅的解析

研究課題名(英文) Genome-wide analysis of epigenetic effects of endocrine disrupting chemicals on thyroid system.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺ホルモンは、リガンド依存的転写因子である核内ホルモン受容体に結合することによって、標的遺伝子の転写を調節する。その際、ヒストンがアセチル化され、クロマチン構造が緩むことによって転写が活性化されるなど、エピジェネティックな制御が存在することが知られている。そこで本研究では、このようなエピジェネティックな制御に及ぼす環境化学物質の影響をゲノムワイドに検討することを目的とした。研究成果として、従来知られていたホルモン応答配列以外の上流域においてもエピジェネティックな制御が存在すること、ある種の化学物質がその種類依存的、また標的遺伝子特異的にエピジェネティック制御を攪乱することなどを見出した。

研究成果の概要(英文)：Thyroid hormone (TH) plays an important role in various biological processes. Thyroid system is thought to be one of the important endpoints affected by several environmental chemicals. The aims of this research are: 1) to clarify the molecular mechanism of TH-TH-receptor (TR) action, and 2) to clarify the effects of environmental chemicals on the epigenetic control of TH-responsive gene expression.

T3-induced thrb gene activation is mediated by liganded TR binding to TREs in the 5' flanking and exon b regions. T3 induced the euchromatin-associated epigenetic marks in the 5' flanking and exon b regions. Ioxynil and tetrabromobisphenol A altered T3-induced histone H3 and RNAPII post-translational modifications that are closely linked to transcriptional elongation stages of RNAPII. We detected chemical-specific and target gene-dependent effects, which may reflect the differences in action sites of the chemicals.

研究分野：分子生物学

キーワード：内分泌かく乱物質 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

甲状腺ホルモンは、周産期の脳の発達等に非常に重要な役割を果たすホルモンである。この時期に甲状腺系がある種の化学物質によって攪乱されると、知能の発達や、行動等に影響が出ることが報告されている。しかしながら、ほ乳類等の高等動物は胎生であるため、この時期の個体に及ぼす化学物質の影響を検討することは難しい。

両生類の変態は、甲状腺ホルモンによって誘起される劇的な生理現象であり、幼生型の組織から、成体型の組織に再構成される。この変態期は、高等動物における周産期に相当すると考えられている。従って、両生類の変態は、甲状腺ホルモン作用のみならず、甲状腺系攪乱作用を検討し、その知見をヒト等の高等動物にフィードバックする上で、非常に有用なモデル系であると言える。

甲状腺ホルモンは、甲状腺から血中に分泌されると、ホルモン結合タンパク質と結合し、体内を循環する。標的細胞に入ると、核に移行し、核内ホルモン受容体と結合する。この受容体は、リガンド依存型の転写因子であり、ホルモンが結合することによって、転写調節複合体を再構成し、標的遺伝子の転写を調節している。ホルモン作用によって、標的遺伝子の発現が活性化される際、転写活性化複合体に含まれるタンパク質の活性によって、ヒストンがアセチル化され、クロマチン構造が緩むと考えられてきた(図1)。しかし近年、アセチル化だけでなく、ヒストンのメチル化も重要な役割を担っていると考えられるようになってきた(図1)。ホルモン作用による、クロマチン構造の変化は、非常に重要な現象であるにも関わらず、両生類において、数種類のホルモン応答遺伝子の発現調節に関してのみ報告されてきており、ゲノムワイドなヒストン修飾変化の検討はなされていない。

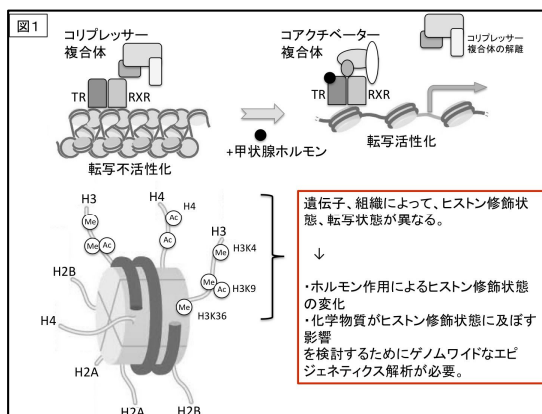


図1 甲状腺ホルモン作用によるクロマチン構造の変化と遺伝子発現との関連

我々は、甲状腺系を攪乱する化学物質の影響について、血中タンパク質との結合に及ぼす影響、細胞に取り込まれる際の影響、核内受容体との結合に及ぼす影響、標的遺伝子の発

現調節に及ぼす影響、攪乱される遺伝子のゲノムワイドな探索等、様々なステップで検討し、甲状腺系攪乱作用について知見を蓄積してきた。また、内分泌攪乱化学物質が、ホルモン受容体と、受容体と協調的に働くコリプレッサーとの結合を強めることや、受容体とDNAの結合を弱めること等が報告されていることから、化学物質によって、本来起こるべきクロマチン構造の変化が攪乱されている可能性が高いと考えられる。しかしながら、上述の通り、ホルモン作用によるクロマチン構造の変化、さらにはこの変化に及ぼす化学物質の影響について、ゲノムワイドな解析はなされておらず、それを可能とするようなモデル実験系およびプラットフォームの確立と、それに基づいた大規模な解析が必要である。

2. 研究の目的

一般的に、甲状腺ホルモンの作用によって、ヒストンのアセチル化は増加し、クロマチン構造が緩み、転写が活性化されると考えられている。それに対して、ヒストンのメチル化は、メチル化されるリシン残基の位置、組織によって制御が異なっている。従って、アセチル化と比較して、複数の残基、メチル基の転移数等を詳細に検討する必要がある。本研究では、甲状腺ホルモン処理、及び甲状腺ホルモンと化学物質の同時処理を行い、ゲノムワイドにヒストン修飾の変化を比較することを目的とする。

具体的には、[I]両生類モデル生物のネッタイツメガエルのプロモーター領域をゲノム配列から予測し、その配列をもとにプロモーターアレイを設計する。[II]ゲノムワイドな発現解析を行い、変動する遺伝子を網羅的に探索する。[III]アセチル化ヒストン抗体を用いてChIP on chip解析を行う。[IV]同様にメチル化の解析を行う。ヒストン H3 の 4 番目、9 番目、27 番目、36 番目のリシンのモノ、ジ、トリメチル化を検討する。[V]発現解析、ヒストン修飾解析の結果、ホルモン結合配列(受容体が結合する配列)をゲノム上にマッピングし、発現量の変化とヒストン修飾の変化との関連について考察する。両生類モデルから得られた知見をもとに、ほ乳類の周産期胎児モデルとしてのマウスモデルへの適用の可能性を考察したい。

3. 研究の方法

・ネッタイツメガエルのマイクロアレイ設計
本研究では、ゲノムワイドな、発現解析及びヒストン修飾の検討を、両生類でゲノム配列が既知のネッタイツメガエルを用いて行う。しかしながら、申請者が利用経験があり、かつ本学に機器類が設置されているアジレント社から、当該生物のマイクロアレイは発売されていない。従って、研究の第一段階として、発現解析用、及びヒストン修飾検討用のマイクロアレイ(プロモーターアレイ)を

設計する必要がある。ゲノムデータベースから、cDNA 配列及び、コーディング領域上流域の配列を取得し、マイクロアレイを設計する。データの取得、アレイの設計は、適宜コンピュータプログラムを作成して行う。

・ホルモン処理、化学物質処理したサンプルを用いたゲノムワイドな発現解析
 ネットアイツメガエルを対照群、甲状腺ホルモン処理群、甲状腺ホルモンと化学物質処理群に分け、サンプリングを行う。組織から抽出した RNA を用いて、ゲノムワイドな発現解析を行い、ホルモン応答遺伝子、また化学物質によって発現が攪乱される遺伝子の抽出を行う。また、サンプルの均一性を担保するために、ヒストン修飾解析用の固定サンプルも同時に調製する。

・プロモーターアレイを用いたヒストン修飾状態の検討
 独自に設計したプロモーターアレイを用いて、ヒストンの修飾状態を検討する。第一に、ヒストン H4 のアセチル化を検討する。いくつかのホルモン応答遺伝子では、当該遺伝子上流域に存在するホルモン受容体結合配列周辺で、有意にヒストン H4 のアセチル化が上昇することが報告されているため、ポジティブコントロールとすることができる。

次に、ヒストン H3 の 4 番目、9 番目、27 番目、36 番目のリシンのメチル化を検討する。4 番目のリシンのメチル化は、転写開始反応に、36 番目のリシンのメチル化は転写伸長反応に関与していると考えられている。9 番目のリシンのメチル化は、転写の不活性化に関与しており、それぞれのメチル基の転移数が多い程、現象が増大すると考えられている。それぞれのリシンのモノ、ジ、トリメチル化を検討する。

・発現解析、ヒストン修飾状態のゲノムへのマッピング

発現解析、ヒストン修飾状態の検討結果をゲノム上にマッピングし、それぞれの結果を可視化する。これによって、ホルモン処理、化学物質処理によって変動する遺伝子と、その上流域のヒストンの修飾状態を一元的に俯瞰できる。

4. 研究成果

・ネットアイツメガエルマイクロアレイの設計
 研究の第一段階として、両生類幼生に及ぼす環境化学物質の影響をゲノムワイドな遺伝子発現レベルで検討することを目的とした。そこで、データベースから取得したネットアイツメガエル cDNA 配列を元に、マイクロアレイを設計した。アレイ解析において重要なステップである各プローブのアノテーションに関して、本研究経費で購入したコンピュータを用いて Perl プログラムを作成し、注釈付を行った。

・遺伝子発現レベルに及ぼす環境化学物質の影響の検証

次に、ネットアイツメガエル幼生の甲状腺ホルモン応答に及ぼす環境化学物質の影響を遺伝子発現レベルで検討した。しかしながら、動物の個体差などの理由により、再現性の高い結果が得られなかった。そこで、アフリカツメガエル培養細胞を用い、実験系の簡素化を行った。

・アフリカツメガエル培養細胞を用いた甲状腺ホルモン応答遺伝子発現変動に関わるエピジェネティック制御機構の解析

アフリカツメガエル培養細胞にホルモン処理を行い、甲状腺ホルモン応答遺伝子の発現誘導を確認した。その後、ChIP アッセイによって、コーディング領域、制御領域におけるヒストン修飾、RNA ポリメラーゼ II の結合および修飾状態がどのように変化するか検討した。その結果、従来知られていた応答エレメント以外の制御領域において、甲状腺ホルモン処理によってヒストン修飾等が変化することを見出した。本結果は成果 3 として発表した。また、得られた成果の概要を図 2 として示した。

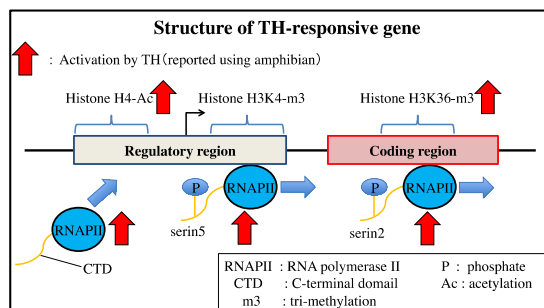


図 2 甲状腺ホルモン応答遺伝子領域におけるホルモンによるエピジェネティックな制御メカニズム

・甲状腺ホルモンによるエピジェネティックな制御に及ぼす環境化学物質の影響の検討
 上記の通り、ホルモン応答遺伝子がホルモンによって発現変動する際、遺伝子領域（制御領域、コーディング領域含む）においてヒストン修飾等のエピジェネティックな変化が誘導されることが明らかになった。そこで、このようなエピジェネティックな制御に及ぼす環境化学物質の影響について検討した。その結果、複数のヒストン修飾、RNA ポリメラーゼ II の結合、修飾が、化学物質の種類依存的に、また応答遺伝子の種類依存的に影響を受けることを見出した。本結果は成果 5 として発表した。また得られた成果の概要を図 3 として示した。

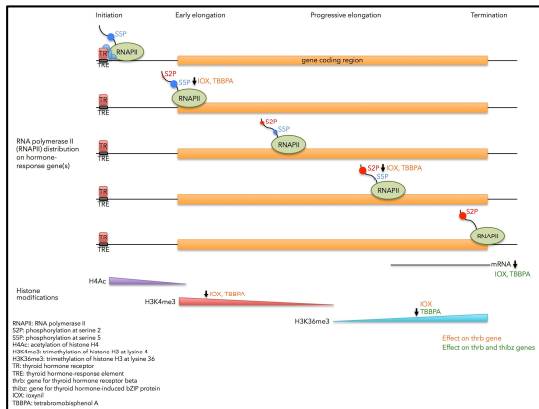


図3 甲状腺ホルモンによる応答遺伝子発現のエピジェネティックな制御に及ぼす環境化学物質の影響

・その他の環境要因が動物個体に及ぼす影響の検討

環境化学物質が生物に及ぼす影響の検討と並行して、その他の環境要因が生物に及ぼす影響について検討を行った。一点目は温度変化である。通常野外に生息する生物は環境中の温度変化にさらされる。ウシガエルは、低温にさらされると、甲状腺ホルモン処理の有無に関わらず変態を停止することが知られているが、その分子機構は明らかになっていない。そこで、非モデル生物であるウシガエルの遺伝資源を蓄積するべく、RNA シーケンスによる cDNA 配列情報の網羅的解析を行った。さらに温度変化によって変動する遺伝子群をゲノムワイドに探索した。その結果、平均長 600bp 前後の cDNA 配列を 30 万程度収集することができ、かつ低温によって脂肪酸不飽和化酵素が誘導されることを見出した。さらに脂肪酸の組成がどのように変化するかを検討した。また、低温および甲状腺ホルモン処理による遺伝子発現の変化を半網羅的に解析した。本研究結果は成果 1 として発表した。

二点目は食餌条件である。野外に生息する生物は常時食餌をとることができるわけではなく、長期の絶食にさらされることが想定される。それにも関わらず、長期に生存可能である。このメカニズムを明らかにするため、摂食、絶食、絶食後再摂食の 3 条件下で飼育したアフリカツメガエルの小腸を用いて研究を行った。絶食を行うと、超組織の萎縮が見られるが、再摂食後 1 日で速やかに回復した。この分子機構を明らかにするため、半網羅的遺伝子発現解析を行った。検討した遺伝子のうち大部分は絶食で発現レベルが低下した。そのなかから複数遺伝子に焦点を絞り、ヒストン修飾等のエピジェネティックな変化を検討したところ、絶食条件下で、一般的に遺伝子発現が促進されると言われるクロマチン状況にあることが示唆された。このことは、遺伝子発現レベルが低下することと相反する現象であり、新しい知見をもたらした。

本研究結果は成果 2 として発表した。

・環境要因に対するゲノムワイドなエピジェネティック制御の変化
上記の通り、様々な環境要因がエピジェネティックな変化をもたらすことが示唆された。そこで、アセチル化、メチル化などのヒストン修飾、リン酸化などの RNA ポリメラーゼ II 修飾に焦点を絞り、ゲノムワイドな変化を検討した。その結果、ある環境要因の変化によってヒストンのアセチル化が変動することを見出した（未発表データ）。今後、どのような遺伝子領域でエピジェネティックな変化が見られるか検討するとともに、環境化学物質が同様の変化をもたらすか検討していく予定である。

・総括

本研究の当初のテーマは、環境化学物質が及ぼすエピジェネティックな変化のゲノムワイドな解析を行うことであった。しかしながら、ホルモンや環境化学物質に対する動物個体の応答に複雑な個体差が見られ、研究に遅れが生じる危険性があった。そこで、培養細胞を用いた実験系で研究を推進することとし、甲状腺ホルモン応答に関わるエピジェネティック制御の基礎的知見の蓄積、そのエピジェネティック制御に及ぼす環境化学物質の影響について明らかにすることができた。また、今後の研究を幅広く推進する準備として低温、食餌等の環境要因が生物に及ぼす影響を検討した。また、その過程で従来乏しかったウシガエルの遺伝資源を十分量蓄積することができた。本研究の成果によって、今後、環境要因が生物に及ぼす影響に関する研究は強力に推進することが可能になったと考えられる。

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 7 件)

1. Suzuki S, Awai K, Ishihara A, Yamauchi K. (査読有)
Cold temperature blocks thyroid hormone-induced changes in lipid and energy metabolism in the liver of *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Cell Biosci.* 2016 6:19.
2. Tamaoki K, Okada R, Ishihara A, Mochizuki K, Goda T, Yamauchi K. (査読有)
Morphological, biochemical, transcriptional and epigenetic responses to fasting and refeeding in intestine of *Xenopus laevis*. *Cell Biosci.* 2016 6:2.
3. Kasai K, Nishiyama N, Izumi Y, Otsuka S, Ishihara A, Yamauchi K.

(査読有)

- 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 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 467(1):33-38
4. Ueno T, Ishihara A, Yagi S, Koike T, Yamauchi K, Shiojiri N. (査読有) Histochemical analyses on biliary development during metamorphosis of *Xenopus laevis* tadpoles. *Zool Sci.* 2014 32(1):88-96.
 5. Otsuka S, Ishihara A, Yamauchi K. (査読有) Ioxynil and tetrabromobisphenol A suppress thyroid-hormone-induced activation of transcriptional elongation mediated by histone modifications and RNA polymerase II phosphorylation. *Toxicol Sci.* 2014 138(2):290-299.
 6. Iwase K, Ishihara A, Yoshimura S, Andoh Y, Kato M, Seki N, Matsumoto E, Hiwasa T, Muller D, Fukunaga K, Takiguchi M. (査読有) The Secretogranin II Gene Is a Signal Integrator of Glutamate and Dopamine Inputs. *J Neurochem.* 2014 128(2):233-245.
 7. Ishihara A, Takahashi R, Numajiri T, Kaneko S, Ishizawa Y, Koya S, Yamauchi K. (査読有) Effects of Japanese herbal crude drug, combined extract of *Sasa albo-marginata* leaves, Japanese red pine leaves and ginseng roots on gene expression in hypercholesterolemic rat liver. *J Trad Med.* 2013 30(5):236-245

[学会発表](計 10 件)

1. Effects of thyroid hormone on the epigenetic changes in the regulatory region of the *Xenopus laevis* thyroid hormone receptor gene
日本比較内分泌学会 (2015 年 12 月 12 日) JMS アステールプラザ (広島県・広島市)
Norihito Nishiyama, Kentaro Kasai, Yushi Izumi, Shunsuke Otsuka, Akinori Ishihara, Kiyoshi Yamauchi.

2. Effects of environmental chemicals on thyroid hormone-dependent modifications of histones and RNA polymerase II
日本比較内分泌学会・国際両生類爬虫類神経内分泌学会 (2014 年 11 月 8 日) 岡崎コンファレンスセンター (愛知県・岡崎市)
Akinori Ishihara, Kiyoshi Yamauchi.
3. Analysis of the low temperature response mechanism in bullfrog larvae
日本比較内分泌学会・国際両生類爬虫類神経内分泌学会 (2014 年 11 月 8 日) 岡崎コンファレンスセンター (愛知県・岡崎市)
Shunsuke Suzuki, Akinori Ishihara, Koichiro Awai, Kiyoshi Yamauchi.
4. Effects of fasting and refeeding on intestinal functions in *Xenopus laevis*
日本比較内分泌学会・国際両生類爬虫類神経内分泌学会 (2014 年 11 月 8 日) 岡崎コンファレンスセンター (愛知県・岡崎市)
Keiji Takamoki, Reiko Okada, Akinori Ishihara, Kazuki Mochizuki, Kiyoshi Yamauchi.
5. 円口類ヌタウナギの甲状腺ホルモン結合タンパク質の解析
日本動物学会 (2014 年 9 月 11 日) 東北大学川内北キャンパス (宮城県・仙台市)
笠井謙太郎, 鈴木駿介, 西山学即, 石原顕紀, 山内清志
6. 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 (2014 年 9 月 11 日) 東北大学川内北キャンパス (宮城県・仙台市)

- 泉勇志, 石原顕紀, 山内清志
7. ウシガエル生体膜の低温応答機構の解析
日本動物学会 (2014年9月13日) 東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)
鈴木駿介, 石原顕紀, 栗井光一郎, 山内清志
8. アフリカツメガエルを用いた消化管の絶食/再摂食に対する応答の検討
日本動物学会 (2014年9月13日) 東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)
玉置啓二, 岡田令子, 石原顕紀, 望月和樹, 山内清志
9. 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 (2013年9月26日) 岡山大学(岡山県・岡山市)
大塚駿介, 石原顕紀, 山内清志
10. 遺伝子重複によって生じたニジマスHIUHase/TTRスーパーファミリーの解析
日本動物学会 (2013年9月27日) 岡山大学(岡山県・岡山市)
笠井謙太郎, 西山学即, 石原顕紀, 山内清志

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.ipc.shizuoka.ac.jp/%7esbkya%7ema/>

6. 研究組織
(1)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

(2)研究分担者
なし
(3)連携研究者
なし