

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510083

研究課題名(和文) ツメガエル視床下部 下垂体 副腎及び甲状腺軸かく乱の作用機序と試験評価系の確立

研究課題名(英文) Establishment of a protocol to examine the effects of endocrine disrupting chemicals on anuran metamorphosis.

研究代表者

鈴木 賢一 (Suzuki, Ken-ichi)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：90363043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本申請課題は、化学物質が脊椎動物の視床下部-下垂体-副腎(HPA)軸及び視床下部-下垂体-甲状腺(HPT)軸に及ぼす影響の作用機序を分子レベルで明らかにし、内分泌かく乱作用の試験評価システムを確立することが目的である。HPA及びHPT軸において中心的な役割を果たす遺伝子群に注目し、モデル動物としてツメガエル(*Xenopus tropicalis*及び*Xenopus laevis*)を用いて研究を遂行した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to establish a new protocol to examine the effects of endocrine disrupting chemicals on anuran metamorphosis. Focusing on the molecular mechanism by which endocrine disruptors disturb metamorphosis, we tried to develop reporter transgenic lines and to analyze metamorphosis-related genes in *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*.

研究分野：内分泌かく乱

キーワード：甲状腺ホルモン 変態 無尾両生類 ツメガエル 甲状腺ホルモン受容体

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な化学物質が環境中に排出され、生物への潜在的な内分泌かく乱作用が社会問題化している。脊椎動物個体の内分泌系を制御するのは視床下部-下垂体-副腎(HPA)軸および視床下部-下垂体-甲状腺(HPT)軸である。前者はグルココルチコイド、後者は甲状腺ホルモン(TH)の血中濃度を制御している。無尾両生類において、HPA 軸と HPT 軸による個体レベルの変態制御は中枢となっており、化学物質のエンドポイントとして重要である。しかしながら、個体レベルから分子レベルまでの作用機序に関する知見は少なく、内分泌かく乱作用を評価する上で、解明しなければならない課題である。

2. 研究の目的

本申請課題の目的は、化学物質が視床下部-下垂体-副腎(HPA)軸および視床下部-下垂体-甲状腺(HPT)軸に及ぼす影響の作用機序を分子レベルで明らかにし、その分子基盤に基づいた内分泌かく乱作用の試験評価システムを確立することである。HPA および HPT 軸において中心的な役割を果たす遺伝子群に注目し、モデル動物として、ネッタイツメガエル(*Xenopus tropicalis*)とアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の二種のツメガエルを用いて研究を遂行した。初期の研究項目は以下のように設定した。

ツメガエルトランスジェニック動物の作製：甲状腺ホルモンおよびグルココルチコイドに反応してレポーター遺伝子(GFP および Luciferase)を発現するコンストラクト作製と受精卵への導入によるトランスジェニックガエルの作製
トランスジェニックガエルおよび野生型を用いた内分泌かく乱作用の評価検討
ツメガエル幼生に対する化学物質の影響の実際

ネッタイツメガエル幼生における甲状腺ホルモン応答遺伝子の同定：マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析

評価に用いた化学物質は、既知のアゴニストやアンタゴニストをコントロールとして用いた他、哺乳類において抗甲状腺ホルモン活性を持つことが知られている医薬品 A、近年環境中での放出量が多く問題となっている臭素系難燃剤 B を用いた。いずれも、HPA および HPT 軸をかく乱する環境化学物質の候補として考えられている。

3. 研究の方法

トランスジェニックガエルの作製：
本研究課題で用いたトランスジェニック(Tg)アフリカツメガエルは以下の種類である。

1)FGK promoter/EGFP Tg
アフリカツメガエル FGK 遺伝子のプロモ

ーターを含む転写調節領域を pEGFP(Clontech 社)レポーターベクターに組み込んだコンストラクトをトランスジェネシスした親系統から得た F1 及び F2 を使用。詳細は Suzuki et al. (2010) を参照のこと。

2)TRbetaAI promoter/EGFP Tg
アフリカツメガエル TRbetaAI 遺伝子のプロモーターを pEGFP(Clontech 社)レポーターベクターに組み込んだコンストラクトをトランスジェネシスした親系統から得た F1 及び F2 を使用。詳細は Ranjan et al. (1994)、及び Goto et al. (2006)を参照のこと。

3)TRbetaAI promoter/Luciferase Tg
アフリカツメガエル TRbetaAI 遺伝子のプロモーターを pGL3(Promega 社)レポーターベクターに組み込んだコンストラクトをトランスジェネシスした親系統から得た F1 を使用。詳細は Ranjan et al. (1994)を参照のこと。

ツメガエル幼生への曝露実験：
被検物質である化学物質はエタノール、DMSO に溶解し、 10^{-2} ~の 10^{-3} M stock 溶液を作製した。この stock 溶液をエタノールにより希釈し、飼育水中に 10^{-9} M~ 10^{-6} M の各濃度となるように加え、ネッタイツメガエルおよびアフリカツメガエルのオタマジャクシをガラス容器内に入れて曝露した。発生段階は Nieuwkoop and Faber (1994)に従った。0.01%エタノール中で飼育したものを溶媒コントロール群(無処理対照群)とした。餌はオタマジャクシにはセラミクロン(Sera Heinsberg, ドイツ)を与え、12 時間明/12 時間暗の条件下で飼育した。液の交換は 1 日おきに行った。実験中の水温は $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ (アフリカツメガエルのオタマジャクシ)、 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ (ネッタイツメガエルのオタマジャクシ)とした。

In vitro レポーターアッセイ：
アフリカツメガエル培養細胞 A6 に、各種ホルモン応答性エレメントを組み込んだ pGLベクター、核内受容体発現ベクター、及び内部標準用 pRL/CMV ベクターを co-transfection し、各種化学物質およびホルモンを加え、Dual luciferase reporter assay kit (プロメガ社)により活性を測定した。

In vivo レポーター解析：
トランスジェニック幼生の EGFP 蛍光イメージは、Leica 社製蛍光実体顕微鏡と Nikon 社製デジタルカメラ NF60 を用いて取得した。取得した蛍光画像は、NIH ImageJ を用いて解析し、後肢及び鰓の蛍光強度と表面積の積を蛍光シグナルとして数値化した。Tg 幼生および培養細胞における Luciferase 活性は、D-luciferin と Berthold 社製ルミノメーターを用いて測定した。

マイクロアレイおよび qRT-PCR 解析：
ネッタイツメガエルの甲状腺ホルモンおよびステロイドホルモン応答性遺伝子の候補（2400 遺伝子）に対する複数プローブを持つカスタムマイクロアレイを作製した。甲状腺ホルモンに曝露したネッタイツメガエル幼生（実験群）と溶媒対照群から得た total RNA を cDNA に合成し、マイクロアレイ解析を行った。溶媒対照群と実験群（各 n=3）を比較し、統計的に優れたシグナル強度を示した遺伝子を甲状腺ホルモン応答性遺伝子の候補として同定した。同定した遺伝子の一部は、上記 cDNA を用いて、ABI 社製 StepOne の qRT-PCR により解析した。内部標準遺伝子としては rpL8 を用いた。

4. 研究成果

(1) レポーターツメガエルを用いた内分泌かく乱物質の評価
両生類の変態は HPT-甲状腺ホルモンと HPA-グルココルチコイドの相乗効果によって進行すると考えられている。本研究項目では、甲状腺ホルモンに反応するレポーターツメガエル群を用いて、*in vivo* で内分泌かく乱（変態かく乱）物質の評価系を確立するための条件を検討した。EGFP をレポーターにした甲状腺ホルモン応答トランスジェニックツメガエル幼生を、甲状腺ホルモン、既知のアゴニスト/アンタゴニスト、内分泌かく乱化学物質 A および B に暴露し、そのレポーター活性を測定した。さまざまな条件を検討した結果、最も感度よく評価できるのは、エンドポイントである後肢の成長が始まる発生ステージであることが判明した。また、これまでのプロトコールで評価されていた後肢に加え、鰓もよいエンドポイントとなることが判明した。化学物質 A および B は、強い変態抑制効果を示したことから、生体内において甲状腺ホルモンアンタゴニストである可能性が示唆された。Luciferase をレポーターとするホルモン応答性ツメガエルは、他のトランスジェニックラインと比べて、発生異常や遅延が見られ、F1 を得るまでに多くの時間を費やした。今後、生体毒性の低い Luciferase 遺伝子の開発が必要であると考えている。得られた F1 初期胚を用いて、変態を抑制した化学物質 B を評価したところ、アゴニストおよびアンタゴニスト活性を示さなかった。このことは、B が TR に直接作用しているのではなく、もっと上位で変態をかく乱している可能性を示唆している（下記、*in vitro* レポーターシステムの項参照）。加えて、幾つかのレポーターネッタイツメガエルを作製し、現在次世代を得るべく飼育している。

今後、得られた知見および成果は、*in vivo* において HPA および HPT 軸かく乱の評価系となることが期待される。

(2) *in vitro* レポーターシステムの構築
アフリカツメガエル培養細胞 A6、甲状腺ホルモン応答配列を含む Firefly Luciferase ベクター、アフリカツメガエルおよびネッタイツメガエル TRa、TRb および RXR の cDNA を発現するベクターを用いて、*in vitro* の甲状腺ホルモンかく乱物質の評価系を構築した。既知の甲状腺ホルモンのアゴニストと潜在的アゴニスト/アンタゴニスト群を用いて評価した結果、濃度依存的な転写活性およびアゴニスト/アンタゴニスト活性を確認できた。興味深いことに、*in vivo* においてツメガエルの変態を強く抑制する化学物質 B（上記の項目参照）は、*in vitro* レポーターアッセイにおいて TRa および TRb に対するアンタゴニスト活性を示さなかった。このことは、化学物質 B が HPT 軸または HPA 軸に影響を及ぼし変態を抑制した可能性を示唆している。同時に、グルココルチコイドやエストロジェンも評価できるベクター系を構築した。これらのレポーターシステムは、細胞から遺伝子まで全てツメガエル由来であることから、今後、両生類に対する内分泌かく乱物質の *in vitro* 評価系の一つとなることが期待される。

(3) 作用機序解明のための甲状腺ホルモン応答遺伝子群の同定

HPA/HPT 軸かく乱の作用機序を解析する目的で、ネッタイツメガエルのゲノムデータを用いて、核内受容体が制御する可能性の高い遺伝子を *in silico* 解析でゲノムワイドに予測した。それらの候補遺伝子のうち、TR が結合し制御する可能性が高い遺伝子群を 2000 以上選択し、カスタムマイクロアレイを作製した。このマイクロアレイを用いて、ネッタイツメガエル幼生における甲状腺ホルモン応答遺伝子の候補の同定を試みた。変動した多くの遺伝子の中から、2 倍以上増減する遺伝子群を選択し、qRT-PCR により検証した。多数の遺伝子が qRT-PCR の結果と正の相関を示したことから、これらは甲状腺ホルモンにより制御されている可能性が高い遺伝子であることがうかがえる。興味深いことに、造血や炎症に関する遺伝子群が優位に増減した。これらの中には、甲状腺ホルモンとグルココルチコイドの相乗効果により発現が誘導されることが明らかとなっている遺伝子も複数含まれていた。このことは、両生類における内分泌かく乱物質の作用が、造血系や免疫系に影響を及ぼす可能性を示唆している。

(4) ヒストン修飾を *in vivo* で解析できるトランスジェニックの作製

内分泌かく乱化学物質によるエピゲノム修飾への影響を精査するため、エピゲノム修飾の一つであるヒストン H3 リシン 9(H3K9)アセチル化（プロモーター、エンハンサーや転写開始点(TSS)近傍に多く見られ、転写活性

化マークとして知られている)の挙動を、in vivo で確認できるトランスジェニックツメガエルの作製に成功した。Mintbody トランスジェニック胚は初期発生において体節で強い蛍光シグナルを示した。Mintbody mRNA 導入胚と類似の時空間的蛍光パターンを示したことや、脱アセチル化酵素の阻害剤により蛍光強度が増加したことから、トランスジェニック胚が H3K9 アセチル化をモニターしていることが証明された。現在このトランスジェニックツメガエルをライン化している。今後、化学物質のエピジェネティクス修飾への影響を解析する上で、有用なツールとなることが期待される。

(5) ゲノム編集技術を用いた甲状腺ホルモン受容体の機能と内分泌かく乱物質作用機序の解明

遺伝子機能を簡便かつ高効率に解析できるゲノム編集技術が、研究期間中に急速に発展した。アフリカツメガエルやネッタイツメガエルにおける、TR の機能や内分泌かく乱化学物質の作用機序を解明する目的で、この技術の確立を試みた。さらに、ネッタイツメガエル TR α の knock-out に成功し、その表現系から、unliganded TR α が変態のタイミングを制御している事実が判明した。このことは、TR に結合しうる化学物質は、変態のタイミングをかく乱する可能性があること示唆しており、今後、両生類を用いた内分泌かく乱物質の作用機序を理解する上で重要な知見となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

(1) Choi J, Suzuki KI, Sakuma T, Shewade L, Yamamoto T, Buchholz DR. Unliganded thyroid hormone receptor alpha regulates developmental timing via gene repression as revealed by gene disruption in *Xenopus tropicalis*. *Endocrinology*. 2014 Dec 2;en201411554. (査読有)

(2) Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, Kume S, Sakamoto N, Obara M, Daimon T, Sezutsu H, Yamamoto T, Sakuma T, Suzuki KT. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using

TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat Commun*. 2014 Nov 20;5:5560. doi:10.1038/ncomms6560. (査読有)

(3) Sakane Y, Sakuma T, Kashiwagi K, Kashiwagi A, Yamamoto T, Suzuki KT. Targeted mutagenesis of multiple and paralogous genes in *Xenopus laevis* using two pairs of transcription activator-like effector nucleases. *Dev Growth Differ*. 2014 Jan;56(1):108-14. (査読有)

[総説](計1件)

Suzuki KT and Hayashi T. Genome Editing Using Site-Specific Nucleases in Amphibians. *Targeted Genome Editing Using Site-Specific Nucleases: ZFNs, TALENs, and the CRISPR/Cas9 System*, Springer, pp133-149 (2015)

[学会発表](計18件)

(1) 鈴木 賢一・坂根 祐人・佐久間 哲史・鈴木 美有紀・柏木 昭彦・柏木 啓子・坂本尚昭・山本 卓、アフリカツメガエルにおける TALEN を用いた標的遺伝子の改変、2015年3月3日、2015年度日本動物学会中国四国支部 広島県例会、広島大学(広島)

(2) 鈴木 美有紀・坂根 祐人・佐久間 哲史・坂本 尚昭・山本 卓・鈴木 賢一、ゲノム編集およびトランスジェニック技術を用いたアフリカツメガエル再生現象の可視化、2015年3月3日、2015年度日本動物学会中国四国支部 広島県例会、広島大学(広島)

(3) Hirano M, Suzuki KT, Iwata H. Functional characterization of the clathrin as a novel regulator of ecdysone receptor signaling pathway. 環境ホルモン学会研究発表会 第17回研究発表会、

2014年12月9日、東京大学(東京)

(4) **鈴木 賢一**、両生類統合戦略会議 PartIV のための問題提起、第1回イベリアトゲイモリ研究集会、2014年12月5日、鳥取大学(鳥取)

(5) 鈴木 美有紀・**鈴木 賢一**、何故再生を繰り返すと再生能力が低下するのか?、第1回イベリアトゲイモリ研究集会、2014年12月5日、鳥取大学(鳥取)

(6) Suzuki M, Sakane Y, Sakuma T, Sakamoto N, Yamamoto T, **Suzuki KT**. *In vivo* monitoring of histone H3 lysine 9 acetylation using Mintbody transgenic *Xenopus laevis* during embryogenesis and tail regeneration. 集まれ!理系女子第6回女子生徒による科学研究発表交流会、2014年10月25日、京都大学(京都)

(7) **鈴木 賢一**・坂根 祐人・佐久間 哲史・山本 卓、ツメガエルにおける簡便なノックイン技術の確立:PITCh システム、第4回ゲノム編集研究会、2014年10月7日、広島国際会議場(広島)

(8) 坂根 祐人・佐久間 哲史・鈴木 美有紀・柏木 啓子・柏木 昭彦・坂本 尚昭・山本 卓・**鈴木 賢一**、アフリカツメガエルにおけるTALENを用いた標的遺伝子の改変、第4回ゲノム編集研究会、2014年10月6日、広島国際会議場(広島)

(9) Suzuki M, Sakane Y, Sakuma T, Sakamoto N, Yamamoto T, **Suzuki KT**. *In vivo* monitoring of histone H3 lysine 9 acetylation using Mintbody transgenic *Xenopus laevis* during embryogenesis and tail regeneration. 第4回ゲノム編集研究会、2014年10月6日、広島国際会議場(広島)

(10) 佐能 正剛・中村 直樹・**鈴木 賢一**・柏木 啓子・花田 秀樹・山本 卓・新海正・杉原 数美・藤本 成明・北村 繁幸・柏木 昭彦・太田 環、化学物質におけるカエル甲状

腺ホルモン作用のアゴニストおよびアンタゴニスト活性、フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー、2014年9月19日、つくば国際会議場(茨城)

(11) **鈴木 賢一**、ネットイツメガエル幼生および成体肝臓のオミックスデータ、日本動物学会 第83回 仙台大会、2014年9月12日、東北大学(宮城)

(12) **鈴木 賢一**、ケラチンから理解する無尾両生類のメタモルフォーゼ、日本動物学会 第83回 仙台大会、2014年9月12日、東北大学(宮城)

(13) 佐々木 和泉・柏木 昭彦・柏木 啓子・花田 秀樹・太田 茂・佐能 正剛・山本 卓・**鈴木 賢一**・新海 正、アミオダロンのネットイツメガエル脳下垂体への影響、日本動物学会 第83回 仙台大会、2014年9月11日、東北大学(宮城)

(14) 渡辺 大樹・柏木 昭彦・柏木 啓子・花田 秀樹・太田 茂・佐能 正剛・山本 卓・**鈴木 賢一**・新海 正、アミオダロン暴露による水生両生類の甲状腺に対する影響、日本動物学会 第83回 仙台大会、2014年9月11日、東北大学(宮城)

(15) **Suzuki KT**, Kashiwagi K, Sakuma T, Kashiwagi A, Mochii M, Yamamoto T. Genome editing reveals a novel function of keratin in fin formation in *X. laevis*. 15th International Xenopus Conference, August 26, 2014, Pacific Grove, California (United States of America)

(16) Sakane Y, Sakuma T, Kashiwagi K, **Kashiwagi A**, Yamamoto T, **Suzuki KT**. Targeted mutagenesis of multiple and paralogous genes in *Xenopus laevis* using two pairs of TALENs. 15th International Xenopus Conference, August 26, 2014, Pacific Grove, California (United States of America)

(17) Sakane Y, Sakuma T, Suzuki M,

Yamamoto T, **Suzuki KT**, New strategy for gene knock-in in *Xenopus laevis* using Platinum TALENs. 第 47 回日本発 生生物学会、2014 年 5 月 27 日-30 日、ウ インクあいち (愛知)

(18) **鈴木 賢一**、Platinum TALEN を用い た新しいノックインシステムとアフリカツ メガエルへの応用、第 61 回日本実験動物 学会総会、2014 年 5 月 16 日、札幌コンベ ンションセンター (北海道)

(19) 佐能正剛, 柏木啓子, 花田秀樹, 中村 直樹, **鈴木賢一**, 山本 卓, 新海 正, 杉 原数美, 北村繁幸, 柏木昭彦, 太田 茂、 甲状腺ホルモン様物質によるカエルにおけ る in vitro および in vivo 評価、フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2013.9.13-14, 福岡

(20) 佐能 正剛, 柏木 啓子, 花田 秀樹, 中村 直樹, **鈴木 賢一**, 山本 卓, 新海 正, 杉原 数美, 北村 繁幸, 柏木 昭彦, 太田 茂、ツメガエルにおけるアミオダロ ンの蓄積と甲状腺ホルモン攪乱作用、環境 ホルモン学会第 16 回研究発表会, 東京, 2013.12.12-13

(21) 佐能正剛, 柏木啓子, 花田秀樹, 松原 加奈, 川畑公平 1 中村直樹, **鈴木賢一**, 山 本 卓, 新海 正, 藤本成明, 杉原数美, 北村繁幸, 柏木昭彦, 太田 茂、甲状腺ホ ルモン様化学物質アミオダロン曝露による カエルの変態に対する影響、環境ホルモン 学会第 15 回研究発表会, 東京, 2012.12.18-19 東京

〔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 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 賢一 (SUZUKI KEN-ICHI)
広島大学・大学院理学研究科・特任講師
研究者番号 : 90363043

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

柏木 昭彦 (KASHIWAGI AKIHICO)
広島大学・大学院理学研究科・特任教授
研究者番号 : 50106796