

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：57102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550042

研究課題名(和文) 内分泌かく乱物質の次世代影響とゲノムインプリンティング

研究課題名(英文) Relationship between next generation effect of endocrine disruptor and genome imprinting

研究代表者

富永 伸明 (TOMINAGA, NOBUAKI)

有明工業高等専門学校・その他部局等・教授

研究者番号：30227631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、内分泌かく乱物質であるBisA曝露を多世代にわたって行った線虫受精卵のヒストンH3のメチル化およびアセチル化修飾状況を定量的に解析することに成功した。線虫は、BisA曝露で経代的に産卵数が減少することを報告しているが、本研究の結果から、その際に受精卵中の細胞において特異的なヒストンH3Lys4のジメチル化修飾体、Lys9のアセチル化修飾体が減少していることが分かった。このことは、内分泌かく乱物質の経代的な影響はエピジェネティックな修飾として次世代の受精卵に受け継がれる可能性が高いことを示すものである。

研究成果の概要(英文)：Bisphenol A (BisA) is one of the most known endocrine disrupted chemicals. In this study, I determined the modification levels of histone H3 protein in *C. elegans* fertilized eggs at several generations during BisA treatment. *C. elegans* grew from fertilized egg to adult on several concentrations of BisA. This procedure was repeated for third generations. Crude histone fractions were prepared from fertilized egg of each generation. Proteins were separated by SDS-PAGE and subjected western blotting. Then immuno-binding assay using specific monoclonal antibodies for histone H3 lys4 or Lys9 modifications were carried out. Results indicated that histone H3 Lys4-dimethylation and lys9-acetylation levels were decreased by BisA exposure significantly. Overall results indicated that exposure of BisA to parental *C. elegans* memorized in the fertilized eggs by the specific histone H3 methylation and/or acetylation modifications. Then next generation effects was occurred through gene expression.

研究分野：環境生物化学

キーワード：ヒストン ビスフェノールA 線虫 内分泌かく乱物質

1. 研究開始当初の背景

内分泌かく乱物質は、生体が持つ内在性ホルモンのアゴニストあるいはアンタゴニスト活性を持ち、生体内の内分泌系をかく乱すると考えられる物質である。最も懸念された影響は、女性ホルモン様活性による繁殖力の低下であり、長期間にわたる影響として影響を受けた個体の減少だけでなく、個体バランスの変化による生態系をかく乱する可能性も考えられる。また、内分泌かく乱物質のもう一つの大いなる問題に、次世代影響があるが、その有無に対する明確な解答は未だ国内外において示されていない。これは継世代研究の実験ストラテジの難しさに起因すると考えられる。次世代影響を研究するためには長期の *in vivo* 系を計画する必要があるが、実験動物のライフサイクル、個体差が重要な要因となり、一般的な動物モデルであるラット、マウス等でも大規模な長期的な実験計画を立てる必要があり、ヒトにおいては長期にわたる詳細なコホート調査に頼らざるを得ないと考えられる。大規模コホート調査は国内外で始まったばかりであり、その結果がまとまるのはまだまだ先である。

ところで、内分泌かく乱を疑われる物質の多くは体内蓄積性があまり高くなく、高濃度に母親体内に蓄積した化学物質が胎児・新生児へ移行することによる従来の次世代的影响とはそのメカニズムは異なると考えられる。分子生物学的に考察すると内分泌かく乱物質によって継代的影響が起こるとすると親世代と子世代の遺伝子発現が異なっていると考えられ、DNA のメチル化、ヒストンのアセチル化などの化学修飾等の状況が異なってくるインプリンティングの変化が深く関わることが予想されるが、内分泌かく乱物質の次世代影響と DNA、ヒストン修飾の関係を長期世代にわたって定量的に明らかにした報告はない。

2. 研究の目的

線虫は世代交代が極めて短時間であり、我々は過去にビスフェノール A をはじめとしたいくつかの内分泌かく乱物質が線虫の繁殖力を継代的に抑制することを示した。蓄積性が少ない化学物質が次世代影響を引き起こすためには、エピジェネティックな遺伝子発現レベルの修飾の必要性があると考えた。本研究では、ごく低濃度の内分泌かく乱物質の線虫の数世代以上の暴露を試み、暴露世代別に線虫ゲノムに生じるヒストンのメチル化、アセチル化の化学修飾の蓄積状態を定量的に明らかにし、内分泌かく乱物質の次世代影響と長期暴露における分子レベルでのエピジェネティックなインプリンティング蓄積との関係を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

C. elegans への BisA 曝露

約 200000 個の受精卵を BisA プレートお

よびコントロールプレートにまき、線虫を成長させた。これが成長後、卵を収集し 1 世代目とした。以後、同様の操作を 3 世代目まで行った。卵は液体窒素で急速冷凍し、-80 のフリーザーにて保存した。線虫卵からのヒストンの精製と修飾体の検出と定量

線虫卵 500000 個を用い Histone Purification Mini Kit を用い粗コアヒストンを精製した。280 nm で吸光度測定を行い、タンパク質量を算出した。(O.D.₂₈₀ 0.42 = 1 mg/mL)

ドデシル硫酸ナトリウム 15 %ポリアクリルアミドゲル電気移動(15 %SDS-PAGE)

精製した粗コアヒストン試料を 6000 rpm、30 分間遠心分離を行い、ポルテックスミキサーで攪拌を行った。この操作を 2 回繰り返して、3 倍のサンプル buffer を試料の半分量加えて攪拌した。再び遠心分離、攪拌を行い、泳動槽にセットした 15 %ポリアクリルアミドゲルに分子量マーカー 1 μ L、14 ng/ μ L コアヒストン試料を 10 μ L ずつのせ、電流 190 mA 一定、ゲル 1 枚に対して電圧 20 V の条件で 15 %SDS-PAGE を行った。電気泳動後、銀染色 (Silver Stain Kit) および Western blotting を行った。Anti Histone H3 あるいはその Lys4 および Lys9 修飾体に特異的モノクローナル抗体を用いた Immuno binding 法および化学発光検出系を用いて特異的バンドを CCD カメラで検出した。検出したバンドは定量化ソフト CS Analyzer を用いて、発光強度をピーク面積の積分値から算出し、コントロールに対する比を求めた。

4. 研究成果

粗コアヒストン画分は比較的純度が高いものを回収できていることが銀染色で確認できた (Fig. 1)。

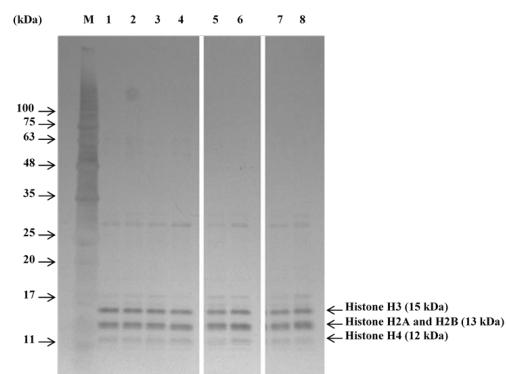


Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified core histones. The purified core histones were separated SDS-PAGE on a 15% polyacrylamide gel and stained with silver stain. Lane M, molecular weight marker; Lane 1, Control; Lane 2, 0.01 mM BisA 1st generation; Lane 3, 0.1 mM BisA 1st generation; Lane 4, 1 mM BisA 1st generation; Lane 5, 0.01 mM BisA 2nd generation; Lane 6, 0.1 mM BisA 2nd generation; Lane 7, 0.01 mM BisA 3rd generation; Lane 8, 0.1 mM BisA 3rd generation

CCD カメラで検出した未修飾および Lys4 の各メチル化修飾、Lys9 の各メチル化修飾およびアセチル化修飾のバンドを Fig. 2 に示す。1 mM BisA 曝露は毒性が強く、2 世代目以降で十分な数の卵の回収ができなかったため、

1 世代目のみの結果を示す .15 kDa のバンド (Fig. 1)と全ての Anti-Histone 抗体で検出したバンド (Fig. 2)は同じ位置にあったことから、銀染色において検出された 15 kDa のバンドはヒストン H3 であることが分かった。未修飾がいちばん強く発光し、次に Lys4 モノメチル修飾の発光が強かった (Fig. 3)。コントロールと比較して、未修飾および Lys4 モノメチル修飾には BisA 曝露による発光の大きな変化は見られなかったが、Lys4 ジメチル修飾は世代を重ねるごとに発光が減少しており、Lys4 トリメチル修飾は全体の発光が弱かった (Fig. 2)。Lys9 モノメチル修飾およびジメチル修飾は発光が増加し、Lys9 トリメチル修飾は発光が弱く、Lys9 アセチル修飾は発光が減少していた (Fig. 2)。これらのことから、発光が強かった未修飾および Lys4 モノメチル修飾のヒストン H3 タンパク質量は多く、発光が弱かった Lys4 および Lys9 トリメチル修飾のヒストン H3 タンパク質量は少ないことが分かった。

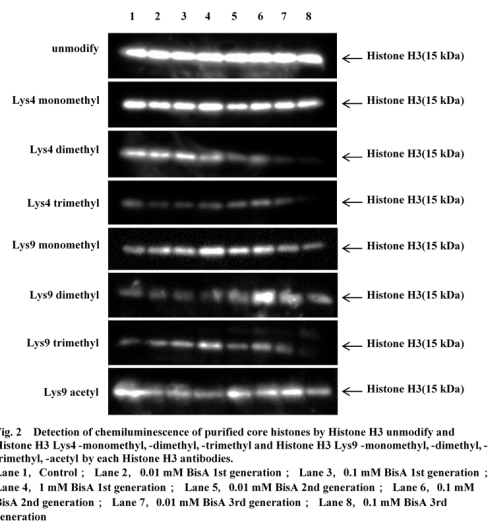


Fig. 2 Detection of chemiluminescence of purified core histones by Histone H3 unmodify and Histone H3 Lys4-monomethyl, -dimethyl, -trimethyl and Histone H3 Lys9-monomethyl, -dimethyl, -trimethyl, -acetyl by each Histone H3 antibodies.
Lane 1, Control; Lane 2, 0.01 mM BisA 1st generation; Lane 3, 0.1 mM BisA 1st generation; Lane 4, 1 mM BisA 1st generation; Lane 5, 0.01 mM BisA 2nd generation; Lane 6, 0.1 mM BisA 2nd generation; Lane 7, 0.01 mM BisA 3rd generation; Lane 8, 0.1 mM BisA 3rd generation

各バンドの発光強度のコントロールに対する比を求めた (Figs. 3, 4)。未修飾、Histone H3 Lys4 モノメチル化体は BisA 曝露による修飾はコントロールに比べて大きな変化は

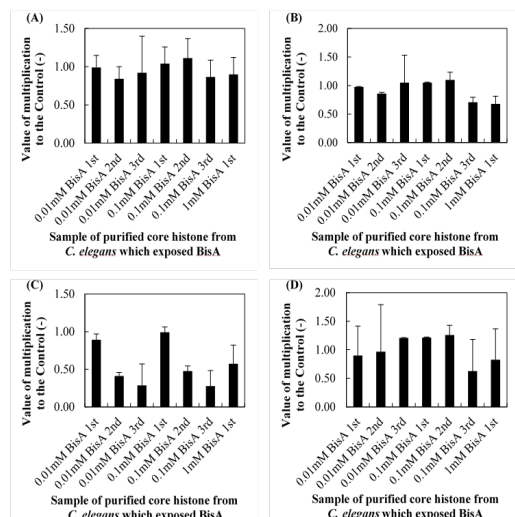


Fig. 3 Relative density of each Histone H3 unmodify and Lys4 modifications. (A), Histone H3 unmodify; (B), Histone H3 Lys4 monomethyl; (C), Histone H3 Lys4 dimethyl; (D), Histone H3 Lys4 trimethyl

見られなかった (Fig. 3(A), (B))。これは修飾されていないヒストン H3 が線虫の受精卵中に極めて多いことを示し、多くの遺伝子は BisA に暴露されても発現量に大きな変化ないことを示唆する。一方、ヒストン H3 の Lys4 ジメチル化体は 0.01 および 0.1 mM BisA の 1 世代目では大きな変化は見られなかったが、2 世代目以降で大きく減少する傾向が見られた (Fig. 3(C))。また、1 mM BisA 低下が見られる。このことは BisA に曝露されたことを線虫ヒストン分子に記憶していることを意味する。一般に、ヒストン H3 の Lys4 のメチル化は、ユークロマチン形成に関与すると考えられるため、特異的な遺伝子発現に影響を及ぼしている可能性が考えられる。一方、Lys4 トリメチル化体は発光強度が著しく低く、定量性が得られなかったため、今回は検討を行わなかった (Figs. 2, 3(D))。

Histone H3 Lys9 の修飾状況はモノメチル、ジメチル化体がコントロールに比べてわずかに増加していた (Fig. 4 (A) and (B))。一方、Lys9 アセチル化は修飾が大きく減少していた (Fig. 4 (D))。これらのことから、線虫に BisA を曝露することで、Histone H3 の Lys9 メチル化が促進される一方でアセチル化が抑制あるいは脱アセチル化が促進されていることが考えられる。Lys9 がメチル化されるとメチル化修飾に結合するクロモドメインタンパク質 HP1 がリクルートされ、ヘテロクロマチン化が促進されるとされており、ヘテロクロマチンの部分にある遺伝子は、転写が不活性になる。また、ヒストンタンパク質は正に帯電し、DNA は負に帯電している。ヌクレオソーム内のヒストンと DNA は電気的な力で結合している。ヒストン分子のアミノ末端の Lys にアセチル基が結合するとヒストンの尾部の正電荷を減少させ、ヒストンと DNA の電気的引力を減少させ、ヌクレオソームの凝集した構造を緩くする。そのことでリモデリングタンパク質の DNA への結合を促し、転写が促進されると考える。したがって、今回の Histone H3 の Lys9 におけるアセチル化率が減少していることは、ヒスト

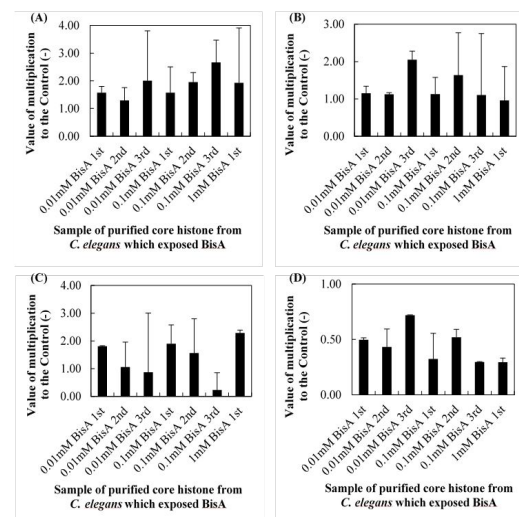


Fig. 4 Relative density of each Histone H3 Lys9 modifications. (A), Histone H3 Lys9 monomethyl; (B), Histone H3 Lys9 dimethyl; (C), Histone H3 Lys9 trimethyl; (D), Histone H3 Lys9 acetyl

ンと DNA の電氣的引力も増加を引き起こし、ヌクレオソームが凝集され、転写が抑制されると考えられる。これらのことから、BisA は Lys9 をメチル化の促進とアセチル化の抑制を通して、線虫は受精卵中に特異的に転写の抑制を引き起こすことも示唆された。HistonH3 の Lys9 トリメチル体は発光強度が著しく低く、定量性が得られなかったため、今回は検討を行わなかった(Fig. 4 (C))。

線虫の繁殖力は、0.1 mM BisA では 1 世代目に大きく減少することなく、2, 3 世代と世代を経るにつれて減少した(Fig. 5)。

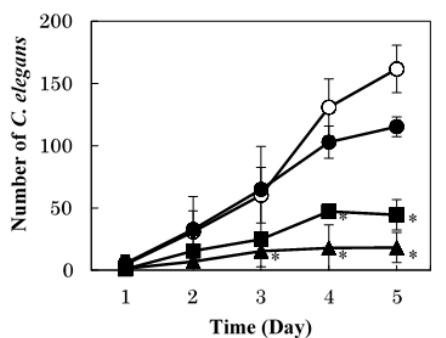


Fig. 5 Effect of 0.1 mM BisA on the fecundity of *C. elegans*.

○, Control; ●, 1st generation; ▲, 2nd generation; ■, 3rd generation

The asterisk symbols (*) denote significantly different when compared to the control group number at $p < 0.05$

本研究では、内分泌かく乱物質である BisA 暴露を多世代にわたって行った線虫受精卵のヒストン H3 のメチル化およびアセチル化修飾状況を定量的に解析することに成功した。その結果、BisA は特異的にヒストンの修飾に明確な影響を与えることがわかり、産卵数の減少など内分泌かく乱物質による経世代的な影響はエピジェネティックに受精卵に受け継がれている可能性が高いことを明らかにすることができた。修飾状況の変化はいずれも遺伝子発現を抑制する方向に働くものであったことから、今後、その遺伝子を調査することで BisA の世代を超えた影響およびその発現メカニズムが明らかにされることが期待される。

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 1 件)

Inokuchi A, Yamamoto R, Morita F, Takumi S, Matsusaki H, Ishibashi H, Tominaga N, Arizono K: Effects of lithium on growth, maturation, reproduction and gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. J. Appl. Toxicol., in press (査読有) DOI:10.1002/jat.3058

[学会発表](計 2 件)

椋島李歩, 富永伸明, 山口明美, 中村浩, 内田雅也, 有蘭幸司: パナジウムの線虫 *C. elegans* による *in vivo* 評価, 日本農芸化学会関西・中四国・九州支部大会, 2013 年 9 月 5 日 (広島)

椋島李歩, 富永伸明, 山口明美, 中村浩, 内田雅也, 有蘭幸司: パナジウムとインスリンの線虫 *C. elegans* による複合影響評価, 日本内分泌かく乱物質学会第 16 回研究発表会, 2013 年 12 月 12 日 (東京)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富永 伸明 (TOMINAGA, Nobuaki)
有明工業高等専門学校物質工学科・教授
研究者番号: 30227631

(3) 連携研究者

山口 明美 (YAMAGUCHI, Akemi)
有明工業高等専門学校教育研究技術支援センター・技術職員
研究者番号: 90399262