

研 究 報 告 書

「胎児プログラミング仮説の分子機構の解明と医療への応用」

研究タイプ: 通常型(※大挑戦型課題として延長無)

研究期間: 平成24年10月～平成28年3月

研 究 者: 成 耆 鉉

1. 研究のねらい

ストレスにより誘導されたエピゲノム変化による、個体の環境適応と、その遺伝機構の解明は、生命の恒常性維持機構、及び、疾患発症機構を理解する上で重要である。英国の Barker 教授が最初に提唱した「低体重で生まれた子供は成長後に糖尿病などの生活習慣病を発症し易い」という説(Barker 説)は、疫学調査の結果とも合致し、現在では「胎児・乳幼児期の栄養状態が成長後の疾患発症頻度に影響する」という胎児プログラミング仮説(Developmental Origin of Health and Disease: DOHaD)として広く知られ、急速に関心が高まってきている。また、このような環境ストレスの影響は、世代を超えて、次世代へと引き継がれていくという報告もなされている。しかしこれまで、この説を検証する緻密な実験が困難であることや、分子メカニズムが全く不明であることから、この説を信じない研究者も多かった。ようやく、ラットとマウスに高脂肪餌、低タンパク質餌を与えると、次世代の代謝状態、遺伝子発現に変化が現れることが報告され(Ng ら、Nature, 2010; Carone ら、Cell, 2010)、研究が始まったばかりである。また、母親ラットを子供から分離すると、成長した子供が行動異常を呈することが報告されている(Weaver ら、Nat Neurosci, 2004)。これは、グルココルチコイド受容体遺伝子の発現制御領域のエピゲノム変化に起因することが示されているが、次世代に遺伝し得るかどうかは、報告がない。また、胎児期における、栄養、感染、母体の喫煙のような環境ストレスが、新生児の免疫能力に影響を及ぼすことが、報告されており、このような現象が、一群の遺伝子のエピゲノム変化を介していることが示唆されているが、そのメカニズムは全く不明である。このように、様々なストレスによる、エピジェネティック変化と、次世代への影響については、世界的に関心が高まっているが、その分子機構に迫る知見はまだ得られていない。

本研究では、多様な遺伝学的手法が利用でき、生活環の短いショウジョウバエを用いて、様々なストレスによるエピゲノム変化が、恒常性維持機構に、どのような分子メカニズムを介して、影響を及ぼすのか、また、その影響は遺伝するかどうかを明らかにすることを目指した。

2. 研究成果

(1)概要

親の受けたストレスが次世代に影響するかどうかという問題は、恒常性維持機構の理解する上でも、大変重要な課題である。しかしながら、科学的な解析が行われるようになったのは、極めて最近のことで、その分子機構については何も分かっていないのが現状であった。そこで、本研究で私は、この現状を打破するため、1)次世代に影響を及ぼすストレスを特定し、実験系を確立すること、2)その分子機構を明らかにすること、3)この仕組みの生物学的意義は何なのかを明らかにすること、そして、4)本研究成果を医療に繋げていくことを目標と

した。

まず、私は、ショウジョウバエを用いた実験系の確立を目指し、様々なストレスを用いて次世代の影響を探ったところ、拘束ストレスをもちいた実験系の確立に至ることができた。父親に拘束ストレスを与えることにより、次世代におけるヘテロクロマチン形成に顕著な影響が合わられ、更には、その過程に、p38-dATF-2 経路が関与していることが示された。また、親の受けたストレスがどのように次世代に伝わるのかを理解するため、ストレス情報の生殖細胞系列への伝達の仕組みがあると考え探索したところ、サイトカインの1つ Upd3 が、拘束ストレス依存的に誘導され、次世代におけるエピゲノム変化に関与していることを見出した。さらに、親の拘束ストレスの次世代にける影響を明らかにするため、RNA-seq とメタボローム解析を行い、次世代において、解糖系、TCA 経路、電子伝達経路等のエネルギー代謝に顕著な変化が合われることを見出し、親の拘束ストレスが、次世代におけるエネルギー恒常性に大きな影響を与えていることを見出した。

(2) 詳細

1) 次世代に影響を及ぼすストレスを特定と実験系の確立

私は、まず、どのようなストレスが次世代において顕著な影響を示すのかを明らかにするため、次世代のヘテロクロマチン形成に影響を及ぼすストレスの探索を行った。その中で、拘束ストレスは、次世代のヘテロクロマチン状態に最も大きな影響が出ることを見出され、更にその条件検討を行っていった。そして、父親に三日間連続で10時間の拘束ストレスを与えることにより、次世代のヘテロクロマチンに効果的に影響を及ぼすことができることを見出した。

2) その分子機構を明らかにすること

拘束ストレスが次世代のヘテロクロマチンに影響することから、以前に私が見出した dATF-2 がこの現象に関与しているものと考え、その関係を調べることにした。そのために、まず、dATF-2 のノックアウト系統の作製を試み、その作製に成功した。このノックアウト系統は、特に見だった表現型を示さず、野生型とほぼおなじに見えたが、dATF-2 ノックアウト系統に実際に拘束ストレスをかけると、次世代におけるヘテロクロマチンへの影響が全く現れないことが分かった。さらには、dATF-2 の上流因子である MEKK1 の機能欠失変異体においても、同様に拘束ストレスによる影響を見出すことが出来なかった。また、dATF-2 の発現組織を特定するために RNA in situ ハイブリダイゼーション法を用いた処、dATF-2 は精巣で非常に高く発現していることが確認された。また、実際に拘束ストレスによって、p38 のリン酸化レベルが精巣において上昇することが見出された。このような結果から、dATF-2 生殖細胞系列において、ストレス依存的なエピゲノム変化に関与していることが明らかになった。

また、親の拘束ストレスが次世代に影響するためには、ストレスの情報が生殖細胞に伝わらないといけないことから、そこには、ストレス情報を伝達する何らかの情報伝達機構があるものと考え、その解明に取り組んだ。その結果、サイトカインの1つである Upd3 が、拘束ストレス依存的に発現誘導がかかり、更には、Upd3 の発現上昇によって、次世代のヘテロクロマチン形成に影響を及ぼすことをみいだした。

このような結果から、拘束ストレスによる次世代への影響には、まず、ストレス依存的に Upd3

発現の誘導が起こり、精巣器官に伝えられ、生殖細胞系列において、p38-dATF-2 経路を介したエピゲノム変化を引き起こし、その影響が次世代に出ていることが示唆された。

3) この仕組みの生物学的意義の解明

私は、親の拘束ストレスの次世代に及ぼす影響の生物学的意義に迫るため、まず、RNA-seq 解析とメタボローム解析を行った。RNA-seq 解析の結果、親への拘束ストレスにより、約200の遺伝子の発現が上昇し、500の遺伝子発現の低下が認められた。更に、パスウェイ解析をおこなったところ、特に、拘束ストレスを受けた親由来の子において発現が減少した遺伝子群には、解糖系や TCA 回路などのエネルギー代謝経路の遺伝子が多く含まれていることが明らかになった。さらに、私は、同じように拘束ストレスを与えた親とストレス無しの親由来の次世代成虫からサンプルを調整し、メタボローム解析を行った。興味深いことに、メタボローム解析の結果からも、多くの解糖系、TCA 回路、電子伝達系などのエネルギー代謝経路の代謝産物において、顕著な変化があるということが明らかとなった。そこで、実際に ATP 産生の阻害剤であるロテノン感受性を観察した処、やはり、親の拘束ストレスにより、ロテノン感受性が亢進することがしめされた。

このような結果は、親への拘束ストレスが、次世代のエネルギー恒常性に大きな影響を与えているということを強く示唆するものであった。

4) 本研究成果を医療に繋げていくこと

本研究において、得られたように親の拘束ストレスは次世代のエネルギー代謝に影響及ぼすことが示された。そこで、エネルギー代謝に関わるような疾患との関連性を調べることにした。その1つとして、パーキンソン病の原因因子の1つである、Parkin のショウジョウバエホモログ *Park^l* の突然変異体を用いて関連性があるかどうかを検討してみた。*Park^l* は、形態的には野生型とそれほど変わりはないのだが、そのホモ個体では、高頻度で発生致死となる。そこで、この表現型が、親世代における拘束ストレスで、影響を受けるかどうかを検討したところ、実際に、致死性が回復するということが見出された。

3. 今後の展開

本研究をとうして私は、親の拘束ストレスが次世代のエネルギー恒常性に影響を与えることを見出し、その過程に p38-dATF-2 経路が関わっていることを見出した。本研究は、まず、親のストレスの遺伝の分子メカニズムについては、その多くが分かっていないなか、その一部分を明らかにしてきたことは大きな意義があると考えられる。今後の展開としては、さらに、具体的なエピゲノムの制御がどのように起こっているのかを明らかにし、ストレス応答機構、制御機構、エピゲノム状態の維持機構の理解に迫っていく必要があると考えている。また、医学的な関連性においては、今回ショウジョウバエで明らかになったような次世代への影響が、マウスなどの哺乳動物やヒトではどうなのか、dATF-2 のホモログである ATF-7 などによる制御が保存されているのかを明らかにしていく必要があると考えている。ショウジョウバエで見出された dATF-2 経路を

かいしたストレス依存的エピゲノム変化とその遺伝現象が他の動物種で保存されていることが証明されれば、医学的見地からも、本研究の推進が更に重要性を増していくものと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究では、次世代に影響が大きく出るようなストレスを探すところから開始し、なかなか困難を極めたが、拘束ストレスの実験系の確立までこぎつけたことは、重要な成果の1つだと考えている。また、強い精神的ストレスが、次世代のエネルギー恒常性に影響を与えているという結果は、社会的に見ても大きなインパクトを与えうるものと考えている。しかしながら、論文として完成するには、本研究期間内に達成できなかったことから、社会的波及効果へまだつなげることができていず、早急に論文公表するため取り組んでいかないと行けないと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

胎生期、幼児期の栄養状態が、成人になってからの生活習慣病発症に影響するという、胎児プログラミング仮説(DOHaD)は、環境ストレスがどのように生活習慣病などの発症に影響するかについての新たな視点をもたらし、注目を集めている。本研究課題では、多様な遺伝学的手法が利用でき、生活環の短いショウジョウバエを用いて、様々な環境ストレスによるエピゲノム変化が、生体の恒常性維持機構に、どのような分子メカニズムを介して、影響を及ぼすのか、また、その影響は遺伝するかどうかを明らかにすることを目指した。いくつかの環境ストレスの中で、拘束ストレスは、次世代のヘテロクロマチン状態に最も大きな影響が出ることが見出され、エネルギー恒常性に大きな影響を与えていると考えられた。更にストレス依存的に Upd3 発現の誘導が生じ、精巣器官に伝えられ、生殖細胞系列において p38-dATF-2 経路を介したエピゲノム変化を引き起こすことが確認された。今後、具体的なエピゲノムの制御がどのように起こっているのかを明らかにし、ストレス応答機構、ならびに、エピゲノム状態の維持機構を理解することが必要で、さらに、マウスなどの哺乳動物やヒトでも同様のエピゲノム変化とその世代を超えた継承が存在するか興味を持たれる。

研究費は、計画通りの予算で研究を行った。

本研究者はさがけ研究により、国際学会での発表や総説の執筆も実施しており、今後の活躍を十分に期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

投稿準備中

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(著作物)

Seong KH, Maekawa T, Ishii S. **Chapter 6** Inheritance of stress-induced epigenetic changes mediated by the ATF-2 family of transcription factors, **Stress-Induced Mutagenesis**, David Mittelman(Ed), Springer-Verlag New York Inc., 2013. 103-118.

成耆鉉、石井俊輔. 環境要因によるエピゲノム変化と記憶. **細胞工学**. 2015 年 9 月号. Vol. 34 No. 9. 879-883.

(学会発表)

Seong, KH, Ishii, S

Epigenetic inheritance caused by paternal restraint stress in *Drosophila*.

24th European *Drosophila* Research conference, 2015年11月,
Heidelberg, Germany.

Seong, KH, Ishii, S

Epigenetic change and its inheritance caused by paternal restraint stress in *Drosophila*.

Waddington Symposium Epigenetics in dialogue with THE GENOME, 2015年6月,
Edinburgh, UK.

Seong, KH

Inheritance of stress-dependent epigenetic change in *Drosophila melanogaster*
8th world congress on developmental origins of health and disease, 2013年11月, SUNTEC
Singapore

成耆鉉、石井 俊輔

Epigenetic change and its inheritance caused by paternal restraint stress in *Drosophila*

第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月、横浜

成耆鉉、石井 俊輔

Inheritance of epigenome changes induced by restraint stress in adulthood
第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月、神戸

成耆鉉、李 棟, 中邑 亮一, 石井 俊輔

ショウジョウバエにおけるストレス依存的エピジェネティック制御とその遺伝の解析
第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月、福岡