

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02158

研究課題名（和文）発達期タンパク質栄養によるシナプス伝達調節分子脳内発現と高次機能の制御機構

研究課題名（英文）Molecular basis underlying regulation of synapse-related protein expression and higher brain functions by maternal protein nutrition.

研究代表者

古屋 茂樹（Furuya, Shigeki）

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：00222274

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、母体を介した発達期タンパク質栄養制限が次世代成熟期にもたらす脳機能への影響について、行動と分子発現の両面から検討を行った。行動では、雌性制限群特異的に感覚情報フィルター機能が障害されていた。その変化に伴い大脳皮質ではmiRNAとmRNAが雌性制限群特異的に発現変化していた。生物情報学的解析により、同変化RNAについて行動変化への関与推定される生物学的過程へのエンリッチメントを検出した。さらに受容体等シナプス関連分子の発現とホルモン情報伝達経路の変化も見いだした。以上の結果より、発達期タンパク質栄養制限が成熟期行動障害と付随分子変化を導き、長期的な影響を及ぼすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、発達期タンパク質栄養制限（対照の半量）により、成熟期の感覚情報フィルター機能が雌性特異的に損なわれ、遺伝子発現変化も導くことを明らかにした。感覚情報フィルター機能障害は、統合失調症のエンドフェノタイプである。本実験では離乳後両群共に約25%タンパク質を含む同一の餌を給餌しており、さらに全期間同じ摂食量は制限していない。しかし、母体栄養に依存する期間においてのみのタンパク質制限だけでも、子宮内発達不全を誘発し、成熟期の精神疾患発症リスクを高める可能性があることを示している。すなわち巷で言われる「小さく生んで大きく育てる」は精神疾患発症の環境要因となる誤った言説であり注意が必要である。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to reveal the effects of maternal protein restriction on mature brain function of F1 generation in terms of behavioral and molecular levels. In behavior, sensory information processing function was significantly affected in the female-restricted group-specific manner. Alterations in miRNA and mRNA expressions in the cerebral cortex was accompanied with the behavioral deficit in the female-restricted group. Bioinformatics analysis detected significant enrichments of the altered RNAs in biological processes involved in behavioral changes. Changes in the expression of synapse-related molecules such as neurotransmitter receptors and in hormone signaling pathways were also detected in the female-restricted group. These results indicate that maternal protein restriction during early developmental periods leads to behavioral deficits and accompanying molecular changes in adult stages.

研究分野：分子栄養学

キーワード：発達期 タンパク質栄養 精神疾患 統合失調症 遺伝子発現 miRNA RNA-seq

1. 研究開始当初の背景

Barker が提唱する疾患発達期起源説 (DOHaD 仮説) によると、胎児期から新生児期の母体を通じた栄養摂取が正常から逸脱する状態 (低栄養, 過剰栄養) は、成熟期や次世代にまで慢性疾患発症に関わる機能変化を導く環境要因となり得る。妊娠期母体の低栄養は、子宮内発達不全による出生時低体重の主要因の一つであり、疫学研究からは出生時低体重が成人期の生活習慣病だけでなく、就学期の認知機能低下、さらには成熟期の精神疾患リスクにも影響することが報告されている (Richards et al, *BMJ*, 2001; de Bie et al, *Horm Res Pediatr*, 2010)。発達期低栄養による疾患リスク増加に係る責任栄養素と関与分子機序を同定する試みは、ラット・マウス等の実験動物を用いた栄養介入実験で行われている。特に胎児期から新生児期の母体を介した低タンパク質食給餌モデルは、子宮内発達不全と高血圧やインスリン抵抗性など成熟期生活習慣病関連症状の発症を再現し得る (Zambro et al, *J Physiol*, 2006; Brawley et al, *Pediatr Res*, 2003)。

ヒト精神疾患と発達期低栄養の関係においては、過去の飢饉時の疫学的研究から、胎児期から幼年期に飢餓による低栄養を経験することにより思春期以降の統合失調症ならびに統合失調型パーソナリティ障害発症リスクが約2倍高まること (Susser et al, *Ann NY Acad Sci*, 2008)、さらに老年期での認知機能低下が加齢と共に顕著になることも報告されている (de Rooji et al, *PNAS*, 2010)。統合失調症は遺伝要因と環境要因の相互作用により思春期以降から発症率が増加し、生涯有病率が0.7%と高い難治性精神疾患である。近年、同疾患感受性遺伝子の解析は大きく進展しているが、環境要因としての発達期の飢餓等栄養不全に掛かる分子機序の実態は不明のままである。一方で、ラット・マウスの母体低タンパク質食給餌による子宮内発達不全モデルを用いた研究から、発達期に軽度な低タンパク質栄養状態に暴露されることで、成獣期での統合失調症関連行動異常の発症、さらに自発行動の低下、不安行動、報酬行動、鬱様行動の増大等の種々の行動異常が起こり、予想外なことにこれらの行動異常は雌雄差 (性的二型性) を伴うことが示されている。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ本研究では、発達期の母体を介した軽度タンパク質栄養不全が次世代成熟期にもたらす脳機能異常について、妊娠マウスへの栄養介入実験により次世代個体の子宮内発達不全を誘発し、成熟期における脳機能に及ぼす影響について行動と分子発現変化から明らかにすることを目的とした。特に統合失調症に特徴的なエンドフェノタイプである感覚情報フィルター機能の変化と、その分子的基盤としてのシナプス伝達調節分子群と関連情報伝達系の発現異常との機能的連関に着目し、網羅的発現解析手法を組み合わせることで発達期の母体タンパク質栄養が次世代成熟期脳高次機能維持に果たす役割に係る新規知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

1) 栄養介入実験

5週齢雌性 DBA/2J/Jcl および6週齢雄性 C57BL/6J/Jcl を日本クレア株式会社から購入した。動物実験施設 (コンベンショナル) 搬入後に3週間馴化飼育を行った。その後交配開始時より、対照群には AIN93G 組成標準飼料 (ND 群) を、タンパク質制限群 (RD 群) には AIN93G の組成に準拠し、カゼイン含量を AIN93G 標準組成の半量である10%に下げ、AIN93G と等カロリーとなるようショ糖含量を調整した。なお、飼料の製造および滅菌処理 (γ 線照射) はオリエンタル酵母工業株式会社に委託した。4日間の交配期間後は雌のみ分離前と同ケージ・同給餌条件で飼育し、F1 マウス離乳時まで継続した。F1 マウスは出生後4週齢で離乳および雌雄分離を行った。離乳後 F1 マウスは両群ともに未精製原料からなる市販固形ペレット (CE-2; 日本クレア株式会社) を給餌した。上記の給餌においては、全期間を通じて自由摂食させ飲水量についても制限を

行わなかった。

2) 行動試験

F1 世代マウスを 10 週齢で尾懸垂試験 (BIOSEB, Vitrolles, France), 11 週齢でプレパルス抑制試験 (Panlab /Harvard Apparatus, USA) に供した。各試験は instruction manual に従い実施した。

3) 分子発現解析

行動試験後に安楽死させた個体から脳を取り出し、大脳皮質、前頭前野、海馬、線条体、視床下部、脳幹、小脳を取り出し超低温冷凍庫 (-80°C) で凍結保存した。それらについてモノアミン分析, mRNA 発現解析 (qRT-PCR), ウェスタンブロッティング, miRNA マイクロアレイ解析, 次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行った。雌性前頭前野 total RNA を miRNA マイクロアレイ (Agilent SurePrint G3 Mouse miRNA 8×60K) へ、雌性大脳皮質 total RNA を RNA-seq に供した。データ取得は業者 (セル・イノベーター社, 福岡市) に委託した。miRNA の target 遺伝子は, miRDB (<http://mirdb.org/>), RNA-seq の発現データは Mev (<https://sourceforge.net/projects/mev-tm4/>), DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) および Ingenuity Pathway Analysis (IPA: QIAGEN) を用いて主成分分析, Heatmap, エンリッチメント解析等を行った。モノアミン分析, mRNA 発現解析 (qRT-PCR) ウェスタンブロッティングは当研究室の既報に従って行った。

4. 研究成果

本課題は、発達期タンパク質栄養不全が成熟期の統合失調症関連行動異常を惹起する可能性を評価することが検討項目の一つであるが、課題実施期間 (2018. 4 月~2022. 3 月) の初年度 2018 年 8 月に代表者の所属する学部・大学院のキャンパス移転が実施された。それに伴い新キャンパスでは、実験動物飼養保管施設が部局内に新設された。同施設は移転前と同じコンベンショナルグレードであるが、飼養環境は以下の項目が移転前と異なっていた。

- (1) 設定室温は移転前と同様に 23°C に設定されているが湿度制御が集中管理ではない飼育室単位での調節となり、夏季には除湿機、冬季は加湿を行ったが年間を通じて湿度が変動した。
- (2) 照明設備は光源が LED となり移転前よりも飼育室内の照度が明るくなった。
- (3) 給餌飼料について新施設では搬入に際して滅菌処理が必須となった。移転前は給餌する AIN93G および同準拠のタンパク質制限餌は自作していた。新施設では餌の滅菌が可能な滅菌装置を保有していないため、委託製造企業 (オリエンタル酵母) に外注して γ 線滅菌を行った。そのため成分組成は変更していないが、委託先での各成分の供給メーカーや品番は開示されていないため、性状等は完全に同一ではなくなった。
- (4) 研究棟実験室内に新たに設置された動物実験室で行動試験を実施した。測定装置は更新・変更していないが、測定環境 (照度, 湿度等) は厳密には同一ではない。

以上の飼育環境の変化は実験結果の再現性に影響を及ぼす可能性があった。そのため、移転後まず行動試験と分子発現の再現性確認を行った。

1) 子宮内発達不全及び生後発達遅滞

新施設での母体を通じた胎児期と新生児期のタンパク質制限により、次世代個体は雌雄ともに 4 週齢の離乳時に RD 群個体の体重は ND 群よりも有意に軽量であった。しかし 10 週齢では雌雄ともに両群間で体重に有意差はなく、解剖後測定した脳重量にも違いは認められなかった。移転前には離乳の段階では雌雄ともに両群間の体重に変化は観察されなかったことから、飼育環境の違いが何らかの影響を及ぼしていると推定された。しかし移転前も出生直後は雌雄ともに RD 群が低体重であったことから、4 週齢での RD 群の低体重は母体を通じたタンパク質栄養不全により、子宮内発達不全 (IUGR) および生後の成長遅滞を反映していると考えられた。

2) 行動解析

生後 11 週齢において感覚情報フィルター機能を評価するプレパルス抑制試験を行った。その結果、雌性 RD 群が ND 群に対してプレパルス抑制が全体的に低下しており、予備刺激が高い場合に有意なプレパルス抑制の低下を確認した。雄性個体は両群で同程度の抑制が検出されたことから、雌性 RD 群に特異的な現象であった。この結果は移転前の結果を再現していた。また、うつ様行動を評価する尾懸垂試験も実施し、雌性 RD 群に不動時間が長い傾向を認めた。以上の行動試験結果より、母体を介した発達期タンパク質栄養制限が次世代雌性特異的に行動障害を誘発する環境要因となり得ることが明らかとなった。

3) 分子発現

雌性 RD 群特異的な行動障害に伴い脳内で発現が変化する分子として、移転前の実験結果よりシナプス後部に局在し Ca^{++} シグナルを制御する Neurogranin (NRGN) について mRNA およびタンパク質レベルでの減少を観察していた。NRGN は甲状腺ホルモン (T3) 受容体の標的遺伝子であり、その発現量低下は認知機能の低下を伴う (Miyakawa et al, *Hippocampus*, 2001)。また、他の T3 受容体標的遺伝子についても雌性 RD 群大脳での mRNA 発現減少を観察していた。そのため、移転後の実験で得た脳サンプルについて NRGN および T3 受容体標的遺伝子の発現変化を検討した。新施設での実験により得た脳サンプルでも、NRGN タンパク質は雌性 RD 群大脳皮質で対照群よりも減少していた。しかし雄性 RD 群でも同様に減少しており、雌性特異性が消失していた。さらに qRT-PCR では雌雄共に群間で mRNA の相対発現量に違いは認められなかった。また、他の T3 受容体標的遺伝子についても qRT-PCR で検討したところ、1 遺伝子のみ雌性 RD 群特異的に発現低下していたが、他は群間で発現量に変化を認めなかった。そのため、雌性 RD 群特異的な行動表現型への NRGN を含む T3 受容体標的遺伝子の関与は低いと判断した。一方で種々の神経伝達物質受容体/神経栄養因子/ホルモン下流で活性化されるキナーゼ Akt についても、移転前には雌性 RD 群特異的なリン酸化レベルの低下を見いだしていた。新施設で得たサンプルでも雌性 RD 群特異的な同リン酸化の減少が確認できた。Akt の遺伝子変異はプレパルス抑制障害を惹起することから (Bergeron et al, *Front Mol Neurosci*, 2017)、行動表現型への関与が推定された。さらにモノアミン定量解析から、制限群脳の複数領域でのセロトニンの代謝変化を検出した。以上の分子発現解析から、行動表現型に関わる分子機序としての遺伝子発現変化の把握について、移転後の脳サンプルを用いて再度網羅的解析を実施する必要があると判断した。

脳内遺伝子発現変化を全ゲノムスケールで理解することを目的に、RNA-seq 解析と miRNA 発現解析を行った。いずれも雌性大脳皮質を用いた。RNA-seq 解析からは約 460 遺伝子の発現変化が検出された。それらの発現変化遺伝子 (DEGs) は主成分分析 (PCA) で明瞭に分離し (図 1)、ヒートマップからも ND および RD 群は異なる発現プロファイルを持つことが示された (図 2)。DEGs について DAVID にてエンリッチメント解析を行ったところ、response to estradiol, aging, regulation of calcium ion-

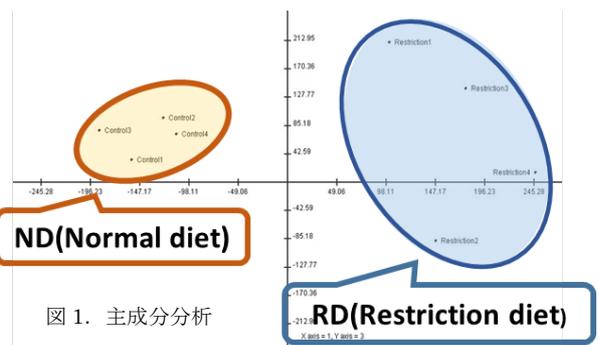
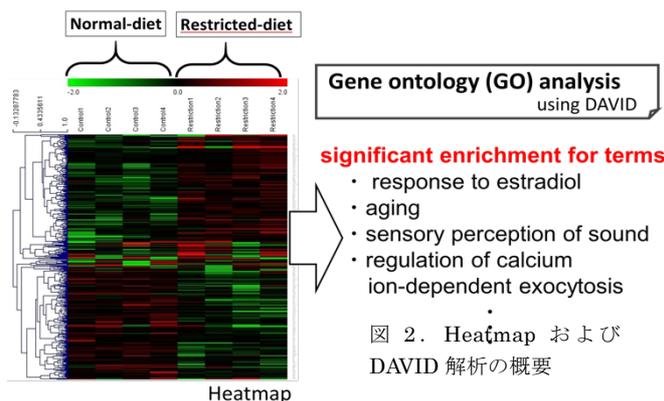


図 1. 主成分分析



dependent exocytosis, sensory perception of sound 等の雌性 RD 群特異的な行動表現型との関連が推定される生物学的過程の有意なエンリッチメントが同定された。これらの構成遺伝子について、現在 qRT-PCR による発現解析を行っている。また、DEGs について個別の発現データから行動表現型への寄与が推定される分子を抽出し、その関連分子も含めた qRT-PCR による発現からは、複数のセロ

トニン受容体遺伝子について雌性 RD 群特異的な発現変化が大脳皮質で検出され、それらの変化は行動表現型と矛盾しない方向であった。さらに社会性行動制御への寄与が推定され、そのシグナル異常と精神疾患との連関が示唆されている神経ペプチドホルモン X について、雌性 RD 群大脳皮質での発現低下傾向ならびに雄性 RD 群での増加傾向を見いだした。さらに X の受容体について、雄性 RD 群視床下部で顕著に発現増加しており、雌性 RD 群での X シグナル減弱に対して雄性 RD 群ではその増強が起こり、行動表現型の違いを生じている可能性が示唆された。RNA-seq に並行して機能性 RNA として遺伝子発現制御に関わる miRNA について、雌性 RD 群で発現変化している分子の同定を目的にマイクロアレイ解析を行い、雄性で発現変化せず、雌性 RD 群のみで発現減少している分子 Y を見いだした。その標的 mRNA についても発現解析を行い、全てではないが複数の標的 mRNA 分子が雌性 RD 群特異的に発現増加していることを確認した。現在これらの分子発現変化について、Akt 活性変化や行動表現型との関連を検討している。

本課題は申請時、キャンパス移転前の実験で得られた行動表現型と分子発現に係る知見を基に立案された。申請時にはシナプス伝達関連分子である NRGN の発現変化を基軸とした解析を計画していた。しかし上述のように、移転後の動物実験環境や使用する飼料について移転前との違いが明白であったため、計画の前半は実験結果の再現性確認を最優先事項とした。その結果、本計画の根幹を成す感覚フィルター情報機能障害を呈す行動表現型や分子発現変化の中核となる Akt キナーゼのリン酸化について、発達期タンパク質制限による雌性特異的な変化を再現できた。一方で、NRGN を含む分子発現変化については移転前の実験結果と一致しない例が散見された。そのため、行動表現型により近い分子変化の同定を目的に RNA-seq や miRNA 解析を取り入れた。その結果からは行動表現型への関連が推定される遺伝子および miRNA について変化を検出した。また、これらの解析から明らかになったことは、RD および ND 群間で脳重量に差がない成熟期においても、過去の発達期タンパク質制限が雌雄で異なった成熟期における脳内遺伝子発現変化を誘発していることである。個々の遺伝子発現について 2 倍以上または 0.5 倍以下となる顕著な変化は少ないが、神経伝達に関わる多く分子についての僅かな発現変化の総体として行動に影響を及ぼす可能性も分子機序の実態として想定する必要がある。さらにそれらの発現変化は領域特異的を示す傾向があり、今回 RD 群大脳皮質で性的二型性を呈す発現変化が同定された遺伝子の多くは、海馬においては変化してない例が多く、一部は逆方向に変化していた。発達期タンパク質栄養制限が成熟期雌性の感覚情報フィルター機能に及ぼす負のインパクトの実態を理解するためには、分子発現変化の性的二型性および領域特異性が起こる機序について、今後さらなる研究が必要であると考えられた。本課題で得られた成果は現在取りまとめを行っており、学会発表および原著論文投稿を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 椛島 奈津美, 古屋 裕美, 北野 楽, 古屋 茂樹
2. 発表標題 発達期タンパク質制限は成熟期の行動異常と脳内モノアミン神経伝達システム異常を誘発する.
3. 学会等名 2020年度日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北野 楽, 椛島 奈津美, 渡邊 貴美, 最上 侑佑盛, 日比 亜佑実, 古屋 茂樹
2. 発表標題 発達期タンパク質栄養制限による成熟期脳内神経伝達機能異常.
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本 咲希, 松元 沙樹, 古屋茂 樹
2. 発表標題 齧歯類の標準飼料は脳の神経伝達物質代謝、遺伝子発現、行動に異なる影響を及ぼす.
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本 咲希, 松元 沙樹, 古屋茂 樹
2. 発表標題 齧歯類の標準飼料は脳の神経伝達物質代謝、遺伝子発現、行動に異なる影響を及ぼす.
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会オンライン大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北野 楽, 椛島 奈津美, 渡邊 貴美, 最上 侑佑盛, 日比 亜佑実, 古屋 茂樹
2. 発表標題 発達期におけるタンパク質栄養制限は成熟期脳内神経伝達シグナル系の発現・機能異常を惹起する
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北野 楽, 椛島 奈津美, 渡邊 貴美, 最上 侑佑盛, 日比 亜佑実, 古屋 茂樹
2. 発表標題 発達期タンパク質栄養制限による成熟期脳内神経伝達機能異常
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北野 楽, 名井 典乃子, 日比 亜佑実, 最上 侑佑盛, 古屋 茂樹
2. 発表標題 発達期低タンパク質栄養による次世代成熟期脳内神経伝達物質代謝異常
3. 学会等名 日本アミノ酸学会第12回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北野 楽, 名井 典乃子, 日比 亜佑実, 最上 侑佑盛, 古屋 茂樹
2. 発表標題 発達期低タンパク質栄養による次世代成熟期神経伝達物質代謝およびシグナル伝達の異常
3. 学会等名 日本農芸化学会 2018 年度西日本支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北野 楽, 名井 典乃子, 日比 亜佑実, 最上 侑佑盛, 古屋 茂樹
2. 発表標題 発達期低タンパク質栄養は次世代成熟期脳神経系における神経伝達物質代謝とそのシグナル伝達の異常を惹起する
3. 学会等名 第55回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古屋 裕美, 北野 楽, 椛島 奈津美, 古屋 茂樹
2. 発表標題 発達期タンパク質栄養制限は成熟期脳内miRNAと標的神経情報伝達関連遺伝子の発現を変化させる
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会 (オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古屋 裕美, 北野 楽, 椛島 奈津美, 安田 時生, 古屋 茂樹
2. 発表標題 発達期低タンパク質栄養による次世代成熟期の脳内遺伝子発現解析
3. 学会等名 令和3年度 (2021年度) 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会 (オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古屋 裕美, 椛島 奈津美, 古屋 茂樹
2. 発表標題 発達期低タンパク質栄養による次世代個体脳内miRNAおよび標的神経伝達関連遺伝子の発現異常
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部 2021年度合同鹿児島大会 (オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高鍋 莉紗子, 古屋 裕美, 梶島 奈津美, 北野 楽, 古屋 茂樹
2. 発表標題 発達期タンパク質栄養制限は成熟期脳内セロトニン代謝と受容体遺伝子の発現を変化させる
3. 学会等名 第59回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------