

令和 5 年 5 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K19351

研究課題名（和文）先天異常を引き起こす母体の加齢効果を小型魚類でモデル化する

研究課題名（英文）Modeling Maternal Aging Effects That Cause Congenital Anomalies Using Small Fish

研究代表者

鈴木 誠（Suzuki, Makoto）

広島大学・両生類研究センター・助教

研究者番号：10533193

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、母体年齢を先天異常の発症に寄与する環境因子の1つと捉え、新規モデルの開発を通じてその影響を分子レベルで解明することを目指した。その結果、モデル脊椎動物のゼブラフィッシュとネッタイツメガエルで母体年齢が胚発生に与える影響を体系的に解析する実験系を構築した。また適齢ではないネッタイツメガエルの雌に由来する胚が重篤な発生異常を示すことを明らかにし、それに付随した遺伝子およびタンパク質の発現変動を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胚発生は常に多様な環境因子の影響にさらされている。それらの環境因子は時として重篤な先天異常を引き起こすが、その詳細なメカニズムは未だ明確でない。本研究でモデル化された母体年齢が胚発生に与える影響に関する研究成果は、胚発生における遺伝子-環境相互作用の分子基盤の解明という基礎生物学な意義に加え、母体の高齢化が先天異常にもたらす影響の理解にも繋がり、出生率の改善を目指した生殖医療の発展へと貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we considered maternal age as one of the environmental factors that cause congenital abnormalities and aimed to elucidate its effects at the molecular level by developing new models. As a result, we developed an experimental model to systematically analyze the effects of maternal age on embryonic development using zebrafish and *Xenopus tropicalis* as model vertebrates. We also found that embryos from *X. tropicalis* females of unsuitable age showed severe developmental abnormalities and identified associated gene and protein expression changes.

研究分野：発生生物学

キーワード：初期発生 ゼブラフィッシュ ネッタイツメガエル 環境因子 背腹軸 前後軸

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現代社会では、ヒトの胚発生は常に多様な環境因子の影響にさらされている。例えばアルコールとタバコの煙は、脳組織の低形成、流産、そして新生児の死亡率の増加といった問題を引き起こしうる、広く認識されるリスク因子である。また、葉酸の欠乏や抗てんかん薬のバルプロ酸は、1,000-2,000 件の出産に 1 例という割合で中枢神経系の先天異常や神経管閉鎖障害を引き起こす可能性がある。これらの環境因子が遺伝子との複雑な相互作用 (**Gene-Environmental Interaction**) を経て先天異常を引き起こす可能性は、主に疫学調査の結果から明らかになってきた。しかし、その詳細なメカニズムは未だ明確でない。

### 2. 研究の目的

母体の高齢化は、繁殖成功率に重大な影響を与えるリスク因子の一つである。母体年齢の胚発生に対する影響は、特に哺乳類においては、卵母細胞の染色体分離異常に起因する染色体異常を通じて説明されることが多い。しかしながら、母体の高齢化に伴う先天異常の発症率には、染色体異常を伴わないケースも存在する。これは、年齢に依存した母体特性の変化が子の発生と発達に複雑な様式で影響を及ぼす可能性を示している。これらを踏まえ、本研究の目的は、母体年齢を先天異常の発症に寄与する環境因子の 1 つと捉え、新規モデルの開発を通じてその影響を分子レベルで解明することとした。

### 3. 研究の方法

異なる年齢の雌のゼブラフィッシュおよびネッタイツメガエルから未受精卵を得て、精子懸濁液を用いた人工授精により胚を得た。得られた胚は定められた温度で飼育し、原腸胚期、尾芽胚期でサンプリングし、形態解析とトランスクリプトーム解析に用いた。プロテオーム解析には未受精卵を用いた。採取した卵巣の一部から QIAGEN RNeasy MiniKit で Total RNA を抽出後、Illumina TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit でライブラリーを調整し、Illumina 社シーケンサーでトランスクリプトーム解析を実施した。未受精卵と原腸胚については同様に QIAGEN RNeasy MiniKit で Total RNA を抽出後、NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina でライブラリーを調整し、NovaSeq6000 でトランスクリプトーム解析を実施した。得られたトランスクリプトームデータはフィルジェン社の CLC Genomics Workbench で解析し発現変動遺伝子を得た。

### 4. 研究成果

(1) 母体年齢が胚発生に与える影響を体系的に解析する実験系を構築した。ゼブラフィッシュに関しては、異なる年齢の野生型系統と変異体系統を適切な規模で飼育可能で且つ安価に構築できる飼育システムを作成し、長期的な親魚の飼育を可能にする基盤を確立した。また、卵細胞の生存や極性形成に必須である細胞内構造のバルビアニ小体に着目し、バルビアニ小体が豊富に含むミトコンドリア等の染色法を応用することにより、バルビアニ小体の母体年齢に依存した形態の変化を可視化することが可能になった。

(2) 当初計画していたゼブラフィッシュに加えて、別の水棲脊椎動物のモデル生物ネッタイツメガエルを用いた解析を実施し、母体年齢に依存した体軸形成の異常の存在を明らかにした。材料は、ゲノム解読プロジェクトに用いられた Nigerian A 系統を選定した。Nigerian A 系統の適齢および若齢の雌から採取した未受精卵に適齢の雄から採取した精子を反応させることで胚を得て、その胚の発生を尾芽胚期まで経時的に解析した。その結果、得られた胚は母体年齢に依らず卵割期や原腸胚期においては明確な異常は示さず正常に発生した一方、若齢の雌から得た胚は尾芽胚期において眼や脳を含む頭部前側構造の形成不全を示した。前側形成不全の程度は、1 個体ごと及び同腹個体集団ごとの両方において差が認められた。重度の影響が生じた胚では前側構造を完全に欠損し、軽度の影響が生じた胚では眼の縮小を示した。この頭部前側の発生異常は、尾芽胚期初期に最も早期に認められた。前側形成不全の発生率は適齢の雌から得た胚では十分に低かったことから、前側形成不全の発生率と程度は母体年齢の影響を強く受けることが示された。

(3) 卵巣トランスクリプトームから、加齢に伴う卵中の遺伝子発現変動を明らかにした。2 つの異なる系統の 4 段階の年齢の個体から卵巣サンプルを調整して RNA-seq を実施して解析データ (サンプルあたりのデータサイズは 3.7-5.9 Gb) を得て、卵形成過程での年齢の変化による遺伝子発現量の変化について検証した。その結果、適齢の雌の卵巣と比較して、高齢の雌の卵巣では、微小管の動態制御、タンパク質分解、ミトコンドリア、カルシウムシグナルに関与する遺伝子の発現が上昇していることが明らかになった。これらの遺伝子と年齢効果を機能的に関連付けることで、加齢に伴い卵の性質が変化する過程の理解に繋がると期待される。

(4) 個体数が豊富な若齢個体を用いたトランスクリプトームおよびプロテオーム解析から、加齢に伴う卵中の遺伝子およびタンパク質発現変動を明らかにした。若齢および適齢の雌から得た未受精卵に由来する胚の尾芽胚期における体軸形成を指標としたスコアリングによって、各年齢群における母体年齢の効果を評価した。また、未受精卵と原腸胚を用いた mRNA-seq とプロテオーム解析を実施し、発現変動遺伝子・タンパク質群を得た。GO エンリッチメント解析の結果からは転写、翻訳、細胞分裂、代謝等、細胞の基本機能に関わる GO が多く検出された。このことは母体年齢の違いにより細胞および胚発生に関与する多岐に渡る遺伝子の発現動態が変化することを示唆している。これらの候補分子の機能を検証することにより、脊椎動物において母体年齢が胚発生に与える影響の解明が期待される。

以上の解析結果により、母体年齢が水棲脊椎動物の胚発生に与える影響を理解するための重要な基礎情報が得られた。特に、異なる年齢での遺伝子発現の変動や体軸形成の異常が観察されたことは興味深く、母体年齢によって遺伝子の発現動態に変化が生じ、それが胚発生に影響を与える可能性があることを示唆している。

今後の展望として、同定された候補遺伝子の機能を詳しく解析し、母体年齢が胚発生に及ぼす影響のメカニズムをさらに明らかにすることが重要である。また、他の水棲脊椎動物種やさらに幅広い生物種における母体年齢効果の比較を通じても新たな知見が得られることが期待される。さらなる研究の展開により、胚の発生や成長における母体年齢の重要性やそのメカニズムについての理解が進むことが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tanouchi Mikio, Igawa Takeshi, Suzuki Nanoka, Suzuki Makoto, Hossain Nusrat, Ochi Haruki, Ogino Hajime	4. 巻 64
2. 論文標題 Optimization of CRISPR/Cas9 mediated gene disruption in <i>Xenopus laevis</i> using a phenotypic image analysis technique	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth and Differentiation	6. 最初と最後の頁 219 ~ 225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12778	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki, M., Igawa, T., Suzuki, N., Ogino, H. and Ochi, H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Spontaneous neoplasia in the western clawed frog <i>Xenopus tropicalis</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 microPublication Biology	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17912/micropub.biology.000294	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kinoshita Noriyuki, Hashimoto Yutaka, Yasue Naoko, Suzuki Makoto, Cristea Ileana M., Ueno Naoto	4. 巻 30
2. 論文標題 Mechanical Stress Regulates Epithelial Tissue Integrity and Stiffness through the FGFR/Erk2 Signaling Pathway during Embryogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3875 ~ 3888.e3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.02.074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Harris A., Siggers P., Corrochano S., Warr N., Sagar D., Grimes D.T., Suzuki M., Burdine R.D., Cong F., Koo B-K., Clevers H., Stevant I., Nef S., Wells S., Brauner R., Ben R.B., Belguith N., Eozenou C., Bignon-Topalovic J., Bashamboo A., McElreavey K., Greenfield A.	4. 巻 115
2. 論文標題 ZNRf3 functions in mammalian sex determination by inhibiting canonical WNT signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 5474 ~ 5479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1801223115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yokoyama Hitoshi, Kudo Nanako, Todate Momoko, Shimada Yuri, Suzuki Makoto, Tamura Koji	4. 巻 60
2. 論文標題 Skin regeneration of amphibians: A novel model for skin regeneration as adults	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 316 ~ 325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12544	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 井川 武, 鈴木 誠, 鈴木菜花, 柏木昭彦, 柏木啓子, 荻野 肇
2. 発表標題 ネッタイツメガエル近交系4系統のゲノム固有性に由来する形態的差異について
3. 学会等名 第14回日本ツメガエル研究集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Igawa, T., Suzuki, M., Suzuki, N., Kashiwagi, A., Kashiwagi, K., Ochi, H. and Ogino, H.
2. 発表標題 Morphological and behavioral characteristics of <i>Xenopus tropicalis</i> inbred strains in NBRP
3. 学会等名 18th International <i>Xenopus</i> Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井 理央奈, 鈴木 誠, 鈴木 菜花, 荻野 肇
2. 発表標題 ツメガエル幼生における終脳再生の初期過程の三次元形態解析
3. 学会等名 第92回日本動物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 誠, 井川 武, 柏木昭彦, 柏木啓子, 古野伸明, 鈴木菜花, 田澤一朗, 高瀬 稔, 三浦郁夫, 鈴木 厚, 花田秀樹, 中島圭介, 彦坂 暁, 越智陽城, 加藤尚志, 森 司, 荻野 肇
2. 発表標題 ネッタイツメガエルの遺伝学・ゲノム科学的リソース基盤の形成とその活用
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 真菜、川崎 詩織、坂口 裕介、鈴木 菜花、鈴木 誠、荻野 肇
2. 発表標題 ツメガエル再生尾部における脊髄特異的な遺伝子発現誘導系の構築
3. 学会等名 日本動物学会中国四国支部広島県例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 誠, 井川 武, 鈴木 菜花, 越智陽城, 荻野 肇
2. 発表標題 両生類研究センターにおけるトランスジェニックツメガエルの開発と収集
3. 学会等名 第13回日本ツメガエル研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Igawa, T., Suzuki, M., Suzuki, N., Kashiwagi, A., Kashiwagi, K., Ochi, H. and Ogino, H.
2. 発表標題 Generation of <i>Xenopus tropicalis</i> inbred strains and their genome polymorphism data by NBRP in Japan
3. 学会等名 Xenopus Resources and Emerging Technology Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki, M., Inoue, Y. & Ueno, N.
2. 発表標題 Mechanical regulation of folding and tubulogenesis of Xenopus neural plate
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 誠
2. 発表標題 脳の発生からみる上皮組織の折りたたみと管形成の力学制御
3. 学会等名 第41回日本バイオレオロジー学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Suzuki, M., Yasue, N. & Ueno, N.
2. 発表標題 Mechanical regulation of closing movement and morphology of Xenopus neural tube
3. 学会等名 17th International Xenopus conference（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Suzuki, M.
2. 発表標題 Mechanical regulation of epithelial folding and tubulogenesis of neural tube
3. 学会等名 12th GfE School “Imaging and Modeling Development”（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 誠, 上野 直人
2. 発表標題 神経管の閉鎖運動と形状決定の力学制御
3. 学会等名 第12回日本ツメガエル研究集会・第4回次世代両生類研究会合同シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 誠
2. 発表標題 神経管の閉鎖運動と形状決定の力学制御
3. 学会等名 日本発生物学会秋季シンポジウム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 誠、井川 武、鈴木 菜花、加藤 陽菜子、欧 語詩、辻本 貴行、黒坂 寛、林 利憲、荻野 肇
2. 発表標題 NBRPツメガエル・イモリとツメガエルを用いたヒト疾患研究
3. 学会等名 第93回 日本動物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 欧 語詩、鈴木 誠、成瀬 清、笹倉 靖徳、Paix Alexandre、荻野 肇
2. 発表標題 ツメガエルにおけるCRISPR/Cas9と長鎖一本鎖DNAを用いた簡便な遺伝子ノックイン
3. 学会等名 第93回 日本動物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田 真菜、川崎 詩織、坂口 裕介、鈴木 菜花、鈴木 誠、荻野 肇
2. 発表標題 ツメガエルにおける至適Tet-0n システムの開発
3. 学会等名 第93回 日本動物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤 陽菜子、鈴木 誠、荻野 肇
2. 発表標題 ツメガエルにおける母体年齢が胚発生に与える影響の解析
3. 学会等名 令和4年度 日本動物学会中国四国支部広島県例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田 真菜、川崎 詩織、坂口 裕介、鈴木 菜花、鈴木 誠、荻野 肇
2. 発表標題 至適化されたツメガエル用のTet-0nシステムは神経特異的な遺伝子発現を誘導できる
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
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			
米国	プリンストン大学			
ドイツ	EMBL Heidelberg			