

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591603

研究課題名(和文)胎児組織に着目した成人疾患発症の分子基盤の解明

研究課題名(英文)Elucidating molecular basis of adult disease development by examining fetal tissues

研究代表者

RAK WAL RANDEEP (Rakwal, Randeep)

筑波大学・教育イニシアティブ機構・教授

研究者番号：70590850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠期低栄養暴露マウス胎児脳の遺伝子発現をDNAマイクロアレイ法で解析した結果、低栄養暴露により自閉症や肥満に関わる遺伝子の発現の変化が確認された。さらに2D-DIGE法を用いたプロテオーム解析では低栄養暴露で発現量が変化する15個のタンパク質を同定した。発現量が減少した13個のうち5個はmRNAの安定性やスプライシングの正確性を高める働きがあるRNA結合タンパク質であった。以上のことから妊娠期低栄養暴露によりマウス胎児脳において精神疾患や成人病に関わる遺伝子の発現が変化したり、RNA結合タンパク質が減少することによりmRNAの安定性やスプライシングの正確性が低下している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our results based on global gene expression analysis using DNA microarray revealed differential gene changes after maternal undernutrition, suggesting undernutrition influences mRNA expression of numerous genes including those that might be involved with neurodevelopmental disorders like autism or diabetes. Utilizing another complementary high-throughput omics approach, namely proteomics (2D-DIGE), we identified 15 differentially expressed proteins whose expression levels changed by undernutrition. Among 13 majorly down-regulated proteins, 5 proteins whose abundance decreased were identified as RNA interacting proteins, reported to be involved in enhancing stability of mRNA and accuracy of splicing. We believe that maternal undernutrition influenced mRNA stability and accuracy of splicing by a change in gene expressions along with decreased expression of RNA interacting protein in fetal brain, and which might result in psychiatric disorders and lifestyle-related diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、胎児・新生児医学

キーワード：Dohad マイクロアレイ プロテオーム 脳 低栄養

## 1. 研究開始当初の背景

英国の Barker らを中心とする一連の疫学研究により、成人期に発症する多くの疾患の原因が胎生期の環境にあるとする DOHaD (Developmental Origins of Health and Diseases) 説が近年提唱されるようになった (Barker; J Intern Med 2007;261: 412-7)。これらの疫学研究は出生時の低体重 ( $2.5\text{kg} <$ ) と成人期の高血圧、心血管疾患ならびに 2 型糖尿病の発症リスクとの関連を明らかにしてきたが、最近では出生時低体重が注意欠陥多動性障害とうつといった精神疾患にも関与することが報告されている。日本国は OECD 加盟国のなかで 2 番目に出生時低体重児の出生率が高く、うつ病は生活習慣病とともに国民病と言われる疾患の一つであり、出生時低体重児の増加を追う様に近年増加している。DOHaD 説に基づき胎児環境に着目した研究はうつ病の原因究明と治療に新たな道を開く可能性が考えられ、さらに近年問題視されつつある子供のうつに関する機序や初期マーカーの発見につながる可能性も期待できる。本研究により精神疾患の原因因子を同定することは、うつ病の根本治療につながる薬剤開発ならびに有用な予防法の開発低体重児の精神疾患発症リスク低減のためにも重要なことと思われる。

## 2. 研究の目的

本研究では Developmental Origins of Health and Diseases (DOHaD) 説に基づき、うつ病誘発の妊娠期低栄養暴露の胎児脳(うつ誘発脳)をマウスで作成し、DNA アレイ解析およびプロテオーム解析を行い、うつ病発症に関与する候補遺伝子群およびタンパクを低栄養暴露胎児脳から同定する。

## 3. 研究の方法

C57BL/6J 妊娠マウスに自由摂取群の摂取量に対し 50% の給餌制限を妊娠 10 日より 18 日の解剖日まで行い、対照群は自由に餌を摂取させた。妊娠 18 日の午前に帝王切開により胎児を取り出し、性別判定、胎児体重を測定した後すみやかに胎児脳をサンプリングし、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。この胎児脳よりトータル RNA を抽出し DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。さらに同じ胎児脳サンプルからタンパク質を抽出して 2D-DIGE 法によるプロテオーム解析を行い、発現に変化があったスポットは LC-MS/MS 解析によりタンパク質同定を行った。

## 4. 研究成果

### [トランスクリプトーム解析]

#### (1)DNA マイクロアレイによる遺伝子発現

低栄養暴露胎児脳の遺伝子発現解析を行い、低栄養暴露により発現が変化した遺伝子について解析した。妊娠期低栄養暴露により発現量が 1.5 倍以上増加した遺伝子プローブ数は 1213 個、発現量が 0.75 倍以下に減少したのは 1168 個であった。

#### (2)カテゴリー解析

これらマイクロアレイ解析で得られた遺伝子リストのカテゴリー解析を行った。カテゴリー解析は QIAGEN 社の PCR-array の遺伝子データを基に、カテゴリー分類した。発現増加、減少で共に G タンパク質共役受容体と分子毒性関連の遺伝子が多かった。さらに発現増加では血管形成、mTOR シグナル伝達、発現減少ではリポプロテインシグナル伝達、神経伝達物質受容体、小胞体ストレス応答関連のカテゴリーがそれぞれ上位となった。

#### (3)IPA 解析

マイクロアレイ解析で得られた遺伝子リストの IPA (Ingenuity pathway analysis) 解析では上位 6 つのパスウェイは、遺伝病、代謝病、結合組織疾患、発達障害、神経系発達機能、翻訳後修飾、細胞間シグナル伝達、炭水化物代謝、癌、細胞死、精神障害、神経疾患、骨格・筋疾患になった。GABA 受容体遺伝子 GABRR2, GABRA2 や体内時計関連のホルモン合成に関与する遺伝子 AANAT、肥満関連のレプチン受容体 Lepr、様々な疾患に関与する mTOR など自閉症や肥満に関わる遺伝子については再度サンプリングした低栄養暴露胎児脳を用いた RT-PCR 法による発現解析を個別別に行ったところ、再現性が確認できた。

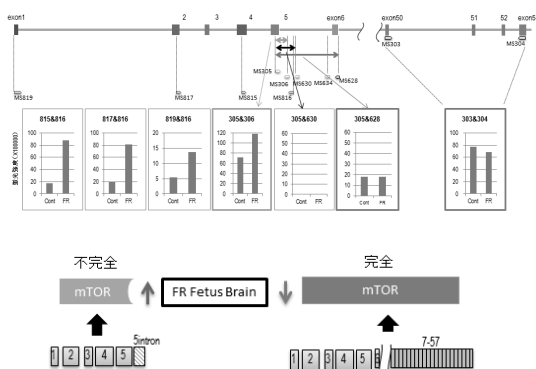
IPA 解析による遺伝子発現変化がもたらす影響予測の一つにメラトニン増加があった。メラトニンは催眠・生体リズムに関与し、精神疾患、生活習慣病、発癌の予防に効果があるとも言われている。今回の結果からメラトニン合成遺伝子である AANAT は低栄養暴露により発現量が増加することが確認されたことから、LC-MS/MS 法による低栄養暴露胎児脳のメラトニン定量を行った。結果は予想に反し、低栄養暴露胎児脳においてメラトニン量は低下していることが確認された。AANAT 遺伝子はメラトニン合成の律速遺伝子といわれているが、今回の実験では AANAT 遺伝子が低栄養により発現が促進されているにもかかわらず、実際の胎児脳ではメラトニン量は低栄養で減っていた。AANAT はリン酸化により安定化するが、リン酸化しないものは分解するとの報告がある。よって今後は低栄養暴露胎児脳での AANAT のリン酸化についても確認していきたい。

#### (4)mTOR 遺伝子の解析 (図 1)

今回のマイクロアレイ解析の結果で、特に発現が増加する遺伝子のプローブを調べるとエキソン部分ではなくイントロン部分に位置するものが多く確認された。その中の mTOR 遺伝子について調べてみると、発現が増加しているプローブはエキソン 5 とエキソン 6 の間のイントロン部分であった。より詳細に調べるためにエキソンやイントロンにプライマーを設計し、RT-PCR 法でより詳しい発現解析を行った。エキソン 1 からエキソン 5 と 6 の間までは発現量が低栄養暴露により増加しているがエキソン 5 と 6 の間約 240bp を過ぎると発現がほとんどなくなり、

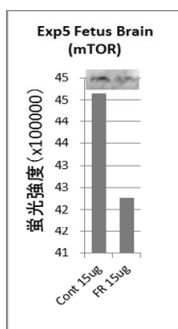
エキソン 6 になるとコントロールも低栄養暴露も発現量はほとんど変わらない結果となった。確認のためにエキソン 50 と 53 にプライマーを作成し発現量をみたところコントロールも低栄養暴露も発現量はほとんど変わらない結果となった。このことから低栄養暴露により胎児脳においてスプライシング異常等が起こり、完全でない mTOR (エキソン 5 と 6 の間まで) が増加し、完全な mTOR が減少してしまっている可能性が示唆された。

図 1. mTOR 遺伝子の RT-PCR 解析



ウェスタンブロット解析 (図 2) では、低栄養暴露により mTOR (C 末端認識) の減少が見られた。N 末端認識 mTOR 抗体を使用し、小さなサイズの mTOR を確認するため、同様にウェスタンブロット解析を行ったが、明確な結果が得られなかった。今回の結果で低栄養暴露の胎児脳で mTOR がタンパク質レベルで減少することは確認できたが、完全でない mTOR が実際に増加しているかどうかまでは確認できなかった。今後は免疫沈降による濃縮などを行い、低栄養暴露の胎児脳で完全でない mTOR が増加しているのかどうかの確認を行いたい。

図 2. mTOR のウェスタンブロット解析



[プロテオーム解析]

2D-DIGE 法を用いた網羅的なプロテオーム解析を行ったところ、低栄養暴露胎児脳で発現量が変化したタンパク質スポットは合計 36 個で 27 個が減少し、9 個が増加であった。そのうち同定に進めることができたのは 15 個のタンパク質スポットで、この 15 個のタンパク質を LC/MSMS 法により同定したところ、以下に示す表のような結果になった。

2D-DIGE法により低栄養暴露胎児脳から同定されたタンパク質

Decreased	Dmrtc2	Doublesex- and mab-3-related transcription factor C2
Decreased	4732456N10Rik	hypothetical protein LOC239673
Decreased	Basp1	Brain acid soluble protein 1
Decreased	Tmtc2	Tmtc2 protein
Decreased	Eef1a1	Elongation factor 1-alpha 1
Decreased	Rbmprt	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G
Decreased	Dsp	Desmoplakin
Decreased	Ankrd6	Isoform 1 of Ankyrin repeat domain-containing protein 6
Decreased	Hnmpa0	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0
Decreased	Hnmpa2b1	Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1
Decreased	Hnmpc	Uncharacterized protein
Decreased	Marcks1	MARCKS-related protein
Decreased	Hnmpa1	Putative uncharacterized protein
Increased	Gnb1	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1
Increased	Gap43	Neuromodulin Gap junction B-50, Basp2, GAP-43

発現量が増加した 2 個のタンパク質は Gnb1 と Gap43 であった。減少した 13 個のタンパク質のうち 5 個が RNA 結合タンパク質であることが確認できた。

[まとめ]

トランスクリプトーム解析の結果から低栄養暴露により胎児脳で自閉症に關与する GABA 受容体遺伝子や体内時計に關する AANAT 遺伝子など、うつ病発症にもつながるいくつかの重要な遺伝子が同定できた。これらの遺伝子については、プロモータ領域のメチル化部位の同定を進め、生後の環境条件によってメチル化 (脱メチル化) のと遺伝子発現の変化を共に調査していきたいと考えている。

プロテオーム解析では低栄養暴露により胎児脳で RNA 結合タンパク質の減少が確認できた。RNA 結合タンパク質の働きとして mRNA の安定性やスプライシングの正確性の向上が知られている。Adipocyte 1:4, 246-249; 2012 Marc-Étienne Huot and Stéphane Richar (The Sam68 STAR RNA-binding protein regulates mTOR alternative splicing during adipogenesis) の論文では SAM68 という RNA 結合タンパク質の欠乏により mTOR 遺伝子の異常スプライシングが起こり、脂質生成に影響を及ぼすとしている。さらに Kim, T.D., Woo, K.C., Cho, S., Ha, D.C., Jang, S.K. and Kim, K.T., 2007 (Rhythmic control of AANAT translation by hnRNP Q in circadian melatonin production). Genes Dev. 21, 797-810 や、Kojima S, Danielle L. Shingle and Carla B. Green., 2011 (Post-transcriptional control of circadian rhythms), Journal of Cell Science 124, 311-320 では、RNA 結合タンパク質 hnRNP Q が AANAT 遺伝子の転写後の mRNA 安定性と AANAT タンパク質のリン酸化において重要な働きをしていることが述べられている。これらのことから、妊娠期低栄養暴露の胎児脳では RNA 結合タンパク質が減少することで、転写後の mRNA の安定性の低下や、異常スプライシングが起こりやすくなる可能性が考えられた。これらの結果は今後なるべく早く論文にまとめ投稿する予定である。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

ラクワル ランデエブ

( RAKWAL, Randeep )

筑波大学・教育イニシアティブ機構・教授

研究者番号：70590850

### (2)研究分担者

塩田 清二 ( SHIODA, Seiji )

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：80102375