

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659165

研究課題名（和文） ストレスによる発現変化の次世代への遺伝

研究課題名（英文） Transgenerational inheritance of altered gene expression via stress

研究代表者

前川 利男 (MAEKAWA TOSHIO)

独立行政法人理化学研究所・石井分子遺伝学研究室・基幹研究所研究員

研究者番号：90201764

研究成果の概要（和文）：

野生型マウスの雄親を低蛋白質の餌で飼育すると、通常の餌で飼育した場合と比較して、子供の肝臓でのコレステロール生合成系の遺伝子発現が上昇することが報告された (Carone BR, Cell, 2010)。この現象における ATF-7 の関与を検討した結果、野生型で見られる子供の遺伝子発現上昇が ATF-7 KO の雄では全く見られず、ATF-7 の関与が明らかになった。このとき、精巢細胞では約半数のコレステロール生合成系遺伝子のプロモーターに ATF-7 が結合しており、プロモーター部位で H3K9 のメチル化が減少していた。

研究成果の概要（英文）：A paternal “low-protein” diet altered gene expressions, mainly involved in lipid and cholesterol biosynthesis, in the livers of offspring even though the maternal diet was unaltered (Carone BR, Cell, 2010). We have studied the effect of ATF-7 on these gene expressions and have found that using Atf-7 knockout male mice low-protein diet didn't alter expressions of cholesterol biosynthesis genes. And we have found that ATF-7 binds to the promoter regions of about half of these cholesterol biosynthesis genes. And also, in the promoter regions of these genes, the degrees of histone H3K9 methylation were reduced.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：ATF-7、栄養ストレス、コレステロール生合成、遺伝子発現、次世代への影響

1. 研究開始当初の背景

ATF-2 は、1989 年に私達が最初に同定した転写因子であり、C₂H₂ タイプのメタルフィンガー構造と p38/JNK によってリン酸化される部位を N 末端側に持っており、これらが転写活性化ドメインを形成している。また、B-Zip タイプの DNA 結合ドメインを C 末端側に有しており、塩基性アミノ酸に富む領域で標的配列の CRE と呼ばれる

5'-TGACGTCA-3' を特異的に認識して結合し、ロイシンジッパーで ATF-2 ファミリーメンバー及び Jun ファミリーメンバーとダイマー構造を形成する。

シグナル伝達系において、ATF-2 は TNF α などの炎症性サイトカインや低酸素刺激、UV 照射等の種々のストレスによって活性化されるストレス応答性キナーゼ p38/JNK によって直接リン酸化される。活性化されてい

ない ATF-2 は標的遺伝子の転写を抑制し、活性化された ATF-2 はコアクチベータをリクルートすることによって転写を誘導すると推定されている。

ATF-2 ファミリーは ATF-2 と ATF-7、CRE-BPa の 3 つのメンバーから成り、これらはいずれも、p38/JNK によってリン酸化され、活性化される。ATF-2 と CRE-BPa はストレスによって主に転写を活性化するのに対して、ATF-7 はストレスの無い時にヒストンメチル化酵素をリクルートしてヘテロクロマチン構造を形成して、転写を抑制していると考えている。

私達はこれまでに、マウス変異体を作製して解析し、ATF-2 が胎便吸引症候群や乳癌の発症、脂肪細胞への分化等に関与することを報告してきた。CRE-BPa 遺伝子欠損マウスは、肺胞の未発達によって生後すぐに致死となる。一方、ATF-7 遺伝子欠損マウスは正常に発育するが、野生型に比べて体の大きさが 10%程度小さく、セロトニンが関係するいくつかの実験で行動異常が見られた。DNA マイクロアレイを用いてこの行動異常の原因遺伝子を検索した結果、中脳の背側縫線核における、セロトニン受容体 5B (HTR5B) の顕著な発現上昇によって、自己受容体がシナプス間隙のセロトニン濃度を低下させ、神経症に似た行動異常を引き起こすことを見出した。更に分子メカニズムを詳細に解析した結果、ATF-7 はヒストンメチル化酵素である ESET と相互作用して、HTR5B 遺伝子のプロモーターに ESET をリクルートし、ヒストン H3K9 のトリメチル化を導入して部分的にヘテロクロマチン様構造を形成することによって転写を抑制していることが明らかになった。

2. 研究の目的

ストレスによって変化した遺伝子の発現変化が子供や孫の世代に遺伝するかどうかは、種々の疾患や進化とも関連し、遺伝学の極めて重要な問題である。およそ 200 年前にフランスのラマルクが獲得形質は遺伝するという説を提唱したが、獲得形質の遺伝には遺伝子の DNA の塩基配列の変異が必要だと考えられていた当時、一旦はダーウィンによって否定された。しかし、現在では DNA の塩基配列の変化が無くても、エピジェネティクスと呼ばれる DNA やヒストンの化学修飾だけでも発現の変化を起こすには十分であり、環境ストレスや栄養状態などの影響が細胞分裂を超えて維持される例が続々と報告されている。これらの論文では、ストレスによるエピジェネティックな変化が示唆されているが、このような現象は、まだ分子メカニズムが解明されていないため、一般に広く受け入れられていないのが現状である。

そこで、現在の発展したマイクロアレイによる遺伝子発現解析技術や次世代シーケンサーによるクロマチン IP の解析技術を用いればストレスによって変化した遺伝形質が子供や孫の世代に遺伝するケースが有るかどうかをある程度は検証することが可能である。

私達は最近、転写因子 ATF-7 を介して、ストレスによるエピジェネティックな変化が誘導され、それが長期間持続し得ることを示唆するデータを得ている。

本研究では、ATF-7 の下流に位置する種々の標的遺伝子を解析し、「ストレスによる遺伝子発現変化は遺伝するか？」という疑問に答え、その分子メカニズムを明らかにして行く。

3. 研究の方法

1) C57BL6 の野生型マウスの雄を離乳直後に 1 ~ 2 ヶ月間低蛋白質の餌で飼育して栄養ストレスを与えると、通常の餌で飼育した場合と比較して、その子供の世代の肝臓でのコレステロール生合成系の遺伝子発現が上昇することが報告された (Carone B, et al, Cell, 2010)。そこで、この実験系における ATF-7 の関わりを検討するために、野生型の雄と ATF-7 ヘテロノックアウトマウスの雄をそれぞれ通常の餌と低蛋白質の餌で飼育して、通常の餌で飼育した野生型の雌と交配し、得られたそれぞれの子供の肝臓での遺伝子発現に違いが有るかどうかを調べた。

マウスはそれぞれの実験に独立に飼育した 3 系統を用いた。また、発現解析にはアフィメトリクス社の発現解析用 DNA マイクロアレイを用いて比較した。

2) 上の実験で ATF-7 ホモノックアウトマウスの雄を使用した方が野生型と比較して差が顕著だと予想されるが、ATF-7 ホモノックアウトマウスの雄は行動異常を伴うので、2 ~ 3 ヶ月齢の若いホモの雄を二日以内に交配させて子供を得るのが至極困難だと予想される。

そこで、野生型の雄と ATF-7 ホモノックアウトマウスの雄を通常の餌と低蛋白質の餌でそれぞれ飼育して精子を採取し、人工授精によって受精させた後、ICR の里親に受精卵を移植した。このようにして子供を得た後、子供の肝臓における遺伝子発現を調べた。

3) 次世代への遺伝のメカニズムを探るうえで最も重要な ATF-7 の標的遺伝子を探索した。マウスの精巣を材料にして、ATF-7 に対する特異的な抗体を用いてクロマチン IP を行った後、次世代シーケンサーによって ATF-7 の結合している遺伝子の解析を行った。

4) マウスの精巣及び成熟精子を材料にして、ヒストンを抽出し、それぞれのヒストンのメチル化の程度をウエスタンブロッティング

で野生型マウスと ATF-7 KO マウスで比較した。

5) 社会的分離ストレスをかけたマウスでは中脳の背側縫線核でセロトニン受容体 5B(HTR5B)の発現レベルが亢進することを既に発表した。そこで、社会的分離ストレスをかけたマウスを交配して、次世代のHTR5Bの発現レベルを解析した。社会的分離ストレスの期間を変化させて、次世代への影響を調べた。

4. 研究成果

1) 離乳直後のマウスの雄を通常の餌と低蛋白質の餌でそれぞれ9~12週齢になるまで飼育し、通常の餌で飼育した野生型の雌と2日間交配させて、その子供の世代の肝臓での遺伝子発現を比較した。

その結果、p値が0.01以下で、低蛋白質で発現が増加した遺伝子が779個、発現が減少した遺伝子も576個同定された。ATF-7ヘテロノックアウトではそれぞれ183遺伝子と167遺伝子程度であった。この中で、既に報告されている通り、野生型マウスでは低蛋白質で飼育した場合コレステロール生合成系の遺伝子発現が顕著に上昇していた(17遺伝子中11遺伝子の発現がp値0.01以下で上昇しており、残りの6遺伝子も全てp値0.06以下の条件で上昇していた)。しかし、ATF-7遺伝子のヘテロノックアウトマウスでは通常の餌と低蛋白質の餌で飼育した両方でコレステロール生合成系の遺伝子発現が上昇しており、両者でほとんど差が見られなかった。

以上の結果から、野生型マウスの雄親を低蛋白質の餌で飼育すると、通常の餌で飼育した場合と比較して、子供の肝臓でのコレステロール生合成系の遺伝子発現が上昇する現象にATF-7が深く関与することが明らかになった。

2) ATF-7ホモノックアウトマウスの雄から精子を採取して人工授精で子供を得た後、子供の肝臓における遺伝子発現をDNAマイクロアレイを用いて、同じく人工授精で得られた野生型の子供と比較した。その結果、予想に反して、野生型において通常の餌と低蛋白質の餌で子供の肝臓におけるコレステロール生合成系の遺伝子に有意な発現の差は認められなかった。精子を採取して人工授精を行い、受精卵をICRの里親に移植するプロセスがストレスシグナルを活性化していると考えられる。ただし、この条件でも野生型で発現が変化する遺伝子の大部分はATF-7ホモノックアウトでは変化が無く、逆にATF-7ホモノックアウトで変化している遺伝子は野生型で変化がなかった。

3) 次世代への遺伝を考えるうえで最も重要な組織は雄の場合精巣である。そこで、ATF-7

の次世代へ繋がる標的遺伝子を探索するために、マウスの精巣から精巣細胞を分離した後、ATF-7特異抗体を用いてChIPを行い、得られたDNAを次世代シーケンサーで解析した。

その結果、ATF-7は1340個の遺伝子に結合していた。この中で、ATF-7の遺伝子内における結合部位を調べた結果、およそ76%が転写開始点から500塩基対以内に存在しており、転写制御領域に結合していることが明らかになった。1340個の遺伝子のおよそ40%は代謝に関連する遺伝子であった。

また、野生型で次世代での発現変化が顕著であったコレステロール生合成系の遺伝子のおよそ7割にATF-7は結合していた。コレステロール生合成系の遺伝子の発現はシグナル伝達系で上位に位置するPPAR δ によっても制御されていると考えられているが、上位のPPAR δ にも結合が見られた。

4) マウスの精巣から精巣細胞を分離した後、ヒストンを抽出して、ヒストンH3K9のジメチル化とトリメチル化の程度をウエスタンブロッティングで野生型マウスとATF-7 KOマウスで比較した。その結果、ATF-7 KOマウスではジメチル化及びトリメチル化ヒストンH3K9の著しい減少が明らかになった。これまで我々は免疫共沈実験の結果、ATF-7はESETやSuv39、G9a等と複合体を形成してヒストンH3K9をメチル化していることが分かっている。ATF-7をノックアウトした精巣細胞でジメチル化及びトリメチル化ヒストンH3K9が著しく減少しているのはこれらの結果を反映した物であろうと考えている。

5) 社会的分離ストレスをかけた雄マウスでは中脳の背側縫線核でセロトニン受容体5B(HTR5B)の発現レベルが亢進することを既に発表した。そこで、社会的分離ストレスをかけた雄マウスを通常に飼育している雌と交配して、次世代のHTR5Bの発現レベルを解析しようと試みた。ただし、社会的分離ストレスをかけたマウスの交配は困難で、子供を得るまでに長時間を要した。その結果、子供の遺伝子発現は通常に飼育した場合と比較して有意な差は見られなかった。交配までに長期間を要したことから、社会的分離ストレスの効果が減少した可能性も考えられるが、精巣におけるATF-7の結合部位を調べた結果から、ATF-7はHTR5Bに結合していないことが分っており、次世代に影響する可能性は大きくないと結論した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

Seong K, Maekawa T, Ishii S: Inheritance and memory of stress-induced epigenome change: roles played by the ATF-2 family

of transcription factors. *Genes to Cells*
17, 249-263, 2012, 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

- 1) 前川利男: ストレスによるエピゲノム変化の遺伝、日本エピジェネティクス研究会、奈良市、2013年5月31日
- 2) 前川利男: 転写因子 ATF-7 を介したストレスによる老化と次世代への遺伝、理研シンポジウム、つくば市、2013年5月11日
- 3) 前川 利男、Binbin Liu、吉田 圭介、仲村 賢一、田久保 海誉、石井 俊輔: 転写因子 ATF-7 を介したストレスによるテロメアの長さの制御、日本分子生物学会、福岡市、2012年12月14日
- 4) 吉田 圭介、前川 利男、Renard-Guillet Claire、白髭 克彦、石井 俊輔: マクロファージの炎症時における ATF-7 の機能解析、日本分子生物学会、福岡市、2012年12月11日
- 5) 前川利男、吉田圭介、Binbin Liu、仲村賢一、田久保海誉、石井俊輔: ストレスは ATF-7 を介してヘテロクロマチン形成とテロメアの長さを制御する、日本分子生物学会、横浜市、2011年12月15~16日
- 6) 吉田 圭介、前川 利男、Claire Renard-Guillet、白髭克彦、石井俊輔: ATF-7 は炎症の抑制因子として機能する、日本分子生物学会、横浜市、2011年12月14日

[その他]

ホームページ等

http://www.riken.jp/research/labs/distinguished/mol_genet/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前川 利男 (MAEKAWA TOSHIO)

独立行政法人理化学研究所・石井分子遺伝学研究室・基幹研究所研究員

研究者番号: 90201764

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

吉田圭介 (KEISUKE YOSHIDA)

独立行政法人理化学研究所・石井分子遺伝学研究室・基礎特別科学研究員

研究者番号: 80587452