

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658120

研究課題名(和文) 母親・父親へのメチル化促進食による子世代の肝臓代謝遺伝子のエピゲノム制御

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of liver metabolism gene expression in offspring by maternal or paternal methyl donor supplementation

研究代表者

亀井 康富 (Kamei, Yasutomi)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：70300829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、MIAMI法により、メチル化促進飼料にて妊娠期～授乳期の母マウスを飼育して経胎盤的あるいは経母乳的にメチル基を与えた新生仔マウスにおける肥満表現型と、肝臓における、DNAメチル化と遺伝子発現の経時変化を網羅的に解析した。その結果、メチル化促進食により肥満が抑制された。また、多くの遺伝子において肝臓DNAメチル化の変動が観察された。また、C57BL/6Jマウスは食事性誘導肥満になりやすく、PWKマウスは食事誘導性の肥満になりにくい。これらのマウスをかけ合わせてF1をつくったところ食事性誘導肥満は父性遺伝することが判明した。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation is a key epigenetic process in the regulation of gene expression in mammals. In this study, we examined the effect of supplementing methionine and specific vitamins (i.e. B12 and folate) to the diet of pregnant/nursing mice on long-term health implications in their offspring. We observed that an early dietary intervention (methyl-supplemented diet) suppressed the increase in body weight and development of a fatty liver induced by a high-fat diet (HFD) in adulthood. We also observed that many genes underwent changes in the DNA methylation levels as a result of the methyl-supplemented diet. C57BL/6J mice are susceptible to HFD-induced obesity. We generated and analyzed reciprocal crosses between 2 mouse strains, namely, F1 progeny with a B6 father and F1 progeny with a PWK father. The former strain was more susceptible to HFD-induced obesity compared with the latter strain; this finding suggested that the susceptibility to HFD-induced obesity was transmitted paternally.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：環境生理学

キーワード：DNAメチル化 脂質合成 転写調節 肝臓 授乳期

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：DNA メチル化、脂質合成、転写調節、肝臓、授乳期

1. 研究開始当初の背景

肥満や生活習慣病は塩基配列の変異により付与される遺伝素因と、食物を中心とする環境因子の複雑な相互作用により発症する多因子疾患である。従来、多くの疫学調査により、妊娠期（胎児期）の栄養環境を反映する出生時体重が小さいと、成人期の肥満や生活習慣病の発症率が高いことが指摘されている（Science 305:1733-1736, 2004）。さらに、妊娠マウスの摂取カロリーを制限することにより得られる子宮内胎仔発育遅延（IUGR）マウスは高脂肪食負荷により成獣期に太りやすくなるという（Cell Metabolism 1:371-378, 2005）。このような疫学調査結果および動物実験データから、胎児期・新生児期の栄養と成人後の脂肪蓄積・肥満感受性に DNA メチル化などのエピジェネティクス制御が存在することが概念的に示唆されるが分子機構の実体は不明である。

器官形成期に相当する胎児期から個体の成長が著しい新生児期は全身臓器の可塑性が最も高い時期であるため、外的環境要因の変化に応じて多様なエピゲノム変化がもたらされる可能性がある。代表的なエピゲノム変化である DNA メチル化やヒストン修飾は生体内の酵素反応によるため、食品成分や化学物質などの摂取により影響を受けると考えられる。S-アデノシルメチオニンのメチル基が DNA や蛋白質に供与されるが、メチオニンや葉酸などメチル基供与体を多く含有するメチル化促進飼料（FASEB J. 12:949-957, 1998）により妊娠マウスを飼育すると、仔マウスにおいて特定の遺伝子座の DNA メチル化が増加することが報告されている（J. Nutr. 132:2393S-2400S, 2002）。一方、父親の栄養環境が仔の糖尿病

の罹患性に影響を与えうることを示唆するデータが報告された。すなわち、交配前の父ラットに高脂肪食を負荷すると、その雌性の仔の膵β細胞の複数の遺伝子の DNA メチル化・遺伝子発現変化により糖代謝能が悪化するというものである（Nature 467:963-6, 2010）。しかしながら、これらのマウスの受精～胎仔期～新生仔期のどの時期にどの程度の DNA メチル化が変化するのか、又、その機能的意義は全く不明である。

2. 研究の目的

多くの疫学調査により、胎生期の栄養環境が成人期に発症する肥満や生活習慣病に関連する可能性が指摘されている（Developmental Origins of Health and Disease; DOHaD）。一方、胎生期のみならず個体の成長が著しい新生児期も全身臓器の可塑性が高い時期であり、新生児期の栄養環境が成人期の肥満や生活習慣病の疾患感受性に影響を与える可能性がある。本研究は、胎児期・妊娠期の母親・父親の栄養状態が次世代に及ぼすエピジェネティクス制御の分子機構の解明を目指す試みである。

3. 研究の方法

研究目的の達成のために、下記の1)～3)を遂行する。

1) 肝臓初代培養における遺伝子発現と DNA メチル化パターンの網羅的解析では、DNA メチル化の網羅的解析法である MIAMI 法（Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers）（Oncogene 25: 3059-3064, 2006）により、マウスの肝臓初代培養における DNA メチル化状態を網羅的に解析した。そして DNA メチル化により制御される脂肪合成関連遺伝

子を探査する。バイオインフォマティクスの手法により DNA メチル化により制御される遺伝子群を解析した。これまでにマウス肝臓における新規脂肪合成の律速酵素である GPAT1 遺伝子のプロモーター領域が、新規メチル化酵素 Dnmt3b による DNA メチル化により発現制御をうけることを報告した (Diabetes 61:2442-2450, 2012)。新規 DNA メチル化酵素には Dnmt3a も存在するが、両者の基質特異性には不明の点が多い。本研究では、Dnmt3b と Dnmt3a を過剰発現したマウス肝臓初代培養細胞を用いてゲノムワイドに DNA メチル化変化を解析した。

2) MIAMI 法 (Oncogene 25: 3059-3064, 2006) により、メチル化促進飼料にて妊娠期～授乳期の母マウスを飼育して経胎盤的あるいは経母乳的にメチル基を与えた新生仔マウスの肝臓における、DNA メチル化と遺伝子発現の経時変化を網羅的に解析した。

さらに、胎仔期 (妊娠期)～新生仔期 (授乳期) に新生仔マウスあるいは母マウスのコントロール飼料あるいはメチル化に関与する栄養成分を豊富に含んだ飼料 (メチル化促進飼料) を与え、離乳後の仔マウスの生活習慣病に関連する表現型 (体重、脂肪蓄積、糖脂質代謝、エネルギー消費、肝臓代謝関連の組織像など) を解析した。産仔を離乳し、5 週令で仔に普通食 (chow diet) あるいは高脂肪食を与え、体重と摂食量を毎週記録した。

3) Peg1/Mest はインプリンティング遺伝子であり、父親由来のアレルのみ転写される。以前、我々は Peg1/Mest がマウスの adult の肥満した脂肪組織で高く発現することを見出した。そこで我々は Peg1/Mest に加えてインプリンティング遺伝子の発現が肥満で変化するかどうか調べた。

一方、C57BL/6J (B6) マウスは食事性誘導肥満になりやすく、PWK マウスは食事誘導性の肥満になりにくい。これらのマウスを掛け合わせて F1 をつくり、父親由来あるい

は母親由来の情報が産仔の肥満表現型を決定するかを解析した。

4. 研究成果

1) アデノウイルスを用いて GFP (Ad-G)、Dnmt3b (Ad-3b) あるいは Dnmt3a (Ad-3a) をマウス肝臓初代培養細胞に過剰発現し、MIAMI 法 (Oncogene 25:3059-3064, 2006) によりゲノムワイドな DNA メチル化変化を解析した。Ad-3b 過剰発現と Ad-3a 過剰発現では Ad-3b による DNA メチル化作用の方が強いことがバイサルファイト法により確認された。バイオインフォマティクス解析したところ、Dnmt3b 特異的遺伝子では CANAGCTG の配列が、Dnmt3b と Dnmt3a の両者によりメチル化される遺伝子では CCGGWNCSC の配列が濃縮されていることが明らかになった。肝細胞では Dnmt3b が主要な DNA メチル化酵素であり、肝臓における遺伝子発現に制御に関与することが示唆された。さらにこの網羅的なメチル化解析法を用いて、親獣に栄養環境変化を与えた場合の産仔の肝臓の DNA メチル化解析を行なっている。

2) 仔に普通食を与えた場合、母親にコントロール飼料とメチル化促進飼料を与えたグループの間で、体重と摂食量に変化はなかった。一方、高脂肪食を与えた仔の場合では、母親にメチル化促進飼料を与えた群は、母親にコントロール飼料を与えた群と比較して体重増加が抑制された。体重あたりの摂食量は母親にメチル化促進飼料とコントロール飼料を与えたグループの間で違いはなかった。興味深いことに、産仔の肝臓で、多くの遺伝子において DNA メチル化の変動が観察された。また、交配前の雄マウスにメチル化促進飼料を与えた実験においては明らかな変化は認められなかった。

この研究で、我々は授乳期の母獣へのメチル化促進飼料の投与が、高脂肪食によって誘導される仔マウスの脂肪肝を抑制することを観察した。母親の栄養環境が子供の

成長後のメタボリックシンドロームの罹患感受性に影響することを示唆する結果である。この分子説明として、脂肪肝の抑制には、新生仔期間に経母乳的に摂取したメチル化促進飼料により獲得した何らかのエピジェネティックな変化が、離乳後の肝臓の脂肪合成に影響したと考えられる。新生仔期、授乳期は肝臓を含む器官が発達し、細胞増殖する可塑性の高い時期であることから、一定の遺伝子で新規 DNA メチル化が生じると推察することは可能であろう。

3) やせと肥満の脂肪組織において代表的なインプリンティング遺伝子の発現を調べたところ肥満脂肪組織で Peg1/Mest および P57/Kip2 の発現が増加することを見出した。しかしながら、他のインプリンティング遺伝子の顕著な増加した発現は観察されなかった。

C57BL/6J (B6) マウスと PWK マウスを合わせて F1 をつくったところ B6 が父親のとき、F1 は食事性誘導肥満になりやすいが、PWK が父親のときは、F1 は食事性誘導肥満になりにくかった。つまり食事性誘導肥満は父性遺伝することがわかった。

以上の研究成果は、胎仔期あるいは個体の成長が著しい新生仔期は全身臓器の可塑性が高い時期であり、胎生期や離乳前後の急激な栄養環境の変化が DNA メチル化を制御し、成獣期に発症する肥満や脂肪肝に対する疾患感受性を決定する可能性を示唆するものである。また、肥満の表現型が父親由来のアレルから伝達されることが示唆され、父親由来のエピジェネティクス制御の手がかりが得られた。

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 3 件)

1. S. Morita, T. Horii, M. Kimura, Y. Arai, Y. Kamei, Y. Ogawa, I. Hatada.

Paternal allele influences high fat diet-induced obesity. PLOS ONE 9:e85477, 2014 doi: 10.1371/journal.pone.0085477

2. M. Takahashi, Y. Kamei*, T. Ehara, X. Yuan, T. Suganami, T. Takai-Igarashi, I. Hatada, Y. Ogawa. Analysis of DNA methylation change induced by Dnmt3b in mouse hepatocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications 434, 873-8, 2013. (*Corresponding author) doi: 10.1016/j.bbrc.2013.04.041.

3. 亀井康富、小川佳宏：エピゲノムと糖尿病：最新医学 67: 27-31, 2012.

[学会発表] (計 3 件)

1. 亀井康富 肝臓脂質代謝のエピジェネティクス制御 シンポジウム：栄養とエピゲノム 第 67 回日本栄養・食糧学会 愛知県名古屋 2013 年 5 月 25 日
2. 亀井康富 生活習慣病とエピジェネティクス 第 13 回抗加齢医学の実際 日本抗加齢医学会シンポジウム 東京都品川区 2013 年 9 月 16 日
3. 亀井康富、亀井康富 生活習慣病とエピジェネティクス 京都大学農学研究科食品生物化学専攻 招待セミナー 京都府宇治市 2013 年 11 月 13 日

[図書] (計 1 件)

1. 亀井康富、小川佳宏：「生活習慣病と DNA メチル化」：栄養とエピジェネティクス—食による身体変化と生活習慣病の分子構造— (ネスレ栄養科学会議 監修) 建帛社 (東京) 114-119, 2012.

[その他]

ホームページ等

<http://nutrition.life.kpu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀井康富 (KAMEI YASUTOMI)

京都府立大学生命環境科学研究科・教授

研究者番号：70300829