

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 7 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14578

研究課題名(和文) マウス Y 染色体多型の経世代遺伝効果の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanism underlying trans-generational genetic effect observed in Y-chromosome consomic mouse strains

研究代表者

城石 俊彦 (Shiroishi, Toshihiko)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：90171058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウス別亜種由来の Y 染色体を B6/J 系統の遺伝的背景に導入した際にみられた経世代遺伝効果のメカニズムについて明らかにすることを目的とした。しかし、この遺伝的背景では代謝関連表現型データの分散(バラツキ)が大きいことが判明し、急遽、データが安定して計測されることが期待できる B6/N 系統に別亜種由来の Y 染色体を移し変えて表現型を解析した。この結果、B6/N の遺伝的背景においても経世代遺伝効果が観察された。

2 年間の研究期間では、当初計画していた経世代遺伝効果の分子メカニズムの解明までは研究を進めることができなかったが、今後、B6/N 系統において分子メカニズムの解明を進める予定である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the mechanism of trans-generational genetic effect (TGE), which was observed in B6/J-Y consomic mouse strains carrying the Y-chromosome derived from different mouse sub-species. In the beginning of this study, however, we observed unexpected large variation of metabolism-related data of the Y-consomic strains in the original B6/J genetic background. Therefore, we replaced the genetic background of the B6/J strains with that of a different B6-sub strain, B6/N, and examined whether the Y-consomic strains show TGE in the new B6/N genetic background. The result showed that TGE was reproduced irrespective of the genetic background.

Now, we plan to investigate the molecular mechanism underlying TGE using the newly established Y-consomic strains in the B6/N genetic background.

研究分野：遺伝学

キーワード：遺伝学 Y 染色体 エピゲノム 糖尿病 発現制御

## 1. 研究開始当初の背景

優性変異遺伝子をヘテロに持つ親と野生型ホモ親から生まれた次世代で、変異を持つヘテロ個体のみならず野生型遺伝子のホモ個体が何らかの表現型を示す例が知られている。例えば、c-Kit receptor 遺伝子のリガンドをコードする Steel 遺伝子の  $S^{lb}$  変異をヘテロに持つマウスの雄は精巣腫瘍を高率に発症するが、この雄親と野生型ホモ雌親の交配から生まれる次世代において、ヘテロ雄は予想通り腫瘍を発症するが、野生型ホモ雄の腫瘍発生が極端に低下することが知られている (Heany et al. Cancer Res 2008<sup>1</sup>; Nelson et al. PNAS USA 2012<sup>2</sup>)。これらの現象は、経世代遺伝効果 (Transgenerational Genetic Effect: TGE) と呼ばれており、分子機構として、ゲノムインプリンティング現象と同様に、DNA メチル化やクロマチン修飾などのエピジェネティック制御、もしくは精子に含まれる機能性 RNA の関与等が想定されている。しかし、TGE の分子基盤は全くの未知である。

最近、哺乳類の Y 染色体のゲノム解析が進展し、これまで知られていた精子形成以外に他の機能を有する遺伝子の存在が明らかになってきた (Bellott et al. Nature 2014<sup>3</sup>)。申請者らは、マウス Y 染色体の遺伝的多型について研究を進めていた。マウスの参照ゲノム配列が決定された C57BL/6J (B6) 系統は、その成立の起源から日本産野生マウス亜種の Y 染色体 ( $Y^{mus}$ ) を持つため (Takada et al. Genome Res 2013<sup>4</sup>)、申請者らは、西欧産 domesticus 亜種由来の Y 染色体 ( $Y^{dom}$ ) を B6 系統の遺伝的背景に導入して新たに Y-コンソミック系統 ( $B6-Y^{dom}$ ) を樹立し、詳細な表現型解析を開始した。その結果、対照とする  $B6-Y^{mus}$  雄が軽度の糖代謝異常表現型 (血中グルコース高濃度、低めの耐糖能など) を示すのに対し、 $B6-Y^{dom}$  雄ではこれらの表現型が緩和されていた。これは、Y 染色体上に糖代謝

を制御する遺伝子が存在するという、それ自体がたいへん興味深い結果である。さらに、この  $B6-Y^{dom}$  の表現型が Y 染色体を持たない次世代の雌個体においても観察された。即ち、Y 染色体上の遺伝型が雄の生殖細胞 (精子) を経由して次世代の雌個体に伝搬するという典型的な経世代遺伝効果 (TGE) を示した。そこで、この現象の分子的基盤を明らかにすべく本研究を企画した。

## 2. 研究の目的

Y 染色体は、雄性決定因子である *Sry* 遺伝子や精子形成関連遺伝子を含むことが知られている。しかし、哺乳類では他の常染色体が持っている多くの機能遺伝子を進化上で失っており (Skaletsky et al. Nature 2003)、言わば崩壊途中の染色体と考えられてきた (Lahn and Page, Science 1997)。最近になり免疫制御関連遺伝子の存在も報告されているが、通常の遺伝学が適用できず、Y 染色体上の遺伝解析は遅れている。申請者らは、マウスの亜種間で Y 染色体を交換したコンソミック系統を新規に樹立して表現型解析を行い、哺乳類の Y 染色体上の遺伝的多型が糖代謝などのエネルギー代謝にかかわる表現型を制御していることを見出した。これ自体、哺乳類の遺伝学において画期的な発見であり、関連分野へのインパクトは大きい。さらに、この表現型が次世代の雌個体へと伝搬されることを見出したことから、Y 染色体多型が経世代遺伝効果 (TGE) にも関与することが示された。これにより、TGE の分子機構の解析にこれまでにない斬新な実験系を提供できると考えた。そこで、本研究では、Y 染色体コンソミック系統で観察された糖代謝制御に関する経世代遺伝効果 (TGE) の分子基盤を解明する。Y 染色体多型に依存する表現型を示す雌雄の肝臓を標的組織としたメチローム解析やクロマチン修飾解析等を実施して TGE の分子実体を明らかにする。ま

た、雄の生殖細胞（精子）での包括的な RNA-seq 解析やクロマチン修飾解析により、B6- $Y^{mus}$  と B6- $Y^{dom}$  の両系統の生殖細胞中に存在する RNA やヒストン修飾の違いを解析して TGE の世代間分子キャリアーを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

後述するように、当初、TGE が観察された C57BL/6J (B6/J) 系統の遺伝的背景西欧産  $dom$  亜種由来の Y 染色体 ( $Y^{dom}$ ) を導入した B6/J- $Y^{dom}$  コンソミック系統を材料にして、メチローム解析やクロマチン修飾解析等を実施する計画であったが、この遺伝的背景では、表現型の再現性が一定せず、問題があることが研究開始の時点で明らかになった。そのため、方針を変更して、急速、エネルギー代謝系表現型が安定していることが知られている類縁の亜系統である C57BL/6N (B6/N) に  $Y^{dom}$  染色体を移し替えることにした。このため、B6/J- $Y^{dom}$  雄個体を B6/N 系統雌に戻し交配し、さらに生まれた雄個体を使って B6/N 雌個体への戻し交配を継続して行った。さらに、Y 染色体の多型の幅を広げて解析することを考えて、東南アジア産のキャストネウス (*castaneus*) 亜種由来の Y 染色体 ( $Y^{cas}$ ) を、同様にして B6/N 系統の遺伝的背景に戻し交配によって移し替えた。以下の実験は、戻し交配のもっとも世代が進んだ雌個体を用いて行った。

表現型解析のデータ生産については、B6/J- $Y^{msm}$  コンソミック系統の表現型スクリーニングにおいて使用した方法 (Takada et al. *Genome Res.*, 2008) を採用した。

### 4. 研究成果

(1) 既存の Y-染色体コンソミック系統の戻し交配による各 Y-染色体の C57BL/6N 系統の遺伝的背景への入れ替え

西欧産ドメスティカス亜種由来の Y 染色体

( $Y^{dom}$ ) を B6/J 系統の遺伝的背景に導入した Y-コンソミック系統 (B6J- $Y^{dom}$ ) 及び東南アジア産キャストネウス亜種由来の Y 染色体 ( $Y^{cas}$ ) を B6/J 系統に導入した B6J- $Y^{cas}$  系統をそれぞれ樹立し。この研究の開始時点までに、糖代謝をはじめとしたエネルギー代謝関連の表現型解析のパイロットデータを得ているが、これまで経世代遺伝効果 (TGE) を観察してきた B6/J 系統では、エネルギー代謝系の表現型において個体によるバラツキが出るということが判明し、バラツキが少ないことが知られている B6/N 系統の遺伝的背景に Y 染色体を置換することが TGE のエピゲノム解析を詳細に実施するために必要と考えた。そこで、本研究では、エピゲノム解析を本格的に開始する前に、時間が掛かっても遺伝的背景の置換を優先して行うことにした。このため、当初の実験計画を変更し、既存の B6J- $Y^{dom}$  染色体コンソミック系統を B6/N へ戻し交配し、Y-染色体の B6/N 系統の遺伝的背景への導入を進めた。これにより、戻し交配世代を 6-7 代まで進めることができた。それらを、B6N- $Y^{dom}$  および B6N- $Y^{cas}$  と表記した。

#### (2) B6/N 系統の遺伝的背景での Y-染色体コンソミック系統の表現型解析

B6/N 系統の遺伝的背景に、西欧産ドメスティカス (*dom*) 亜種由来の Y 染色体 ( $Y^{dom}$ )、並びに東南アジア産キャストネウス (*cas*) 亜種由来の Y 染色体 ( $Y^{cas}$ ) を戻し交配によって入れ替えた最新の 6-7 世代 (B6N- $Y^{dom}$  および B6N- $Y^{cas}$ ) を使用して、基本的な表現型の観察と、糖代謝を含むエネルギー代謝関連表現型の収集を行った。

##### a. 基礎的な形態・代謝関連の表現型解析

Y-染色体系統の雌個体を対象にして、最初に、基本的な外部形態、臓器重量、それに基本的な代謝関連形質について計測し、経世代効果 (TGE) が B6/N 系統の遺伝的背景で再現されるかどうかを検証した。解析には、10 週

令の個体を使用した。測定項目は、体重、全長、頭胴長、肝臓重量、および血中 HDL-コレステロール(HDL-chol)、血中総コレステロール(T-chol)、血中 non-HDL コレステロール(non-HDL) および中性脂肪である血中トリグリセリド(TG)である。表現型収集は B6-Chr<MSM> コンソミック系統を使用した表現型収集のプロトコール (Takada et al. 2008) を若干改変して行った。頭胴長は、鼻尖から尻尾の付け根までを測定した。肝臓重量は、測定した肝臓重量を体重に対する割合として示した。

図 1 のグラフは、B6N-Y<sup>dom</sup> のメス 10 頭、B6N-Y<sup>cas</sup> のメス 8 頭、および B6/N のメス 3 頭の表現型データの平均値を示す。この図では、解析頭数が少ないので統計的有意差はまだ算出してない。

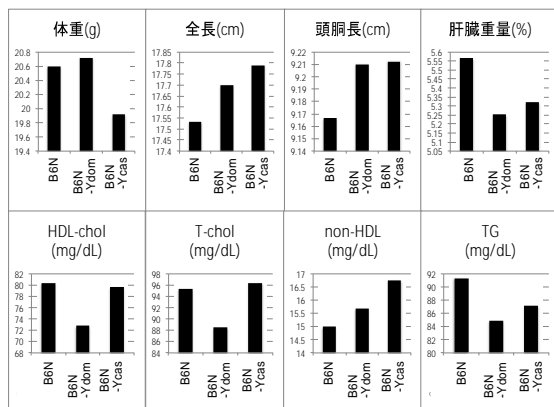


図 1 . 基本的形質についての表現型データ

全体的な傾向を以下に述べる。体重については、対照とする B6/N と比較した場合、B6N-Y<sup>dom</sup> とは差がないが、B6N-Y<sup>cas</sup> の平均値が若干低かった。全長および頭胴長については、B6N-Y<sup>dom</sup> および B6N-Y<sup>cas</sup> とともに、B6/N より若干長い傾向があった。体重に対する肝臓重量比では、B6N-Y<sup>dom</sup> および B6N-Y<sup>cas</sup> とともに B6/N より低い値を示した。血中コレステロールに関しては、HDL-chol および T-chol は、B6/N および B6N-Y<sup>cas</sup> には差がないが、B6N-Y<sup>dom</sup> がこれらに比べて低い傾向を示した。TG に関しては、B6/N と比較した場合に、B6N-Y<sup>dom</sup> および B6N-Y<sup>cas</sup> とともに低い値を示した。今後は、B6N-Y<sup>dom</sup>

および B6N-Y<sup>cas</sup> とともに、B6/J を遺伝的背景にした場合のデータのバラツキ具合と比較するため、解析頭数をさらに増やしてデータの収集を行う必要がある。全般的な傾向としては、B6/N の遺伝的背景においても、遺伝子型が同一である Y-染色体コンソミック系統の雌個体において、雄親の違いによって表現型に差異が生じる可能性が示された。即ち、経世代遺伝効果の存在が確認できた。

#### b. その他の糖代謝関連の表現型解析

糖代謝の重要な指標である耐糖能を測定するために、IPGTT (Intraperitoneal Glucose Tolerance Testing) を実施した。解析には、10~12 週令の B6/N、B6N-Y<sup>dom</sup> および B6N-Y<sup>cas</sup> の雌個体各 4 頭を使用した。絶食前の血糖値は随時血糖として平均値を示した。測定値の単位は mg/dL である。随時血糖に関しては、B6/N と B6N-Y<sup>dom</sup> に差がないが、B6N-Y<sup>cas</sup> の平均値が若干低い傾向があった。耐糖能試験について、それぞれの個体に体重に応じたブドウ糖を負荷し、0、15、30、60 および 120 分後の血糖値を測定した。グラフは平均値を示す。解析頭数が少ないので、統計解析による有意差検定を行っていない。B6N-Y<sup>dom</sup> および B6N-Y<sup>cas</sup> とともに、B6/N と比較して耐糖能が良い傾向が観察できた。これらのデータは、以前に B6/J 系統の遺伝的背景で観察された傾向と類似している。今後、解析頭数をさらに増やすことで、分散(バラツキ)の少ないデータを得ることができ、系統間で統計的有意差が得られるものと期待している。

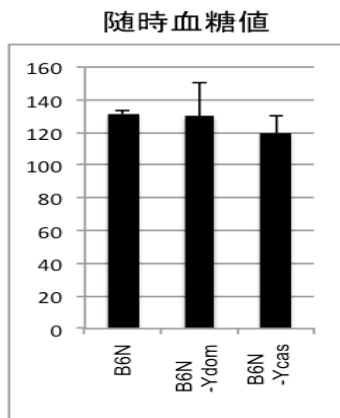
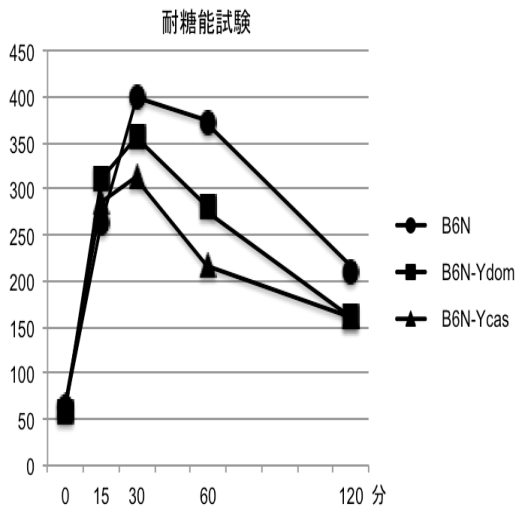


図2. 耐糖能試験

c. インスリン抵抗性に関する表現型解析

糖代謝関連形質として重要なインスリン感受性を計測する目的で、インスリン負荷試験を行った。解析には、12-14週令のB6/N(2頭)、B6N-Y<sup>dom</sup>(3頭)およびB6N-Y<sup>cas</sup>(3頭)を使用した。インスリン負荷後20分おきに120分後までの血糖値を測定した。図3のグラフは平均値を示す。単位はmg/dLである。解析頭数が少ないので、統計解析による有意差検定を行っていない。また、測定開始80分以降に測定機器の検出限界を下回る値が観察された個体のデータを除外した。インスリン感受性に関しては、B6N-Y<sup>dom</sup>およびB6N-Y<sup>cas</sup>とも、B6/Nと比較して違いが観察されなかった。しかしながら、80分以降の血糖値の上昇に関しては、両系統とも、B6/Nと比較して回復が早くなる傾向があった。今後、

解析頭数をさらに増やしてデータを取ること、統計的有意性が示せるものと期待している。

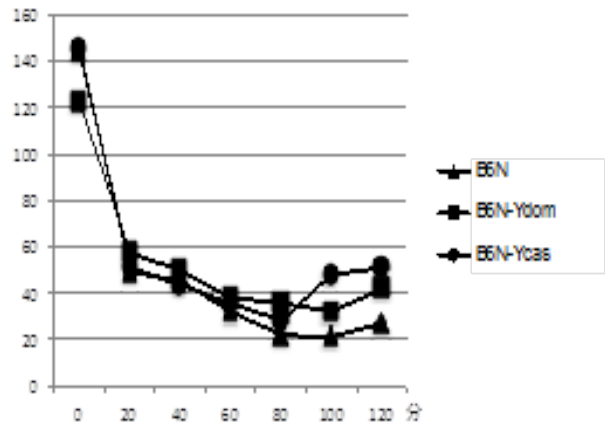


図3 インスリン抵抗性

(3) 考察と今後の展望

本計画では、親の遺伝子型が次世代の表現型に影響を与える経世代遺伝効果を実証し、その分子メカニズムを明らかにするために研究を開始した。しかし、研究開始と同時に別亜種由来のY-染色体を導入したB6/J系統の遺伝的背景では、代謝関連表現型データの分散(バラツキ)が大きいことが判明し、急速にデータが安定して計測されてことが期待できるB6/N系統に各亜種由来のY-染色体を移し替えることとした。計画期間中に、何とか6-7世代の戻し交配を完了することができ、もっとも世代が進んでいる雌個体を用いて表現型解析を行うことが出来た。この結果、解析の個体数は少ないものの、元のB6/J系統の遺伝的背景で観察された遺伝効果が、異なる遺伝的背景においても観察され、経世代遺伝効果の存在する可能性が強まった。現在、解析頭数を増やした追加実験を行っており、厳密に統計的有意性が得られるかどうかを確認する予定である。また、解析対象となっているY-染色体コンソミック系統の雄個体において、同様な表現型の差異が見られることを、B6/N系統を遺伝的背景とする系で解析することを平行して進めていく予定である。

2年間の研究期間では、残念ながら当初計画していた経世代遺伝効果の分子メカニズムの解明までは研究を進めることができなかった。しかし、安定して代謝関連表現型が計測される B6/N 系統においても B6/J 系統と同様な傾向が見られたことから、この後の分子メカニズムの解明はより容易に進めることができるものと期待している。

<引用文献>

1. Heaney JD, Lam M-Y, Michelson MV, Nadeau JH. (2008). Loss of the transmembrane but not the soluble Kit Isoform increases testicular germ cell tumor susceptibility in mice. *Cancer Res.*  
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0779
2. Nelson VR, Heaney JD, Tesar PJ, Davidson NO, Nadeau JH. (2012). Transgenerational epigenetic effects of the Apobec1 cytosine deaminase deficiency on testicular germ cell tumor susceptibility and embryonic viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 2766. Doi: 10.1073/pnas.1207169109
3. Bellott DW et al. (2014). Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators. *Nature* 508, 494. Doi: 10.1038/nature13206
4. Takada T, Mita A, Maeno A, Sakai T, Shitara H, Kikkawa, Y, ... Shiroishi, T. (2008). Mouse inter-subspecific consomic strains for genetic dissection of quantitative complex traits. *Genome Research*, 18(3), 500-508.  
<http://doi.org/10.1101/gr.7175308>

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2件)

高田豊行、近藤伸二、矢坂 拓、阿部貴志、清澤秀孔、鈴木 穰、豊田 敦、藤山秋佐夫、城石俊彦「エネルギー代謝表現型の亜種間差に関わる遺伝子発現動態の探索」日本遺伝学会 第 88 回大会、2016 年 9 月 7-10 日、三島

高田豊行、福多賢太郎、野口英樹、豊田敦、山崎由紀子、藤山秋佐夫、城石俊彦「マウス野生由来系統群“ミシマバッテリー”のゲノム解読と体質関連遺伝子探索への利用」第 63 回日本実験動物学会総会、2016 年 5 月 18-20 日、川崎

6. 研究組織

(1)研究代表者

城石俊彦 (SHIROISHI Toshihiko)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：9 0 1 7 1 0 5 8

(2)連携研究者

高田豊行 (TAKADA Toyoyuki)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

研究者番号：2 0 3 5 6 2 5 7