

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19023

研究課題名(和文)小胞体シグナルを介した母体栄養に起因する胎仔肝のエピゲノム修飾の解明

研究課題名(英文) Analysis of epigenomic modification of fetal liver caused by maternal nutrition via endoplasmic reticulum signal

研究代表者

張 君 (ZHANG, Jun)

徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)・特任研究員

研究者番号：70629790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠中の母体の栄養状態が胎児の将来の生活習慣病の罹患率上昇に関連することが疫学調査から明らかになっているがその詳しい分子機序は不明な点が多い。小胞体ストレス応答を制御するPERKは、飢餓や飽食などの栄養環境の変化でも活性化し、またPERKの活性化は肝臓での糖代謝と脂質代謝に影響することをこれまでに見出してきた。本研究では、肝臓のPERKのみを任意に活性化できる遺伝子改変マウスを用いて、PERKを介した胎児肝臓におけるエピゲノム変化を解析した。胎生期の一時期にPERKを活性化すると、出生後の肝臓でのDNAメチル化の割合が増加していることを見出すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：Epidemiological studies have revealed that the nutritional status of pregnant mothers is related to an increase the risk for adverse outcomes both in maternal and offspring health, but a detailed molecular mechanism is still unknown. Previously, we have found that PERK, which regulates endoplasmic reticulum stress response, is activated by changes in nutritional conditions such as starvation and satiation, and that activation of PERK affects glucose metabolism and lipid metabolism in the liver. In this study, epigenomic changes in fetal liver via PERK were analyzed using genetically modified mice which can arbitrarily activate only PERK in the liver. We found that the proportion of DNA methylation was increased in the liver after birth when PERK was activated in the liver at a time of embryonic stage.

研究分野：分子病態栄養学

キーワード：分子病態栄養学 小胞体ストレス PERK

1. 研究開始当初の背景

母体の妊娠中の栄養状態が胎児の将来の生活習慣病の罹患率の上昇に関連するという Barker 仮説は、その後の多くの疫学調査の結果から現在では広く支持されているが、その分子機構は不明な点が多い。肝臓は3大栄養素の代謝の要となる臓器で、その機能の破綻は糖尿病や脂肪肝などの生活習慣病の発症に繋がる。

細胞は、PERK 経路、ATF6 経路、IRE1 経路の3つ小胞体シグナルにより、一時的な翻訳停止、タンパク質の折り畳み能力増加、折り畳み不全タンパク質の分解などを行って小胞体ストレスを緩和する応答機構を持つ。近年、小胞体でのタンパク質の折り畳み環境を調節する小胞体シグナルが、肝臓での代謝の制御にも関与することがわかり、代謝制御の新たな機構として注目されている。

2. 研究の目的

最近、申請者は、肝臓で PERK 経路を活性化させた際に誘導される遺伝子の網羅的解析から、PERK 活性化は DNA メチル化やヒストンメチル化に必要な遺伝子を誘導することを見出した。そこで、母体栄養の変化は胎児肝臓で小胞体ストレスを惹起し、PERK 活性化によって生じたエピゲノム修飾により糖代謝や脂質代謝を制御する遺伝子の発現が高まり、成体後に糖尿病や脂肪肝などの生活習慣病の発症リスクを高めているという仮説を考えるに至った。本研究は遺伝子改変マウスを用いて上記仮説の検証を行い、妊娠中の食生活改善による生活習慣病発症の分子基盤の解明を目指す。

3. 研究の方法

母体栄養による胎児肝臓での小胞体シグナル活性化によるエピゲノム修飾との成体後の代謝変化の因果関係について、母親マウスに、通常食を与えた群、70%カロリー制限した群、高脂肪食を与えた群、肝臓特異的に小胞体シグナルである PERK を活性化させた群の計4群由来の仔マウスについて、エピゲノム修飾と代謝の表現型との関係を比較解析することで、新たな分子機構の同定を目指す。具体的には、以下の解析を実施する。

(1) 胎児期での PERK 経路活性化の程度の生化学的解析

通常食、70%カロリー制限あるいは高脂肪食(脂質60%)を妊娠後から母マウスに与えて、肝臓の器官形成が行われる胎生13.5日目、15.5日目及び17.5日目で胎児肝を摘出して、分子シャペロン BiP、GRP94、PDI などの mRNA 発現で小胞体ストレスの程度を、さらに ATF4、ATF3、C/EBP などの mRNA 発現で PERK 経路の活性化の程度を RT-qPCR

で解析する。また、母胎栄養状態の変化による PERK 経路の活性化と同程度の PERK 活性を胎児肝臓で誘導することができる AP の投与量を、上述した PERK 経路の下流遺伝子の誘導を RT-qPCR で評価して決定する。

(2) 成体期での糖尿病や脂肪肝などの表現型解析

通常食を与えた群、70%カロリー制限した群、高脂肪食を与えた群、肝臓特異的に小胞体シグナルである PERK を活性化させた群の計4群間で、糖尿病や脂肪肝を惹起しやすいように成体後の8週齢から高脂肪食を与えて、糖代謝と脂質代謝の変化を生理学的解析、生化学的解析、組織学的解析で比較検討する。

(3) 出生後の体重差が消失する新生児期でのエピゲノム修飾解析

出生直後には認める体重差が消失する新生児期の肝臓を摘出して、全ゲノムにわたる網羅的な DNA メチル化を Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)-seq で解析する。

(4) (1)~(3)の結果から考えられる分子機構の培養細胞を用いた検証

マウスを用いた *in vivo* 実験の結果から考えられる分子機構を検証するために、肝細胞株である HepG2 細胞において Fv2E-PERK システムを遺伝子導入し、PERK 経路の活性化により予想される DNA 脱メチル化とそれに伴う標的遺伝子の転写活性の増加を MeDIP と RT-qPCR で解析する。

4. 研究成果

(1) 胎児期での PERK 経路活性化の程度の生化学的解析

通常食、70%カロリー制限あるいは高脂肪食(脂質60%)を妊娠後から母マウスに与えて、肝臓の器官形成が行われる胎生13.5日目、15.5日目及び17.5日目で胎児肝を摘出して、分子シャペロン BiP、GRP94、PDI などの mRNA 発現で小胞体ストレスの程度を、さらに ATF4、ATF3、C/EBP などの mRNA 発現で PERK 経路の活性化の程度を RT-qPCR で解析した。

また、母胎栄養状態の変化による PERK 経路の活性化と同程度の PERK 活性を胎児肝臓で誘導することができる AP の投与量を、上述した PERK 経路の下流遺伝子の誘導を RT-qPCR で評価して決定した。

(2) 成体期での糖尿病や脂肪肝などの表現型解析

通常食を与えた群、70%カロリー制限した群、高脂肪食を与えた群、肝臓特異的に小胞体シグナルである PERK を活性化させた群の計4群は、出生直後は体重差をわずかに認めるが、生後1週間後には4群間で差を認め

ないことが予備実験で明らかになっている。糖尿病や脂肪肝を惹起しやすいように成体後の8週齢から高脂肪食を与えて、4群間での糖代謝と脂質代謝の変化について検討した。生理学的解析として週毎に体重、随時血糖を測定し、グループ間で差を認めたら、領域特異的代謝機能を評価するために肝臓を摘出して、門脈周辺の幹細胞を標識するGPS1および静脈域の幹細胞を標識するGSマーカーの免疫染色を行った。

胎生期での小胞体ストレス応答経路PERKの活性化が、出産後の新生仔期の生体機能にどのように影響するかを解析し、その分子機構について検討を行った。

申請者が作製した臓器特異的、薬剤依存的にPERKを活性化できる遺伝子改変マウスを用いることで、小胞体ストレスを惹起させずに、PERK経路だけを胎生期に活性化させて、無活性化群、母体のみ活性化群、母仔とも活性化群を得た。出生後の体重差が消失する新生児期において、小胞体ストレス刺激における肝臓でのPERK経路の下流遺伝子の発現解析をすると、胎生期でのPERK活性化に伴ってPERK下流遺伝子の発現誘導が亢進することがわかった。マウスでの表現型のメカニズムを明らかにするために、PERK経路のみ活性化できる培養細胞の5-メチルシトシン(5mC)によるエピゲノム修飾解析を行ったところ、PERK経路活性化による脱メチル化が誘導されることが明らかになった。

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)

[学会発表](計10件)

張 君、三宅雅人、津川和江、宮本千伸、親泊政一

UPR欠損マウス胎児線維芽細胞は小胞体からのCa²⁺放出を介してアポトーシスを誘導する

第11回臨床ストレス応答学会大会

2016年11月12日

山口大学医学部霜仁会館(山口県・宇部市)

張 君、三宅雅人、津川和江、宮本千伸、親泊政一

UPR欠損マウス胎児線維芽細胞は小胞体からのCa²⁺放出を介してアポトーシスを誘導する

第11回小胞体ストレス研究会

2016年10月10日

岐阜大学サテライトキャンパス(岐阜県・岐阜市)

倉橋清衛、河野恵理、宮本千伸、津川和江、親泊美帆、木村千寿子、久永哲、森本雅俊、山川哲生、谷内秀輔、張 君、三宅雅人、安倍正博、親泊 政一

ラベルフリー測定によるハイスループッ

トスクリーニングを用いた新規インスリン分泌促進薬の探索

第59回日本糖尿病学会年次学術集会

2016年5月21日

国立京都国際会館(京都府・京都市)

三宅雅人、高原一菜、張 君、倉橋清衛、宮本千伸、津川和江、親泊美帆、親泊政一
ATF6の肥満・糖尿病における役割の解明

第59回日本糖尿病学会年次学術集会

2016年5月20日

国立京都国際会館(京都府・京都市)

三宅雅人、張 君、志内哲也、倉橋清衛、宮本千伸、津川和江、親泊美帆、親泊政一
小胞体ストレスなどで活性化されるeIF2リン酸化シグナルによる摂食調節を介した肥満抑制作用

第38回分子生物学会年会・第88回生化学会年会合同大会

2015年12月2日

神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

張 君、三宅雅人、倉橋清衛、津川和江、宮本千伸、親泊美帆、親泊政一

CRISPR/Cas9を用いた小胞体ストレス応答伝達タンパク質の検証

第38回分子生物学会年会・第88回生化学会年会合同大会

2015年12月2日

神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

佐藤亮祐、三宅雅人、谷内秀輔、山川哲生、張 君、倉橋清衛、森本雅俊、久永哲、西良浩一、親泊政一

ATF6は非古典的小胞体ストレス応答として軟骨細胞分化を制御する

第38回分子生物学会年会・第88回生化学会年会合同大会

2015年12月1日

神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

張 君、三宅雅人、倉橋清衛、津川和江、宮本千伸、親泊美帆、親泊政一

CRISPR/Cas9を用いた小胞体ストレス応答伝達タンパク質の検証

第10回小胞体ストレス研究会

2015年11月29日

淡路夢舞台国際会議場(兵庫県・淡路市)

三宅雅人、張 君、倉橋清衛、宮本千伸、津川和江、親泊美帆、親泊政一

小胞体ストレスなどで活性化されるeIF2リン酸化シグナルによる摂食調節を介した肥満抑制作用

第58回日本糖尿病学会年次学術集会、2015年11月29日

海峡メッセ下関(山口県・下関市)

森本雅俊、久永哲、張 君、谷内秀輔、山川哲生、三宅雅人、西良浩一、親泊政一
ATF6の骨形成における役割

第10回小胞体ストレス研究会

2015年11月29日

淡路夢舞台国際会議場（兵庫県・淡路市）

6．研究組織

(1)研究代表者

張 君 (ZHANG, Jun)

徳島大学・先端酵素学研究所・特任研究員

研究者番号：70629790