

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15053

研究課題名(和文)獲得形質の遺伝メカニズム

研究課題名(英文)The molecular mechanism of transgenerational epigenetic inheritance

研究代表者

本道 栄一 (Hondo, Eiichi)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：30271745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、糖尿病モデルマウスを使ってTransgenerational Epigenetic Inheritanceの分子機構を明らかにするものである。膵島beta細胞株をSTZ処理をした培養上清で上昇したmiRNAは、我々の行った糖尿病モデルマウスの血中エクソソームで上昇するmiRNAと一致した。つまり、beta細胞の崩壊過程で分泌されるmiRNAが血中で上昇し、生殖細胞に影響を及ぼす可能性が示唆された。miRNA投与実験の効果を確かめるため、過去の報告にある糖尿病マウスで変化した精子のメチル化DNAの領域を確認したが、我々の結果と一致しなかった。そこで我々のマウスのプロファイルを確立した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the molecular mechanism of transgenerational epigenetic inheritance. The miRNAs upregulated in the culture medium of pancreatic beta cell line were consistent with the miRNA species upregulated in the blood of diabetic mice. This suggests that miRNAs produced in degenerating beta cells should enter blood stream and have an influence on the germ cells. The methylated DNA regions of diabetic mice sperm in the previous report were not consistent with our result using our inbred strain of mice. Then, we revealed the epigenomic profile in glycometabolic genes using our own mice.

研究分野：動物形態学

キーワード：獲得形質 エピゲノム 糖尿病モデル

1. 研究開始当初の背景

親世代で獲得した形質が次世代に遺伝する、いわゆる獲得形質の遺伝は、こと親世代の糖代謝系でのエピゲノム変化とともに(型糖尿病)子の膵島B細胞数が変化する点で、科学界に受け入れられたものと思われる。一方、その直接の因果関係については明確に証明されておらず、それは、親世代の膵島B細胞の変化と子の膵島B細胞の変化の間を結ぶ分子機構の知見がないことが原因だった。

2. 研究の目的

以上を踏まえ、本研究では、1.親世代での糖代謝に関わる情報伝達のしくみを明らかにすること、2.親世代から子世代への情報伝達のしくみを明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

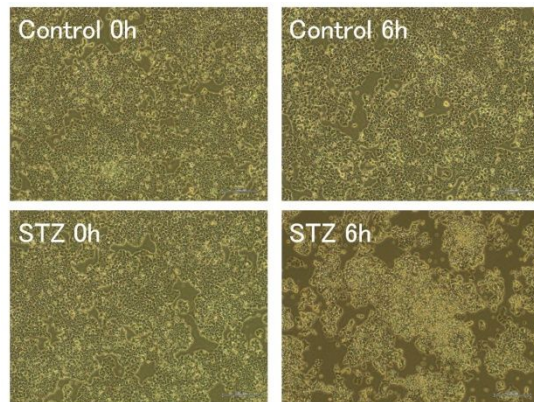
親世代での糖代謝に関わる情報伝達を明らかにするため、研究開始点で我々が明らかにしていた型糖尿病マウスの血中上昇もしくは減少するmiRNAの変化と、実際に膵島細胞で分泌するmiRNAの変化が一致するかどうかの検討を行った。このため、まず、インスリノーマ細胞(Min6)の最適培養条件を設定した。次に、インスリノーマ細胞に退行性変化を起こさせるため、ストレプトゾチンの最適添加条件の設定を行った。設定後、ストレプトゾチン投与群と対照群の培養上清を回収し、上述の血液中のmiRNAの変化と一致するかどうかqPCRにて検討を行った。

2016年度の研究で、我々が長年維持してきたICRマウス生体より摘出した精巣より、バイサルファイトシーケンシングにより、過去に報告のある糖代謝関連遺伝子Pik3r1, Pik3caおよびPtpn1のシトシンメチル化を確認したところ、過去の報告と一致しなかった(PNAS 111(5) 2014)。そこで、糖尿病モデルマウスの精巣上体尾部の精子および正常マウスの同精子を用いてMeDIP(メチル化DNA免疫沈降法)による次世代シーケンシングによって、両者におけるDNAメチル化の程度の異なる糖代謝関連遺伝子の部位の網羅的な検出を行った。両者とも、次世代シーケンシングにて少なくとも100万リードが割り当てられるよう、ライブラリーの作製を行った。

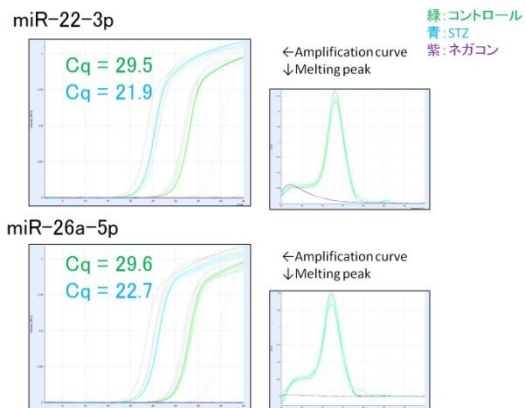
4. 研究成果

DMEM high glucose, 15% FBS, ペニシリン、ストレプトマイシン、beta-メルカプトエタノール培地(0.1mM)にて培養を行ったところ良好な生育を示したため、本インスリノーマ

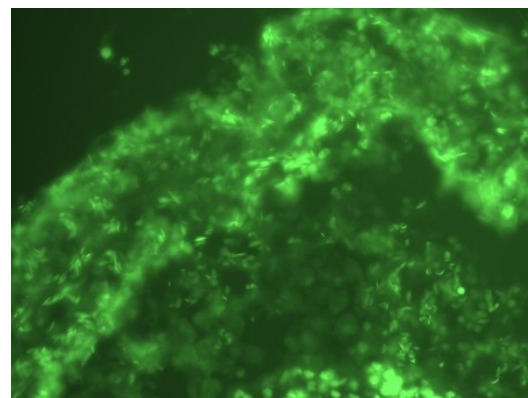
細胞へのストレプトゾチン投与実験を行った。本細胞はストレプトゾチン感受性で、比較的早期の反応を示した(下図)。



ストレプトゾチン投与6時間後の培養上清中および対照群の間でのmiRNAの変化を確認したところ、型糖尿病モデルで対照群と比較して上昇したmiRNAの一部でインスリノーマ細胞の培養上清でも一致していた(下図)。



対照群で型糖尿病モデルと比較して上昇するmiRNAについても検討する必要はあるが、概ね、以下の推論「膵島B細胞の退行の過程でB細胞から放出されるmiRNAが血中で上昇し、生殖細胞でのエピゲノムを変化させる」が成り立つ可能性が高くなった。上述のmiRNAはすべてエクソソームに包埋されているため、このエクソソームが精巣組織に取り込まれるかどうかを確認するため、Min6細胞の培養上清に対してexo-glow exosome labeling kit(システムバイオサイエンス社)による標識を試み、得られた産物を用いて精巣組織培養片を用いた取り込みを確認した。



投与後48時間での取り込み確認を行ったこ

と、マウスの精子発生には *in vivo* で少なくとも1 か月かかること、今回が精巢の組織培養であることから、前ページ最下図の色素の多くは、切断された精細管から流入したものとと思われるが、能動的に輸送された可能性、精細胞がエクソソームの取り込みを活発に行っている可能性も残されている。

研究の方法欄で述べたように、本研究は論文 (PNAS 111(5) 2014) の上で計画されたが (親世代と子世代をつなげる分子機構の解明の部分) その論文に再現性がなかった。別の報告 (Nature Volume: 551, Pages: 281 Date published: 16 November 2017) にあるように、C57BL/6J のような近交系であっても、系統維持の過程でゲノム変異が蓄積し、2002年にNCBIに登録されたゲノム (Jackson Lab 産の C57BL/6) と比べても、現行の Jackson 産 C57BL/6J では数千の変異が認められているようである。ゲノム配列ですらこのような現状にあるから、エピゲノムの変化は非常に繊細で、同じ系統のマウスであっても飼育環境 (餌の種類の違いなど) の違いでも大きな差異が生まれるように思われた。そこで、我々の長年飼育してきた同系統 (ICR マウス) でのエピゲノムの変化した遺伝子群を次世代シーケンシングで確認したところ、上述の論文で公表されている *Pik3ca* や *Ptpn1* とは異なる *Mafb*, *pde1c*, *neurexin1*, *ifgr1*, *cacna1e*, *insr*, *stxbp4*, *ptpn11*, *casr*, *rxf3* 遺伝子のイントロン部分にメチル化の相違が認められた。これらの一部についてバイサルファイトシーケンシングによって実際にメチル化が変化しているかどうかを確認したところ、MeDIP シーケンシングの結果と一致した。本研究のさらなる重要な点は、如何にして生殖細胞の情報が次世代へ移行するかであり、現在糖尿病モデルマウスの精子からの受精卵と正常マウス精子からの受精卵のトランスクリプトーム比較を行う必要がある。

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 14 件)

1. Hengjan Y, Saputra V, Mirsageri, Pramono D, Supratikno, Basri C, Ando T, Ohmori Y, Agungpriyono S, Hondo E. Nighttime behavioral study of flying foxes on the south coast of West Java, Indonesia. J Vet Med Sci (in press) 査読あり
2. Rahpaya SS, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Oba M, Katayama Y, Nunomura Y, Kokawa S, Kimura T, Kobayashi A, Kirino Y, Okabayashi T, Nonaka N, Mekata H, Aoki H, Shiokawa M, Umetsu M, Morita T, Hasebe A, Otsu K, Asai T, Yamaguchi T, Makino S,

Murata Y, Abi AJ, Omatsu T, Mizutani T. Dembo-PCR technique for the detection of bovine abortion, diarrhea, and respiratory disease complex infectious agents in potential vectors and reservoirs. J Vet Sci. (in press) 査読あり

3. Iida K, Kobayashi R, Hengjan Y, Nagata N, Yonemitsu K, Nunome M, Kuwata R, Suzuki K, Ichianagi K, Maeda K, Ohmori Y, Hondo E. The genetic diversity of D-loop sequences in eastern bent-winged bats (*Miniopterus fuliginosus*) living in Wakayama Prefecture, Japan. J Vet Med Sci 2017; 79(6), 1142-1145. 査読あり

4. Hengjan Y, Pramono D, Takemae H, Kobayashi R, Iida K, Ando T, Kasmono S, Basri C, Fitriana YS, Arifin EMZ, Ohmori Y, Maeda K, Agungpriyono S, Hondo E. Daytime behavior of *Pteropus vampyrus* in a natural habitat: the driver of viral transmission. J Vet Med Sci 2017; 79(6), 1125-1133. 査読あり

5. Basri C, Arifin EMZ, Takemae H, Hengjan Y, Iida K, Sudarnika E, Zahid A, Soejoedono RD, Susetya H, Sumiarto B, Kobayashi R, Agungpriyono S, Hondo E. Potential risk of viral transmission from flying foxes to domestic animals and humans on the southern coast of West Java, Indonesia. J Vet Med Sci 2017; 79(9), 1615-1626. 査読あり

6. Hengjan Y, Iida K, Doysabas KCC, Phichitrasilp T, Ohmori Y, Hondo E. Diurnal behavior and activity budget of the golden-crowned flying fox (*Acerodon jubatus*) in the Subic bay forest reserve area, the Philippines. J Vet Med Sci 2017; 79(10), 1667-1674. 査読あり

7. Kuroda M, Masuda T, Ito M, Naoi Y, Doan YH, Haga K, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Sano K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Aoki H, Ichimaru T, Sunaga F, Mukono I, Yamasato H, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Oka T, Nagai M. Genetic diversity and intergenogroup recombination events of sapoviruses detected from feces of pigs in Japan. Infect Genet Evol. 2017 Nov;55:209-217. 査読あり

8. Nakagawa K, Nakagawa K, Omatsu T, Katayama Y, Oba M, Mitake H, Okada K, Yamaoka S, Takashima Y, Masatani T, Okadera K, Ito N, Mizutani T, Sugiyama M. Generation of a novel live rabies vaccine strain with a high level of safety by

introducing attenuating mutations in the nucleoprotein and glycoprotein. *Vaccine*. 2017 Oct 9;35(42):5622-5628. 査読あり

9. Taniguchi S, Maeda K, Horimoto T, Masangkay JS, Puentes-pina R Jr, Alvarez J, Eres E, Cosico E, Nagata N, Egawa K, Singh H, Fukuma A, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Tsuchiaka S, **Omatsu T**, Mizutani T, Une Y, Yoshikawa Y, Shimojima M, Saijo M, Kyuwa S. First isolation and characterization of Pteropine orthoreoviruses in fruit bats in the Philippines. *Archives of Virology* 2017; 162(6), 1529-1539. 査読あり

10. Tsuchiaka S, Rahpaya SS, Otomaru K, Aoki H, Kishimoto M, Naoi Y, **Omatsu T**, Sano K, Okazaki-Terashima S, Katayama Y, Oba M, Nagai M, Mizutani T. Identification of a novel bovine enterovirus possessing highly divergent amino acid sequences in capsid protein. *BMC Microbiol* 2017; 17(1), 18 査読あり

11. Oba M, Katayama Y, Naoi Y, Tsuchiaka S, **Omatsu T**, Okumura A, Nagai M, Mizutani T. Discovery of fur seal feces-associated circular DNA virus in swine feces in Japan. *J Vet Med Sci*. 2017 Oct 7;79(10):1664-1666. 査読あり

12. Kokawa S, Oba M, Hirata T, Tamaki S, Omura M, Tsuchiaka S, Nagai M, **Omatsu T**, Mizutani T. Molecular characteristics and prevalence of small ruminant lentiviruses in goats in Japan. *Arch Virol*. 2017 Oct;162(10):3007-3015. 査読あり

13. Fukano H, Yoshida M, Katayama Y, **Omatsu T**, Mizutani T, Kurata O, Wada S, Hoshino Y. Complete Genome Sequence of *Mycobacterium stephanolepidis*. *Genome Announc*. 2017 Aug 17;5(33). 査読あり

14. Shi G, Ando T, Suzuki R, Matsuda M, Nakashima K, Ito M, **Omatsu T**, Oba M, Ochiai H, Kato T, Mizutani T, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of the 3' Untranslated Region in Encapsidation of the Hepatitis C Virus. *PLoS Pathol* 2016; 12(2), e1005441. 査読あり

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

本道栄一 (HONDO, Eiichi)
名古屋大学大学院・生命農学研究科・教授
研究者番号：30271745

(2)研究分担者

大松勉 (OMATSU, Tsutomu)
東京農工大学・農学部・准教授
研究者番号：60455392