

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07144

研究課題名(和文) 栄養代謝関連遺伝子欠損マウスを用いた母体低栄養モデルマウスの開発

研究課題名(英文) Effects of maternal-gene mutations on phenotypes of wild-type progeny

研究代表者

古瀬 民生 (Furuse, Tamio)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・開発研究員

研究者番号：60392106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、栄養輸送や栄養代謝、特にメチル基質の供与に強くかかわるOne Carbon Metabolism (OCM)に関する遺伝子の中でMat2a遺伝子の変異体を仮親として得た野生型マウスの受精卵を移植して仔を得て、同様に野生型の母体から作出された仔との間で行動表現型および遺伝子発現の比較を行った。まず、Mat2a変異体の血漿中のOCM関連物質の濃度を測定したところ複数の項目で変化がみられた。Mat2a変異体を仮親として得た野生型マウスにおいては行動表現型の変化と脳の遺伝子発現に変化が検出され、母体のOCM関連遺伝子の変異が次世代の行動表現型に影響を与えることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生育環境が成人した後の疾患感受性に影響を与えるという概念はDevelopmental Origins of Health and Disease (DOHaD)と呼ばれ、精神疾患分野においても生物学的メカニズムの解明が求められている。本研究により、マウスにおいては、母体のOCM関連遺伝子Mat2aの変異が次世代の遺伝子変異を持たないマウスの行動表現型や遺伝子発現に影響を与えることが明らかになった。このことから、ヒトにおいて母体のOCM関連遺伝子の変異が次世代に伝達しない場合においても、次世代の疾患感受性に影響する可能性が示唆され、上記のDOHaD研究の進展に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The OCM is consisted of methionine cycle and folate cycle. The folate cycle is involved in DNA synthesis and the methionine cycle is involved in DNA methylation by donating methyl group. In the present study, we aimed to evaluate effects of maternal OCM deficit on neurobehavioral phenotypes of progeny. In order to evaluate the effects of Mat2a mutation on nutritional environment of the fetuses, we performed LC-MS measurements of OCM metabolites in plasma of heterozygote of the Mat2a mutants and wild type mice. The pre-pregnancy females of the Mat2a mutants exhibited decreased concentration of S-adenosyl methionine (SAM). We transferred C57BL/6N embryo to uterus of wild type and heterozygous Mat2a knockout (Mat2a mutant) females. The offspring from the Mat2a mutants exhibited increased locomotor activity and deficits of fear conditioned learning. These results suggest that the exposure to decreased SAM level during early to middle pregnancy affects brain function of progenies.

研究分野：実験動物学

キーワード：DOHaD マウス行動解析 実験動物 Mat2a One carbon metabolism

1. 研究開始当初の背景

胎児期の生育環境が成人した後の疾患感受性に影響を与えるという概念が DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 仮説として提唱されている。疫学調査による検証はヒトの遺伝的不均一性、生育環境を統御の困難さから、DOHaD 仮説の詳細な検証に必要な精度の高いデータを得る事は困難であるため、動物モデルを用いた実験系で詳細に検討する必要がある。マウスはモデル動物として最も広範囲に使用されている。特に、マウスの神経細胞は神経科学のツールとして長年研究されており、様々な知見が蓄積されている。また、脳構造のヒトとの相動性に関するデータが豊富であるだけでなく、近年の遺伝子改変技術の進歩によりノックアウトマウス、トランスジェニックマウスといった遺伝子改変マウスを用いた解析の労力とコストが削減されている。このことから、マウスは精神疾患研究における最も有用なモデル動物の一つである。そこで我々は、マウスの生活環における胎生期に着目し、マウスの胎児期における母体の栄養条件、特に低栄養が行動表現型に与える影響を、高度に統制された飼育条件、表現型解析プラットフォーム、ゲノム DNA メチル化の定量、脳組織解析を用いて検討し、発達障害・精神疾患における DOHaD 仮説の検証を目指してきた。これまでは、母獣に低タンパク食を与えた場合の仔の行動表現型解析とエピゲノム解析を行い、母体の低タンパク食が仔のゲノムメチル化と行動表現型に影響を与えることと、ゲノムメチル化と行動表現型変化の一部が、食品中のメチル基供給源である葉酸を飼料に添加することにより低減されることを明らかにした (Furuse et al., Genes & Nutrition 2017)。このことから、母体のメチル基供与体の多寡が仔のゲノム DNA メチル化レベルに影響を与え、疾患感受性に影響を与えることが考えられる (Furuse et al., Genes & Nutrition 2017)。実際に、カナダにおいてはパンへの葉酸添加を義務付けたところ二分脊椎症への罹患率が半減したという。メチル基供与体であるメチオニン、葉酸などの代謝回路は one carbon metabolism (OCM) と呼ばれ、関連遺伝子はその変異を持つ個体だけの疾患だけでなく、母体がその変異を持つことにより母体環境が変化し、次世代の表現型に影響を与えることが知られ始めている。

2. 研究の目的

本研究では、この OCM 遺伝子群に着目し、OCM 関連遺伝子のノックアウトマウスを母体として用い、これに野生型、もしくは精神疾患関連遺伝子の変異体の受精卵を移植して仔を得て、同様の野生型の母体から作出された仔との間で表現型および遺伝子発現、ゲノムメチル化の比較を行い、精神疾患における母体遺伝子変異によって生ずる胎児期低栄養と仔の異常表現型との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

表現型解析に用いる仔マウスの生産には変異マウスを仮親とした体外受精、胚移植を用いる。これは、自然交配において生ずると考えられる、卵子形成における母体の遺伝子変異の影響を排除するためである。得られた仔マウスについて仮親の遺伝子型に基づいて行動表現型の比較(図1)を行った。さらに、行動表現型に差異の見られた個体群に関しては、脳神経系の組織解析を行った。

検査番号	検査分野	検査法	週齢											
			6	7	8	9	10	11	12	13	14			
行動特性検査 A	行動・精神・神経	明暗往来試験												
		オープンフィールドテスト												
		Crawley社会相互作用テスト												
		ホームケージテスト												
		Y迷路												
		恐怖条件付け試験												
		プレパルスインヒビションテスト												

図1 日本マウスクリニックにおける網羅的行動解析プラットフォーム

4. 研究成果

本研究では、OCM関連遺伝子の一つである *Mat2a* 遺伝子 (図2) 変異マウスを用いて解析を行った。

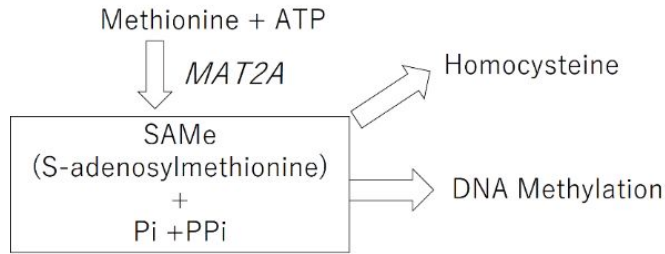


図2 *Mat2a* 遺伝子の機能

未妊娠の *Mat2a* 変異体の血漿中における S-adenosyl methionine (SAM) の濃度測定を行ったところ、SAM の濃度の有意な減少を確認した (表1)。

表1 *Mat2a* 変異体における OCM 関連物質の濃度変化

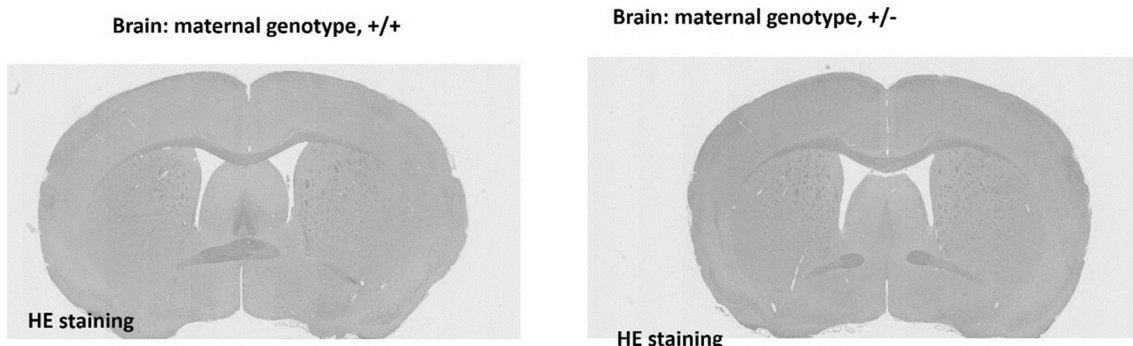
OCM関連物質	<i>Mat2a</i> 変異体血漿中濃度
Methionine	減少
S-adenosyl-homocysteine	減少
S-adenosyl methionine	減少
Homocysteine	増加

そこで、同じサンプルを用いて Homocysteine、S-adenosyl homocysteine、Methionine などの OCM に関連する物質を質量分析により定量したところ、それぞれで量的な変化が見出された。一方で、*Mat2a* 変異体における上記の物質の量的な変化は、妊娠時においては縮小した。また、胎児の脳組織についても上記の物質の一部で量的な変化が見受けられた。また、*Mat2a* 変異体の雌を仮親とし、体外受精により得られた野生型 C57BL/6 由来の受精卵を移植して仔獣を作出した。この仔獣においては移動活動量の有意な増大などの行動表現型変化が見受けられた (表2)。

表2 *Mat2a* KO 野生型産仔行動解析結果要約

Behavior	
Fear and anxiety	低下
Social interaction	変化なし
Object exploration	変化なし
Activity pattern	変化なし
Locomotor activity	上昇
Learning and memory	低下

これらのことから、母体における OCM 関連遺伝子の変異は次世代の行動表現型に影響を与えることが明らかになった。また、先端モデル動物支援プラットフォーム (16H06276) の協力を得て脳組織形態の観察を行ったところ、ヘテロ KO 由来の産仔に目立った異常は検出されなかったが (図3)、一部の脳領域で神経活動マーカーである cFos タンパクの免疫組織化学染色を行ったところ陽性細胞の増加が見受けられた。



以上より、母体におけるメチル化基質の減少が次世代の脳神経系の機能に影響を与えることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 古瀬 民生、若菜 茂晴	4. 巻 73
2. 論文標題 胎児期栄養は発達障害の環境要因となりうるのか 胎児期低栄養暴露マウスの網羅的行動表現型解析から得られた知見	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本衛生学雑誌	6. 最初と最後の頁 97-100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1265/jjh.73.97	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shimazu Tadahiro, Furuse Tamio, Balan Shabeesh, Yamada Ikuko, Okuno Shuzo, Iwanari Hiroko, Suzuki Takehiro, Hamakubo Takao, Dohmae Naoshi, Yoshikawa Takeo, Wakana Shigeharu, Shinkai Yoichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Role of METTL20 in regulating β -oxidation and heat production in mice under fasting or ketogenic conditions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-19615-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Rozman J. et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of genetic elements in metabolism by high-throughput mouse phenotyping	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 288
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-017-01995-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Bowl Michael R. et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 A large scale hearing loss screen reveals an extensive unexplored genetic landscape for auditory dysfunction	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 886
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-017-00595-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Karp Natasha A. et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 Prevalence of sexual dimorphism in mammalian phenotypic traits	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 15475 ~ 15475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ncomms15475	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsumura, K., Seiriki, K., Okada, S. et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Pathogenic POGZ mutation causes impaired cortical development and reversible autism-like phenotypes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-14697-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furuse Tamio, Mizuma Hiroshi, Hirose Yuuki, Kushida Tomoko, Yamada Ikuko, Miura Ikuo, Masuya Hiroshi, Funato Hiromasa, Yanagisawa Masashi, Onoe Hirotaka, Wakana Shigeharu	4. 巻 12
2. 論文標題 A new mouse model of GLUT1 deficiency syndrome exhibits abnormal sleep-wake patterns and alterations of glucose kinetics in the brain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	6. 最初と最後の頁 038828-038828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dmm.038828	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kim Karam, Suzuki Akio, Kojima Hiroto, Kawamura Meiko, Miya Ken, Abe Manabu, Yamada Ikuko, Furuse Tamio, Wakana Shigenaru, Sakimura Kenji, Hayashi Yasunori	4. 巻 157
2. 論文標題 Autophosphorylation of F-actin binding domain of CaMKII is required for fear learning	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurobiology of Learning and Memory	6. 最初と最後の頁 86 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nlm.2018.12.003	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Moore Bret A. et al.	4. 巻 1
2. 論文標題 Identification of genes required for eye development by high-throughput screening of mouse knockouts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-018-0226-0	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 古瀬民生、幸田尚、串田知子、山田郁子、三浦郁生、小林喜美男、石野史敏、若菜茂晴
2. 発表標題 母体のメチオニン代謝異常が仔の行動表現型と遺伝子発現に与える影響
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古瀬民生、幸田尚、串田知子、山田郁子、三浦郁生、小林喜美男、石野史敏、若菜茂晴
2. 発表標題 マウスの母体におけるone carbon metabolism 異常が仔の行動表現型と遺伝子発現に与える影響
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古瀬民生、串田知子、山田郁子、三浦郁生、金田秀貴、小林喜美男、若菜茂晴
2. 発表標題 マウスモデルを用いたDOHaD仮説の実証6：母体のOCM関連遺伝子変異が仔の行動表現型に与える影響
3. 学会等名 第64回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古瀬民生、幸田尚、串田知子、山田郁子、三浦郁生、金田秀貴、小林喜美男、石野史敏、若菜茂晴
2. 発表標題 A maternal mutation in one carbon metabolism related gene alters behavioral phenotypes of wildtype progenies
3. 学会等名 第47回日本神経精神薬理学会 年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古瀬民生、幸田尚、串田知子、山田郁子、三浦郁生、金田秀貴、小林喜美男、石野史敏、若菜茂晴
2. 発表標題 マウスにおける母体のMat2a遺伝子変異による仔の遺伝子発現・行動表現型の修飾
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tamio Furuse, Ikuko Yamada, Tomoko Kushida, Ikuo Miura, Shinya Ayabe, Atsushi Yoshiki, Masaru Tamura
2. 発表標題 Development of D0HaD models using mutant mice with one carbon-metabolism related genes
3. 学会等名 2019 AMMRA & AMPC meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tamio Furuse
2. 発表標題 Behavioural-phenotyping pipeline in the Japan Mouse Clinic
3. 学会等名 2019 AMMRA & AMPC meeting students workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古瀬民生、山田郁子、串田知子、三浦郁生、尾崎藍、永瀬茜、若菜茂晴、田村勝
2. 発表標題 母体の遺伝子変異がマウス野生型産仔の表現型解析結果に与える影響
3. 学会等名 第66回実験動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tamio Furuse, Ikuko Yamada, Tomoko Kushida, Ikuo Miura, Ai Ozaki, Akane Nagase, Shigeharu Wakana, Masaru Tamura
2. 発表標題 One carbon metabolism 関連遺伝子変異体を用いたDOHaDモデルの開発
3. 学会等名 NEURO 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古瀬民生、山田郁子、串田知子、尾崎藍、三浦郁生、上野正樹、田村勝
2. 発表標題 胎児期に母体のメチル基供与体の減少に暴露されたマウスの神経行動学的表現型解析
3. 学会等名 第42回分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----