

論文内容の要旨

論文題目 胎生期低亜鉛環境が引き起こす仔におけるエピゲノム変化の解析
指導教員 遠山 千春 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

社会医学専攻

栗田 尚佳

【背景・目的】

発展途上国において胎生期、幼若期の亜鉛欠乏が問題となっている。実際、ラテンアメリカ、アフリカ、アジアにおいて、6~65 ヵ月齢の子供の死亡率の約 4.4%が亜鉛欠乏に起因するという報告がある。また、このような地域では潜在的に 5 歳未満の亜鉛欠乏のリスクが高い (Figure 1)。また、これらのブラジル、インド、エジプト、南アフリカ、フィリピンなどの国々では 1990 年代から胎生期、幼若期の微量栄養素欠乏の問題と、一方で肥満や生活習慣病の増加の問題とが共存している。これらの問題は、胎児期並びに幼若期において亜鉛、鉄、ビタミンAなどの微量栄養素欠乏の影響が子供たちに何らかの負の刷り込みとして残り、近年の食生活の欧米化による微量栄養素の不足、高カロリー食の過剰摂取、運動不足などのこれらの要因が引き金になって、生活習慣病などの罹患率が上昇しているのではないかと考えられている [ENREF 39](#)。

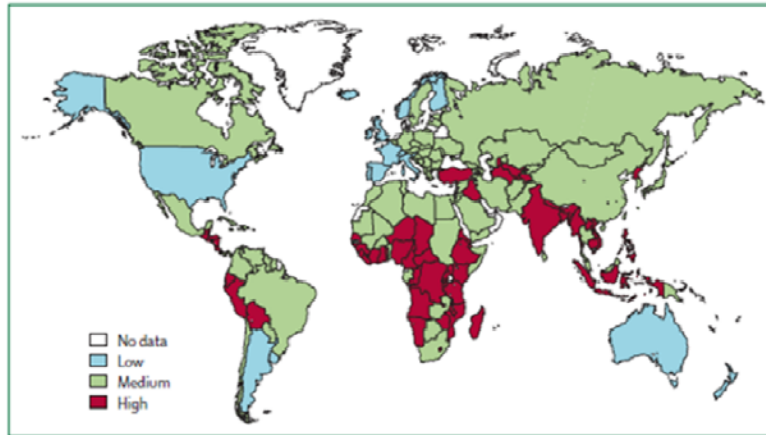


Figure 1. 5歳未満の子供における亜鉛欠乏のリスクの分布
(Black et al., 2008, *Lancet*) から引用

近年、Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 説が国際的に注目されている。これは、胎児を取り巻くあらゆる環境が子の生育後の健康と状態を規定する起源になるという概念である。また DOHaD 説で説明される影響は胎児のゲノムにおける DNA メチル化、ヒストン修飾のようなエピゲノム変化によって引き起こされ、その影響は世代を超えて継承される可能性がある。

これまでに実験動物を用いた研究において、胎生期・幼若期の低亜鉛環境が成熟してからの個体の健康状態に影響を及ぼす DOHaD 説との関連性を示唆する報告がある。例えば、周産期に低亜鉛状態で育ったラットで成熟後に高血圧症状、学習記憶異常が確認されている。また胎生期に低亜鉛環境を経験したマウスにおいては、血漿中 IgM 産生能の低下が世代を超えて続くことが 3 世代まで調べられ報告されている。また、これらの実験動物において、亜鉛の代謝の重要性を示す報告もある。すなわち胎生期低亜鉛環境を経験し、出生後に通常食により通常の亜鉛環境で生育したマウスでは、重金属毒性軽減、亜鉛の恒常性維持に重要な役割を持つメタロチオネイン (MT) タンパク質の誘導能が増強することが認められている。

そこで、本研究では胎生期の低亜鉛という環境が子供のゲノムに対して、エピゲノム変化という形で刷り込みを起こし、そのゲノムへのプログラミングが成長してからの疾患発症や環境化学物質に対する感受性を変化させている可能性を考えた。そこで

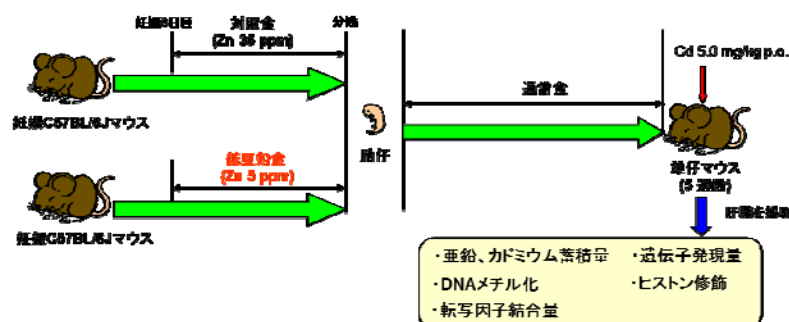
本研究では、重金属毒性軽減、亜鉛の恒常性維持などに重要な役割を担っている MT 遺伝子に焦点を当て、胎生期低亜鉛環境が引き起こす仔へのエピゲノム変化の解析を行った。

【方法】

胎生期低亜鉛環境が引き起こす仔でのエピゲノム変化を解析するために、次の様な動物実験を中心に検討を行った。妊娠 C57BL/6J マウスを 2 群に分け、妊娠 8 日目から分娩時まで低亜鉛食 (Zn 5 ppm) 及び 対照食 (Zn 35 ppm) を自由摂取させた。これらの母マウスから生まれた仔マウスを用いて以下の 2 種類の実験を行った。

1) 胎生期低亜鉛実験 (生後 5 週齢)

分娩ならびに離乳以降、両群とも通常固形飼料で飼育した。その後、5 週齢の雄仔マウスに Cd 5.0 mg/kg を単回経口投与した。投与後 6 時間で肝臓を採取し、肝臓中 Zn, Cd 蓄積量、遺伝子発現量、タンパク発現量、DNA メチル化、ヒストン修飾なら

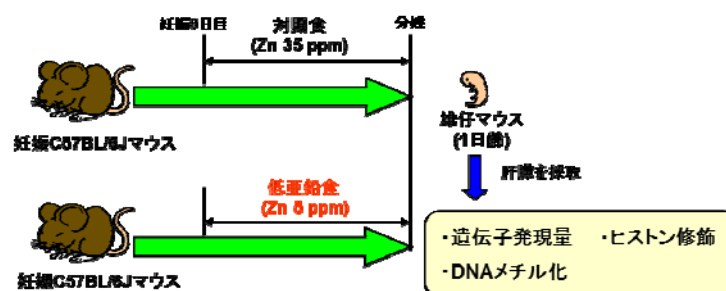


びに転写因子結合量の解析を行った (Figure 2)。

Figure 2. 胎生期低亜鉛実験 (生後 5 週齢) の実験スケジュール

2) 胎生期低亜鉛実験 (生後 1 日齢)

生後 1 日目の雄性マウスの肝臓を採取し、遺伝子発現量、DNA メチル化、ヒストン



修飾解析を行った (Figure 3)。

Figure 3. 胎生期低亜鉛実験（生後 1 日齢）の実験スケジュール

【結果】

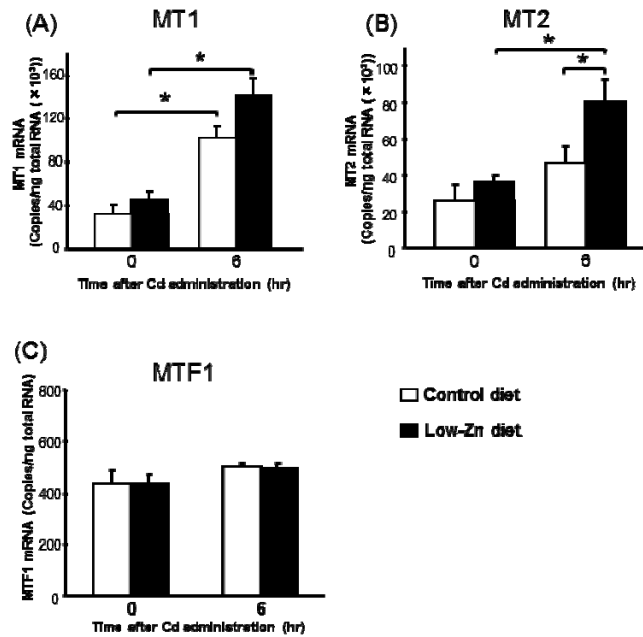


Figure 4. 胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウスへのカドミウム曝露による MT1、MT2、MTF1 mRNA の発現量変化

胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウスでの、カドミウム曝露による MT1 mRNA 発現量は、胎生期低亜鉛食群において対照食群に比べて増加傾向にあったが有意な差は認められなかった (Figure 4A)。一方、MT2 mRNA 発現量は胎生期低亜鉛食群のほうが対照食群に比べ統計的に有意に誘導レベルが高いことがわかった (Figure 4B)。MT の主要な転写因子である MTF1 の mRNA 発現量には胎生期低亜鉛食による変化は認められなかった (Figure 4C)。

この時点における肝臓中亜鉛、カドミウム蓄積量は胎生期低亜鉛環境による変化は認められなかったことから (Table 1)、胎生期低亜鉛環境で育ったマウスへのカドミウム曝露による MT2 遺伝子の発現上昇は肝臓中亜鉛及びカドミウム蓄積量の違いによるものではないと考えられる。

Table 1 胎生期低亜鉛食による 5 週齢雄マウス肝臓中の亜鉛、カドミウム蓄積量

Experimental group	Zn ($\mu\text{g/g}$ tissue)		Cd ($\mu\text{g/g}$ tissue)	
	Intact	Cd-exposed	Intact	Cd-exposed
Control diet	32.15 ± 0.45 (n=5)	42.81 ± 1.16 (n=6)	N.D. (n=5)	0.71 ± 0.13 (n=6)
Low-Zn diet	32.62 ± 0.51 (n=9)	42.12 ± 0.75 (n=11)	N.D. (n=9)	0.89 ± 0.11 (n=11)

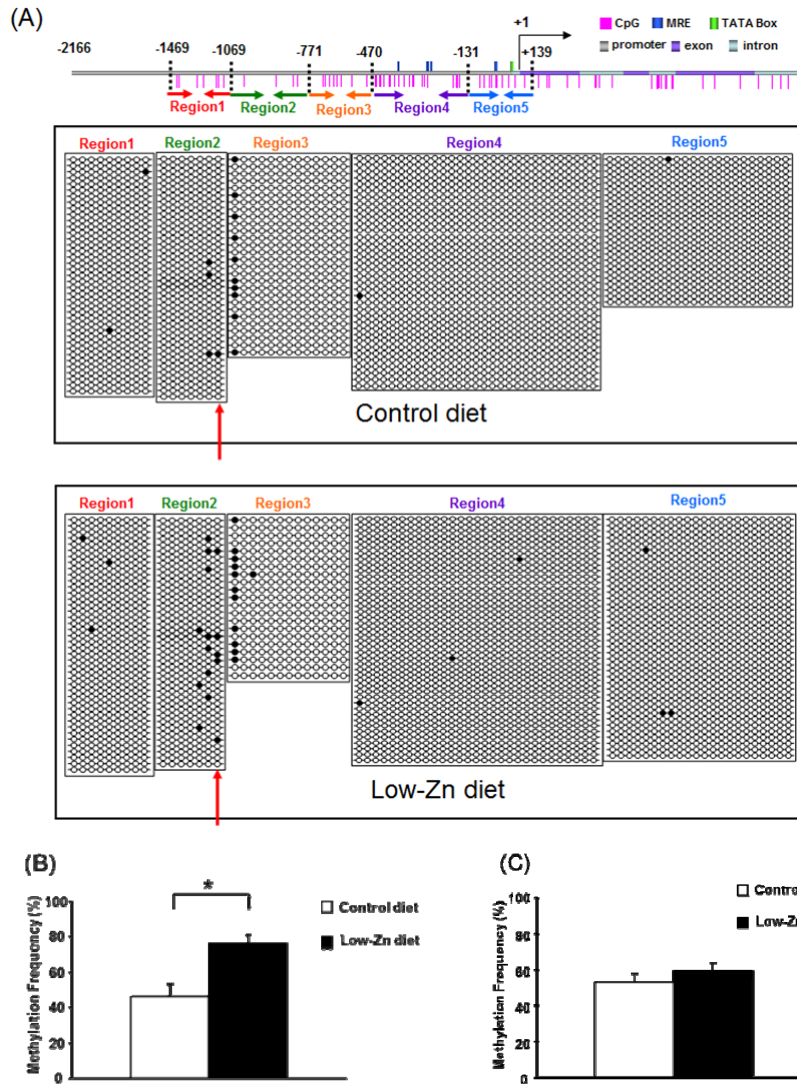


Figure 5. 胎生期低亜鉛環境による雄マウス肝臓の MT2 プロモーター領域の DNA メチル化への影響 (A) 5 週齢雄マウスのバイサルファイトシーケンスによる解析、(B) 5 週齢および (C) 1 日齢雄マウスの -821bp の DNA メチル化解析

次に、仔マウスの MT2 遺伝子におけるエピゲノムに変化が生じていることを想定し、胎生期低亜鉛環境で育った 1 日齢と 5 週齢マウスの肝臓中 MT2 遺伝子の DNA メチル化とヒストン修飾解析を行った (Figure 5)。

胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウス肝臓における MT2 遺伝子プロモーターの DNA メチル化変化をバイサルファイトシーケンス法で解析した (Figure 5A) と、MTF1 が結合する MRE を含む領域においては、胎生期低亜鉛食群ならびに対照食群ともにメチル化されている CpG はほとんど観察されなかった。しかし、上流

-800bp 近傍の 3 か所の CpG でメチル化が検出できた。特に、-821bp の CpG のメチル化が胎生期低亜鉛食群 (12.1%) で、対照食群 (2.5%) に比べて増加していた (Figure 5A、赤矢印)。

このバイサルファイトシーケンス法による解析でメチル化変化が認められた -821bp の CpG は、Methylation sensitive 制限酵素 *Aci I* の制限酵素サイトに含まれているため、*Aci I* を用いた定量 PCR 法での検証解析を行った (Figure 5B)。胎生期低亜鉛食群と対照食群との間で統計学的有意差が確認でき、Figure 5A を支持する結果となった (Figure 5B)。1 日齢の仔マウス肝臓では-821bp の CpG のメチル化に変化はなかった (Figure 5C)。しかし、この-821bp の CpG を含む領域は、本研究でのレポーター遺伝子アッセイの結果 (博士論文本文参照) によれば転写活性化にとって重要な領域ではなかった。

胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウスの肝臓中 MT2 プロモーターの MRE 配列を含む領域を中心に、カドミウム曝露前ならびにカドミウム曝露 6 時間後のヒストン修飾を ChIP qPCR 法により解析した。その結果、いわゆるヒストン修飾仮説 (Figure 6) から考察すると、胎生期低亜鉛食群における MT2 プロモーターは、遺伝子転写活性化状態で見られるオープンクロマチン構造に近いことが示唆された。(Figure 7)。1 日齢マウスにおいて AcH3 レベルは胎生期低亜鉛食群の Region 1 と Region 2 において有意な上昇が認められた (Figure 8A)。また今回の解析対象である MRE^注を含むプロモーター領域は、レポーター遺伝子アッセイの結果 (博士論文本文参照) から遺伝子転写活性化に重要であることが確認された。

これらのことから、胎生期低亜鉛環境によって引き起こされたヒストン修飾がエピジェネティックメモリーとして成熟後まで残り、成熟後の MT2 遺伝子誘導能の増強に関与することが示された。

脚注

MRE (metal responsive element) : MT の主要な転写調節因子である MTF1 が結合するコンセンサス配列

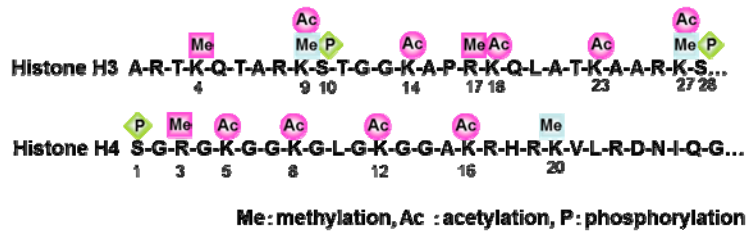


Figure 6. ヒストン暗号仮説 ヒストン暗号仮説はヒストンテールの修飾が機能的タンパク結合部位に成り得るという仮説である。ヒストンのN末端はアセチル化、メチル化、リン酸化などのような修飾を受ける。ピンク色のマークは遺伝子活性化の修飾、水色のマークは遺伝子不活性化の修飾を示す。ヒストン H3 セリン 10 のリン酸化は細胞分裂間期において遺伝子活性化、ヒストン H3 セリン 28 のリン酸化は細胞分裂 M 期における染色体分配と染色体凝縮、ヒストン H4 セリン 1 のリン酸化は精子形成時のクロマチン圧縮や、DNA 損傷応答に関与するとされている。

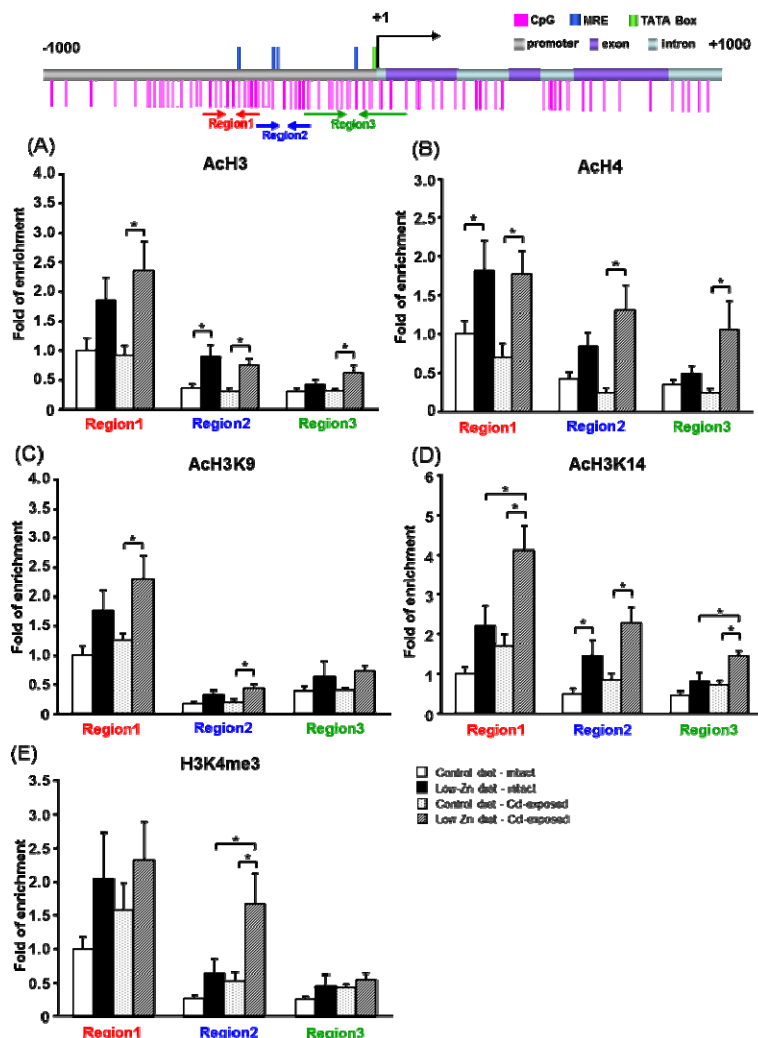


Figure 7. 胎生期低亜鉛環境による 5 週齢雄マウス肝臓中 MT2 プロモーターのヒストン修飾の変化。 (A) ヒストン H3 アセチル化、(B) ヒストン H4 アセチル化、(C) ヒストン H3 リジン 9 アセチル化、(D) ヒストン H3 リジン 14 アセチル化、(E) ヒストン H3 リジン 4 トリメチル化を示す。

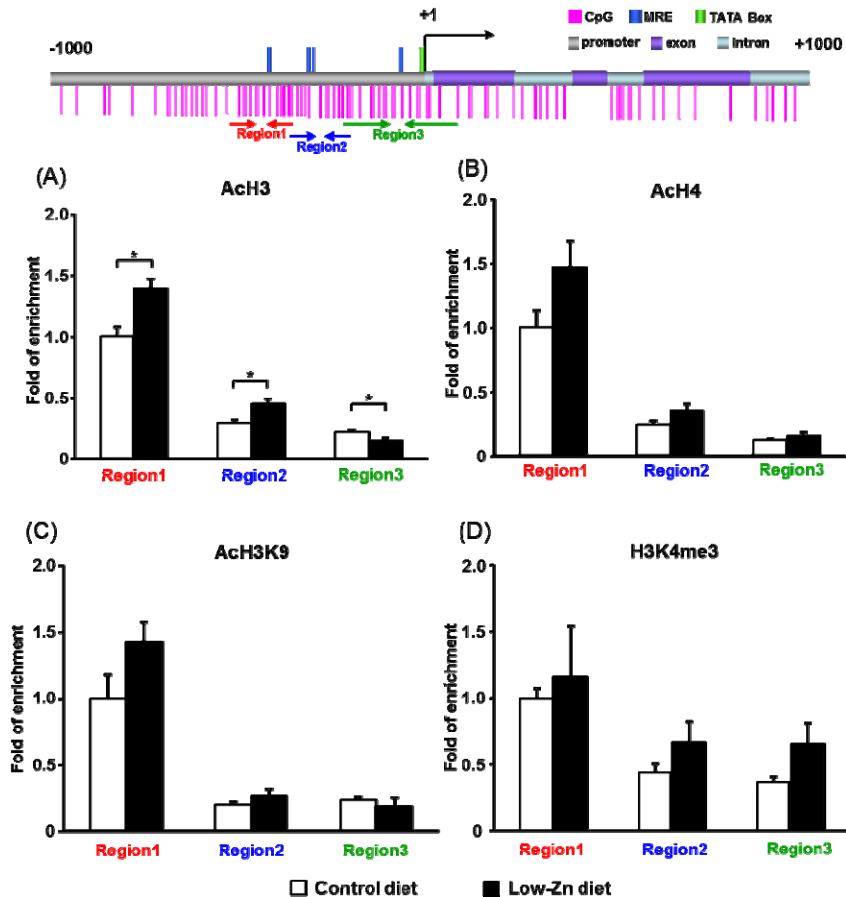


Figure 8. 胎生期低亜鉛環境による1日齢雄マウス肝臓中MT2プロモーターにおけるヒストン修飾変化 (A) ヒストン H3 アセチル化、(B) ヒストン H4 アセチル化、(C) ヒストン H3 リジン 9 アセチル化、(D) ヒストン H3 リジン 4 トリメチル化を示す。

Figure 7 の結果より、今回解析した MT2 プロモーターの MRE を含む領域においては、胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウスで遺伝子転写活性化状態を示す比較的オープンクロマチン構造になっていることが示唆された。これまでに *in vivo* でカドミウム曝露時の MT2 プロモーターへの MTF1 の結合量変化を検討した報告はない。そこで胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢マウスにおける同領域における転写因子 MTF1 の結合量を ChIP qPCR 法で解析した (Figure 9)。

胎生期低亜鉛食群、対照食群ともに今回の検討対象の三つの Region において、カドミウム曝露 1 時間後で MTF1 の MT2 プロモーターへの結合量が増加し、6 時間後では曝露前のレベルに戻ることが示された (Figure 9)。カドミウム曝露後 6 時間において、Region 2 と Region 3 の胎生期低亜鉛食群での MT2 プロモーターへの MTF1 結

合量が、対照食群に比べて有意に増加していた (Figure 9B、C)。カドミウム曝露後 1 時間では Region 2 で、胎生期低亜鉛食群の MTF1 結合量が対照食群に比べて増加傾向が認められた (Figure 9B)。一方、Region 1 ではカドミウム曝露後のどの時点においても、MTF1 結合量は両群間で有意な差は認められなかった (Figure 9A)。これらのことから、胎生期低亜鉛食群ではカドミウム曝露後の MT2 プロモーターへの MTF1 の結合時間が長くなり、この変化が MT2 遺伝子発現量を増加させていると考えられる。

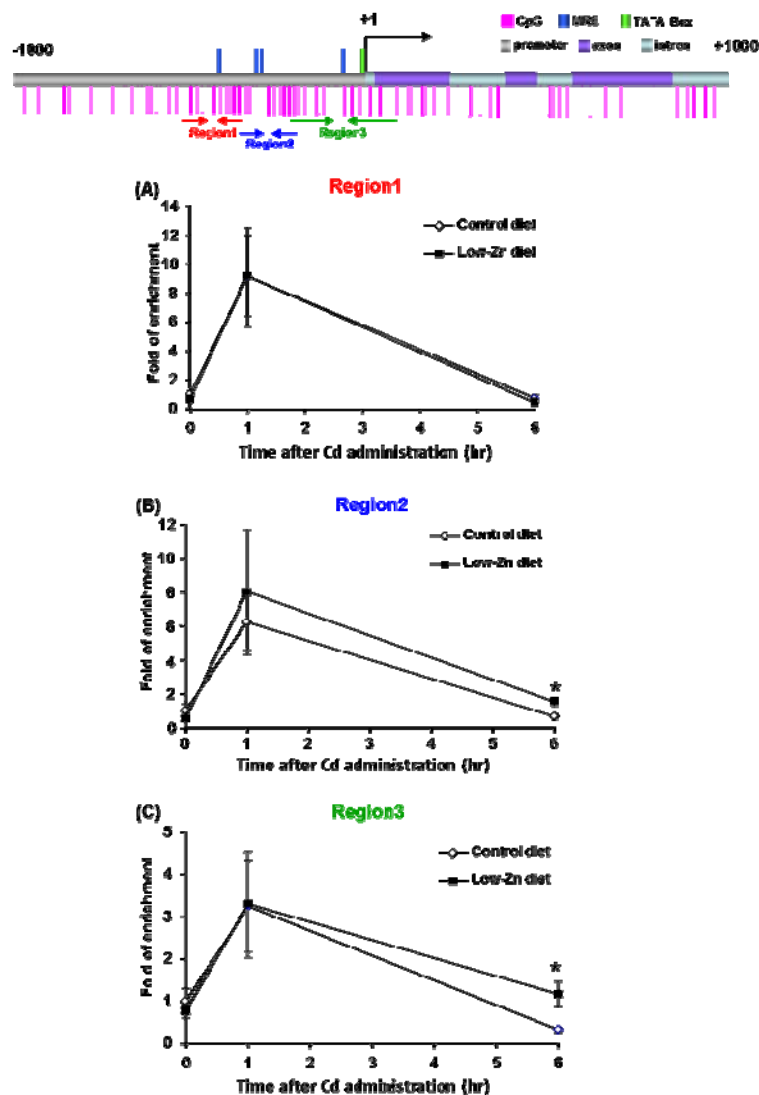
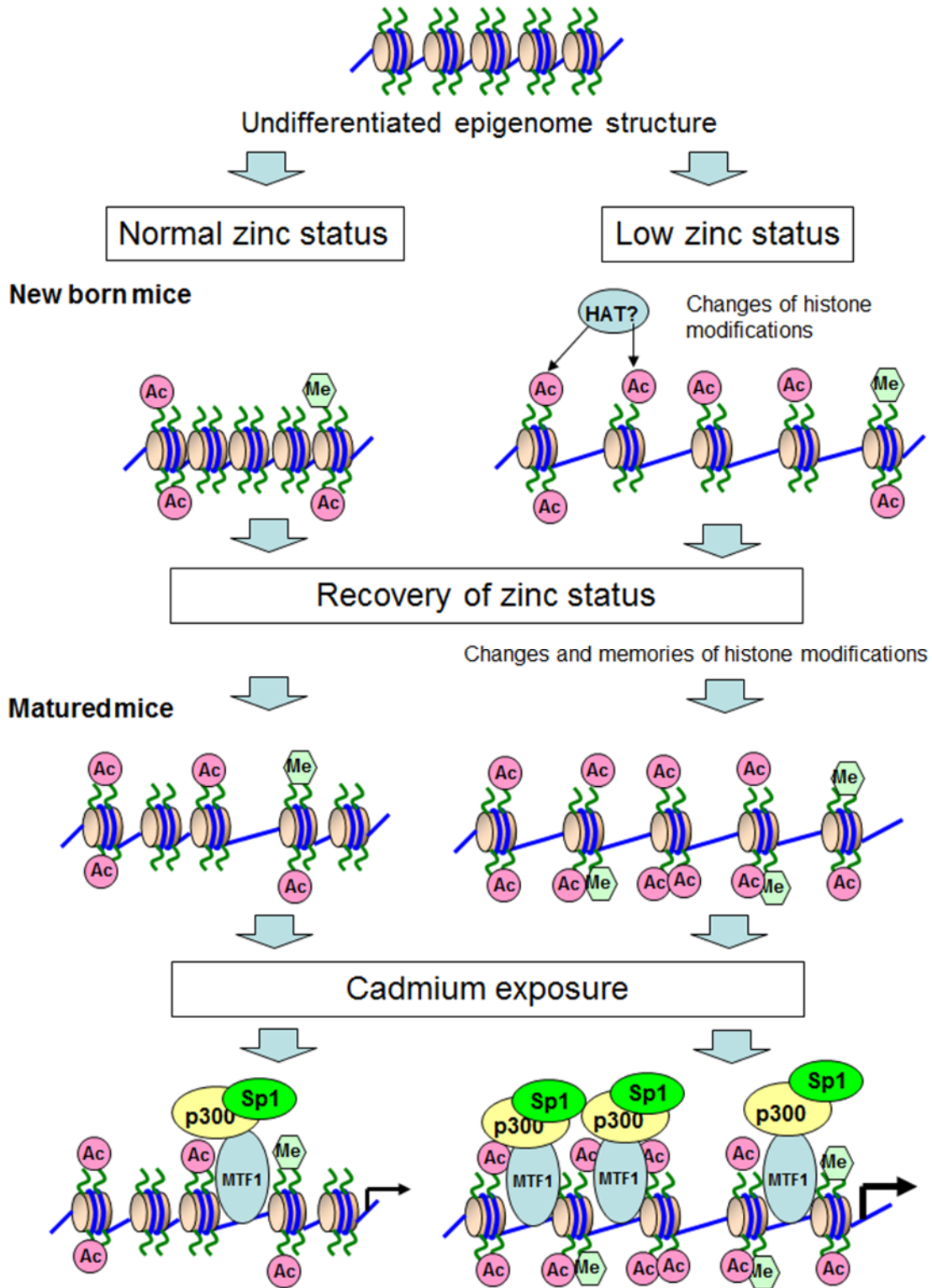


Figure 9. 胎生期低亜鉛環境による 5 週齢雄マウス肝臓中 MT2 プロモーターの MTF1 結合量の変化 胎生期低亜鉛環境で育った 5 週齢雄マウスに Cd 5.0 mg/kg を単回経口投与し、投与後 0、1、6 時間の肝臓中 MT2 プロモーターの転写因子結合量を解析した。

【結論】

本研究から、胎生期に低亜鉛環境で育ち、出産後に通常食で育った仔が成熟後にカドミウムに曝露すると MT2 の誘導が増強することが明らかとなり、このメカニズムとして、MT2 プロモーターでのエピゲノム変化、特にヒストンのアセチル化が亢進し、それがエピジェネティックメモリーとして成熟後まで残ることによる可能性が明らかとなった (Figure 10)。これまでに低タンパク質食などの栄養環境が胎生期においてエピゲノム変化を引き起こすことが示されているが、本研究において、胎生期における微量元素環境も仔へのエピゲノム変化を引き起こすことが初めて明らかとなった。本研究で得られた知見は、DOHaD 仮説を胎生期微量元素の作用という観点から支持するものであり、疾患の予防と健康の増進にとって、胎児期環境の重要性を示す証拠のひとつとなると考える。



Figur

e 10. 本研究で得られた胎生期低亜鉛環境による MT2 遺伝子のエピゲノム変化のまとめ