

令和元年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18497

研究課題名(和文) 感染ストレスが次世代に与える影響の分子解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of effect of infection stress into the next generation

研究代表者

吉田 圭介 (Yoshida, Keisuke)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・協力研究員

研究者番号：80587452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：父親の環境ストレスの影響が世代を超えて、次世代の子供の表現型・疾患に影響を与える現象が知られている。本研究では、「父親が病原体感染した時、子供の免疫力に影響があるか？」また、その分子メカニズムの解明についてマウスを用いて解析を行った。その結果、免疫ストレスを受けた父親マウスでは、精子に含まれる特定のメチル化ヒストンの量が変動していることが観察された。また、免疫ストレスを受けた父親マウスから生まれた子供は、炎症反応に必要な遺伝子の活性化が亢進していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の結果から、父親の病原体感染ストレスが次世代個体の免疫細胞の活性化状態に影響を与える可能性が示唆された。観察された免疫細胞の活性化が、個体の長期的恒常性に対して有利・不利に働くかはまだ解析が必要だが、子供を持つ予定の父親が自身の病原体感染の子供への影響を留意する必要がある可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Recent reports indicate that paternal environmental stress affects phenotype in offspring beyond generation. In this study, I tried to reveal "whether paternal immune stress affects pathogenic resistance in offspring" using mice. Here, it's observed that amount of specific type of methylated histone was changed in mouse sperm by infection stress. Furthermore, offspring from father mouse which have infected exhibited increased gene expression of inflammation-related genes.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス 自然免疫 精子 Transgenerational effect

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

高等生物では、親の受けた環境ストレスや栄養状態の影響が生殖細胞を通じて、次世代の子孫に伝わるという現象が知られている。これまでの疫学調査から、第二次世界大戦中にオランダで飢饉に陥った人の子孫では、体の大きさが平均より小さくなる傾向にあること (“Dutch famine” の例)、思春期に喫煙経験のある父親を持つ息子は、BMI 値が大きくなる傾向にあること (ALSPAC の報告) などが報告されている (参考文献 1)。最近では、実験動物を用いた検証が行われており、低タンパク食で飼育した雄マウスの次世代の肝臓では、通常食で飼育した個体と比較して、DNA 複製や脂肪代謝に関わる遺伝子群の転写量が有意に上昇することが報告されている (参考文献 2)。こうした現象の詳細な分子メカニズムは明らかになっていないが、環境ストレスによって親の生殖細胞、精子や卵子のエピジェネティック修飾状態 (DNA 配列の変化を伴わない、DNA や染色体ヒストンのメチル化等の化学修飾) が変化し、これが次世代の体細胞へと継承されているのではないかと考えられている (参考文献 3)。

また、高等真核生物の精子形成過程では、染色体上のほとんどのヒストンが小分子の塩基性タンパクであるプロタミンへと置き換わることで、精子 DNA が凝縮した構造をとっている。一方で、精子核に微量に残存したヒストンが次世代の受精卵へと継承され、遺伝子の転写や染色体構造に影響を与える可能性が示唆されていた (参考文献 3)。研究開始の当初、ヒト・マウス精子の残存ヒストンの染色体上の結合部位をマッピングした報告がいくつかあるものの、研究グループによって結果が大きく異なっており、データの信頼性に欠けていた (参考文献 4)。

## 2. 研究の目的

これまでの報告から、高等真核生物において栄養・精神ストレスなどが次世代個体の表現型に影響を与える結果が示されているが、その具体的な分子メカニズムまで明らかになっていなかった。本研究では、「父親の自然免疫ストレスが精子細胞のエピゲノム変化 (ヒストンメチル化の変化) を通じて、次世代個体の免疫系に影響を与えるのではないかと」という作業仮説を立て、この検証を行った。

## 3. 研究の方法

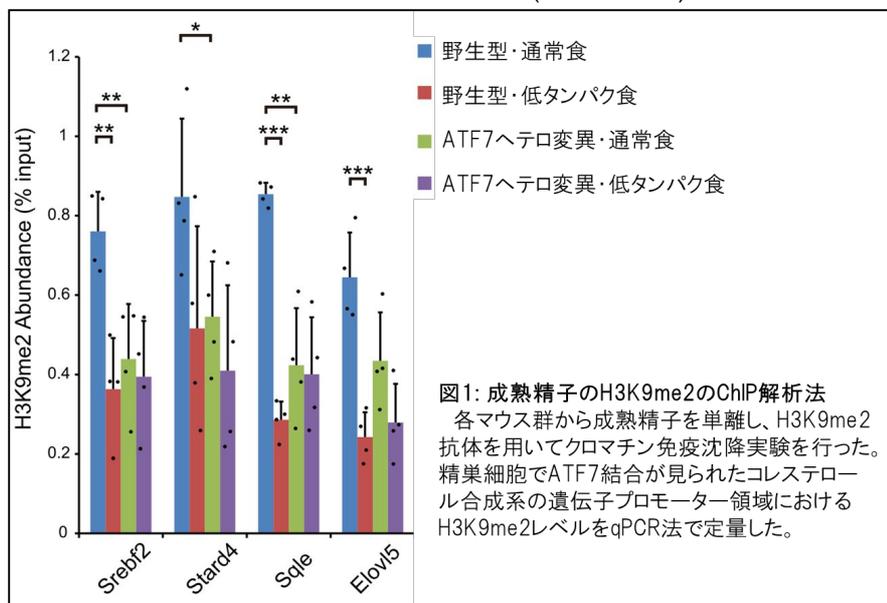
細菌感染を模すため、各投与量の LPS (リポ多糖・大腸菌などのグラム陰性菌の毒性成分) を投与した成体マウス (7 週齢: C57BL/6j) から経時的に成熟精子画分 (HRCS: Histone-Replacement Completed Spermatozoa) を回収し、これに含まれる各メチル化ヒストン量の変化をウェスタンブロッティング法で解析した。また、固定化した HRCS を用いてクロマチン免疫沈降を行い、各領域のヒストン結合量を解析した。

LPS または PBS を投与した雄マウスと未処理の雌マウスとの自然交配により次世代個体を作成した。各投与群の独立した 3 匹と雌マウスを掛け合わせ、各ペアで産まれた 2-3 匹の雄マウスを以降の解析に供した。次世代個体の免疫細胞の遺伝子発現量を調べるため、成体マウス (10 週齢) から常在性腹腔マクロファージを単離し、Total RNA を回収した。各遺伝子の発現量を RT-qPCR 法により定量した。

## 4. 研究成果

### (1) 精子のエピゲノム解析法の確立

上述の通り、開発者が解析を進め始めた当時、成熟精子のヒストン修飾状態などのエピゲノム状態について解析した報告はいくつかあったが、研究グループによって結果が大きく異なり一貫性が無かった。本研究の達成にあたり、精子エピゲノムの解析は必須であったため、まず、開発者は独自に、成熟精子の解析法の確立を試みた (参考文献 5)。この手法を用いることによ



り、マウス精巣上体から純度の高い成熟精子集団を単離し、ChIP法によって特定の精子のゲノム領域でのヒストン結合量(非修飾・修飾を含めた)を定量することが出来た(申請者の別課題”18K06189”参照)。

次に、メチル化修飾ヒストンについても同様の解析が可能か検討を行った。これまでの開発者の解析から、雄マウスの低タンパク食ストレスによって、転写因子 ATF7(ストレスによってヒストンメチル化状態を制御する因子)依存的に成熟精子における H3K9me2(ヒストン H3K9 のジメチル化修飾)の含有量が減少することを見出している。そこで、通常食・低タンパク食で処理した雄マウスから回収した成熟精子について、H3K9me2 の ChIP 解析を行った。その結果、ATF7 の結合領域の遺伝子プロモーター領域において H3K9me2 シグナルが検出され、低タンパク食によって H3K9me2 の結合量の減少が観察された(図 1)。一方で、ATF7 ヘテロ変異の精子では、このような H3K9me2 レベルの減少は観察されなかった。現在、これらの成果をまとめた論文を投稿中である。

### (2) 自然免疫ストレスによる精子のエピゲノム変化の解析

前項の条件を用いて、自然免疫ストレスによって成熟精子に含まれる修飾ヒストンの全体量が変化すると検討を行った。良く研究されている代表的な修飾ヒストンについて一連の解析を行った結果、転写抑制に寄与するヒストンのエピジェネティックマークである H3K9me3(ヒストン H3K9 のジメチル化修飾)レベルが LPS 投与 6-9 週間後にかけて亢進していることを見出した。そこで次に、LPS 投与によって H3K9me3 レベルが変動する領域を ChIP-seq 解析法によって解析することを試みたが、有意な結合シグナルが検出されなかった(図 2)。現在は、使用する抗体の種類など精子の H3K9me3 ChIP 条件の検討を行っている。

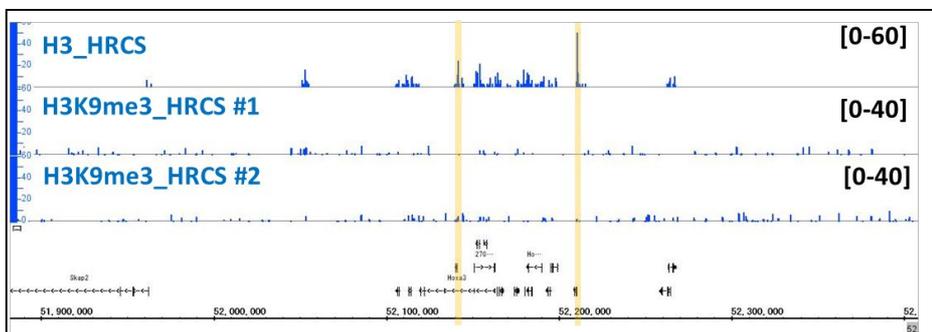


図2: 成熟精子HRCSにおけるH3K9me3のプロファイル

野生型マウスからHRCS画分を精製し、H3K9me3抗体を用いてChIP-seq解析を行った。H3のChIP-seq解析結果を参考として付した。ここでは、6番染色体のHoxaクラスター領域周辺を示している。オレンジは、H3の有意な結合領域を示している。

### (3) 親の免疫ストレスによる次世代の影響の解析

上記の精子の H3K9me3 レベルが亢進する LPS 投与条件で雄マウスを処理し、未処理の雌マウスと掛け合わせ産仔を得た。対照群には PBS を投与した。次世代マウスの 10 週齢時に腹腔マクロファージから RNA を回収し、RT-qPCR により遺伝子の基底発現量を調べた。その結果、Il1b や Il6 などの炎症性サイトカインの発現量が LPS 投与した次世代では有意に発現が上昇していた(図 3)。一方で、別の炎症性サイトカインである TNF は有意な差が見られなかった。このことから、一部の炎症性サイトカインの基底発現量が特異的に上昇していると考えられる。現在、網羅的な発現プロファイルを RNA-seq 法により解析中である。

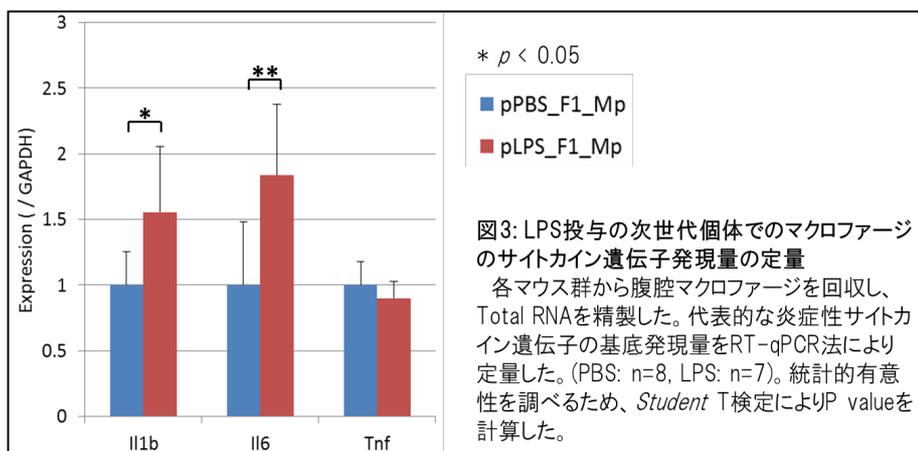


図3: LPS投与の次世代個体でのマクロファージのサイトカイン遺伝子発現量の定量

各マウス群から腹腔マクロファージを回収し、Total RNAを精製した。代表的な炎症性サイトカイン遺伝子の基底発現量をRT-qPCR法により定量した。(PBS: n=8, LPS: n=7)。統計的有意性を調べるため、Student T検定によりP valueを計算した。

#### <参考文献>

1. Heard, E., Martienssen, R.A. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell* **157**:95-109 (2014).
2. Carone, B. R. *et al.* Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* **143**, 1084-1096 (2010).
3. Perez, M.F., Lehner, B., Intergenerational and transgenerational epigenetic inheritance in animals. *Nat Cell Biol.* **21**:143-151 (2019).
4. Saitou, M., Kurimoto, K. Paternal nucleosomes: are they retained in developmental promoters or gene deserts? *Dev Cell.* **30**:6-8 (2014)
5. Yoshida, K. *et al.*, Mapping of histone-binding sites in histone replacement-completed spermatozoa. *Nat Commun.* **9**: 1 (2018).

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Analysis for trans-generational inheritance of epigenetic change induced by pathogen infection via ATF7.

Yoshida K, Maekawa T, Ishii S, WGC Conference: Innate Immune Memory 2017, Hinxton (UK), (2018).

〔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〕

特になし。

#### 6 . 研究組織

(1)研究分担者 該当なし

(2)研究協力者 該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。