

令和元年5月29日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17605

研究課題名(和文) 子孫の疾患リスクと関連する精子DNAメチル化異常の成立機構

研究課題名(英文) Sperm DNA methylation for a risk of offspring's disorder

研究代表者

木村 龍一 (Kimura, Ryuichi)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00781759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまで知られていなかった精子形成過程におけるREST/NRSFの発現について明らかにした。細胞分画された精巣の生殖細胞系列における遺伝子発現データの解析により、REST/NRSFは生殖細胞系列の幹細胞として知られるA型の精粗細胞において最も発現が高く、精子形成の進行と共に発現レベルは減少することが明らかとなった。さらに、内在性REST/NRSFのC末端にエピトープタグを付与したノックインマウスを作成することにより、生殖細胞系列におけるREST/NRSFタンパク質の発現と局在を初めて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、雄の生殖細胞系列におけるREST/NRSFの発現と局在が初めてを明らかとなり、加齢より精子DNAメチル化異常が生じる分子機構の一端に迫ることができた。父親の高齢は子どもの自閉スペクトラム障害や統合失調症といった疾患のリスク因子であり、加齢により生じる精子DNAメチル化の変化がその原因の1つである可能性が指摘されている。今後、精子形成におけるREST/NRSFの機能を検討することにより、REST/NRSFによる精子DNAメチル化の制御機構が明らかとなれば、高齢の父親に由来する子孫の疾患リスクを低減するような予防的介入法の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified the expression of REST / NRSF during the spermatogenesis process, which was unknown until now. Analysis of gene expression data in the germ cell line of the cell fractionated testis shows that REST / NRSF is most expressed in A-type spermatozoa, known as germline stem cells and the expression levels was decreased with progress of spermatogenesis. Furthermore, by creating a knock-in mouse with an epitope tag attached to the C-terminus of endogenous REST / NRSF, we have clarified for the first time the expression and localization of REST / NRSF protein in germ cell line.

研究分野：発生生物学

キーワード：精子エピゲノム 神経発達障害

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精子により雄から子孫へ伝達される情報は多様であり、個体の表現型を決定するゲノム情報に加え、DNAメチル化、ヒストンタンパク質の化学修飾、転写された non-coding RNA などの多数のエピゲノム情報も受精の際に精子から伝達される。近年の研究により、心理的ストレス環境や栄養不良は精子のエピゲノム変化を引き起こすばかりでなく、これらを経験した雄に由来する仔は表現型の異常を示す個体の多いことが報告され、子孫の表現型に影響する情報として精子エピゲノム情報が着目されている。

2. 研究の目的

父親の高齢は子どもの自閉スペクトラム障害や統合失調症といった疾患のリスク因子であり、これまでに我々の研究グループでは、高齢マウスの精子において多数の遺伝座に DNAメチル化異常が生じることを見出した。さらに、高齢雄に由来する仔マウスでは精神疾患様の行動異常や脳の遺伝子発現が異常となることも明らかとなり、加齢により生じる精子 DNAメチル化の変化が子孫の疾患素因となる可能性が示唆された。そこで本研究では、雄の加齢に伴い精子の DNAメチル化異常が生じる分子機構について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

マウスの加齢による精子 DNAメチル化異常は主に低メチル化を中心に生じており、これらの低メチル化領域に共通した DNA配列を検索したところ、REST/NRSF 結合モチーフが高度に濃縮することが明らかとなった。REST/NRSF は主に胎児期の中枢神経系に発現し、神経特異的な遺伝子発現を抑制する転写抑制因子として知られる。REST/NRSF は標的遺伝子の発現を抑制するために種々のエピゲノム修飾酵素をリクルートするが、ES細胞では REST/NRSF 結合モチーフの DNAメチル化状態は REST/NRSF 自身の結合依存的に制御されることが明らかにされている (Stadler et al., 2011)。そこで本研究では、精子形成過程における REST/NRSF の機能に着目し、精巣組織の免疫染色画像解析 (図 1) と遺伝子発現解析を組み合わせることにより、REST/NRSF および DNAメチル基修飾酵素の局在と発現が加齢と共にどのように変化するかについて明らかにすることを試みた。

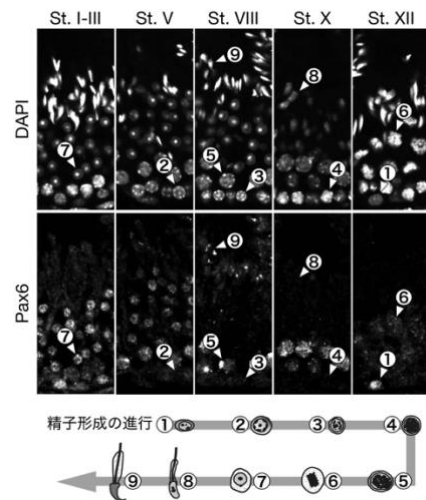


図 1. 精子形成の進行に応じて対象分子の発現と細胞内局在を解析するための手法 (Kimura et al., 2015 より改変)

4. 研究成果

精子形成過程における REST/NRSF の発現について明らかにするために、本研究ではまず精巣の生殖細胞系列を分画して各々の細胞における遺伝子発現を網羅的に解析した先行研究 (Namekawa et al., 2006) から REST/NRSF の発現データを抽出することにより、精子形成の進行に伴う REST/NRSF の mRNA 発現変化を解析した。その結果、REST/NRSF は生殖細胞系列の幹細胞として知られる A 型の精祖細胞において最も発現が高く、精子形成の進行と共に発現レベルは減少することが明らかとなった (図 2)。精子形成過程における REST/NRSF の発現量が加齢により変化する可能性を検討するために、精巣から RNA を抽出し定量 PCR 法にて REST/NRSF の発現量を比較したが、高齢の精巣で有意な変化は認められなかった。これは REST/NRSF を高発現する A 型精祖細胞や B 型精祖細胞といった細胞集団が精巣の全細胞の 2-3%程度に希少な集団であることに起因すると考えられ、今後これらの細胞を精製して解析に与える必要性が示唆された。

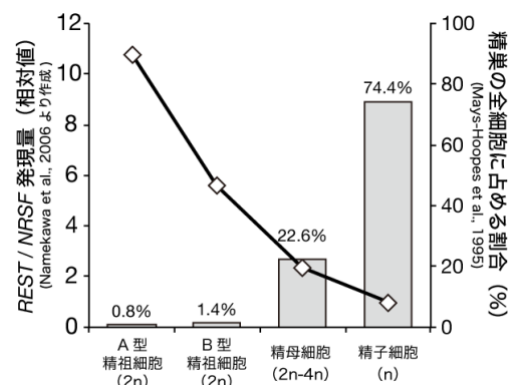


図 2. 精子形成の進行に伴う REST/NRSF 発現量の変化 (折れ線図) と精巣における生殖細胞系列の存在割合 (ヒストグラム)

次に、精子形成過程の特定の分化段階に着目して REST/NRSF タンパク質の発現を比較するために、免疫組織染色による解析を試みた。市販されている複数の抗 REST/NRSF 抗体を用いて特異性の確認を行ったが、これらの抗体は十分な特異性が確認されず、免疫組織染色による解析には適さないことが明らかとなった。そこで、抗体の特異性の問題を解決するために、学外の研究者 (国立精神・神経医療研究センター 井上由紀子博士) と協力して内在性 REST/NRSF の C 末端にエピトープタグ (PA-tag) を付与したノックインマウスを作成した。このエピトープタグに特異的な抗体を用いて精巣の免疫組織染色を行ったところ、ノックインマウスに特異的な

染色が確認され、これは精祖細胞の分子マーカーPlzf と共局在することが明らかとなった (図 3)。また、精祖細胞における REST/NRSF の発現は全ての Plzf 陽性細胞ではなく一部の亜集団にのみ発現することが観察され、精母細胞や精子細胞といった減数分裂開始以降の細胞での発現は認められなかった。この結果から、加齢に伴う精子 DNA メチル化異常は REST/NRSF を発現する一部の精祖細胞において成立する可能性が示唆された。現在、検出感度の向上とアイソフォーム解析を目的とした新たなノックインマウスを作製しており、これらのマウスを用いることにより、これまで知られていない精子形成における REST/NRSF の機能および加齢による変化が明らかになると期待される。

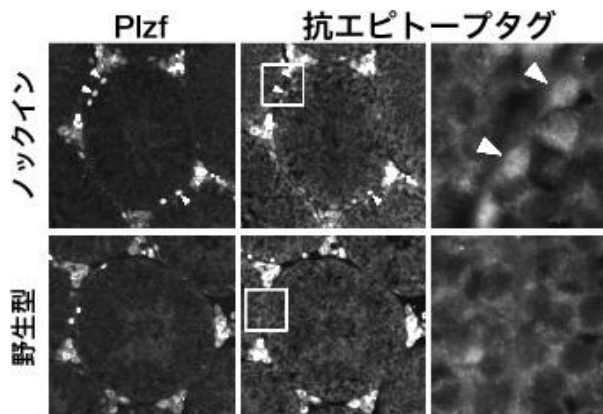


図 3. 内在性 REST/NRSF へのエピトープタグ付与により明らかにされた精祖細胞特異的な REST/NRSF の発現

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Kimura R., Yoshizaki K., Osumi N. Risk of Neurodevelopmental Disease by Paternal Aging: A Possible Influence of Epigenetic Alteration in Sperm. *Adv Exp Med Biol.* 1012:75-81. 2018 (査読有) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29956196>
2. Yoshizaki K., Koike K., Kimura R., Osumi N. Early postnatal vocalizations predict sociability and spatial memory in C57BL/6J mice: Individual differences in behavioral traits emerge early in development. *PLoS One.* 12(11):e0186798. 2017 (査読有) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29091920>
3. 木村 龍一, 稲田 仁, 大隅 典子 自閉スペクトラム症発症リスクとエピジェネティクス 医学のあゆみ 268(3) 180-183 2019 年 (査読無) <https://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiBookDetail.aspx?BC=926803>
4. 大隅 典子, 木村 龍一 父加齢・エピゲノム・精神疾患 *Medical Science Digest* 43(12) 612-615 2017 年 (査読無) <https://www.molcom.jp/products/detail/119671/>

[学会発表] (計 4 件)

1. Kimura R., Yoshizaki K., Koike T., Oki S., Aoki N., Mochizuki K., Kobayashi H., Kikkawa T., Inada H., Matsui Y., Kono T., Osumi N. Paternal aging affects offspring's behavior and gene expression possibly through transmission of hypomethylated DNA regions in NRSF/REST binding sites. *Neuroscience2018.* 2018 年 11 月 4 日 (ナノシンポジウム)
2. 木村龍一, 吉崎嘉一, 小池佐, 沖真弥, 青木七菜, 望月研太郎, 小林久人, 吉川貴子, 稲田仁, 松居靖久, 河野友宏, 大隅典子 Paternal ageing affects phenotypes of mice progeny possibly through epigenetic alteration in sperm. 第 41 回 日本神経科学大会 2018 年 7 月 28 日 (シンポジウム)
3. 木村龍一, 吉崎嘉一, 小池佐, 沖真弥, 青木七奈, 望月研太郎, 小林久人, 吉川貴子, 稲田仁, 河野友宏, 松居靖久, 大隅典子 高齢による精子 DNA 低メチル化が子孫の遺伝子発現と行動表現型に及ぼす影響 AMED-CREST 研究開発領域「エピゲノム研究に基づく診断・治療に向けた新技術の創出」平成 29 年度 領域会議 2018 年 2 月 9 日 (ポスター発表)
4. 木村龍一, 吉崎嘉一, 小池佐, 沖真弥, 青木七奈, 望月研太郎, 小林久人, 吉川貴子, 稲田仁, 河野友宏, 松居靖久, 大隅典子 Trans-generational transmission of ASD-like phenotypes possibly via sperm DNA de-methylation caused by paternal age. 「次世代脳」プロジェクト 冬のシンポジウム 2017 年 12 月 20 日 (ポスター発表)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。