

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03211

研究課題名(和文) 精子特異的ヒストンバリエントH3T/tを起点としたクロマチンダイナミクスの解明

研究課題名(英文) Chromatin Dynamics of the Testis-Specific Histone Variant H3T/t

研究代表者

原田 哲仁 (Harada, Akihito)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：60596823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：精子形成過程におけるH3tの取り込み位置の挙動変化をChIL-seqにより評価した。精祖細胞におけるH3tの局在を可視化したところ、H3tがドメインを形成し、その周囲にH3.1/2が局在している例が多数見受けられた。また、体細胞型ヒストンH3.1/2は減数分裂以前から精子細胞のゲノムに取り込まれていたことから、H3tは体細胞型ヒストンH3.1/2と置換されることで、減数分裂期に機能していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに精巣特異的に発現するヒストンバリエントの同定とその機能解析が行われてきたが、その多くがプロタミン置換などの精子形成過程の後期に関与していることが報告されている。一方で、ヒストン修飾酵素の研究により、減数分裂期に必須の酵素などが同定されている。本研究成果は精子形成の初期に機能するヒストンバリエントが作るクロマチン構造の存在が明らかとなった。これまでのヒストン修飾酵素などの知見と相俟って、生殖細胞形成におけるクロマチン動態の全容解明の一助となった。

研究成果の概要(英文)：We used ChIL-seq to evaluate the behavioral changes in the location of H3t incorporation into genome during spermatogenesis. Visualization of H3t localization in spermatogonial cells revealed that H3t formed a domain and H3.1/2 localized around it in many cases. The somatic histone H3.1/2 was incorporated into the genome before meiosis, suggesting that H3t functions during meiosis by replacing somatic histone H3.1/2.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：クロマチン ヒストン置換 H3t 精子形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞におけるゲノム DNA は、個体が遺伝形質を次世代に伝える分子基盤である。生殖細胞である精子の形成では、精祖細胞が減数分裂を経て、ヒストンがプロタミンに置換されクロマチンが凝縮することが必須である。近年、プロタミン置換の前段階として、TH2A、TH2B などの生殖細胞特異的ヒストンバリエントが発現し、ゲノム DNA に取り込まれ体細胞型ヒストンが置換される必要があることが明らかとなっている (Govin et al., Trends Biochem Sci, 2005)。申請者らは、2015 年に、マウス及びヒトゲノム上に存在する未知ヒストン遺伝子を網羅的に多数同定し、うち精巣特異的な発現するヒストンバリエントを発見した (Epigenetics Chromatin, 2015)。そこで、その一つである H3t の解析を詳細に行った。結果、H3t が、精子形成後期のプロタミン置換に関わるヒストンバリエントとは異なり、減数分裂以前に発現し精子形成の極めて初期の段階から必須であることを明らかにした (Cell Reports, 2017)。これらの知見は精子形成過程では、従来知られているプロタミン置換の促進とは異なる各分化段階で何らかの固有の機能を持つタイプのヒストンが存在していることを意味している。

2. 研究の目的

本研究では、精子形成過程において発現するヒストンのうち、プロタミン置換の促進とは異なる機能を有する H3t およびその他未知のヒストンバリエントの機能を解明する。これまでのヒストンの機能解析は、ヒストン修飾酵素やクロマチンリモデリング酵素が作用するエフェクターとしての理解が進められてきたが、転写、減数分裂におけるヒストン自体の機能については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、独自の微量クロマチン解析技術により精巣内に存在する各分化段階の細胞を用いて解析を行う。従って組織内での各精子形成段階におけるヒストン置換と、転写、減数分裂そして、凝縮を対応させながらクロマチン構造変化を追跡していく。これにより精子形成過程の H3t へのヒストン置換現象にはじまり、それにより引き起こされるクロマチン構造変化そしてその機能について包括的かつ体系的な知見が得られることが期待できる。最終的には、クロマチン構造によるゲノム上の遺伝情報の継承あるいは除去される「エピゲノム遺伝」解析の端緒となると考えている。

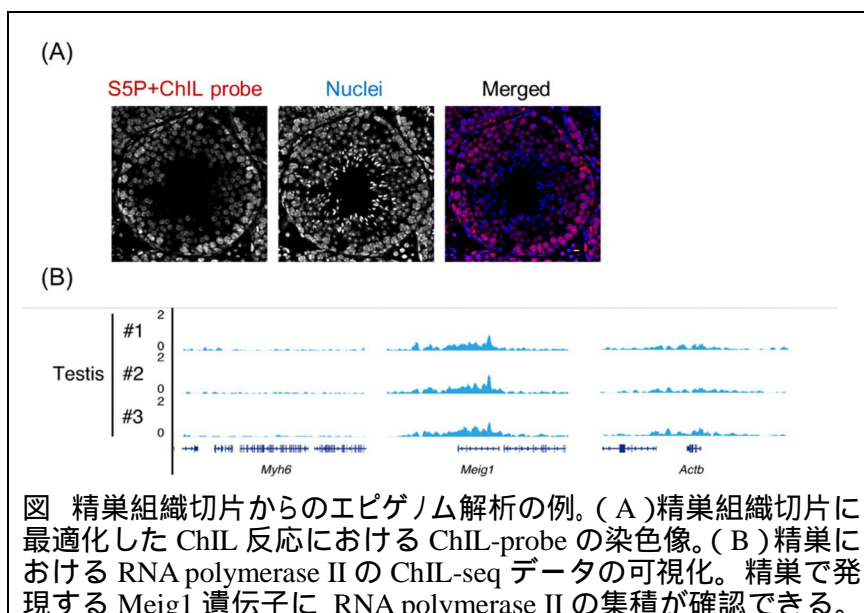
3. 研究の方法

H3T/t を起点とした精子細胞分化特異的なクロマチン構造のダイナミクスを明らかにする。まず、精子形成過程の最初期に発現する精子特異的ヒストンバリエント H3t の発現制御メカニズムの解明とその機能解明を行う。具体的には、GS 細胞のレチノイン酸誘導前後での H3t 遺伝子座周囲のクロマチン構造をエピゲノム解析する。これにより H3t の発現に伴うクロマチン構造変化を明らかにし、発現誘導に必要なエンハンサー配列の同定を試みる。同時に、エンハンサー活性化マーカーである H3K27ac、H3K4me1 修飾、プロモーター活性化マーカーである H3K27ac、H3K4me3 修飾に対するヒストン修飾解析や ATAC-seq によるエピゲノム解析により裏付けを行う。適時、Chromosome Conformation Capture (3C 法) による高次構造制御についても解析を行う。次に、精子形成過程における H3t の取り込み位置の挙動変化を ChIL-seq により評価する。cell sorter を用いて精子形成の各分化段階の細胞を分画し (Gaysinskaya et al., Cytometry, 2014)、well plate に分取した後、ChIL-seq により H3t のゲノム上での取り込み位置を解析する。同時に、ヒストン修飾の ChIL-seq も行い H3t の取り込み位置の特徴付けを行う。並行して組織切片を使った ChIL-seq を進めることで裏付けを行う。その後の分化における各段階で発現・機能す

る既知、未知ヒストンバリエーションについても同様に、発現機序の解明とそれぞれヒストンバリエーションにより構成されるクロマチン構造の機能解析を進める。

4. 研究成果

精子形成過程の最初期に発現する精子特異的ヒストンバリエーション H3t の発現制御メカニズムの解明とその機能解明を行うにあたって、GS 細胞における H3t の発現プロファイルを詳細に取得した。その結果、GS 細胞では、レチノイン酸誘導前から H3t の発現が確認された。したがって、当初予定した GS 細胞での解析の代替として、若齢マウスでの解析を進めることにした。そこで、精子形成過程における H3t の取り込み位置の挙動変化を ChIL-seq により評価した。cell sorter を用いて精子形成の各分化段階の細胞を分画し (Gaysinskaya et al., Cytometry, 2014) well plate に分取した後、ChIL-seq を行った。次世代シーケンスにより得られたリードのうち、マウスゲノムにマッピングされたリード数を H3t と体細胞型ヒストン H3.1/2 で比較したところ、減数分裂前の精祖細胞で H3t のリード数が H3.1/2 と比べ高いことが明らかとなった。また、精祖細胞における H3t の局在を可視化したところ、H3t がドメインを形成し、その周囲に H3.1/2 が局在している例が多数見受けられた。また、体細胞型ヒストン H3.1/2 は減数分裂以前から精子細胞のゲノムに取り込まれていることが知られている。これらのことから、H3t は体細胞型ヒストン H3.1/2 と置換されることで、減数分裂期に機能していることが示唆された。この知見から精子形成において H3t が何らかの特異的なクロマチン構造を形成することで安定な精子形成が行われているのではないかと考えた。そこで、さらに詳細に解析するために、精子形成過程における H3t と関連があると考えられるヒストン修飾に対する ChIL-seq を行うための方法論の確立を目指した。特に単一細胞解析を念頭においたプロトコルの開発を進め、H3K4me3, H3K27ac, H3K9me3, H3K27me3, H3K36me3, H3K4me1 の 1 細胞 ChIL-seq の可視化に成功した。これまでの報告通りに、エンハンサーマーカーである H3K27ac と H3K4me1 のゲノム領域の相関性が確認できた。また、関連する ChIL 法の詳細なプロトコルを発表した。一方で、組織中から単離された細胞は、化学的、物理的的刺激により細胞状態が変化していることも考えられる。そのため、組織中でエピゲノム解析が可能な技術開発も進めた。薄切切片に最適化した ChIL-seq プロトコルを開発し、組織切片上でのエピゲノム解析技術を発表した。今後は、これら技術をもとに H3t の精子形成におけるクロマチンダイナミクスを 1 細胞レベルで解析を進めていく。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Qianmei Wu, Takeru Fujii, Akihito Harada, Kosuke Tomimatsu, Atsuko Miyawaki-Kuwakado, Masatoshi Fujita, Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa.	4. 巻 -
2. 論文標題 Genome-wide analysis of chromatin structure changes upon MyoD binding in proliferative myoblasts during the cell cycle.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Biochem.	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） 10.1093/jb/mvab001.	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 Yuki Sakamoto, Mayuko Sato, Yoshikatsu Sato, Akihito Harada, Takamasa Suzuki, Chieko Goto, Kentaro Tamura, Kiminori Toyooka, Hiroshi Kimura, Yasuyuki Ohkawa, Ikuko Hara-Nishimura, Shingo Takagi, Sachihiko Matsunaga.	4. 巻 11
2. 論文標題 Subnuclear gene positioning through lamina association affects copper tolerance.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 5914
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-19621-z.	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 Hiroshi Ochiai, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Akihito Harada, Yukiko Shimizu, Kenta Nakano, Noriko Saitoh, Zhe Liu, Takashi Yamamoto, Tadashi Okamura, Yasuyuki Ohkawa, Hiroshi Kimura, Itoshi Nikaido.	4. 巻 6
2. 論文標題 Genome-wide kinetic properties of transcriptional bursting in mouse embryonic stem cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Adv.	6. 最初と最後の頁 eaaz6699
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aaz6699.	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 Tetsuya Handa, Akihito Harada, Kazumitsu Maehara, Shoko Sato, Masaru Nakao, Naoki Goto, Hitoshi Kurumizaka, Yasuyuki Ohkawa, Hiroshi Kimura.	4. 巻 15
2. 論文標題 Chromatin integration labeling for mapping DNA-binding proteins and modifications with low input.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Protoc.	6. 最初と最後の頁 3334-3360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41596-020-0375-8.	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 Oka M, Mura S, Otani M, Miyamoto Y, Nogami J, Maehara K, Harada A, Tachibana T, Yoneda Y, Ohkawa Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Chromatin-bound CRM1 recruits SET-Nup214 and NPM1c onto HOX clusters causing aberrant HOX expression in leukemia cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 pii: e46667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.46667.	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 Fukuda S, Kaneshige A, Kaji T, Noguchi YT, Takemoto Y, Zhang L, Tsujikawa K, Kokubo H, Uezumi A, Maehara K, Harada A, Ohkawa Y, Fukada SI.	4. 巻 8
2. 論文標題 Sustained expression of HeyL is critical for the proliferation of muscle stem cells in overloaded muscle.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 pii: e48284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.48284.	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 Sato S, Arimura Y, Kujirai T, Harada A, Maehara K, Nogami J, Ohkawa Y, Kurumizaka H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Biochemical analysis of nucleosome targeting by Tn5 transposase.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Open Biol.	6. 最初と最後の頁 190116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsob.190116.	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 原田 哲仁, 前原 一満, 半田 哲也, 木村 宏, 大川恭行
2. 発表標題 ChIL法による単一細胞エピゲノムプロファイリング.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田 哲仁, 小松 哲郎, 前原 一満, 近藤 友佳理, 田中 かおり, 桑門 温子, 佐藤 優子, 木村 宏, 林 克彦, 小野 悠介, 竹本 龍也, 胡 桃坂 仁志, 大川 恭行
2. 発表標題 ヒストンH3パリアントの選択的取り込みによる組織特異的な遺伝子発現制御
3. 学会等名 第47回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田 哲仁, 前原 一満, 田中 かおり, 半田 哲也, 木村 宏, 大川 恭行
2. 発表標題 組織切片を用いたエピゲノム解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 大川 恭行, 原田 哲仁, 前原 一満	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社 週刊医学のあゆみ	5. 総ページ数 6
3. 書名 1細胞エピゲノム解析技術開発の最前線	

1. 著者名 原田 哲仁, 大川 恭行	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社 実験医学	5. 総ページ数 7
3. 書名 骨格筋研究のための最先端解析技術.	

1. 著者名 原田 哲仁, 大川 恭行	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社 実験医学	5. 総ページ数 8
3. 書名 シングルセルでのエピゲノム情報の計測技術.	

1. 著者名 クロマチン挿入標識法 (ChIL) による単一細胞エピゲノム解析	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 実験医学	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 対象核酸の塩基配列を1細胞レベルで並列に検出する方法	発明者 大川 恭行、原田哲 仁	権利者 国立大学法人九州大学
産業財産権の種類、番号 特許、2020-017027	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------