

令和 3 年 8 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23831

研究課題名（和文）精子幹細胞における分化開始と共役したエピジェネティック因子群の翻訳制御機構

研究課題名（英文）Translational regulation of epigenetic factors in spermatogonial stem cells

研究代表者

黒羽 一誠 (KUROHA, Kazushige)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：50580015

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：精子幹細胞が精子形成へ向けて運命決定される一時期において、大規模なゲノム修飾の転換が起こる。この転換に関わるゲノム修飾酵素群は、翻訳制御によってその量が増加していることが示唆されている。そこで本研究は、この転換点における翻訳制御の実態を明らかにすることを目的とした。その結果、1) 修飾酵素のmRNAの翻訳は、精子幹細胞において強く抑制されていること、2) 転換点の前後で異なるmRNAアイソフォームが発現していること、3) 修飾酵素のmRNAは、転換点の前後を通して細胞質に局在しており、mRNAの核外輸送によってタンパク質合成量が制御されている可能性は低いこと、が本研究により明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム修飾酵素の翻訳制御は、精子幹細胞から分化細胞の移行に必要なエピジェネティクス制御の上流にあると考えられ、そのメカニズムを理解することで、成体幹細胞に対して広く適用可能な『細胞運命の決定機構』を翻訳制御の視点で明らかにできると考えられる。これを達成することは、再生医療研究に重要なだけでなく、「多細胞生物における様々な種類の細胞がどのように生み出されるのか」といった生物学における根本の問いの解明につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：During the time when spermatogonial stem cells loss their stem cell activity, significant epigenetic changes occur in them. It has been suggested that the enzymes involved in the global epigenetic change (hereinafter called "epigenetic factors") may be upregulated by translational regulation. In this study, we aimed to investigate the translational regulation of epigenetic factors during the stem cell to progenitor transition. We found that 1) translation of the mRNAs encoding epigenetic factors is strongly repressed in spermatogonial stem cells, 2) different mRNA isoforms are expressed during the transition, and 3) mRNAs encoding epigenetic factors are localized in the cytoplasm regardless of the stem cell and differentiating cells, thus mRNA export from nucleus may not be crucial for the upregulation of epigenetic factors.

研究分野：精子幹細胞、翻訳制御

キーワード：精子幹細胞 エピジェネティクス 翻訳制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精子幹細胞は、個体の一生涯を通じて「自己複製を繰り返しながら、精子へと分化する細胞を生み出し続ける能力」を持つ。これまで、種の保存や不妊治療の視点から、この特性を分子レベルで理解しようとする試みがなされてきた。しかしながら、正常な精子形成に関わる最初の分岐点、即ち**精子幹細胞が自己複製能を不可逆的に喪失し、分化細胞へ正確に移行していくための分子機構**は未だ解明されていない。

精子形成では、体細胞分裂による細胞増殖、次に2回の減数分裂を経て、最後に精子形態形成が起こる。体細胞分裂期の細胞を精原細胞と呼び、中でも幹細胞活性を有するA型細胞は、単独で存在する「As細胞」と、一度体細胞分裂した2個の「Apr細胞」、さらに4個、8個と、体細胞分裂を繰り返した「Aal細胞」に細分化される。Aal細胞から不可逆的に幹細胞活性を失い分化型精原細胞(A1-4細胞)へと分化する際に、膜型チロシンキナーゼである**Kit** 遺伝子の発現が起こる(図1)。

これまで我々は、**Kit** 陰性から、**Kit** 陽性精原細胞へ移行(= 精原細胞が幹細胞活性を喪失)する時期と一致して、**DNA** メチル化酵素の発現上昇に伴う**DNA** メチル化状態の変化、および、ヒストンメチル化酵素の発現上昇に伴う抑制ヒストン修飾の増加、などが一斉に起こることを見出し、ここを「**エピジェネティック・チェックポイント**」と名付けた(図1, Shirakawa et al., *Development* (2013))。

この結果は、このポイントで導入されるゲノム修飾が、幹細胞から精子形成へ向けた不可逆な細胞分化プログラムを駆動する重要な鍵であることを示唆している。しかしながら、このゲノム修飾の変化をもたらす**DNA** メチル化酵素とヒストン修飾酵素の発現上昇がどのような分子機構で駆動されるのか、については未解明であった。

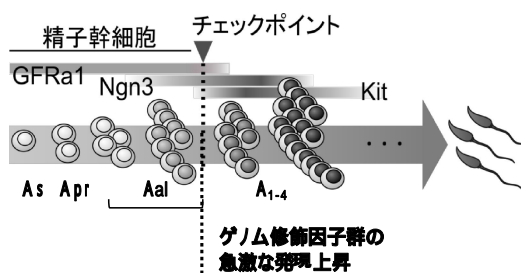


図1. 精子幹細胞の分化段階と共役したゲノム修飾の転換点の発見

2. 研究の目的

これまで、**エピジェネティック・チェックポイント**を境として起こる細胞内での変化を捉えるため、ゲノムワイドな転写量の変化、ヒストン修飾、およびDNAメチル化を解析した。その結果、**DNA** メチル化酵素およびヒストンメチル化酵素の発現上昇が、転写の増大によるものではなく、翻訳の段階で制御されている可能性を見出した。そこで本研究は、**エピジェネティック・チェックポイントにおける翻訳制御の実態を明らかにすること**を目的とした。

3. 研究の方法

DNAメチル化酵素とヒストンメチル化酵素をモデルとして、チェックポイントの前後で翻訳量を変化させる3つの可能性、即ち、**mRNAの核外輸送**、**全mRNAの翻訳の亢進/脱抑制**、**DNAメチル化酵素・ヒストンメチル化酵素のmRNAの選択的な翻訳の亢進/脱抑制**により、タンパク質合成量の上昇を説明できないか、以下の実験1)~3)を行った。また、将来的に多量な細胞数を必要とする生化学的解析を行うため、*in vitro* 培養系の確立を目標として4)を行った。

1)mRNA核外輸送の解析：核内で転写されたmRNAが、Kit遺伝子の発現後、翻訳の場である細胞質に輸送されて翻訳量が増加した可能性が考えられた。そこで、DNAメチル化酵素とヒストンメチル化酵素のmRNAについて、その核外輸送を**In situ hybridization**法で解析した。

2)精原細胞の翻訳活性の解析：Kit遺伝子の発現後、細胞の持つ翻訳活性が上昇し、全mRNAの翻訳量が増加した可能性が考えられた。そこで、細胞内で合成された全タンパク質をピューロマイシンアナログで標識し、それを定量することで細胞の持つ翻訳活性の変化を解析した。

3)mRNAの普遍的修飾(3'ポリ(A))の長さの解析：Kit遺伝子の発現後、mRNAの普遍的修飾の変化によって、翻訳量が増加した可能性が考えられた。真核生物の成熟mRNAの3'末端にはpoly(A)鎖が存在しており、mRNAを分解から保護すると共に、核外への輸送を促進している。そこで、Kit陰性およびKit陽性精原細胞から得られたtotal RNAを用いて、Poly A tail length assay (PAT法)を実施してpoly(A)鎖長を決定した。

4) *In vitro* 培養系の確立：マウスの精子幹細胞を試験管内で増幅する培養系として、**Germline Stem Cell** (以下 **GS 細胞**)が知られている。この培養系は、幹細胞を安定に培養することができるが、細胞の形態や遺伝子発現が均一ではないヘテロな系であり、最も未分化な細胞を濃縮するための培養系確立が必要である。本研究では、精子幹細胞の未分化状態をより強く保つ方法論の確立を目標として、ヒストンメチル化阻害剤の影響を検討した。

4. 研究成果

1)mRNA 核外輸送の解析

DNA メチル化酵素とヒストンメチル化酵素の mRNA は、エピジェネティック・チェックポイントの前後を通して細胞質に局在していることがわかった。これは、タンパク質合成量が mRNA の核外輸送によって制御されている可能性は低いことを示唆している。

2)精原細胞の翻訳活性の解析

これまでの結果と一貫して、DNA メチル化酵素およびヒストンメチル化酵素は、Kit 陰性精原細胞でほとんど合成されていないことが Western blot 法により確認された。一方、細胞のタンパク質合成全般は Kit 陰性精原細胞の段階で既に急激に上昇していることが明らかとなった。この結果は、DNA メチル化酵素およびヒストンメチル化酵素の mRNA の翻訳が Kit 陰性精原細胞において強く抑制されている可能性を示している。

3)mRNA の普遍的修飾(3' ポリ(A))の長さの解析

DNA メチル化酵素とヒストンメチル化酵素の mRNA の poly(A)鎖の長さは、エピジェネティック・チェックポイントの前後を通してほとんど変化しないことがわかった。一方、この解析による副産物として、エピジェネティック・チェックポイントの前後で 3'非翻訳領域の長さが異なるアイソフォームが発現していることが示唆された。

4) *In vitro* 培養系の確立

GS 細胞をヒストンメチル化酵素阻害剤(UNC0646)の存在下で培養し、そのエピゲノムの変化を解析した。その結果、主要なヒストン修飾の減少が、別のヒストン修飾の増加を誘導することがわかった。これは、阻害剤の添加によって GS 細胞の遺伝子発現を操作できることを示している。しかしながら、*in vivo* における精子幹細胞の未分化状態を模倣した培養条件の確立には、更なる検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakajima Kuniko, Ono Michio, Radovic Uros, Dizdarevic Selma, Tomizawa Shin-ichi, Kuroha Kazushige, Nagamatsu Go, Hoshi Ikue, Matsunaga Risa, Shirakawa Takayuki, Kurosawa Takeyuki, Miyazaki Yasunari, Seki Masahide, Suzuki Yutaka, Koseki Haruhiko, Nakamura Masataka, Suda Toshio, Ohbo Kazuyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Lack of whey acidic protein (WAP) four-disulfide core domain protease inhibitor 2 (WFDC2) causes neonatal death from respiratory failure in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	6. 最初と最後の頁 40139 ~ 40139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dmm.040139	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 Zinoviev Alexandra, Kuroha Kazushige, Pestova Tatyana V, Hellen Christopher U T	4. 巻 47
2. 論文標題 Two classes of EF1-family translational GTPases encoded by giant viruses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 5761 ~ 5776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz296	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 Kobayashi Yuki, Tomizawa Shin-ichi, Ono Michio, Kuroha Kazushige, Minamizawa Keisuke, Natsume Koji, Dizdarevi? Selma, Do?kal Ivana, Tanaka Hiromitsu, Kawagoe Tatsukata, Seki Masahide, Suzuki Yutaka, Ogonuki Narumi, Inoue Kimiko, Matoba Shogo, Anastassiadis Konstantinos, Mizuki Nobuhisa, Ogura Atsuo, Ohbo Kazuyuki	4. 巻 148
2. 論文標題 Tsga8 is required for spermatid morphogenesis and male fertility in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev.196212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.196212	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

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ: <http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~finemorp>

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
---------	---------