

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07228

研究課題名（和文）精子幹細胞の分化開始を保证する転写後制御機構の解析

研究課題名（英文）Post-transcriptional control of spermatogonial stem cell self-renewal and differentiation

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：精子幹細胞では、自己複製能を不可逆的に喪失し精子形成へ向けて運命決定される一時期において、転写後レベルで起こる複数のゲノム修飾酵素の発現上昇に伴って大規模なゲノム修飾の変動が引き起こされる。本研究は、これらゲノム修飾酵素群の発現上昇に関わる転写後制御機構を明らかにすることを目指した。結果、1) mRNAの核外輸送と局在化、2) 精子幹細胞の分化移行に伴うタンパク質合成全般の上昇、およびmTORの活性化、の直接的な影響によって誘導されていないことが明らかとなった。これは、ゲノム修飾酵素の蓄積が、タンパク質合成全般の変動に付随するというより、何か選択的な制御機構によって達成されていることを示唆する。

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 period when spermatogonial stem cells lose their self-renewal activity, significant epigenetic changes occur in them. It is suggested that epigenetic modification enzymes, such as DNA methyltransferase and histone methyltransferase, are upregulated through post-transcriptional regulation. In this study, our aim was to investigate the translational regulation of epigenetic modification enzymes during the transition from spermatogonial stem cells to progenitors. We found that 1) mRNA export from the nucleus and its localization within cells, 2) the upregulation of total protein synthesis and the specific activation of mTOR during differentiation, were not sufficient for the induction of epigenetic modification enzymes. Thus, the upregulation of these enzymes is likely to be achieved through selective regulatory mechanisms rather than being accompanied by fluctuations in overall protein synthesis.

研究分野：精子幹細胞と翻訳

キーワード：精子幹細胞 翻訳制御 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の運び手である配偶子の品質を厳密に管理することは、有性生殖を行う全ての生物にとって、正しい遺伝情報を次世代に受け渡すために必要不可欠である。哺乳動物における精子形成は、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「精子幹細胞」により、雄個体の一生を通じて支えられている。この精子幹細胞が、自己複製能を不可逆的に喪失し、分化細胞へと正確に移り変わる過程が、正常な精子形成を左右する最初の分岐点となるが、精子幹細胞から分化細胞への正常な移行を規定する品質制御機構は未だ明らかではない。

これまで研究代表者は、精子幹細胞が自己複製能を喪失する時期と一致して、DNAメチル化酵素量の増加に伴うDNAメチル化レベルの上昇、また、ヒストンH3K9のメチル化(H3K9me)酵素量の増加に伴う抑制ヒストン修飾レベルの上昇、などが一斉に起こることを見出し、この転換点をエピジェネティック・チェックポイントと名付けた。このチェックポイントまでに、DNAとヒストンのメチル化パターンを形成、または、それらを維持できないような場合、いずれも精子への分化が停止して不妊となることから、このゲノム修飾の大規模な転換点が、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と予想される。しかしながら、エピジェネティック・チェックポイントを境としたゲノム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。これまでに実施してきたRNA-sequencingのデータから、DNAメチル化酵素およびH3K9me化酵素のmRNA量は精子幹細胞と分化細胞との間で差異がないことを明らかにしてきた。従って、ゲノム修飾酵素の発現上昇はそのmRNAの転写の増大によるものではなく、**転写後の段階**で制御されていると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、エピジェネティック・チェックポイントを境としたDNAメチル化酵素およびH3K9me化酵素の発現上昇に関わる**転写後制御機構**を明らかにすることを目的として、翻訳制御の可能性を中心に解析を行った。

3. 研究の方法

(1) DNAメチル化酵素およびH3K9me化酵素の発現上昇が、そのmRNAの核外輸送、または局在化によって制御されている可能性を検証する

精子幹細胞と分化細胞におけるDNAメチル化酵素mRNAおよびH3K9me化酵素mRNAの所在を、1分子In Situ Hybridization法により解析した。

(2) DNAメチル化酵素およびH3K9me化酵素の発現上昇が、精子幹細胞の分化移行に伴う翻訳活性の変化と連動している可能性を検証する

精子幹細胞と分化細胞内で合成された全タンパク質を、tRNA類似体(0-propargyl-puromycin)の取り込み量を指標として、Whole Mount免疫染色法により解析した。また、mTOR(細胞の増殖や成長において中心的な役割を持つリン酸化酵素)が、精子幹細胞の分化移行においても重要な役割を果たすことが知られているので、mTORの標的因子である4E-BP1(翻訳開始因子4Eの結合タンパク質1)のリン酸化レベルの変化も合わせて解析した。

(3) DNAメチル化酵素およびH3K9me化酵素の発現上昇が、そのmRNAの翻訳量の変化によって制御されている可能性を検証する

リボソームプロファイリングを実施し、エピジェネティック・チェックポイントで翻訳制御を受ける遺伝子を網羅的に同定する。この方法は、細胞抽出液をRNA分解酵素で処理した後、リボソームによって保護されたmRNA(リボソームフットプリント)からシーケンスライブラリーを作成し、それをディープシーケンシングによって配列決定する方法である。解析された核酸配列はmRNAにおけるリボソームの位置(=翻訳状況)を反映する。

4. 研究成果

(1) DNAメチル化酵素およびH3K9me化酵素の発現上昇が、そのmRNAの核外輸送、または局在化によって制御されている可能性を検証する

H3K9me化酵素mRNAは、運命決定の前後で核内と細胞質のいずれにも存在し(図1)、P-bodyやストレス顆粒のような細胞内構造体への集積も観察されないことが明らかとなった。この傾向は、DNAメチル化酵素mRNAでも同様であった。

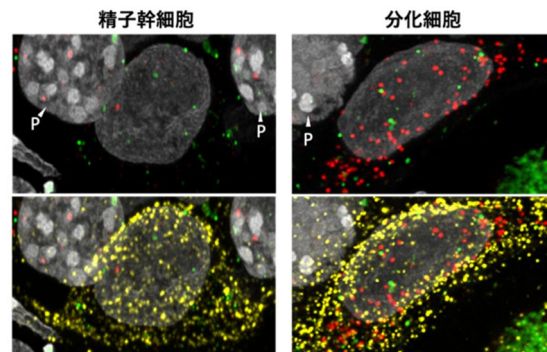


図1 1分子 In Situ Hybridization法によるH3K9me化酵素mRNAの検出。H3K9me化酵素mRNA(緑)と分化マーカーであるKit遺伝子mRNA(赤)を蛍光標識プローブで、細胞の輪郭(黄色)をEカドヘリン抗体、核(灰色)はDAPIにより染色した。P: 隣接するパキテン期の精母細胞

(2) DNAメチル化酵素およびH3K9me化酵素の発現上昇が、精子幹細胞の分化移行に伴う翻訳活性の変化と連動している可能性を検証する

成熟過程にある精子幹細胞において、タンパク質合成全般が顕著に増加する時期はStage 7-8であり、P-4EBPレベルの上昇時期と部分的な相関性が見られた。一方、H3K9me化酵素量はStage 7-8から徐々に上昇し最大値に達するのはStage 11-12であり、その他2つの蓄積時期とは明確に「ずれる」ことが明らかとなった(図2)。この傾向は、DNAメチル化酵素でも同様であった。

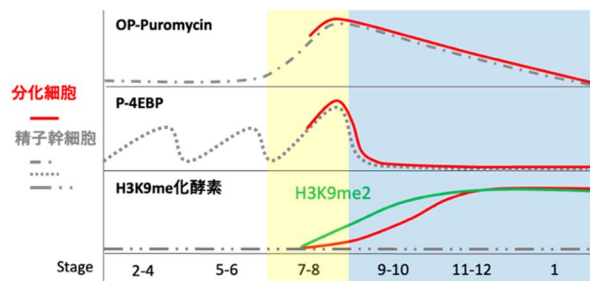


図2 精巣のステージに沿ったOP-Puromycinの取り込み量(上部)、4EBPのリン酸化量(中部)、H3K9me化酵素量とH3K9me修飾量の変動。精細管内では生殖細胞の分化に伴い、周期的な生殖細胞集団のパターン(stage)が形成され、マウスでは12種類に分類される。

(3) DNAメチル化酵素およびH3K9me化酵素の発現上昇が、そのmRNAの翻訳量の変化によって制御されている可能性を検証する

マウスから純化できる精子幹細胞と分化細胞数はわずかであり、多量の細胞数を必要とする一般的なリボソームプロファイリングのプロトコルは本研究に適用できない。従って、実験工程を簡略化し、微量試料に特化したシークエンスライブラリーの調整法を検討するため、精子幹細胞の培養系 -GS細胞- を用いて予備実験を実施した。

RiboLace法(Clamer M. et al., *Cell Rep.* 2018)に基づいたフットプリント精製と、Rfoot-seq法(Li Q. et al., *Genome Res.* 2022)に基づくライブラリー作成手順を参考として、約5000~25000細胞からシークエンスライブラリーを作成することがわかった(図3)。

リボソームプロファイリング法によりマウス精巣の精子幹細胞と分化細胞の翻訳状況を解析した結果、

DNAメチル化酵素mRNAおよびH3K9me化酵素mRNAの翻訳が分化移行に伴って上昇していること、チェックポイントを境として翻訳レベルで発現変動する複数のゲノム修飾酵素遺伝子が存在すること、を示す結果が得られた。これらについては、確認作業を進行中である。

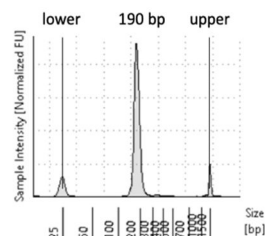


図3 本研究で作成したDNAシークエンスライブラリーのサイズ分布。Tapestation High Sensitivity D1000を用いて解析した。サイズ分布は、174-200bpであり、予想された190bpにピークを持つ。

本研究における結果(1-3)より、DNAメチル化酵素およびH3K9me化酵素の蓄積は、mRNAの核外輸送や局在化、精子幹細胞の分化移行に伴うタンパク質合成全般の上昇、およびmTORの活性化、の直接的な影響によって誘導されていないことを示している。これは、2つのゲノム修飾酵素の蓄積が、タンパク質合成全般の変動に付随しているというよりは、何か選択的な制御機構によって達成されていることを示唆する。本研究により、マウスから純化できるレベルの細胞数でリボソームプロファイリング用のライブラリー作成ができるようになったことから、この方法を用いることで、DNAメチル化酵素およびH3K9me化酵素mRNAの翻訳が選択的に増加していることを示すことができると思われる。また、保有するRNA-sequencingのデータと組み合わせることで、精子幹細胞の分化移行で起こる転写後制御を、「翻訳」と「それ以外」の制御に分類でき、複数の制御によって成り立つ機構であることを明らかにできると予想される。

また、最近我々は、長鎖非コードアンチセンスRNA(AS-lncRNA)が、精子幹細胞の分化移行に伴ったクロマチン関連遺伝子の発現変動に機能していることを示すデータを得た。今後はAS-lncRNAの作用機構に着目して、分化移行で起こる転写後制御機構を解析する予定である。

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 Kobayashi Yuki, Tomizawa Shin-ichi, Ono Michio, Kuroha Kazushige, Minamizawa Keisuke, Natsume Koji, Dizdarevic Selma, Dockal 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

1. 著者名 Miscicka Anna, Bulakhov Alexander G, Kuroha Kazushige, Zinoviev Alexandra, Hellen Christopher U T, Pestova Tatyana V	4. 巻 52
2. 論文標題 Ribosomal collision is not a prerequisite for ZNF598-mediated ribosome ubiquitination and disassembly of ribosomal complexes by ASCC	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 4627 ~ 4643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkae087	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 Shin-ich Tomizawa, Kazushige Kuroha, Michio Ono, Kuniko Nakajima, Kazuyuki Ohbo	4. 巻 -
2. 論文標題 A behind-the-scenes role of BDNF in the survival and differentiation of spermatogonia	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Asian Journal of Andrology	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） なし	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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			
米国	SUNY Downstate Medical Center			