

令和 5 年 4 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20655

研究課題名（和文）雄性生殖細胞におけるR-loopの解消機構と精子形成及び次世代への影響

研究課題名（英文）The Mechanism of R-loop resolution in male germ cells and its effects on spermatogenesis and next generation.

研究代表者

城本 悠助 (Shiromoto, Yusuke)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：40912259

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：R-loop解消因子である二本鎖核酸編集酵素ADAR1を欠損する培養精子幹細胞を樹立したところ、細胞内全体のDNA:RNAハイブリッド量に変化は認められなかったが、老化マーカーであるp16の発現の上昇が認められた。また、培養細胞内にて、ADAR1が関与する因子のスクリーニングを行ったところ、R-loop制御に関与するTDP1などが協調して機能する因子の候補として同定された。Adar1による精巣幹細胞の老化への寄与と、一部のゲノム領域でのR-loop除去因子との相互作用の可能性が示唆された。精巣特異的Adar1欠損マウスを作製しており、精子形成と産仔への影響について解析を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖細胞は次代に遺伝情報を伝達する細胞であり、その異常は次世代に受け継がれる。R-loop解消因子であるADAR1を欠損するGS細胞では細胞内全体のDNA:RNAハイブリッド量やインプリント遺伝子のDNAのメチルに変化は認められなかったが、ADAR1がTDP1などと協調して機能する可能性が示唆された。これらの成果はR-loop解消機構の理解に加え、カンプトテシンなどR-loopを誘導する抗がん剤に対する細胞の生存機構の理解にも繋がり、安全な薬剤使用に貢献できる。ADAR1欠損GS細胞において老化マーカーであるp16の発現が上昇したことから、老化による男性不妊症の原因解明に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）： In this study, we established germline stem cells (GS cells) lacking Adar1, an R-loop resolution factor, and analyzed their DNA:RNA hybrid levels and gene expression. The DNA:RNA hybrid levels of whole genome in the cells were not affected by Adar1 knockout. On the other hand, the expression of p16INK4a, a senescence marker, was elevated in Adar1 knockout cells. This result suggests that Adar1 may contribute to cellular senescence in GS cells.

A screening for ADAR1-related factors in cultured cells identified ATM, TDP1, and XPF as candidate factors that function in regulation of R-loop. Further analysis is needed on the function of Adar1 in R-loop resolution by ATM, TDP1, and XPF in germ cells. Testis-specific Adar1-deficient mice have been generated and are currently being analyzed for effects on spermatogenesis and their offspring.

研究分野：核酸発生生物学

キーワード：精巣 精子幹細胞 R-loop DNA損傷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は次世代に遺伝情報を継承する唯一の細胞であり、その分化過程は厳密に制御されている。特に、重要な機能を有する DNA 領域に変異が生じて次世代に伝搬すると、その子孫はすべての細胞で変異の影響を引き継いでしまう。細胞は日々、外的、内的なストレスに晒されており、DNA 損傷が生じているが、修復機構によって正常な塩基配列を維持している。しかし、損傷を修復しきれない場合、アポトーシスを誘導することで、変異を起こした細胞が排除されている。出生後の雄性生殖細胞の分化は、自己複製能と分化能を有する精原細胞(精子幹細胞)から始まり、減数分裂期の精母細胞を経て、半数体である精細胞となり、精子が産生される。これまでに遺伝子欠損マウスによる解析から、アポトーシス制御(Bax, Bad など)、DNA 修復(Atm など)に機能する遺伝子が正常な精子形成に必須であることが報告されてきた(Russell L et. al. Biol. Reprod. 2002; Takubo K, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2006)。DNA 損傷が引き起こされる原因は種々存在するが、我々は新規の R-loop 制御機構と DNA 損傷についての研究を行ってきた。転写された RNA 鎖は再び鋳型である DNA 鎖に対合し、二本鎖 DNA よりも安定な DNA/RNA ハイブリッド鎖を形成する。同時に、一本鎖の DNA 鎖も形成され、これらの構造が R-loop と呼ばれている。転写と共役して形成される R-loop 領域は容易に DNA 損傷が生じ、低 DNA メチル化状態となるため、細胞には解消機構が備わっている。

これまでに我々は二本鎖 RNA 編集酵素として知られてきた ADAR1 をがん細胞にてノックダウンすると、R-loop 量が上昇することを見出した。また、ADAR1 のノックダウンにより DNA 損傷に応答するタンパクや分裂停止マーカーの発現上昇が観察されており、ADAR1 が R-loop 解消に機能し、その機構の破綻により DNA 損傷や分裂停止に至ることを明らかにした。

これまで R-loop に関する研究は主にがん細胞・培養細胞でなされてきた。生殖系列細胞での解析は DNA:RNA ハイブリッド鎖のヘリカーゼである SETX の欠損マウスでのみ行われてきた。欠損マウスでは免疫染色法により雄性生殖細胞での R-loop 及び DNA ダメージの上昇が報告されている。しかし、生殖細胞における R-loop の形成領域と解消機構の全容、なぜ R-loop が形成されるのか、そして DNA 損傷や DNA の低メチル化が及ぼす細胞分化や子孫の発育への影響など不明な点が多く残っている。

そこで我々は「雄性生殖細胞における R-loop の解消機構と精子形成及び次世代への影響」についての研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では知見の乏しい正常細胞、正常組織(精子形成)における R-loop 解消機構の解明、R-loop 形成の意義の理解を目的としている。また、Adar1 欠損マウスを用いて精子形成及び次世代への影響を明らかにすることで、不妊治療や畜産分野への貢献を目指している。

3. 研究の方法

(1) 精子形成における R-loop 形成の影響と次世代への伝搬

R-loop の形成により、精子への分化の最中に DNA 損傷が生じるかどうか、また精子形成への影響を調べるため、Adar1 floxed マウスを導入して Stra8-Cre マウスと交配し、生殖細胞特異的な Adar1 欠損マウスを作製している。また、生殖細胞以外の正常細胞への影響を調べるため、炎症などの毒性が低い AAV9 キャプシドを用いた Cre リコンビナーゼを発現するアデノ随伴ウイルスを作成している。

(2) 精子幹細胞を用いた Adar1 及び R-loop 解消機構の解明

培養細胞系での評価を行うために精原細胞としての形質を保ち、培養可能である Germline stem (GS)細胞を Adar1-floxed マウスから樹立した。そして、アデノウイルスによる Cre リコンビナーゼを導入し、Adar1 が欠損する GS 細胞を樹立した (Figure A)。細胞内の R-loop 量の定量には DNA:RNA ハイブリッドを認識する抗体である S9.6 抗体を用いたゲノム核酸のドットプロット法を用いた。また、細胞老化マーカーである p16 の発現をウエスタンブロット法を用いて解析した。

(3) Adar1 による R-loop 解消メカニズムの解析

ADAR1 が R-loop 解消及び DNA 修復時にどのような因子と協調して機能しうるか調べるため、野生型の FLAG-ADAR1 及び二本鎖 RNA 結合領域の変異体を強制発現させ、FLAG 抗体による免疫沈降を行った。

4. 研究成果

(1) 精子形成における R-loop 形成の影響と次世代への伝搬

生殖細胞での R-loop 蓄積の影響およびその解消機構を明らかにするため、生殖巣特異的な Adar1 欠損マウスの作成を進めている。Adar1 floxed マウスと Stra8-Cre マウスを交配し、雄性生殖細胞特異的な Adar1 欠損マウスを繁殖している。また、AAV9-Cre リコンビナーゼを発現するアデノ随伴ウイルスを作成し、精巣及び卵巣への感染を開始し妊孕性の解析を進めている。これらの系が効率良く機能した場合、他の組織での欠損や R-loop 解消因子の導入に進む予定である。

(2) 精子幹細胞を用いた Adar1 及び R-loop 解消機構の解明

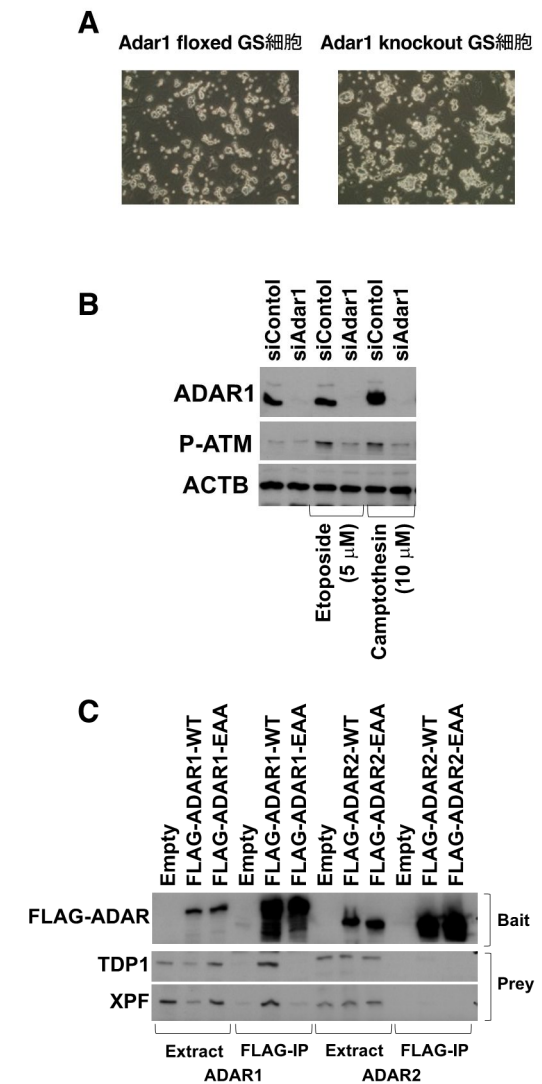
Adar1 floxed マウスから作製した Adar1-knockout GS細胞の培養を試みたところ、GS細胞として細胞増幅が可能であった (Figure A)。そこで細胞内全体の DNA:RNA ハイブリッド量を抗 DNA:RNA ハイブリッド抗体によるドットプロット法を用いて解析したところ、変化が認められなかった。また、生殖細胞において重要となるインプリント遺伝子の DNA のメチル化レベルを COBRA 法を用いて解析したところ、Adar1 欠損による変化は認められなかった。次に老化マーカーである p16 の発現を調べたところ Adar1 欠損による発現上昇が認められた。以上の結果から Adar1 は精子幹細胞における細胞老化に関与する可能性が示唆された。

(3) Adar1 による R-loop 解消メカニズムの解析

これまでに ADAR1 による R-loop の解消については繰り返し配列であるテロメア領域で形成される DNA:RNA ハイブリッドを標的とし、アデノシンからイノシンへの変換によるミスマッチ除去による解消をモデルと考えてきた。Adar1 が協調して働く R-loop 因子を調べるため、薬剤による R-loop 誘導を行い、テロメア領域に限局しない応答についての解析を行った。ウェスタンプロット法によるリン酸化 ATM 量を定量したところ、カンプトテシンおよびエトポシド処理によってリン酸化 ATM は増加するが、ADAR1 のノックダウンによりその増加が抑制されることが分かった (Figure B)。この ADAR1 ノックダウンによるリン酸化 ATM 量の変化は DMSO コントロールでは引き起こされないことから薬剤添加時特異的な現象であった (Figure B)。ATM は二本鎖 DNA 切断に応答することはもちろん、そのリン酸化の阻害により、染色体の不安定化を引き起こし、R-loop 量が増加することが知られている。ATM の 3'UTR 配列には二本鎖 RNA を形成する領域が存在することから ADAR1 が ATM の RNA に作用するのか、もしくはタンパク自体に機能するのか、今後明らかにする必要がある。

細胞内での R-loop の解消、DNA 損傷の応答、ATM の制御に ADAR1 が機能する可能性があることから、どのようなタンパクと共に機能しているのか調べるために FLAG-ADAR1 の免疫沈降を行い、共沈するタンパクのスクリーニングを行った。すると、TDP1 と XPF のタンパクが多量に共沈してきた (Figure C)。DNA 損傷を受けると、修復を促進するためにトポイソメラーゼ I が DNA のねじれを解くために活性化するが、このトポイソメラーゼ I と DNA の複合体 (Top1cc) を取り除くために TDP1 が機能する。Top1cc が取り除かれられない場合、R-loop の蓄積が生じる。ま

Figure



た、Top1ccが蓄積した場合、プロテアソーム系によって分解され、その後R-loopはヌクレアーゼであるXPFやXPGによって切断を受ける。このように、ADAR1はトポイソメラーゼの阻害に応答する因子と共に機能する可能性が示唆された。

また、ADAR1には二本鎖RNA結合ドメインが存在するが、その変異体（ADAR1-EAA）は核酸結合能を失うことが分かっている。EAA変異体での共沈ではこれらの結合は著しく低下することから、RNAもしくはDNAへの結合を介してTDP1やXPFと近い領域に存在することが明らかとなった（Figure C）。また、近年、ADARファミリーに属するADAR2もR-loopの解消に機能することが報告されたことから、ADAR2についてもFLAG抗体を用いて免疫沈降したところ、TDP1とXPFの共沈は認められなかった（Figure C）。このように、ADAR1は特異的に核酸結合能を介してTDP1とXPFと相互作用している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hao Xue, Shiromoto Yusuke, Sakurai Masayuki, Towers Martina, Zhang Qiang, Wu Shuai, Havas Aaron, Wang Lu, Berger Shelley, Adams Peter D., Tian Bin, Nishikura Kazuko, Kossenkov Andrew V., Liu Pingyu, Zhang Rugang	4. 巻 24
2. 論文標題 ADAR1 downregulation by autophagy drives senescence independently of RNA editing by enhancing p16INK4a levels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1202 ~ 1210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41556-022-00959-z	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 -

〔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	The Wistar Institute		