

令和元年6月13日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07099

研究課題名(和文)精子形成過程に必須の役割を果たすヒストンバリエントH3tの機能解析

研究課題名(英文)Functional analyses of testis-specific histone H3 variant H3t

研究代表者

上田 潤(Ueda, Jun)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80450394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は精巣に特異的に発現するヒストンH3バリエントであるH3tが精子形成過程に必須であることを明らかにした。すなわち、H3t遺伝子を欠損すると雄マウスは完全に不妊となり、無精子症を呈することが判明した。しかし、H3tは成熟精子からは最終的になくなる。このことからH3tは精子を作るためだけに必要なヒストンであると言えるが、H3tが精子形成過程でどのような役割を担っているかはまだ不明な点が多い。本研究では、“H3tがどのようなメカニズムでゲノム中に取り込まれ、ゲノム中でどのような分子と相互作用することで染色体の高次構造や機能を制御しているのか？”を明らかにすることを目的として行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国は現在未曾有の少子高齢化・人口減少に直面しており、人手不足など、問題の一部は既に顕在化している。この原因として、我が国全体で起こっている不妊症が考えられる。2015年現在、5.5組に1組が不妊の検査や治療を受けており、その半分は男性側が原因である。本研究結果は現段階では基礎研究の範疇ではあるが、本研究を通じて明らかになった知見は、最終的には臨床医との共同研究を通じて男性不妊症の診断法や治療法の開発に繋がりたいと考えている。特に、我が国において生殖補助医療(体外受精、顕微授精など)によって産まれてくる児は約20人に1人となっていることから、生殖補助医療の成功率を上げることが重要と考えている。

研究成果の概要(英文)：We have identified that testis-specific histone H3 variant H3t is essential for spermatogenesis. When H3t gene was knocked out in mice, male became sterile, displaying azoospermia. Interestingly, although H3t protein was expressed in testicular tissues, this protein was absent from mature spermatozoa. Therefore, H3t is a histone that is only required during spermatogenesis. In this study, we have further investigated how H3t functions within the genome, together with other interacting proteins, to organize higher order chromatin structures during spermatogenesis.

研究分野：生殖生物学

キーワード：クロマチン ヒストンバリエント 精子形成過程 無精子症 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

過去十数年の研究から、エピジェネティクス及びクロマチン制御に関わる因子の多くが精子形成過程に重要な役割を果たすことが明らかとなってきた (Sasaki, H. & Matsui, Y., *Nat. Rev. Genet.*, 2008)。とりわけ、ヒストン H3 の修飾酵素の多くは、精子形成過程の途中、特に減数分裂の中期以降で重要な役割を担っていることがノックアウトマウスを用いた逆遺伝学的解析から明らかとなっている。

我々はマウスの精巣に特異的に発現する新規のヒストン H3 バリエーションである「H3t (t は testis を意味する)」を発見し、この遺伝子が精子形成過程に必須であることを、ノックアウトマウスを用いた解析から明らかとした (Ueda, J., *et al.*, *Cell Reports*, 2017)。すなわち、H3t を欠損すると精巣が著しく縮小し、精子が全く形成されない無精子症を呈して、不妊となることを発見した。この結果は、様々なエピジェネティックな修飾を受けるヒストン H3 バリエーションそのものが細胞分化を決定付けていることを示している。

2. 研究の目的

先述したようにヒストン H3 の修飾酵素を欠失すると減数分裂の中期以降で精子形成が止まるが、これに対して H3t の欠損マウスでは、その異常が精子形成過程の極めて早い時期 (分化型精原細胞の出現時期) に生じていること、さらに正常な精子形成過程では canonical な H3 が DNA 複製依存的に H3t に置き換わっていることが明らかとなった。この結果から、当初はヒストン H3 修飾酵素の基質は canonical な H3 である H3.1/H3.2 だと考えられていたが、精子形成過程においては H3t がこれら酵素の基質である可能性が考えられる。このことはすなわち、どのような翻訳後修飾を受けるかはヒストンバリエーションが既定している可能性を示唆しており、エピジェネティクスの階層性を理解する上で今後重要なコンセプトになってくるものと考えられる。本研究では、H3t がどのような分子メカニズムで精子形成過程の進行を可能にしているのかを解明することを最終目的として行った。とりわけ、H3t がゲノム上のどこに分布し、染色体の高次構造や機能をどのように制御しているのかを解明することを目的としていた。また、H3t はヒトにも存在することから、本研究を通じてヒトの男性不妊症の原因解明にも貢献できるものと考えて行った。

3. 研究の方法

H3t が精子形成過程に必須であり、精原細胞が分化すると共に H3t の発現が誘導され、canonical な H3 と置き換わることをこれまでに明らかにした。本研究では H3t が染色体上のどこに分布し、遺伝子発現や染色体の高次構造をどのように制御しているのかを明らかにするために、精子幹細胞を用いた *in vitro* の分化実験系を用いてヒストンバリエーションの ChIP-Seq 解析を行った。また、H3t の点変異マウスを作製して H3t にユニークなアミノ酸残基の *in vivo* での機能を明らかにするための実験を行っている。

上記と並行して、環状染色体を保有し、乏精子症と診断された患者さんの精子中に環状染色体が含まれているか否かを検査する臨床研究を行った。

4. 研究成果

精子幹細胞の分化誘導実験系を用いたヒストン H3 バリエーションの ChIP-Seq 解析

これまでの解析結果から、DNA の複製依存的にヌクレオソームに取り込まれる canonical なヒストン H3 バリエーションである H3.1/H3.2 が、分化型の精原細胞が分裂する過程で H3t に置き換わっていることが明らかとなった。このことをさらに詳しく調べるために、分化誘導前後の精子幹細胞を用いてヒストン H3 バリエーション (H3.1、H3.3、H3t) の ChIP-Seq 解析を行い、各ヒストンバリエーションが染色体上のどこに局在するのかを明らかにした。

H3t に特異的なヒストン・コードの解明

ここ最近の研究から、ヒストンバリエーションが特定の翻訳後修飾を受けることが示唆されている。Toronto 大学の Jinrong Min 博士と基礎生物学研究所の中山潤一博士との共同研究によって、翻訳後修飾された H3.1/H3.2 よりも H3t により強く結合するクロマチン関連分子を同定し、この結合能の違いが H3t の 1 アミノ酸の違いであることを明らかにした。現在、これらの分子が精子形成過程でどのような機能を有し、遺伝子発現制御や染色体の高次構造形成に関わっているか明らかにするために、継続して研究を行っている。

ヒト精子中に環状染色体が含まれているか否かを検査する臨床研究

グリーンベル ART クリニックの糸井史陽博士、西川和代医師、中部大学の岩本隆司博士との共同研究によって、環状染色体を保有し、乏精子症と診断された患者さんの精子中に環状染色体が含まれているか否かを検査する臨床研究を行った。この研究によって、精子中に環状染色体は含まれておらず、アスペクト比の高い精子または精子頭部の短径が短い精子の受精率が高

いことが明らかとなった(図1)(Nishikawa, K., *et al.*, *JARG*, 2018)。

ヒトの精子頭部の形状はマウスに比べて多様であることが知られている。マウスにおいては精原細胞中のヒストンの大部分がプロタミンに置き換わることが知られているが、ヒトの精子においては15%ほどのヒストンが精子に残ると言われている(Hammoud, S.S., *et al.*, *Nature*, 2009)。このことから、ヒストンの残量がヒト精子の頭部の多様性に影響していることが推察される。さらに、精子頭部の形状が顕微授精を行う際の指標になり得ることを示唆していることから、不妊治療への応用が今後期待される。

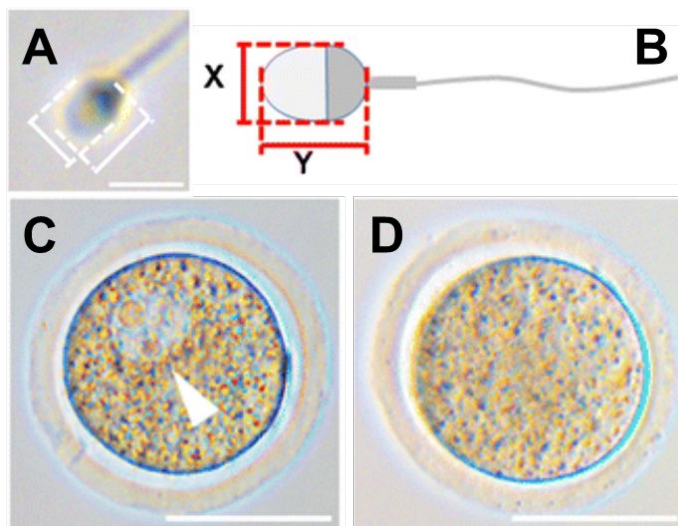


図1.(A) ヒト精子の頭部の拡大写真。スケールバーは5 μ m。(B) ヒト精子の頭部の短径(X)と長径(Y)を計測して、アスペクト比(Y/X)を算出した。(C、D) 脱核したマウスの卵子にヒト精子を顕微授精した。アスペクト比の高い精子または精子頭部の短径が短い精子の多くは前核を1つ形成し受精したが(C、矢頭)、低いものは受精し難かった(D)。スケールバーは50 μ m。

【文献】

- 1) Sasaki, H. and Matsui, Y.: *Nat. Rev. Genet.*, 9: 129-40 (2008)
- 2) Ueda, J†., Harada, A†., Urahama, T†., *et al.*: *Cell Reports*, 18: 593-600 (2017)
† 同等貢献
- 3) Nishikawa, K., Itoi, F., Nagahara, M., Jose, M., Matsunaga, A., Ueda, J., and Iwamoto, T.: *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35: 251-256 (2018)
- 4) Hammoud, S.S., *et al.*: *Nature*, 460: 473-478 (2009)

本研究を行うに当たり、九州大学の大川恭行博士、近畿大学の山縣一夫博士、東京大学の胡桃坂仁志博士、東京工業大学の木村宏博士に多大なサポートをいただきました。この場を借りて深く感謝申し上げます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

Omori, Y. 他(21名中8番目), A revised model of clonal evolution of intraductal papillary mucinous neoplasm-related pancreatic carcinogenesis. *Gastroenterology*, 査読有, 156巻, 2019, pp. 647-661. e2. Cover Article.

DOI: 10.1053/j.gastro.2018.10.029.

Takahashi, T. 他(6名中3番目), A microfluidic device for isolating intact chromosomes from single mammalian cells and probing their folding stability by controlling solution conditions. *Scientific Reports*, 査読有, 8巻, 2018, 13684. doi: 10.1038/s41598-018-31975-5.

DOI: 10.1038/s41598-018-31975-5.

Nishikawa, K. 他(7名中6番目, 共責任著者), The normality of sperm in an infertile man with ring chromosome 15: A case report. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 査読有, 35巻, 2018, pp. 251-256. († co-first author, *co-correspondence) DOI: 10.1007/s10815-017-1061-9.

Ho, J.C. 他(11名中10番目, 共責任著者), Inhibition of the H3K9 methyltransferase G9A attenuates oncogenicity and activates the hypoxia signaling pathway. *PLOS ONE*,

査読有, 12 巻, 2017, e0188051. (*co-correspondence)
 DOI: 10.1371/journal.pone.0188051.
 Tsukada, Y. 他(6名中5番目), Extraction of Cell Nuclei using CNN Features. *Procedia Computer Science*, 査読有, 112 巻, 2017, pp. 1633-1640.
 DOI: 10.1016/j.procs.2017.08.255
 Semba, Y. 他(12名中6番目), Chd2 regulates chromatin for proper gene expression toward differentiation in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research*, 査読有, 45 巻, 2017, pp. 8758-8772.
 DOI: 10.1093/nar/gkx475.
 Yamaguchi, L. 他(9名中5番目), Usp7-dependent histone H3 deubiquitylation regulates maintenance of DNA methylation. *Scientific Reports*, 査読有, 7 巻, 2017, 55.
 DOI: 10.1038/s41598-017-00136-5.
Ueda, J†*, Harada, A†., Urahama, T†., 他(24名中1番目, 共第1著者, 共責任著者), Testis-Specific Histone Variant H3t is Essential for Entry into Spermatogenesis. *Cell Reports*, 査読有, 18 巻, 2017, pp. 593-600. († co-first author, *co-correspondence) 日刊工業新聞, 毎日新聞, 産経新聞, 朝日新聞, 日経新聞, 東海テレビ, NHK に取り上げられました。
 DOI: 10.1016/j.celrep.2016.12.065.
 Sato, Y. 他(14名中8番目), A genetically encoded probe for live-cell imaging of H4K20 monomethylation. *Journal of Molecular Biology*, 査読有, 428 巻, 2016, pp. 3885-3902. Cover Article, 日経バイオテクに取り上げられました。
 DOI: 10.1016/j.jmb.2016.08.010.

[学会発表](計 23 件)

日野 千紘 他(4名中3番目), ラット体外受精卵を用いたエレクトロポレーションによるゲノム編集動物の作製, **第 52 回日本実験動物技術者協会総会**, 2018 年
 Mizukami, Y. 他(6名中5番目), Diversity of precursor lesions for pancreatic cancer: Genetics and biology of intraductal papillary mucinous neoplasm, **The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association**, 2018 年
 Fujii, M. 他(5名中3番目), A granular parakeratosis animal model created by topical aluminum showed characteristic keratinocyte differentiation abnormalities including abnormal profilaggrin processing and cornified cell envelop formation, **International Investigative Dermatology 2018**, 2018 年
 小穴 英廣 他(6名中4番目), マイクロ流路を用いた細胞の分化度と染色体構造安定性との相関のリアルタイム解析技術開発, **2017 年度生命科学系学会合同年次大会**, 2017 年
 池田 善貴 他(7名中3番目), 単一 ES 細胞の分化分裂過程におけるメチル化 DNA 動態の観察法の検討, **2017 年度生命科学系学会合同年次大会**, 2017 年
 上瀬 菜美 他(6名中6番目), メチローマウスを用いた腫瘍分類の画像解析, **2017 年度生命科学系学会合同年次大会**, 2017 年
 小川 剛汰 他(6名中5番目), マイクロ RNA 導入マウスに発症した拡張型心筋症における還元ストレスの解析, **2017 年度生命科学系学会合同年次大会**, 2017 年
 Oana, H. 他(5名中4番目), Direct Observation-based Analysis of Compaction Stability of Individual Chromosomes isolated from Single Mammalian Cells, **21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017)**, 2017 年
 清水 範彦 他(7名中5番目), 旭川医科大学動物施設における NOG マウス室設置, **第 51 回実験動物技術者協会総会**, 2017 年
 Tsukada, Y. 他(6名中5番目), Extraction of Cell Nuclei using CNN Features. **21st International Conference on Knowledge Based and Intelligent Information and Engineering Systems, KES2017**, 2017 年
Ueda, J., Testis-Specific Histone Variant H3t Gene is Essential for Entry into Spermatogenesis., **Society for the Study of Reproduction 2017 Annual Meeting**, 2017 年
 穂井田 謙介 他(7名中2番目), 単一 ES 細胞の分化分裂過程におけるメチル化 DNA 動態の定量的観察, **第 35 回日本受精着床学会総会・学術講演会**, 2017 年
 山縣 一夫 他(24名中2番目), 精巢特異的ヒストンバリエント H3t は精子幹細胞の精子形成過程への移行に必須である, **第 35 回日本受精着床学会総会・学術講演会**, 2017 年
 高橋 智博 他(5名中3番目), 1 細胞・染色体単離技術に基づいた細胞の分化度と染色体構造安定性との相関の解析, **化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 35 回研究会 (35th CHEMINAS)**, 2017 年

- 塚田 裕也 他(5名中4番目), CNN 特徴量を利用した明視野画像からの細胞核抽出, **第42回東海ファジィ研究会 in 日間賀島(ヒマ研2017)**, 2017年
- 仙波 雄一郎 他(11名中9番目), クロマチンリモデリング因子 Chd2 はマウス ES 細胞の分化能維持に必須である, **第39回日本分生生物学会年会**, 2016年
- 穂井田 謙介 他(7名中2番目), メチローム由来単一 ES 細胞におけるメチル化 DNA 動態の動的観察法の開発, **第39回日本分生生物学会年会**, 2016年
- Ho, J.C. 他(4名中2番目), Hypoxia Mediates Tumourigenesis via the H3K9 Epigenetic Regulators G9A and JMJD1A. **第14回がんとハイポキシア研究会**, 2016年
- Lee, K.L. 他(18名中3番目), Hypoxia Mediated Epigenetics and Their Function in the Cell Survival Response of Cancer Cells. **第14回がんとハイポキシア研究会**, 2016年
- Takahashi, T. 他(5名中4番目), Direct acquisition of genome-wide epigenetic information along intact chromatin fibers of individual chromosomes isolated from single mammalian cells. **The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences**, 2016年
- 21 Takahashi, T. 他(5名中4番目), Direct Observation of Epigenetic Modifications along Intact Chromatin Fibers of Individual Chromosomes Isolated from Single Cells in a Microfluidic Channel. **2016 International Conference on Solid State Devices and Materials**, 2016年
- 22 高橋 智博 他(5名中4番目), 動物細胞クロマチンファイバーに対する化学修飾および凝縮部の光マッピング, **化学とマイクロ・ナノシステム学会第34回研究会**, 2016年
- 23 Ueda, J. 他(18名中1番目), Testis-Specific Histone Variant H3t is Essential for Entry into Spermatogenesis. **Cold Spring Harbor Asia 'Chromatin, Epigenetics and Transcription'**, 2016年

〔図書〕(計5件)

小山 恭平 他(3名中2番目), 北隆館社, ヘテロクロマチンによる心筋細胞の分裂抑制, *Precision Medicine* 11月号, 2018

河端 秀賢 他(12名中9番目), アークメディア社, IPMN の分子基盤はどこまでわかったか, *肝胆膵* 11月号, 2018年, 77巻5号.

上田 潤 他(3名中1番目), ニューサイエンス社, ヒストンバリエントとがん~がん微小環境とエピゲノムを繋ぐもの~, *月刊 細胞* 5月号, 2018, 50(5), 52-56.

上田 潤 他(2名中1番目), 北隆館社, ヒストンバリエントとがん, 別冊「B10 Clinica」, 2017, 6(4), 153-157. (月刊「細胞」2017年7月号より転載)

上田 潤 他(2名中1番目), ニューサイエンス社, ヒストンバリエントとがん, *月刊 細胞* 7月号, 2017, 49(8), 30-34.

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/wiz/>

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。