

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18H02369

研究課題名（和文）精子残存ヒストンの機能と経世代効果の検討

研究課題名（英文）Investigating the function and transgenerational effects of sperm-retained histones

研究代表者

岡田 由紀（Okada, Yuki）

東京大学・定量生命科学研究所・教授

研究者番号：60546430

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,200,000円

研究成果の概要（和文）：精巣における切断型ヒストンH3の性状と、その経世代効果を明らかにすることを目的とした。精巣内生殖細胞には分化段階特異的に最低二種類の切断型H3が存在し、ひとつはN末端テイルAla21-Thr22で切断をうける事（csH3）、切断酵素はカテプシンLである事、csH3は精母細胞XY bodyに集積する事を見出した。この集積はDNA損傷応答下流で起こっていた。csH3を持たない精子の作製を試みたが、分化不全を起こし精子が得られなかった。しかしながら本研究によって、精子形成における切断型ヒストンの存在と発生時期、細胞内局在、切断酵素、切断の上流にあるシグナル経路に関する知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、哺乳類精子形成におけるAla21-Thr22切断型H3（csH3）の存在と、DNA損傷応答との関連、さらにはその責任酵素を同定した示した初めての例である。XY bodyにはDNA損傷応答因子に加えて様々なエピゲノム修飾が集積しており、その転写状態は複雑に制御されている。本研究成果は、ヒストンテイル切断によるエピゲノム制御がそこに関与する可能性を強く示唆しており、雄性生殖細胞分化におけるエピジェネティック制御機構にヒストン切断という新たな因子を加えるものである。さらに今後実験手技を改良することによって、切断型ヒストンの経世代効果にも迫れると期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to clarify the nature of cleaved histone H3, which is abundantly observed in testicular germ cells, and its transgenerational effects. We found that at least two types of cleaved histone H3s exist in the germ cell differentiation-dependent manner, and one of them was cleaved at the Ala21-Thr22 of the N-terminal tail (designated as csH3). The csH3 was cleaved by cathepsin L (CTSL) in the testis, and it accumulated in the XY body of the spermatocytes, which occurred downstream of the DNA damage response. To test its transgenerational effect by ICSI, we attempted to induce differentiation of spermatocytes without csH3 to spermatids but failed to obtain spermatids due to the impaired differentiation. This study has provided insight into the presence and ontogeny of cleaved histones in spermatogenesis, their subcellular localization, cleaving enzymes, and signaling pathways upstream of cleavage.

研究分野：生殖エピゲノム

キーワード：精子残存ヒストン 切断型ヒストン 精巣特異的ヒストン 性染色体不活化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) エピゲノムの経世代効果について

エピゲノム修飾は化学的に極めて安定であり、細胞分裂を越えて娘細胞に受け継がれることから「細胞記憶」とも称される。近年はそれが生殖細胞を介して次世代に継承されるとみられる現象が、マウス・ラットを含むモデル動物で多数報告されており、さらにヒトにおいても、両親の受けたストレスが配偶子のエピゲノム変化を介して子供の体質や性格に影響することが科学的に証明されつつある。このエピゲノム遺伝の本体(経世代物質)としては、現在のところ小分子 RNA、DNA メチル化、ヒストン(修飾・クロマチン構造)等が提唱されている。特にヒストンは小分子 RNA や DNA メチル化の生成に直接的・間接的に関与することから、エピゲノムの経世代効果における生殖細胞由来ヒストンの関与を量的・質的に明らかにすることは、当該研究分野における長年の本質的な問いとなっている。

(2) 切断型ヒストンとその機能について

ヒストンを介したクロマチンの構造変換に関わる分子機構として、4つの因子が知られている。一つ目は ATP 依存性クロマチンリモデリング因子、二つ目は共有結合によるヒストン修飾、三つ目はヒストンバリエーションによる置換、そして近年注目を集めているのが、四つ目となるヒストンのテイル切断である。ヒストンテイルの切断は酵母からマラリア原虫、哺乳類まで広く保存された現象であり、特に H3 の N 末端側のテイル切断の例が複数報告されている。ヒストンテイル切断は切断前のヒストンテイルに存在する複数のエピゲノム情報を一掃し得ることから、ヒストンバリエーション置換と同様に、細胞分化などよりダイナミックな細胞の機能変化に関与するものと考えられる。

2. 研究の目的

研究開始当時、研究代表者は精子残存ヒストン H3 が切断を受けていることを見出していた。ヒストン H3 の N 末端テイル部分は、細胞分化や DNA 傷害応答などの際に切断を受けることがいくつかの細胞種で報告されていたが、精子ではこの切断型 H3 が豊富に存在すること、さらに先行研究で報告されている他の細胞種の切断型 H3 とは、その切断部位が異なるという知見を得ていた。そこで本研究では、この精子特異的切断型 H3 の生成経路および精子形成における機能、さらには経世代効果に対する影響を明らかにし、精子残存ヒストンの重要性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 精巣生殖細胞の分画とウェスタンブロット解析

当研究室で樹立した、蛍光蛋白質 Venus と mCherry を精巣内生殖細胞で発現するトランスジェニックマウスを用いて、精巣生殖細胞をその分化段階に応じて分画・採取した(図1)。精子は精巣上体尾部より採取した。これらを SDS サンプルバッファーに懸濁し、ヒストン H3 の C 末端領域および Ala21-Thr22 切断型 H3 を特異的に認識する抗体を用いたウェスタンブロット解析に供した。

(2) 精巣切片の免疫染色

生後 2-4 カ月齢の雄マウス精巣を固定し、O.C.T.コンパウンドに包埋して凍結切片を作成し、各種抗体を用いた免疫染色に供した。

(3) 精巣組織培養とカテプシン L (CTSL) の阻害

生後 4 - 5 日齢の C57BL/6 マウスから精巣を採取し、6 - 8 分割して、アガロースゲル上で培養した。CTSL 阻害剤は培養開始後 10 μ M と 30 μ M で培地に添加した。培養は 5 週間継続し、終了後、精巣組織片を固定して O.C.T.コンパウンドに包埋、凍結させた。各精巣組織片は 5 μ m 厚の連続切片とし、免疫染色に供した。

(4) 精母細胞培養と ATR キナーゼの阻害

生後 20 日齢の C57BL/6 マウスから精巣を摘出し、適切な培地に懸濁した。そこに ATR 阻害剤を加え、細胞を 34 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下で 24 時間培養した。培養後に細胞を回収し、染色体スプレッド標本作製後、免疫染色に供した。

4. 研究成果

(1) 精子形成過程において分化ステージ特異的な切断型ヒストンが存在する

分画生殖細胞のウェスタンブロット解析を行い、精子形成における分化ステージ特異的な切断

ヒストンの有無を検討した。H3 の C 末端テイルを認識する H3-C 抗体では、総精巣抽出液において 3 本のバンドが確認された。最も分子量が大きい 15 kDa 付近のバンドが全長 H3、分子量の小さい 2 つのバンドが切断型ヒストンと考えられた。最も分子量が小さい切断型 H3 は減数分裂後の精子細胞と精巣上体精子でのみ認められた (図 1)。次に、H3 の N 末端側テイル Ala 21-Thr 22 で切断された H3 (csH3) を特異的に認識する市販抗体でウェスタンブロットを行った結果、csH3 は精母細胞と精巣上体精子でバンドが認められた (図 1)。csH3 は、H3-C 抗体で見られた最も分子量が小さいバンドよりも上に位置することから、H3-C 抗体の最小バンドは N 末端テイルが Thr22 以降で切断されたものと考えられた (図 1)。

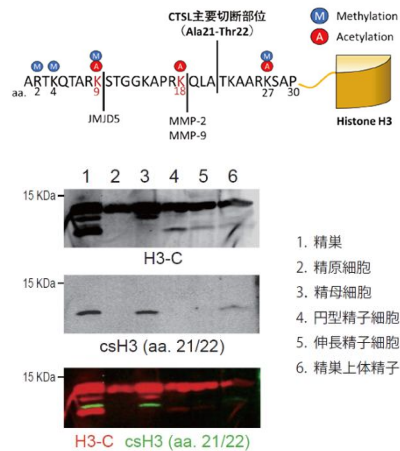


図 1. 精巣における切断型ヒストン H3 の検出。上) ヒストン H3 の N 末端テイルと切断部分の模式図。下) ウェスタンブロットによる切断型 H3 の検出。

(2) csH3 は精母細胞の XY body に集積する

経世代効果の観点から、一倍体精子細胞で認められた低分子量の切断型ヒストンに対してその切断部位を同定し、さらに特異抗体の作製を試みた。質量分析によって切断部位の同定に成功したが、特異抗体は 2 度におよぶトライにも関わらず、作製できなかった。そこで以降の解析は、市販抗体が利用可能な csH3 について実施した。次に csH3 の精母細胞核内局在を検討するために、精巣切片の免疫組織染色を行った結果、csH3 は精細管分化ステージ特異的に、減数分裂期精母細胞核の XY body に局在することを見出した。

(3) カテプシン L (CTSL) はセルトリ細胞質で発現し、精母細胞核に到達する

先行研究において、csH3 の責任切断酵素であることが報告されている CTSL は、精巣においては生殖細胞ではなく精細管内支持細胞 (セルトリ細胞) で発現・分泌されると報告されている。そこで次に、精巣内 CTSL の発現を免疫組織染色で確認すると共に、もし CTSL がセルトリ細胞で発現するのであれば、どのように精母細胞核内にアクセスするのかについて検討した。免疫染色の結果、CTSL は既報どおりセルトリ細胞の細胞質で発現していたが精細管ステージ特異性があり、CTSL が細胞質で発現する時期と csH3 が精母細胞の XY body に集積するステージは概ね一致していた。多重免疫染色による詳細な検討の結果、CTSL はわずかではあるが精母細胞核内にも認められ、中には csH3 と共局在する像も認められた。この結果から、セルトリ細胞由来の分泌 CTSL が精母細胞核で H3 の切断に関与する可能性が示唆された。

(4) csH3 の XY body への集積は CTSL 阻害剤処理で減弱する

CTSL 阻害剤を加えて約 5 週間培養した精巣組織から切片を作製し、免疫染色を行った結果、CTSL 阻害剤処理は csH3 の XY body への集積を有意に減少させることが明らかとなった (図 2)。一方で、CTSL 阻害剤処理は DNA 損傷マーカーである γ H2AX の XY body への集積には、大きな影響を与えなかった。

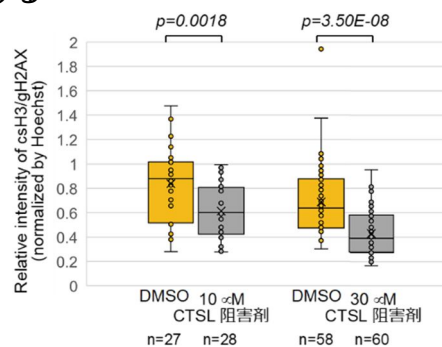


図 2. 免疫染色による XY body への csH3 集積の定量結果。黄色は DMSO 添加群、グレーは CTSL 阻害剤添加群 (10 μ M と 30 μ M) である。

(5) csH3 は DNA 損傷修復応答経路の下流で XY body に集積する

上記の結果より、csH3 の XY body への集積は DNA 損傷応答とは無関係か、その下流にあることが示唆された。そこで後者の可能性について、この時期の DNA 損傷応答経路の最上流に位置する ATR の阻害剤で精母細胞を処理し、csH3 の XY body への集積が変化するか否かを評価した。その結果、阻害剤処理によって、XY body 上への γ H2AX の集積のみならず、csH3 の集積も顕著に抑制されたことから、csH3 は DNA 損傷修復応答経路の下流で XY body に集積すると考えられた (図 3)。

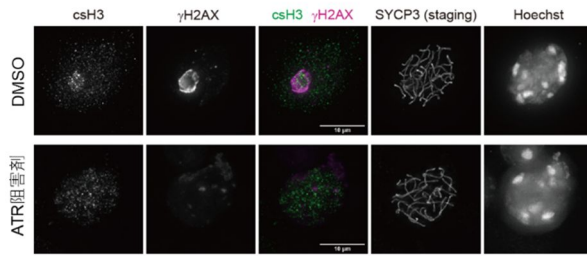


図3. ATR 阻害が csH3 の XY body への集積に及ぼす影響の検討。γH2AX は XY body のマーカーおよび DNA 損傷マーカーとして、SYCP3 は精母細胞のステージング目的で用いた。

(6) csH3 阻害精子の経世代効果の検討

上記の CTSL 阻害剤を加えて約 5 週間培養した精巣組織から精子細胞を採取し、顕微授精を行うことで csH3 の経世代効果の検討を試みた。しかし阻害剤存在下では減数分裂を越えて分化する細胞が著減しており、さらに csH3 生成以外への阻害剤の影響が懸念されたことから、顕微授精を断念した。また既報の先行研究と照会することで経世代効果考察の一助とするために、csH3 の ChIP-seq (CUT&Tag) も試みたが、抗体の品質の問題からか、未だ安定した結果が得られていない。

以上、本研究では精子形成における切断型ヒストンの存在とその発生時期、細胞内局在、切断酵素、さらには切断の上流にあるシグナル経路などの新規の知見を得ることができた。精母細胞の XY body は、これまで性染色体の不活化に関与するという考え方が主流であったが、ここ数年は減数分裂期性染色体のクロマチン開放構造や転写活性化なども報告されている。csH3 は N 末端側 21 アミノ酸を欠くために H3K4 メチル化修飾や H3K9 メチル化修飾が入ることはなく、従ってこれらのメチル化修飾除去を介したクロマチン構造変化や転写調節に寄与する可能性が考えられる。今後 csH3 の ChIP-seq (CUT&Tag) を実現することで、この答えを出していきたい。一方で、当初の目的であった経世代効果には、技術的な問題が解決できず、具体的な成果を得ることができなかったが、2023 年 5 月現在、精子残存ヒストンに関する過去の知見に懐疑的な報告がなされているため、ここで一旦成果をまとめることとした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岸本 かの子、牧野 吉倫、根岸 瑠美、岡田 由紀
2. 発表標題 精子におけるN末端テイル切断型ヒストンH3の切断部位とそのゲノム局在の同定
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------