

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06189

研究課題名(和文) CMS画分を用いたATF7による精子エピゲノムの分子的制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of ATF7-induced epigenetic change in mature sperm fraction

研究代表者

吉田 圭介 (YOSHIDA, KEISUKE)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80587452

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)：疫学的・実験的解析から、親の受けたストレスがDNA配列変化を伴わず、子孫の表現型に影響することが知られている。しかし、その具体的なメカニズムは明らかになっていない。本研究では、「父親の受けたストレスによって精子細胞のエピゲノム状態が変化し、これが次世代へと継承されることで表現型に影響するのではないか」を作業仮説とし、これを検証することを目的とした。まず、精子細胞のエピゲノム状態を解析するために、成熟精子のみを精製し、信頼性の高い精子ヒストン結合領域の解析法を確立した。この手法を用いて、栄養学的ストレス及び精神的ストレスによって、精巣・精子細胞のヒストン修飾状態が変化することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

親の受けたストレスがDNA配列変化を伴わず、次世代の表現型に影響する現象の分子メカニズムを明らかにすることは、進化学の理論構築に貢献するだけでなく、疾患表現型の解明においても重要ではないかと考えられる。こうした遺伝現象の分子メカニズムの研究をさらに進めることによって、子供の疾患のリスク因子(栄養学的・免疫学的ストレスなど)を同定することができる。出産前のカップルが積極的にこうしたリスク因子を避けることによって、健康な新生児を出産できる確率が上がることが期待され、これは特に少子化の進んでいる本邦において重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Epidemiological and experimental studies show that parental stress can affect offspring phenotype without alteration of DNA sequence. However the molecular mechanism of this phenomenon is not clear. In this study, we tried to verify whether paternal stress affects offspring phenotype via epigenetic change in spermatozoa. To achieve this aim, at first, we established reliable and novel method to identify binding sites of residual histone in sperm. Using this method, we reveal that stress-induced epigenetic changes in testicular and sperm cells are crucial role in inheritance of inheritance of paternal environmental stress.

研究分野：精子エピゲノム

キーワード：精子エピゲノム エピジェネティクス 環境ストレス 継世代効果

## 1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は、親の細胞が有する遺伝情報を次世代へと正確に継承するための重要な役割を担っている。生殖細胞の分化・形成過程の異常は、親の不妊、発生段階の障害や重篤な遺伝病を子孫に引き起こす。その一方で、分化・形成過程に異常のない生殖細胞であっても、親の環境ストレスが生殖細胞に影響を及ぼし、子孫の表現型を変化させる興味深い現象が知られている。その具体的な分子メカニズムは明らかになっていないが、父親の受けたストレスの場合、精子におけるエピジェネティック修飾や小分子 RNA の変化が関係しているのではないかと考えられていた。

## 2. 研究の目的

本課題では、「父親の環境ストレスによって精子エピゲノムが変化し、これが次世代個体の体細胞のエピゲノム、トランスクリプトーム変化を介して次世代の表現型に影響を及ぼすのではないか」を作業仮説として、この検証を進めた。

## 3. 研究の方法

### [1] 精子エピゲノム解析法の確立

精巣細胞から精子細胞への分化に伴い、DNA 上のヒストンは強塩基性タンパク質であるプロタミンに置換され、DNA 全体の 1% 前後のみヒストンが残存することが知られている。上述した通り、こうした精子細胞の残存ヒストン及びその化学修飾状態(メチル化・アセチル化など)が父親ストレスの次世代への遺伝現象に関与する可能性が示唆されていた。いくつかのグループから「精子 DNA 上のヒストン結合部位のマッピング結果」の報告があるものの、各グループで結果が異なっており、信頼性に欠けていた。そこでまず、信頼できる精子ヒストン結合部位の解析手法の確立に着手した。

### [2] 環境ストレス時の精子エピゲノム変化の解析

過去の報告から、父親マウスを低タンパク食で飼育後に交配させると、通常食飼育と比較して、次世代の子供マウスの肝臓での遺伝子発現プロファイルが変動することが知られている(Carone BR et al., *Cell*, 2010)。同様のマウス飼育を行った結果、父親の低タンパク食飼育によって、子供マウスの肝臓において 421 遺伝子の発現が上昇し、101 遺伝子の発現が減少した。我々は以前の解析から、ストレス応答的にエピゲノム状態を制御する転写因子 ATF7 が父親ストレスの次世代の遺伝現象に関与することを観察している(Seong KH et al., *Cell*, 2011)。そこで、ATF7 が父親低タンパク食の次世代遺伝現象の制御に関係しているのか調べるため、ATF7 ヘテロ変異マウスを父親マウスとして低タンパク食飼育の実験を行った。

## 4. 研究成果

### [1] 精子エピゲノム解析法の確立(論文 1 参照)

従来解析では、解析する成熟精子を精製する手法として、「成熟精子が貯蔵される精巣上体尾部を培養液中で培養し、上清に誘導される精子細胞を成熟精子画分として実験に供する」という”swim-up 法”と呼ばれる手法が一般的であった。この手法で回収される画分が実際に成熟精子なのかどうか、SCSA 法(精子核のヌクレオソーム DNA をアクリジンオレンジで蛍光染色し、FACS 解析を行う)で成熟精子の純度を詳細に定量解析した結果、10% 前後の未成熟精子が混入してしまうことが分かった。こうした未成熟精子は成熟精子と比較して多量のヒストンを含むため、成熟精子のヒストン解析には swim-up 画分は不適だと考えられた。そこで、未成熟精子を除去し純度の高い成熟精子の画分法の確立を目指した。いくつかの手法で検討した結果、mild sonication と percoll 遠心を組み合わせることで、精巣上体尾部由来の精子から 99% 以上の純度で成熟精子を分離することができる手法を確

立し、この画分を HRCS(Histone Replacement-Completed Spermatozoa)と命名した。

実際に HRCS におけるヒストン結合部位を ChIP-Seq 法で解析した結果、精子ヒストン結合部位は分化発生に関係する遺伝子のプロモーター領域に局在していた。また、こうした遺伝子群は 2 細胞期-ICM において転写活性が抑制され、ヘテロクロマチンが形成されやすい傾向にあることから、精子ヒストンは受精後の初期胚において、転写抑制に参与している可能性が示唆された。

## [2] 環境ストレス時の精子エピゲノム変化の解析 (論文 2,3 参照)

父親マウスの低タンパク食飼育モデルを用いて、ATF7 による父親ストレス遺伝のメカニズムの検証を行った。ATF7 ヘテロ変異マウスを父親マウスとして、次世代個体の肝臓での遺伝子発現を調べると、変動遺伝子が観察されなかった。このことは、父親低タンパク食ストレスの次世代遺伝現象は、ATF7 によって制御されていることを示している。一連の解析を進めた結果、低タンパク食ストレスによって精巣細胞の ATF7 がリン酸化、活性化することによって染色体上から遊離し、転写抑制に寄与する H3K9me2 レベルが減少すること、こうして生じた H3K9me2 レベルの減少が成熟精子細胞まで維持されることを見出した。これらの結果から、栄養学的ストレスによって生じたエピゲノム変化が精巣細胞・精子細胞で誘導され、これが次世代の胎児細胞へと継承されることで、非ゲノム的な遺伝現象が生じることが考えられた。

また JAXA との共同研究から、宇宙ステーション滞在時に受けるストレスによる次世代への影響を調べるため、マウスをモデル生物として解析した。国際宇宙ステーション「きぼう」の実験区画において 35 日間飼育し、地上に帰還したマウスから精巣細胞・精子細胞を回収し解析した。すると、宇宙滞在したマウスの精巣細胞では、ChIP-seq で検出される ATF7 の結合量が減少していた。また、精子細胞においてもメチル化ヒストンの結合量・小分子 RNA の発現変化が観察された。次に、この精子をもちいて次世代マウス個体を作成し、肝臓での遺伝子発現を調べると、宇宙滞在経験のある父親マウスの次世代では、MCM サブユニットをはじめとする DNA 複製複合体に関連する遺伝子群の発現量が有意に上昇していた(FDR<0.05)。また、次世代個体の組織で遺伝子発現量が上昇する遺伝子は、父親の精巣細胞で ATF7 結合が宇宙滞在によって減少している傾向にあった。これらの結果から、宇宙滞在に関係する何らかのストレス(宇宙打ち上げ時の精神ストレスなど)によって精巣での ATF7 が活性化し、これによって直接誘導されるエピゲノム変化が、次世代組織の転写を亢進させている可能性が示唆された。

### <発表論文>

(1) Mapping of histone-binding sites in histone replacement-completed spermatozoa.

Yoshida K, Muratani M, Araki H, Miura F, Suzuki T, Dohmae N, Katou Y, Shirahige K, Ito T, Ishii S,. *Nature Communications* 9(1) 2018 年

(2) ATF7-Dependent Epigenetic Changes Are Required for the Intergenerational Effect of a Paternal Low-Protein Diet.

Yoshida K, Maekawa T, Ly NH, Fujita SI, Muratani M, Ando M, Katou Y, Araki H, Miura F, Shirahige K, Okada M, Ito T, Chatton B, Ishii S,. *Molecular Cell* 2020 年

(3) Intergenerational effect of short-term spaceflight in mice.

Keisuke Yoshida, Shin-Ichiro Fujita, Ayako Isotani, Takashi Kudo, Satoru Takahashi, Masahito Ikawa, Dai Shiba, Masaki Shirakawa, Masafumi Muratani, Shunsuke Ishii,. *iScience* 24(7) 2021 年

## 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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshida Keisuke, Fujita Shin-ichiro, Isotani Ayako, Kudo Takashi, Takahashi Satoru, Ikawa Masahito, Shiba Dai, Shirakawa Masaki, Muratani Masafumi, Ishii Shunsuke	4. 巻 24
2. 論文標題 Intergenerational effect of short-term spaceflight in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102773 ~ 102773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102773	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 Yoshida Keisuke, Maekawa Toshio, Ly Nhung Hong, Fujita Shin-ichiro, Muratani Masafumi, Ando Minami, Katou Yuki, Araki Hiromitsu, Miura Fumihito, Shirahige Katsuhiko, Okada Mariko, Ito Takashi, Chatton Bruno, Ishii Shunsuke	4. 巻 78
2. 論文標題 ATF7-Dependent Epigenetic Changes Are Required for the Intergenerational Effect of a Paternal Low-Protein Diet	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 445 ~ 458.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2020.02.028	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 該当する

1. 著者名 Yoshida Keisuke, Muratani Masafumi, Araki Hiromitsu, Miura Fumihito, Suzuki Takehiro, Dohmae Naoshi, Katou Yuki, Shirahige Katsuhiko, Ito Takashi, Ishii Shunsuke	4. 巻 9
2. 論文標題 Mapping of histone-binding sites in histone replacement-completed spermatozoa	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-06243-9	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5件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田圭介
2. 発表標題 環境ストレスによる精子エピゲノム変化を介した遺伝
3. 学会等名 環境エピゲノミクス研究会 主催 第一回ネットシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田圭介, 石井俊輔
2. 発表標題 父親の環境ストレスによる精子エピゲノム変化と継世代遺伝
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keisuke Yoshida
2. 発表標題 Maintenance and inheritance of chromatin structure altered by environmental stress via epigenetic change
3. 学会等名 9th Symposium of the Smart-Aging Research Center (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田圭介
2. 発表標題 父親マウスの低タンパク食の影響の遺伝は、ATF7に依存する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会0039-2359
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 圭介、村谷 匡史、三浦 史仁、荒木 啓充、白髭 克彦、伊藤 隆司、石井 俊輔
2. 発表標題 単一成熟精子画分を用いた 残存ヒストン結合領域の同定
3. 学会等名 第12回エピジェネティクス研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 吉田圭介、石井俊輔	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 8
3. 書名 「父親の環境ストレスの遺伝」 実験医学4月号 特集「世代を超えるエピゲノム」	

1. 著者名 吉田圭介、成耆茲、石井俊輔	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 7
3. 書名 「エピゲノム変化の世代を超えた遺伝」医学のあゆみ 272巻1号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

父親の食事が子供の代謝に影響するメカニズムを解明 <a href="https://www.riken.jp/press/2020/20200320_1/index.html">https://www.riken.jp/press/2020/20200320_1/index.html</a>
---

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