

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21360

研究課題名（和文）精子核クロマチン高度凝縮に関わるプロタミンは、エピゲノム情報の担い手となるのか？

研究課題名（英文）Are protamines involved in higher condensation of sperm nuclear chromatin responsible for epigenomic information?

研究代表者

谷本 啓司（Tanimoto, Keiji）

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：90261776

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：親（配偶子）から子に継承される、DNA以外の遺伝情報の新規の担い手として、精子クロマチンに豊富に存在し、アルギニン残基を多く含むプロタミンを想定し、その化学修飾がエピゲノム情報として機能する可能性や、受精後の初期発生における役割について探究した。その結果、*in vitro*ではアルギニンメチル化酵素（PRMT）による触媒が検出されたが、哺乳動物細胞では、その明確な証拠が認められなかった。そこで、PRMT1遺伝子を精子特異的に欠損させた結果、既報のように不妊とはならなかったが、体外受精後、ほぼ半数の胚で異常胚を生じた。これに、プロタミンのメチル化異常が関与するのかは、現時点では分からない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、親が曝された環境要因（栄養状態、精神的ストレス、化学物質等）が、次世代（疾患の罹患率など）に影響を与える例が、疫学調査やモデル動物を用いた実験から示されている。これは、配偶子に生じたエピジェネティックな変化が、次世代での遺伝子発現を変化させた結果であると考えられている。これまで、変化の主体はDNAメチル化やヒストンの化学修飾が考えられてきた。精子プロタミンの翻訳後修飾が遺伝情報担体として機能することが分かれば、親から子へ継承されるエピゲノム研究に新たな次元を与える重要な発見となる。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that protamine, which is abundant in sperm chromatin and contains many arginine residues, might be a novel (non-DNA) carrier of genetic information that is inherited from parents (gametes) to their children, and explored the possibility that its chemical modification functions as epigenome information and its role in early development after fertilization. While we found that protamine is methylated by protein arginine methyltransferase (PRMT) *in vitro*, we found no clear evidence of modification in mammalian cells. Therefore, we deleted the PRMT1 gene in a sperm-specific manner and found partial fertility, which differed from the findings previously reported. After IVF, however, almost half of the embryos seemed abnormal in shape. It's not clear whether the methylation defect of protamine is involved in this phenotype.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピゲノム 精子 プロタミン アルギニンメチル化 PRMT1

1. 研究開始当初の背景

親(配偶子)から子に継承される遺伝情報の最大の担い手は、ゲノム DNA の塩基配列である。しかし近年、DNA 以外の要素、つまりエピゲノムが生殖細胞を介して親から子へと継承されることが認識され「transgenerational epigenetic inheritance」の概念が生まれた。生殖細胞を介して継承される情報として最も有力なものは、クロマチンを形成するヒストンの化学修飾である。しかし、オスの生殖細胞である精子では、その成熟過程において、ゲノムをよりコンパクトにするために、ゲノム上のほとんどの領域において、ヒストンが塩基性小型タンパク質であるプロタミンに置き換わる。このため、ヒストン修飾が雄におけるエピゲノム情報の担い手になることはないと考えられていた。しかし、初期発生に関わる遺伝子等、一部ゲノム領域ではプロタミンへの置換が起きず、ヒストンが残存することが報告され、精子においてもヒストンがエピゲノム情報の担体となり得ることが示唆された。一方で、研究代表者はプロタミン自体が化学修飾を受けることで、エピゲノム情報の担体となる可能性を発想し、その可能性を探究することとした。

2. 研究の目的

本研究では、父親から子へと継承される遺伝情報の担い手として、未だ解析がなされていない、哺乳動物の精子ゲノムに豊富に結合するプロタミン・タンパク質の化学修飾を想定し、そのエピゲノム情報としての妥当性と次世代の正常発生や健康維持における役割について、生化学、分子細胞生物学、発生工学的手法を用いて解明することを目的とした。

3. 研究の方法

プロタミンは、塩基性アミノ酸であるアルギニン残基を数多く含み、DNA のリン酸基と強く相互作用する。同化学修飾は、ヒストンにおいてもエピゲノム情報の担体となっている。同修飾の付加は、アルギニンメチル化酵素(Protein Arginine Methyl-Transferase; PRMT)により触媒される。また、いくつかの PRMT (PRMT1、4、5、7) は、精子細胞中での発現が検出される。我々は予備実験として、大腸菌で過剰発現・精製した PRMT1 酵素とマウス・プロタミン (Prm1、および Prm2) および H³ 標識した S-アデノシルメチオニン (SAM) を用いて *in vitro* メチル化反応を試みた。その結果、両プロタミンともにメチル化が検出され、特に Prm2 で顕著であった。そこで、哺乳動物の精子・プロタミンにおけるアルギニンメチル化の有無と、その生物学的意義の解明について、マウスをモデルとして以下の方法による研究を計画した。

- (1) 内在タンパク質のメチル化の有無とメチル化部位の同定: マウス精子のプロタミンを精製し、修飾アルギニン残基を質量分析により特定する。また、そのメチル化アルギニン抗体を作製する。
- (2) メチル化酵素の同定: 現在までに知られる 11 種類のアルギニンメチル化酵素のうち、(1) の責任酵素を、*in vitro* メチル化アッセイにより明らかにする。
- (3) メチル化の機能検証: メチル化プロタミンの役割として、受精後すぐを開始するゲノムのリプログラミングや、その後の胚性遺伝子の活性化への関与の可能性が考えられる。そこで、(1) で作製したメチル化プロタミン抗体を用いた ChIP-sequencing 解析により、マウス精子におけるメチル化プロタミンのゲノム分布を明らかにする。
(2) で同定したメチル化酵素の精子特異的ノックアウトマウスを作製する。ノックアウトマウスを交配し、胚及び産仔が得られるかについて解析する。
- (4) 精子を採取し、ヌクレオプラスミンを処理することで、精子クロマチンからプロタミンタンパク質を遊離させて、回収する。同プロタミンタンパク質のアルギニンメチル化状態を、ウエスタンブロッティング、及び質量分析により解析し、野生型マウス由来プロタミンと比較する。また、受精直後の初期胚における、精子由来ゲノム DNA の能動的脱メチル化反応の変化について、免疫染色法と bisulfite sequencing 法により解析する。さらに、最初期(1細胞期)と、その後(2細胞期)に活性化される遺伝子発現の変化を、RNA-seq 法により解析する。

4. 研究成果

- (1) マウス・プロタミン分子が *in vitro* だけでなく、哺乳動物細胞内でもメチル化修飾を

受けるのかを確認するため、Prm 遺伝子 (*Prm1* と *Prm2*) を動物細胞発現用のベクターに移し替えてタグ配列を付加し、アルギニンメチル化酵素発現ベクターとともに、HEK293T 細胞で過剰発現させた。抗タグ抗体による免疫沈降の後、抗メチル化アルギニン抗体により Prm のメチル化状態を解析した。しかし、明確なメチル化修飾を示すバンドは認められず、他の実験結果と考え合わせて実験手技に問題があると判断した。そこで、(1) の改善を図る一方で、*in vivo* の方向からのアプローチを優先して進めることとした。

- (2) PRMT1 遺伝子の全身性破壊は致死となる。そこで、精子特異的ノックアウトマウスを得るために、マウス胎児期の始原生殖細胞で発現する TNAP (tissue-nonspecific alkaline phosphatase) 遺伝子の制御下に Cre 酵素を発現するマウスと、PRMT1 遺伝子が loxP 配列で挟まれた floxed-PRMT1 allele をもつマウスとを交配し、精子で PRMT1 が欠損されたマウスを作成することを計画した。ところが 2021 年、同遺伝子を Ngn3 遺伝子プロモーター制御下の Cre 酵素を用いて精子特異的に欠損すると、DNA ダメージの蓄積による減数分裂異常により不妊となることが報告された (International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22, 7951)。さらに 2023 年、別のグループから、3 種類のプロモーター (Ubc, Ddx4, Str8) を用いた同様の実験により、全ての例で不妊となることが報告され (Nucleic Acids Research, 2023, 51, 10428-50) その理由として、精子形成に関与する遺伝子のプロモーター領域やプライシング制御領域におけるヒストン修飾 (H4R3me2a) 異常の可能性が挙げられた。ただし、これらの報告では、PRMT1 変異のプロタミンの修飾や、初期発生に対する影響は解析されていなかったことから、引き続き計画を進めることにした。
- (3) 2023 年度、研究代表者も、PRMT1 の精子特異的欠損マウスの作出 (雄 2 匹) に成功し、直ちに妊性試験を開始した。その結果、メスの妊娠確認までに、通常より長く時間を要したものの、両マウスからともに、仔を得ることが出来、これは、明らかに既報とは異なる結果であった。そこで、精巣上体尾部より成熟精子を採取し、体外受精による妊性試験を実施したところ、活性化・運動性に大きな変化はなく、受精も正常に起こった。しかしながら翌日、受精卵を観察したところ、半分程度は異常胚となり、発生が停止していた。残りの通常胚は、そのまま *in vitro* で胚盤胞期胚まで発生を進めさせた。成熟精子と胚盤胞期胚より DNA を抽出し、PCR によりその遺伝子型を解析した結果、一部ではあるが、PRMT1 遺伝子の完全欠損が起こっていない精子・胚が存在することが分かった。これらの結果から推測すると、TNAP-Cre による組換え反応は、他のドライバーマウスによるそれと比べて効率が低い、あるいは、精子形成の遅い時期に起きており、この結果、PRMT1 が発現した一部精子が機能を保持し、受精に至ったことが考えられた。今後、TNAP-Cre 依存的に組換え反応が起こる時期を詳細に解析し、Ngn3、Ubc、Ddx4、Str8 のそれと比較することで、精子形成における PRMT1 の役割を理解するためのヒントが得られるかもしれない。また、成熟精子のプロタミンや残存ヒストンのエピゲノムを解析することで、その機能形成におけるアルギニンメチル化の役割の解明に繋がることを期待出来る。

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Matsuzaki Hitomi, Takahashi Takuya, Kuramochi Daichi, Hirakawa Katsuhiko, Tanimoto Keiji | 4. 巻 51 |
| 2. 論文標題 Five nucleotides found in RCTG motifs are essential for post-fertilization methylation imprinting of the H19 ICR in YAC transgenic mice | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Nucleic Acids Research | 6. 最初と最後の頁 7236 ~ 7253 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkad516 | 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 Matsuzaki Hitomi, Sugihara Shokichi, Tanimoto Keiji | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 The transgenic IG-DMR sequence of the mouse Dlk1-Dio3 domain acquired imprinted DNA methylation during the post-fertilization period | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Epigenetics & Chromatin | 6. 最初と最後の頁 na |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13072-023-00482-x | 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 Matsuzaki Hitomi, Miyajima Yu, Fukamizu Akiyoshi, Tanimoto Keiji | 4. 巻 4 |
| 2. 論文標題 Orientation of mouse H19 ICR affects imprinted H19 gene expression through promoter methylation-dependent and -independent mechanisms | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Communications Biology | 6. 最初と最後の頁 an 1410 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02939-9 | 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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 谷本 啓司、松崎 仁美 |
| 2. 発表標題 トランスジェニックマウスにおけるDlk1-Dio3遺伝子領域IG-DMRの刷り込みメチル化の検証 |
| 3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 谷本 啓司、松崎 仁美、高橋 拓也、倉持 大地、平川 勝彦 |
| 2. 発表標題 マウスH19- ICRの受精後刷り込みメチル化に関わるcis制御配列と候補trans因子の探索 |
| 3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 木村美南、松崎 仁美、谷本 啓司 |
| 2. 発表標題 H19- ICR受精後刷り込みメチル化における候補トランス因子の関与の in vivo 検証 |
| 3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 松崎 仁美、谷本 啓司 |
| 2. 発表標題 Igf2/H19遺伝子座におけるゲノム刷り込み維持機構としてのH19- ICR受精後アレル特異的DNAメチル化 |
| 3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 杉原 翔吉、松崎 仁美、谷本 啓司 |
| 2. 発表標題 トランスジェニックマウスにおけるラットH19- ICRのDMR形成能の検討 |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 松崎 仁美、宮嶋 優、谷本 啓司 |
| 2. 発表標題 マウスH19-ICR配列のin vivo反転によるインプリント遺伝子発現機構の解明 |
| 3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 松崎 仁美、平川勝彦、谷本 啓司 |
| 2. 発表標題 ヒトH19-ICR YACトランスジェニック・マウスを用いた受精後刷り込みメチル化活性の検証 |
| 3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| 筑波大学生命環境系 谷本研究室 https://sites.google.com/view/tanimoto-lab |
|--|

| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|