

邪魔者をどかせると見えてきた、精子ヒストンの局在と規則性 ；新技術で精子ヒストンマップを作成

発表者：

山口 幸佑（東京大学大学院総合文化研究科 博士課程3年）

岡田 由紀（東京大学定量生命科学研究所 病態発生制御研究分野 准教授）

雑誌名：「*Cell Reports*」

日本時間 6月27日（水）午前0時（米国東部夏時間：26日（火）午前11時）

発表のポイント：

- ◆精子クロマチンはプロタミンによって凝集しているため、従来の生化学的クロマチン調整方法では可溶化が困難でした。本研究ではプロタミンを除去する性質を持つヌクレオプラスミンを併用することによって、効率よい可溶化に成功し、バイアスの少ない精子クロマチンの解析を初めて可能にしました。
- ◆この可溶化精子クロマチンを用いて次世代シーケンシング解析を行い、精子ヒストンの局在を評価した結果、精子ヒストンのゲノム局在はその修飾に依存することを明らかにしました。
- ◆本研究成果は、精子を介した次世代へのエピゲノム遺伝現象の分子基盤解明に役立つ知見を提供すると期待されます。

発表概要：

哺乳動物における精子は、90%以上のヒストン（注1）がプロタミン（注2）に置き換わることによって核凝集が起こり、成熟精子となります。この成熟精子に含まれる僅かに残ったヒストンが、精子ゲノムのどこに存在するのかは、長年の議論的でした。その理由は、精子の高度に凝集したクロマチン（注3）に起因します。ヒストンがゲノムのどこに存在するかを調べるには、クロマチンを核から均一に溶出し解析を行う必要がありますが、精子クロマチンは非常に固いため、従来の手法では均一に溶出できず、精子ヒストン局在を正確に評価することが困難でした。

今回、東京大学定量生命科学研究所の山口幸佑 大学院生、岡田由紀 准教授の研究チームは、プロタミンを除去する性質を持つヌクレオプラスミン（注4）で精子を処理することによって精子クロマチンを均一に可溶化する手法を開発し、精子ヒストン局在をより正確に評価することを可能にしました。また、この手法を用いて局在解析を行った結果、精子ヒストンは受けた修飾（注5）の状況によって、特定のゲノム領域に規則的に局在することを明らかにしました。

近年、父親の生活環境や習慣が精子を介して子供に伝わる「エピゲノム（注6）遺伝」現象が大きな注目を集めていますが、本研究成果はそのメカニズムの解明にも役立つ知見を提供すると期待されます。

発表内容：

ヒトやマウスの細胞では、約 2m の長さに及ぶ DNA が、ヒストンと呼ばれるタンパク質に巻き付いて規則正しく折り畳まれることで、小さな核の中に収納されます。この DNA とタンパク質の複合体は一般にクロマチンと呼ばれます。精子では、このヒストンの 90%以上がさらにプロタミンと呼ばれる小型タンパク質に置換され、DNA がよりコンパクトに折り畳まれることにより、クロマチンは高度に凝集し、精子核は普通の細胞核の数分の 1 の大きさになります (図 1)。

このヒストン-プロタミン置換とクロマチンの凝集は、精子が受精能を獲得するために必須のステップですが、一方で僅かに残ったヒストンが、精子ゲノムのどこに存在するのか、それには何らかの機能があるのかについては、長年の議論的でした。2000 年代に次世代シーケンシング (注 7) という技術でヒストンの局在が網羅的に調べられるようになった結果、様々な種類の細胞で「ヒストンマップ」が次々と明らかにされ、この問題は解決したかに思われましたが、精子では依然として相反する諸説が複数の研究チームから発表されるなど、混沌とした状況が続いていました。

なぜ精子では他の細胞のように上手くいかないのか? その理由は、精子が持つ特殊なクロマチン構造に起因します。ヒストンがゲノムのどこに存在するかを調べるには、クロマチンを核から均一に溶出し、さらに適切な長さに細断してから次世代シーケンスなどの解析を行う必要があります。通常の細胞では、超音波破碎や酵素処理などでクロマチンを核から容易に抽出し、適切な大きさに細断して解析に用いることができます。しかし精子のクロマチンは、上述のようにプロタミンのせいで高度に凝集しており、超音波破碎や酵素処理に耐性を示すため、うまく溶出することができません。一方で溶出を促すために超音波破碎や酵素処理を過剰にすると、今度はクロマチンの一部が壊れてしまいます。この事実は、ヒストンとプロタミンが局所的に混在することで、多様かつ不均一なクロマチン構造を形成していることを示唆している一方、このような性質の精子クロマチンを、全体的に漏れなく溶出して実験に用いることは、従来の技術では困難でした (図 2)。

今回、東京大学定量生命科学研究所の山口幸佑大学院生、岡田由紀准教授の研究チームは、クロマチンからプロタミンを除去する性質を持つシャペロン (注 8) タンパク質「ヌクレオプラスミン」を用いることで、精子クロマチンの効率的かつ均一な可溶化に成功しました。試験管内で組み換えヌクレオプラスミン蛋白質と反応させた精子核は、その形を保持したまま数倍に膨張し、核内からはプロタミンと高度に凝集したクロマチンが消失していました。この膨張精子のクロマチンは普通の細胞のそれと同じように超音波で細断可能となったことから、次世代シーケンシング解析によって、ゲノム上に残存したヒストンの局在と相対量を調べました。その結果、ヒストンはゲノム全体にわたって散在し、相対的には非遺伝子領域に多く残る傾向があった一方、修飾を受けたヒストンはその修飾形態に応じて、特異的なゲノム領域に残存していることを明らかにしました (図 3)。この結果は、精子ヒストンがランダムにプロタミンに置き換わるのではなく、ヒストンの修飾に応じて特定の領域がプロタミン置換から保護されることを示唆しています。すなわち、精子における僅かな残存ヒストンは、プロタミン置換から偶然取り残された結果ではなく、何らかの生理学的意味合いを持つのかもかもしれません。

近年、母親の胎内での栄養状態や幼少期の栄養環境がエピゲノム変化を引き起こし、そのエピゲノム変化が子どもの成長後の危険因子になることが広く知られるようになりましたが、さ

らに最近、父親の栄養状態や年齢等が、精子を介して子孫の健康状態に影響を及ぼすことが報告されています。この現象には精子のエピゲノム変化が関与する可能性が考えられますが、上述のようにこれまでは精子ヒストンの正確な質的・量的評価が難しかったことから、この現象にヒストンが関与するかは厳密には調べられていません。従って本研究結果は、この精子を介したエピゲノム遺伝現象の分子基盤解明にも必要不可欠な知見を提供し、今後この研究分野の発展に大きく貢献すると期待されます。

発表雑誌：

雑誌名：*Cell Reports*

論文タイトル：Re-evaluating the localization of sperm-retained histones revealed the modification-dependent accumulation in specific genome regions

著者：Kosuke Yamaguchi, Masashi Hada, Yuko Fukuda, Erina Inoue, Yoshinori Makino, Yuki Katou, Katsuhiko Shirahige, and Yuki Okada* (*責任著者)

問い合わせ先：

東京大学 定量生命科学研究所 病態発生制御研究分野

准教授 岡田 由紀 (おかだ ゆき)

用語解説：

注1「ヒストン」

英語表記は histone。真核生物の核内 DNA と結合して、複合体を形成している塩基性のタンパク質。一般的に 5 種類のヒストン (H1、H2A、H2B、H3、H4) に分類される。

注2「プロタミン」

英語表記は protamine。精子核内に含まれている低分子強塩基性タンパク質で、DNA と強く結合し、プロタミン同士も非常に強く結合するため、DNA を精子核内にコンパクトにまとめる役割を果たす。

注3「クロマチン」

英語表記は chromatin。元々は特異的な染料によって染められる細胞核内の構成要素を示す用語として利用されていたが、現在では DNA とタンパク質から成る複合体を指す。細胞核内において、クロマチン構造の凝集度合いによって遺伝子発現が制御されている。

注4「ヌクレオプラスミン」

英語表記は nucleoplasmin。アフリカツメガエルの卵抽出液中より発見されたタンパク質で、受精後に精子核内に含まれるプロタミンを除去する性質を持つ。哺乳類においても同様の効果を持つことが証明されている。

注5「ヒストン修飾」

ヒストンはアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化など様々な修飾を受けた状態で核内に存在している。これらの修飾は、クロマチン構造を変化させ、遺伝子発現制御に関わっていると考えられている。

注 6 「エピゲノム」

英語表記は **epigenome**。ゲノム DNA 配列を変化させずに表現形や遺伝子発現量を変化させる仕組みの総称。代表的なものとして、DNA メチル化、ヒストン修飾、ノンコーディング RNA、核内高次構造が挙げられる。

注 7 「次世代シーケンシング」

英語表記は **next generation sequencing**。DNA 塩基配列 (A、G、T、C) を決定するシーケンシング反応を、数百万～数十億塩基同時並行して実行する技術のこと。サンプル調整の手法によって遺伝子発現、タンパク質結合部位、ノンコーディング RNA 発現、クロマチン構造等の様々な情報を得ることができる。

注 8 「シャペロン」

英語表記は **chaperone**。タンパク質が形成され、分解されるまでの様々な過程 (タンパク質の折り畳み、複合体形成、輸送、脱凝集等) において介添えするタンパク質の総称。原義は「社交界にデビューする際の介添人・付添人」。

添付資料：

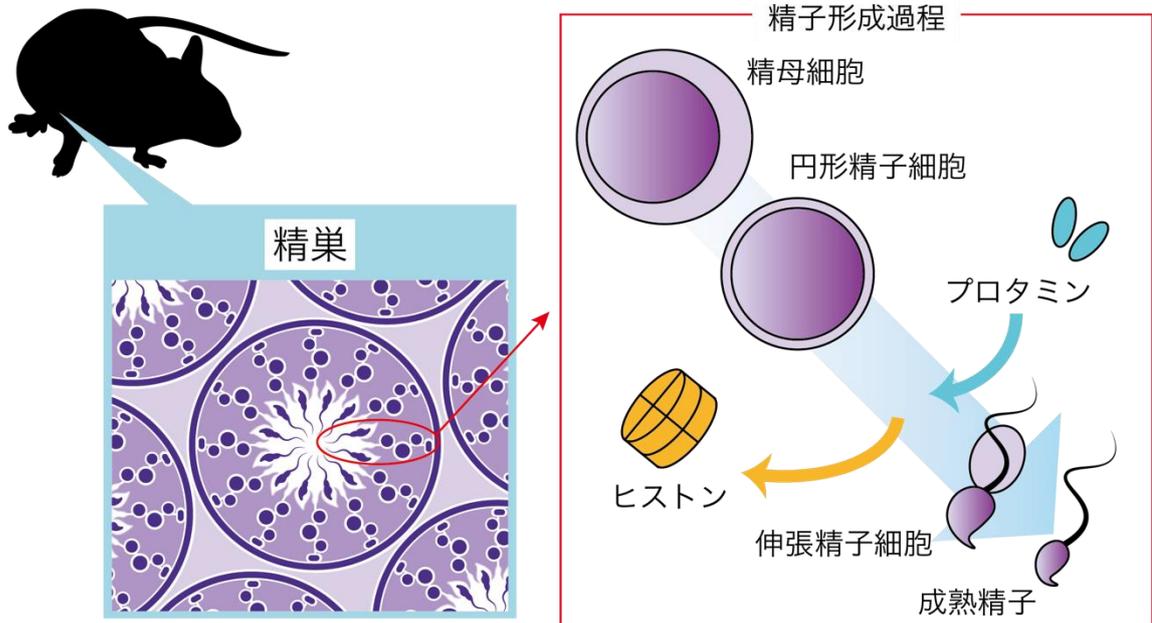


図 1：精子形成過程のイメージ図

哺乳動物の精子形成過程では、90%以上のヒストンがプロタミンに置き換わることによって、DNA がコンパクトに折り畳まれ、クロマチンが高度に凝集します。この過程を経ることによって、精子核は普通の細胞核の数分の 1 の大きさになります。

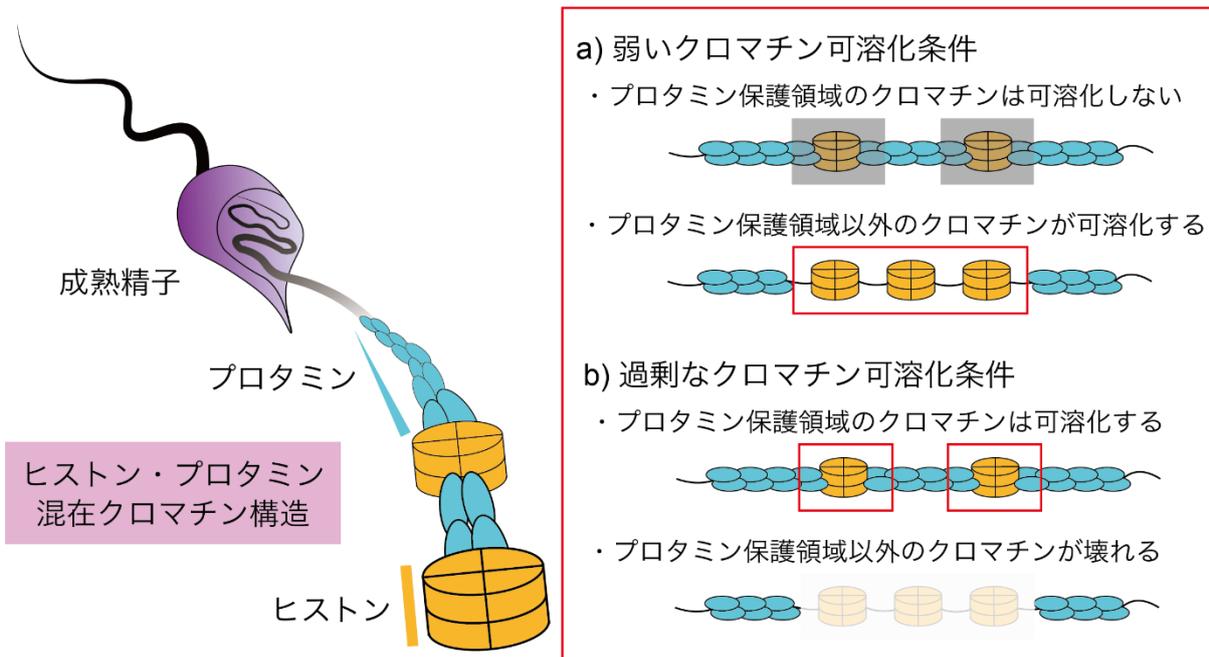


図 2：精子クロマチン可溶化の問題点

精子クロマチン構造は、ヒストンとプロタミンが混在した特殊な構造を取っています。また、精子クロマチン構造は均一な構造ではなく、プロタミンによって極度に凝集している領域と、プロタミンが疎な領域が混在していることが考えられています。このため、a) 弱いクロマチン可溶化条件では、プロタミン保護領域のクロマチンは可溶化せず、b) 過剰なクロマチン可溶化条件では、プロタミンが疎な領域のクロマチンが破壊されてしまうため、精子クロマチンを全体的に漏れなく可溶化し、実験に利用することは困難でした。

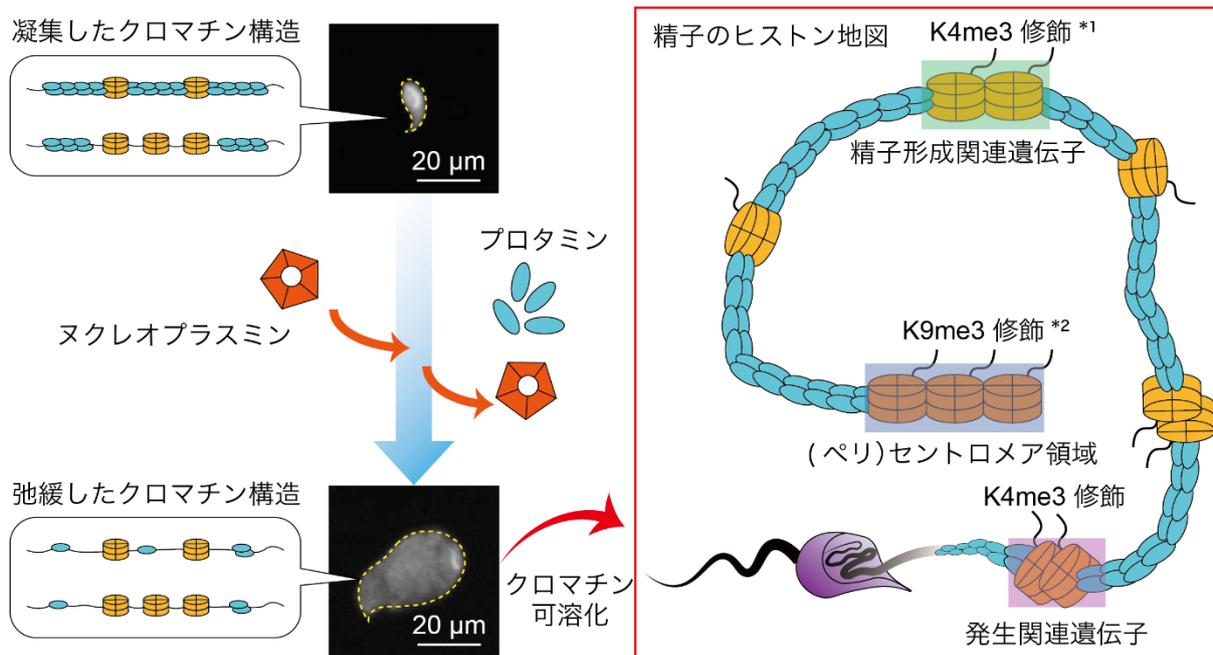


図 3 : ヌクレオプラスミンを用いた精子のヒストン地図の作成

写真は精子核の形状を示しており、黄色破線は精子核の縁を表しています。ヌクレオプラスミン処理前の精子核はプロタミンによって高度に凝集していますが、ヌクレオプラスミン処理を行うことによって、プロタミンが精子クロマチンから除去され、精子核が数倍に膨化することが観察されました。このヌクレオプラスミン処理精子を用いてクロマチンを均一に可溶化し、精子のヒストン地図の作成をしたところ、精子ヒストンはゲノム全体にわたって散在し、相対的には非遺伝子領域に多く残る傾向があった一方、修飾を受けた精子ヒストンはその修飾形態に応じて、特異的なゲノム領域に局在していることが明らかになりました。

*1. **K4me3 修飾** : 代表的なヒストン修飾のうちの一つ。ヒストン H3 の 4 番目のアミノ酸であるリジン (K) がトリメチル (me3) 化修飾を受けたもの。活性化遺伝子に集積する傾向がある。

*2. **K9me3 修飾** : 代表的なヒストン修飾のうちの一つ。ヒストン H3 の 9 番目のアミノ酸であるリジン (K) がトリメチル (me3) 化修飾を受けたもの。発現が抑制されている遺伝子に集積する傾向がある。