

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590269

研究課題名(和文)精子核クロマチンのダイナミクス

研究課題名(英文)Dynamics of sperm chromatin

研究代表者

村野 健作 (Murano, Kensaku)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：80535295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：精子形成の過程で、精子核は遺伝情報を次世代へと伝えるために特化した高度に凝集したクロマチン構造をとる。我々はアデノウイルスの感染サイクルと精子形成・受精過程の生物学的類似性に着目した。アデノウイルスクロマチンをリモデリングする活性を持つヒストンシャペロンTAF-1は精子核クロマチンを膨潤する活性を持つ。本研究の結果、TAF-1は細胞の分化にともなう細胞増殖に重要であり、またマウス個体の発生に必須であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Sperm chromosome forms highly condensed chromatin structure during spermatogenesis to send their information to next generation. We focus on a biological similarity between adenovirus infection cycle and spermatogenesis/fertilization. A histone chaperone, TAF-1, is not only able to remodel adenoviral chromatin structure, but also to make sperm chromatin decondensed in vitro. A series of experiments suggests that TAF-1 is involved in cell growth during differentiation and development through its histone chaperone activity.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヒストンシャペロン

1. 研究開始当初の背景

アデノウイルスは直鎖状 2 本鎖 DNA をゲノムにもつ、正 20 面体のウイルスである。ウイルスゲノム DNA はウイルス由来の塩基性コアタンパク質と複合体をとり、高度に凝集したクロマチン構造をとっている。真核細胞への感染により、ウイルスゲノム上の塩基性コアタンパク質は宿主のヒストンと置き換わり、転写複製反応が進行する (Komatsu T and Nagata K et al., *Nucleic Acids Res*, 2010)。増殖したウイルスゲノムは塩基性コアタンパク質と複合体をとり凝集し、粒子に包まれた後に細胞外へと放出される。

我々は真核細胞におけるクロマチン構造変換メカニズムを明らかにすることを目的とし、アデノウイルスクロマチンを真核細胞クロマチンのモデルと考え、アデノウイルスクロマチンを鋳型とした試験管内複製反応を指標に非感染 HeLa 細胞抽出液から Template Activating Factor (TAF)-I (Nagata K et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995) を同定してきた。TAF-I はウイルス由来の塩基性コアタンパク質と直接相互作用し、アデノウイルスクロマチンの構造変換を介して複製反応を促進する。また TAF-I は真核細胞のリンカーヒストン H1 とも相互作用し、ヌクレオソームへ受け渡す活性を持つことからリンカーヒストンシャペロンであることを示してきた (Kato K and Nagata K et al., *J Cell Sci*, 2011)。精子形成の過程では、減数分裂を経て、精子ゲノム DNA はヒストンからプロタミンなどの精子特異的塩基性タンパク質によって置換され、高度に凝集したクロマチン形態をとる。このクロマチン形態は遺伝情報を次世代へと受け継ぐために特化している。受精によってプロタミンは、卵子に含まれるヒストンと置き換わる。精子クロマチンは脱凝集し、転写および複製可能な状態へと構造が変換され、発

生が開始する。

2. 研究の目的

アデノウイルス塩基性コアタンパク質はアルギニン残基に富んだプロタミン様構造を持つ (Sung MT et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983)。一方、精子形成過程に発現するプロタミンを始めとする一連の塩基性タンパク質はリンカーヒストン H1 を元に進化を遂げてきたことが示唆されている (Lewis JD et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004)。また、リンカーヒストン H1 のシャペロンである TAF-I は、試験管内において精子核クロマチンの脱凝集活性を持つ (Matsumoto K and Nagata K et al., *Mol Cell Biol*, 1999)。以上の報告は、アデノウイルスの感染サイクルと精子形成・受精過程の生物学的類似性を示している。

精子核クロマチンの脱凝集機構はアフリカツメガエルを用いた試験管内系でよく研究されている。アフリカツメガエル卵抽出液から初めてのヒストンシャペロンとして同定されたヌクレオプラスミンは、精子核クロマチンの脱凝集活性を有する。しかし、ノックアウトマウスを用いた研究からヌクレオプラスミンのオルソログである NPM2 は精子核の脱凝集に関与しないことが明らかとなっており、ほ乳類の精子核脱凝集に関わる因子はわかっていない (Burns KH et al., *Science*, 2003)。ヌクレオプラスミンと同様に TAF-I もアフリカツメガエル精子核クロマチンを脱凝集する活性を有する。申請者らはアフリカツメガエル卵抽出液からヌクレオプラスミンを除去しても脱凝集活性は残り、この活性の本体は TAF-I であることを報告してきた (Matsumoto K and Nagata K et al. *Mol Cell Biol*, 1999)。本研究ではマウス初期胚発生の遺伝子発現における TAF-I の機能を明らかにし、ひいては精子核クロマチンの脱凝集過程における TAF-I の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *TAF-I* KO マウスの初期胚発生の観察

TAF-I KO マウスの作製と観察を通じて、発生過程において *TAF-I* が大きな役割を果たす組織(*TAF-I* 標的組織)を明らかにする。

(2) *TAF-I* KO マウスの遺伝子発現パターン

マウスの発生過程における *TAF-I* の遺伝子の組織特異的あるいは時期特異的な発現パターンを詳細に追うことにより、*TAF-I* の発生過程における機能にせまることができると考えている。

(3) 試験管内受精系を用いた受精直後の *TAF-I* の挙動観察

TAF-I KO マウスの初期胚発生において母性由来の *TAF-I* はいつ消失するかについて検討する。

(4) *TAF-I* の機能阻害をめざした抗体の作製

(5) *TAF-I* 遺伝子欠損培養細胞の構築

TAF-I KO Embryonic stem cell (ES 細胞) を構築する。細胞分化の進行過程や分化にともなう細胞増殖過程への *TAF-I* の影響を検討する。

4. 研究成果

(1) *TAF-I* KO マウスの初期胚発生の観察

胎生9.5日目の *TAF-I* KO マウスは野生型に比べて同じ程度に発生していたが、10.5日目以降は野生型と比べ明らかに発生が遅れる様子が観察された。最終的に12.5日以降は *TAF-I* KO マウスの生存は観察されなかった。胎生10.5の野生型の卵黄嚢は血液・血管の発生のため赤いが、*TAF-I* KO マウスの場合では非常に白いことから、血液・血管の発生が未熟であることが示唆された。そこで定量RT-PCR法により血液血管関連遺伝子の転写量を野生型と比較したところ、*TAF-I* KO マウスでは major- β -globin 遺伝子の発現量が顕著に減少していることが明らかとなった。また抗 PECAM1 抗体を用いた免疫染色法により血管の形成を検討したところ、*TAF-I* KO マウスで

は野生型に比較して卵黄嚢および胎子の血管が細く、未熟であることが観察された。以上の結果から *TAF-I* 遺伝子は血液・血管の発生分化に関わっていることが示唆された。

(2) *TAF-I* KO マウスの遺伝子発現パターン

血液・血管発生に関わる遺伝子の *TAF-I* による発現調節機構を解析するため、*TAF-I* KO マウスの遺伝子発現パターンの変化を9.5日目および10.5日目の胚を用いて野生型と比較した。野生型と *TAF-I* KO マウスの発生ステージは体節の数に着目して合わせた。遺伝子発現量の検出にはアフィメトリクス社のマイクロアレイ (GeneChip) を用いた。その結果、9.5日胚では野生型と *TAF-I* KO マウスで差はみられなかった。一方、10.5日胚では54遺伝子の発現に2倍以上の差が観察された。Gene Ontology による解析結果とNCBIデータベースのアノテーションをもとに分類したところ、10遺伝子が解糖系をはじめとするエネルギーコントロールに関わる遺伝子群に属し、また15遺伝子が低酸素応答および血液・血管形成にかかわる遺伝子群に属していた。低酸素応答はエネルギーコントロールと強く関連することから、合わせた25遺伝子の変動は同じ現象を表していると考えられる。これら遺伝子の発現量は予想と反し、*TAF-I* KO マウスにおいて高発現していた。以上の結果から *TAF-I* KO マウスで観察された血液・血管の異常は低酸素および低エネルギー状態を引きおこし、胚を死に至らせるものであると考えられる。

(3) 試験管内受精系を用いた受精直後の *TAF-I* の挙動観察

受精直後の初期胚発生における *TAF-I* の機能を解析するために試験管内受精により *TAF-I* KO 受精卵を得た。*TAF-I* KO マウスの初期胚発生において母性 *TAF-I* はいつ消失するかについて検討した。*TAF-I* ヘテロ欠損マウスの精子と卵子を用意し、体外受精を行った後、

免疫染色法により検出した。その結果、受精後48時間まで、TAF-Iの発現が消失した胚は観察されなかった。すなわちTAF-I KO卵子では母性TAF-Iが発現しており、受精後72時間(胚盤胞期)後には消失することが明らかとなった。細胞核が大きく変化する生命現象である受精や受精直後のTAF-Iの役割については検討できていないことがわかった。

(4) TAF-Iの機能阻害をめざした抗体の作製
TAF-I KO受精卵では母性由来のTAF-Iが含まれており4細胞期まで消失しないことが明らかとなった。そこで、マウス受精卵においてTAF-Iの機能阻害あるいは発現抑制をする実験系の立ち上げを試みた。受精卵の母性由来のTAF-Iの機能を阻害するためマウスTAF-Iに対する抗体を作製した。これまでに作製した抗体を未受精卵へのインジェクションを試みてきた。しかしながらニードルによる抗体のインジェクションが卵に対してストレスが大きいため、現在までに母性TAF-Iの機能について評価検討できていない。今後は、卵特異的にTAF-I遺伝子を欠損するコンディショナルノックアウトマウスの作製が必要であると考えている。

(5) TAF-I 遺伝子欠損培養細胞の構築

マウス個体解析を経て、さらに詳細な解析を進めるため、TAF-I 遺伝子を欠損した培養細胞の構築を試みた。試験管内受精により得られた TAF-I KO 受精卵を胚盤胞まで発生させ、内部細胞塊より TAF-I KO ES 細胞を構築した。TAF-I KO ES 細胞は細胞分化を誘導すると、野生型に比べ顕著に細胞増殖速度が低下した。またヒストンシャペロン活性を欠失した TAF-I 変異体の発現では、その細胞増殖速度の低下を回復することができなかった。以上の結果から、TAF-I はヒストンシャペロンとして発生分化過程の細胞増殖速度を維持し、正常な組織の形態お

よび機能の形成に関与すると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Mori K, Murano K, Ohniwa RL, Kawaguchi A, Nagata K. Oseltamivir expands quasispecies of influenza virus through cell-to-cell transmission. Sci Rep. 2015 March 16; Vol. 5, p9163. doi: 10.1038/srep09163
2. Murano K, Okuwaki M, Momose F, Kumakura M, Ueshima S, Newbold RF, Nagata K. Reconstitution of human rRNA gene transcription in mouse cells by complete SL1 complex. J Cell Sci. 2014 Aug 1; 127(Pt 15):3309-19. doi: 10.1242/jcs.146787.

[学会発表](計 12 件)

1. 村野健作、永田恭介. ヒト細胞内におけるマウス rRNA 遺伝子転写の再構成. 第 37 回日本分子生物学会年会 横浜: 2014.11.25-27
2. 関屋健史、村野健作、永田恭介. M 期における CTCF の DNA 結合領域. 第 37 回日本分子生物学会年会 横浜: 2014.11.25-27
3. 森幸太郎、川口敦史、村野健作、永田恭介. インフルエンザウイルス cell-to-cell 感染によるウイルスゲノムの多様化. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 横浜: 2014.11.10-11.12
4. 村野健作、永田恭介. ヒト細胞内におけるマウス rRNA 遺伝子転写の再構成. 新学術領域転写サイクル合同班会議 2014 山梨: 2014.8.4-6
5. Kensaku Murano, Mitsuru Okuwaki, and

- Kyosuke Nagata. Overcoming the species-specific barrier in the rRNA gene transcription by reconstitution of complete SL1 complex. 13th Asian Conference on Transcription Melbourne, Australia: 2014.2.19-2.21
6. 村野健作、永田恭介 rRNA 遺伝子の種特異的転写機構の解析、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日～12 月 6 日、神戸ポートアイランド（神戸）
 7. 関屋健史、村野健作、永田恭介、M 期リン酸化による CTCF の DNA 結合活性制御の解析、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日～12 月 6 日、神戸ポートアイランド（神戸）
 8. Kensaku Murano, Mitsuru Okuwaki, and Kyosuke Nagata, The Species-specific transcription mechanism of the rRNA gene revealed by a novel monitoring system using RNA-dependent RNA polymerase, 転写サイクル合同班会議 2013、2013 年 8 月 5 日～2013 年 8 月 7 日、ホテルおかだ（箱根）
 9. 村野 健作、RNA依存性RNAポリメラーゼを用いた新規レポーターシステムによるrRNA遺伝子の種特異的転写機構の解析、第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月11日
 10. 村野 健作、ヒストンH1シャペロン TAF-Iの同定とマウス胚発生における機能、生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク第5回公開シンポジウム、京都、2012年11月21日
 11. Murano K, The species-specific transcription mechanism of rRNA gene revealed by a novel monitoring system using RNA-dependent RNA polymerase, The 7th Tsukuba Medical Science Meeting, Tsukuba, 2012.11.1
 12. Murano K, The species-specific transcription

mechanism of rRNA gene revealed by a novel monitoring system using RNA-dependent RNA polymerase, The 12th Asian Conference on Transcription, Jeju Island, Republic of Korea, 2012.6.6-6.9

〔その他〕

受賞

Best poster award, Murano K: The species-specific transcription mechanism of rRNA gene revealed by a novel monitoring system using RNA-dependent RNA polymerase. The 12th Asian Conference on Transcription. Jeju island, Republic of Korea, June 2012,

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/infectionbiology/virology/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村野 健作（MURANO, KENSAKU）
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号：80535295

(2)連携研究者

永田 恭介（NAGATA, KYOSUKE）
筑波大学・学長
研究者番号：40180492