

戴鐳 論文内容の要旨

主論文

Aberrant levels of histone H3 acetylation induce spermatid anomaly in mouse testis
(マウス精巣に於いてヒストン H3 アセチル化レベルの変異が精子細胞異常を引き起こす)

戴鐳, 遠藤大輔, 穂山直太郎, 福田智美, 小路武彦

Histochemistry and Cell Biology, in press (2014)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員:小路武彦教授)

諸 言

哺乳類の精子形成は精祖細胞の体細胞分裂、精母細胞に於ける減数分裂及びそれに続く精子変態過程を経て完了する、厳密に制御された多段階から成る過程である。リジン残基のアセチル化を始めとするヒストンの翻訳後修飾は細胞分裂を経ても維持されるエピジェネティック因子として、クロマチンの構造や機能、遺伝子発現の制御に重要な役割を果たすことから、精子形成過程への関与が注目されている。我々の過去の研究により、マウスの精子形成過程に於いてヒストン H3 の 9 番目 (H3K9)、18 番目 (H3K18) 及び 23 番目 (H3K23) のリジン残基のアセチル化状態は分化段階依存的にダイナミックに変化しており、必須の役割を果たすことが示唆されていた。そこで、本研究では、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤である sodium phenylbutyrate (NaPB) の投与並びに *in vivo* electroporation 法を用いた shRNA 発現ベクターの導入によるヒストンアセチル化酵素 (HAT) のノックダウンによりヒストンのアセチル化レベルを変異させ、その精子形成に及ぼす影響を形態学的及び組織化学的手法により明らかにすることを目的とした。

対象と方法

NaPB 処理 (800 mg/kg) は、7~8 週齢の雄 ICR マウス (体重 30-35g) に対し腹腔内に単回行い、その後 3、6、12 及び 24 時間後に精巣を採取した。

In vivo electroporation 法では、18 日齢の雄 ICR マウス (体重 8-11g) を用いて右側精巣に HAT である steroid receptor coactivator 1 (SRC-1)、general control of amino acid synthesis 5 (GCN5) 及び elongator protein 3 (ELP3) に対する shRNA 発現ベクターを、左側精巣に陰性対照として LacZ に対する shRNA 発現ベクターを注入後、50 V、50 msec で 8 回通電し、導入 10 日後に精巣を採取した。

採取された精巣は、電子顕微鏡用の試料は 2% glutalaldehyde/4% paraformaldehyde/PBS (pH 7.4) により常温、16 時間浸漬固定し、エポン樹脂に包埋した。その他は 4% paraformaldehyde/PBS (pH 7.4) により常温、16 時間浸漬固定し、パラフィンに包埋した。

アセチル化ヒストン H3K9、H3K18 及び H3K23、5-メチルシトシン、SRC-1、GCN5、ELP3、DNA メチル基転移酵素 1 (Dnmt1)、Bax 及び Bcl-2 発現はそれぞれに対する特異的抗体を用いた免疫組織化学法により解析した。Bcl-2 以外については 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で 120 °C、15 分間熱処理し抗原賦活化を行った。細胞死は TUNEL 法により、CCGG 配列の DNA メチル化レベルは HELMET 法によって解析した。

結 果

NaPB 投与により円形精子細胞特異的にヒストン H3K9 及び H3K18 のアセチル化レベルの上昇が認められ、同時に凝集体の形成及びアポトーシス細胞数が増加していた。電顕観察では凝集体の一部に於いて細胞膜が融合し多核化した合胞体が観察された。これらの細胞に於いてはアポトーシス細胞の特徴である核膜周囲へのクロマチンの凝集が認められた。アポトーシス細胞に於いては Bax の発現が亢進しており、内在性経路による誘導であることが明らかとなった。また、ヒストン H3 アセチル化レベルの変化と共に DNA メチル化レベルの低下及び Dnmt1 の発現低下も認められた。

HAT に対するノックダウン実験では SRC-1 shRNA 発現ベクター導入精巣の円形精子細胞に於いてヒストン H3K9 のアセチル化レベル低下、形態異常及びアポトーシス細胞数の増加が認められた。一方で GCN5 及び ELP3 がノックダウンされた精子細胞に於いては同様の変化は観察されず、SRC-1 が特異的にヒストン H3K9 アセチル化の維持と精子変態過程の進行に重要な役割を果たすことが示唆された。

考 察

以上の結果、ヒストン H3 のアセチル化レベルの人為的变化は円形精子細胞の形態異常及びアポトーシスを誘導することが世界で初めて明らかとなった。NaPB 投与及び SRC-1 ノックダウン共に精子変態過程に於ける特定の分化段階にある円形精子細胞で影響が認められたことは、HDAC 及び HAT の活性のバランスによるヒストン H3 アセチル化レベルの調節がこの分化段階に於いて重要な役割を果たすことを示すものである。

更にヒストン H3 アセチル化レベルの変異が DNA メチル化レベルにも影響を及ぼすことが明らかとなり、複数のエピジェネティック因子が関連しながら精子変態過程の進行を制御する可能性が示唆された。このことはこれまで不明であったヒストン修飾と DNA メチル化の相関を生み出す分子機構の研究に精子形成過程が良いモデルとなることを示すものである。