

宋 寧 論文内容の要旨

主 論 文

Immunohistochemical analysis of histone H3 modifications in germ cells during
mouse spermatogenesis

(マウス精子形成過程に於けるヒストン H3 修飾に関する免疫組織化学的検討)

宋 寧, 劉 杰, 安 樹才, 西野 友哉, 菱川 善隆, 小路 武彦

Acta Histochemica et Cytochemica in Press, Vol. 44 (2011)

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

緒 言

ヒストンは、核内に於いて DNA ヒストン複合体として存在し、ヌクレオソームのコア部分を形成するとともに更なる DNA の折り畳みに関与するクロマチン構造の主体を成している。これらは H1、H2A、H2B、H3、H4 の 5 種類からなり、特にヒストン H3 は、特定のアミノ酸残基のアセチル化、メチル化、リン酸化等の種々の化学修飾により、遺伝子発現やクロマチン構造変化といった所謂エピジェネティクス制御において重要な役割を果たしており、個体の発生や組織、器官の維持に深く関与していることが知られている。

一方、哺乳類精子形成過程は、精祖細胞の体細胞分裂、精母細胞の減数分裂とそれに続く精子細胞の変態過程を経て完成精子となる、極めてユニークなプロセスを経るが、この分化過程においてもヒストン修飾が重要な役割を果たすことが知られている。例えば、ヒストン H3 の 9 番目のリジンを脱メチル化する酵素である demethyltransferase のノックアウトマウスでは、顕著な生殖細胞死誘導と精子変態過程の異常による精巣萎縮が引き起こされ不妊となる。しかしながら、精子形成過程全体でのヒストン H3 修飾の変化の詳細と生殖細胞の分化段階との関係についてはほとんど不明であった。

このため、本研究では、マウス精子形成過程でのヒストン H3 アセチル化、メチル化並びにリン酸化の生殖細胞の各分化段階での修飾動態の変化について特異抗体を用い免疫組織化学的に検討した。

対象と方法

ICR マウス (雄、7-8 週齢) の精巣を用いた。組織は 4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて固定後パラフィン包埋し、切片を作成した。ヒストン H3 化学修飾の検出には、修飾にかかわらずヒストン H3 を検出する抗体及びヒストン H3 の修飾部を特異的に検出する抗体として 9 番目のリジン、18 番目のリジン及び 23 番目のリジンそれぞれのアセチル化に対する抗体、4 番目のリジン、27 番目のリジンそれぞれのトリメチル化および 10 番目のセリンのリン酸化に対する抗体を用い、二次抗体としては HRP

-conjugated goat anti-rabbit IgG を用いて免疫組織化学にて検討した。

結 果

1) ヒストン H3 は核に存在し、ステップ 12 の spermatid までの各分化段階では抗ヒストン H3 抗体により同程度に染色されたが、ステップ 13 以降の spermatid では消失した。2) 精祖細胞では、アセチル化ヒストン H3K9、H3K18、H3K23 に対してすべて強陽性であった。一方、トリメチル化 H3K4 のシグナルは弱く、トリメチル化 H3K27 のシグナルは中程度であった。3) 精母細胞では、アセチル化 H3K9、アセチル化 H3K18、トリメチル化 H3K4 に対するシグナルはプレプロトン期よりパキテン期で減少したが、ジプロトン期ではアセチル化 H3K18、アセチル化 H3K23、トリメチル化 H3K4 に対するシグナルは顕著に増大した。H3K27 のトリメチル化状態には変化が見られなかった。4) 精子変態過程では、ステップ 1-8 の round spermatid においてはヒストン H3K18、H3K23 のアセチル化、H3K4 のトリメチル化は減数分裂期の精母細胞より低頻度であったが、ステップ 9-12 の elongated spermatid では H3K9、H3K18、H3K23 のアセチル化は促進されていた。5) ヒストン H3S10 は体細胞増殖を行う精祖細胞の分裂期と減数分裂増殖を行う精母細胞の分裂期で顕著なリン酸化が認められた。

考 察

一般的に体細胞ではヒストン H3 アセチル化と H3K4 トリメチル化は遺伝子の転写活性化に働いており、一方でヒストン H3K27 トリメチル化は転写を抑制している。ところが、体細胞分裂を行う精祖細胞では、体細胞の場合と同様に遺伝子発現を促進する修飾と抑制する修飾がともに観察された。これは分化多能性を持つマウス胚性幹細胞と同様の修飾パターンであり、精祖細胞の多能性に関係していると考えられた。

一方で精母細胞ではパキテン期に於いてヒストン H3K27 トリメチル化は維持されている一方で、ヒストン H3 アセチル化と H3K4 トリメチル化は減少していた。このことは、我々が現在行っている DNA メチル化レベルを細胞単位で検出する HELMET 法を用いた解析で、転写に抑制的に働く DNA メチル化レベルがこの時期に高いこととよく一致しており、このステージでの転写の不活性化にこれらの修飾が寄与していることが示唆された。

また、その後の精子変態過程に於ける核の凝集過程において DNA 結合蛋白はヒストンからプロタミンへ置換される。このためにステップ 13 に於いてヒストン H3 は核から失われるが、その直前にあたるステップ 9-12 に於いてヒストン H3K9 と H3K18 はステップ 1-8 までより高頻度でアセチル化されていた。同様に精子変態過程に於いて DNA のメチル化レベルは低下していた。これらの知見はクロマチンの再構成に於いてヒストン H3 のアセチル化および DNA のメチル化が重要な役割を果たしていることを示している。

以上の結果より、ヒストン H3 修飾と DNA のメチル化が、精子形成過程の様々な段階で特異的なパターンを示し、精祖細胞の多能性、精子形成過程でのクロマチンの変化におけるエピジェネティックな制御要因として関与していることが示唆された。