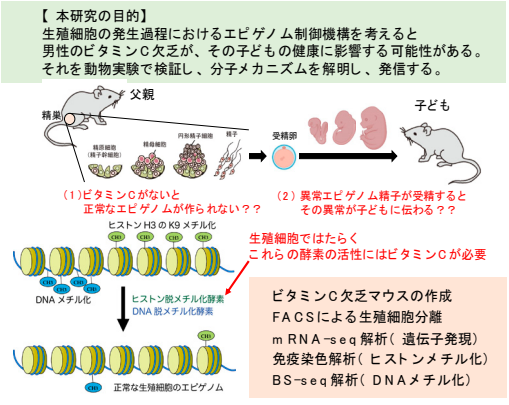
4　ビタミンC欠乏による精子エピゲノム異常とその遺伝性	一柳　健司

【目的】ビタミン C（アスコルビン酸）は霊長類では生合成することができない必須の栄養素で、ビタミン C が欠乏すると、疲労や筋肉低下に始まり、さらに長期間欠乏状態が続くと壊血病を引き起こし死亡する。このように、ビタミン C は本人の健康維持に必須であるが、ビタミン C 欠乏が次世代に影響を与える可能性はあまり意識されていない。本研究の目的は、父親のビタミン C 摂取が不足することにより、その後に生まれてくる子供に影響があるのかどうか、あるとすれば、どのような作用機構によるのかを理解することである。細胞における遺伝子発現はエピジェネティックな機構によって制御されており、その機構には DNA メチル化やヒストン・タンパク質のメチル化が関わることが知られている。これらの修飾は動的であり、メチル化酵素と脱メチル化酵素のバランスによって絶妙にコントロールされているが、脱メチル化酵素は活性にビタミン C を必要とする。培養細胞レベルではビタミン C の過剰投与によって脱メチル化反応が亢進し、欠乏させると脱メチル化反応が減弱する（結果的に DNA やヒストンのメチル化が増える）ことが知られている。オスの生殖細胞の発生過程でも多くの DNA 脱メチル化反応とヒストン脱メチル化反応が行われており、ビタミン C がないと正常なエピジェネック修飾（総体としてエピゲノムという）を持つ精子が形成されないと考えられる。そのような異常なエピゲノムを持つ精子から生まれた子供の発生が異常になる、あるいは、健康を維持できない可能性を明らかにすることは、エピゲノムの遺伝性という生命科学の観点からも、親世代の健康管理による子供世代の健康増進という公衆医療の観点からも重要である。

【方法】ヒトと異なり、マウスはビタミン C を合成する能力を持つので、ビタミン C 合成経路の酵素の一つをコードする SMP30 遺伝子をノックアウトしたマウス（SMP30-KO）を用いて、ビタミン C を含まない餌を与え、1.5 g/L のビタミン C を含む水あるいは含まない水を与えることでビタミン C 供与群と欠乏群のマウスを作成した。3 ヶ月間ビタミン C を欠乏させたのち、精巣から各ステージの生殖細胞を回収し、mRNA-seq、免疫染色、BS-seq を行った。

【結果】ビタミン C が欠乏しても顕微鏡像やフローサイトメトリーで見る限りは生殖細胞の発生に大きな影響を与えているようには見えなかった。しかし、トランスクリプトームにおいては、どの発生ステージでも数百の遺伝子の発現が変化しており、発現変動遺伝子のリストから、発生がやや遅れていることが示唆された。また、免疫染色の解析から、パキテン期精母細胞においてヒストン脱メチル化酵素によって H3K9me2 の修飾は、ビタミン C 欠乏群でも健常と同じく激減するが、円形精子細胞において H3K9me2 の低い状態が維持されていないことが明らかとなった。さらに精子 DNA を BS-seq で解析したところ、約 3,000 のゲノム領域で高メチル化がみられ、特に CpG アイランドで顕著であった。このことは、精子形成過程において Tet タンパク質群による DNA 脱メチル化反応が起きており、ビタミン C 欠乏によって、脱メチル化反応が不全になっていることが示唆される。今後、このような生殖細胞のエピゲノム異常が子供に伝わるかどうか、また表現型に影響を与えるかどうかについて、引き続き研究を進めていきたい。

研究の概略図：父親のビタミン C 欠乏による生殖細胞や次世代への影響を明らかにする



4. ビタミン C 欠乏による精子エピゲノム異常とその遺伝性

一柳　健司

名古屋大学 大学院生命農学研究科 動物科学専攻 ゲノム・エピゲノムダイナミクス研究室

Key words：ビタミン C，継世代エピゲノム遺伝，生殖細胞，DNA メチル化，ヒストンメチル化

緒　言

ビタミン C（アスコルビン酸）は霊長類では生合成することができない必須の栄養素で、ビタミン C が欠乏すると、疲労や筋肉低下に始まり、さらに長期間欠乏状態が続くと壊血病を引き起こし死亡する。このように、ビタミン C は本人の健康維持に必須であるが、ビタミン C 欠乏が次世代に影響を与える可能性はあまり意識されていない。本研究の目的は、父親のビタミン C 摂取が不足することにより、その後に生まれてくる子供に影響があるのかどうか、あるとすれば、どのような作用機構によるのかを理解することである。

細胞における遺伝子発現はエピジェネティックな機構によって制御されており、その機構には DNA メチル化やヒストン・タンパク質のメチル化が関わることが知られている。これらの修飾は動的であり、メチル化酵素と脱メチル化酵素のバランスによって絶妙にコントロールされているが、脱メチル化酵素は活性にビタミン C を必要とする。培養細胞レベルではビタミン C の過剰投与によって脱メチル化反応が亢進し、欠乏させると脱メチル化反応が減弱する（結果的に DNA やヒストンのメチル化が増える）ことが知られている。オスの生殖細胞の発生過程でも多くの DNA 脱メチル化反応とヒストン脱メチル化反応が行われており、ビタミン C がないと正常なエピジェネック修飾（総体としてエピゲノムという）を持つ精子が形成されないと考えられる。そのような異常なエピゲノムを持つ精子から生まれた子供の発生が異常になる、あるいは、健康を維持できない可能性を明らかにすることは、エピゲノムの遺伝性という生命科学の観点からも、親世代の健康管理による子供世代の健康増進という公衆医療の観点からも重要である。

方　法

1. ビタミン C モデルマウスの作成

ヒトと異なり、マウスはビタミン C を合成する能力を持つ。そこで、ビタミン C 合成経路の酵素の一つであるグルコノラクトナーゼをコードする *SMP30* 遺伝子をノックアウトしたマウス（SMP30-KO）［1］を用いて、ビタミン C を含まない餌（CL-2、日本クレア）を与え、1.5 g/L のビタミン C を含む水あるいは含まない水を与えることでビタミン C 供与群と欠乏群のマウスを作成した。生まれてから 2 ヶ月間（性成熟する頃）までビタミン C を与えた後、欠乏群では 3 ヶ月間、ビタミン C を欠乏させた。

2. 生殖細胞の回収

ビタミン C 欠乏 3 ヶ月間およびコントロール群のオスマウスから FACS を用いて生殖細胞の精製を行った。具体的には、精巣の細胞から CD9 抗体（anti-CD9-APC）で染色して未分化精原細胞（精原幹細胞）を、ヘキスト染色を用いてレプトテン期・ザイゴテン期（LZ）精母細胞とパキテン期・ディプロテン期（PD）精母細胞、および減数分裂終了後の円形精子細胞を回収した。方法は我々が確立した方法［2］に準じた。また、精巣上体尾部から精子を回収した。

3. トランスクリプトーム解析

回収した未分化精原細胞、LZ 精母細胞、PD 精母細胞から RNA を抽出し、NEBNext Ultra II Directional RNA library prep kit を用いて mRNA-seq ライブラリーを作製し、NovaSeq でシーケンシングを行った。得られたシーケンスデータについて TrimGalore でアダプター配列を除き、Tophat2 でマウスゲノム（mm10）にマッピングし、Cuffdiff を用いて発現量定量と比較を行った。

4. ヒストン修飾解析

LZ 精母細胞、PD 精母細胞、円形精子細胞を低張液で処理後、1% PFA で固定し、抗 SYCP3 抗体（ab15093）と抗 H3K9me2 抗体（ab1220）に反応させたのち、蛍光二次抗体で染色し、キーエンス蛍光顕微鏡 BZ-X800 で観察と定量を行った。

5. 全ゲノム DNA メチル化解析

回収した精子から DNA を精製し、文献 [3] の方法でバイサルファイト反応を行ったのち、Accel-NGS Methyl-Seq library preparation kit で BS-seq ライブラリーを作製し、NovaSeq でシーケンシングした。得られたシーケンスについて、TrimGalore でアダプターなど、余分な配列を取り除いた後、bismark でマウスゲノム（mm10）にマップし、ゲノムの中にある各 CpG サイトのメチル化状態を決定した。そのデータを入力データとして、Bisulfighter の ComMet を用いて DNA メチル化がコントロール群とビタミン C 欠乏群の間で異なる領域（DMR）を同定した。さらに独自のスクリプトを用いて、DMR の絞り込みを行った。

結果および考察

1. ビタミン C 欠乏によって雄性生殖細胞のトランスクリプトームが変化した

免疫染色やフローサイトメトリーの結果、ビタミン C が欠乏しても生殖細胞の発生過程自体が停止することはなく、精巣内の各発生ステージの細胞数も大きな変化はないことが分かった。精巣内の生殖細胞を FACS で発生ステージごとに分けて分取し、トランスクリプトームを決定した。その結果、遺伝子発現に関しては各ステージで 250～700 個の遺伝子の発現が 2 倍以上変化していることが分かった（図 1）。発現変動している遺伝子には生殖細胞の発生に関わる遺伝子が多く見られ、見かけ上は正常に発生しているように見えるものの、細胞内部の環境が撹乱されていることが分かった。特に、ビタミン C 欠乏によって LZ で発現低下していた遺伝子が PD で発現上昇しており、トランスクリプトーム的にはやや発生進行が遅れている可能性が考えられた。

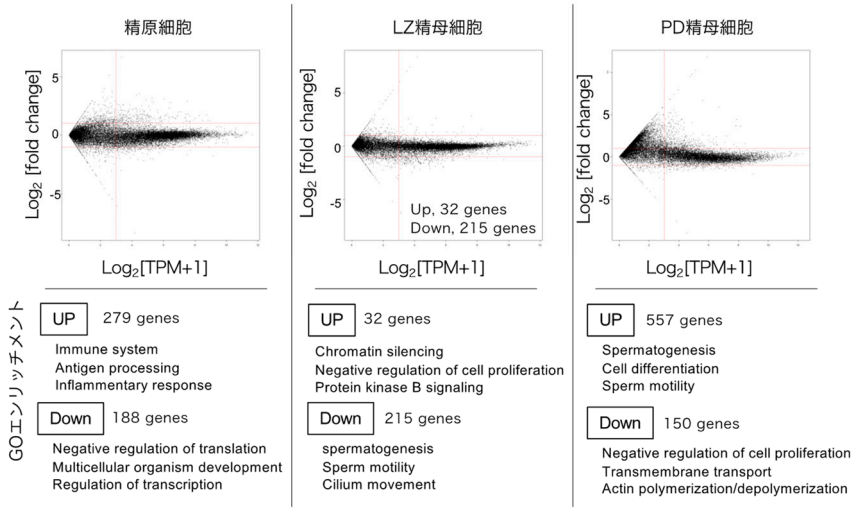


図 1. トランスクリプトーム解析の結果

2. ビタミン C が欠乏すると円形精子細胞の H3K9me2 量が増加した

正常な生殖細胞発生ではパキテン期の後半にヒストン脱メチル化酵素 Jmjd1a の働きにより、H3K9me2 修飾が激減することが知られている［4］。そこで、ビタミン C の欠乏により、この脱メチル化が異常になるかどうかを FACS でステージごとに分離した生殖細胞を用いて免疫染色によって確認した（図 2）。その結果、ビタミン C 欠乏群でもパキテン期（PD 精母細胞）での H3K9me2 の脱メチル化は観察されたが、円形精子細胞の集団の中に非常に高いレベルで H3K9me2 修飾を持つ細胞が現れることが明らかとなった。このことから、正常個体の円形精子細胞で H3K9me2 が低い状態で維持されるのにはビタミン C が必要であることが示唆された。おそらく円形精子細胞ではメチル化反応と脱メチル化反応が拮抗しながら起きており、ビタミン C 欠乏によって脱メチル化反応が低下して高メチル化状態が作り出されたと考えられる。今後は円形精子細胞で ChIP-seq や RNA-seq を行って、どのようなゲノム領域・遺伝子で H3K9me2 の高メチル化が生じるのか、それは遺伝子発現と相関するのか検証したいと考えている。さらに、円形精子細胞で見られる異常が精子まで引き継がれるかどうかを精子クロママチンの ChIP-seq によって検証していきたい。精子クロマチンの H3K9me2 異常は受精後の発生に影響を与えることも知られており［5］、興味深い。

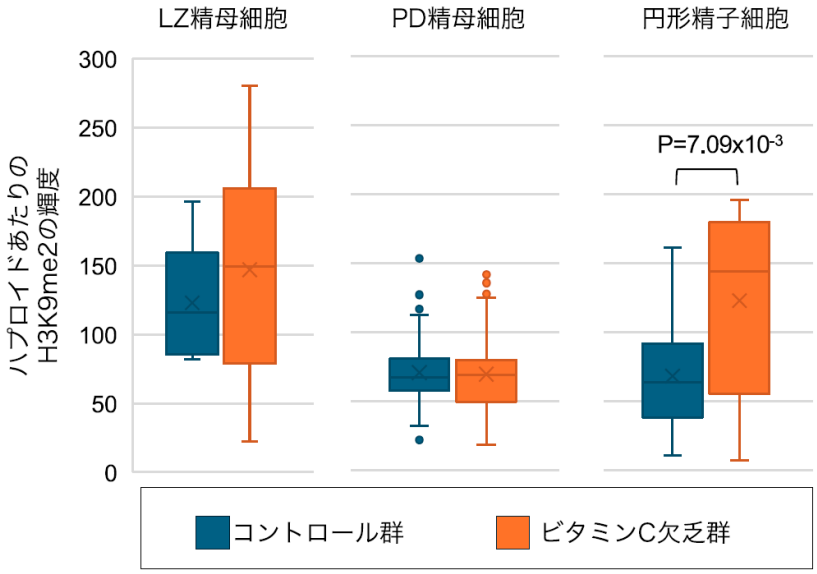


図 2. 各発生ステージおける H3K9me2 量の変化
P 値は等分散を仮定しない t-検定によって算出した。

3. ビタミン C が欠乏すると精子 DNA のメチル化が上昇した

DNA の脱メチル化に関与する Tet1、Tet2、Tet3 酵素もビタミン C を必要とするため、ビタミン C 欠乏により、DNA メチル化も異常になる可能性が考えられる。そこで、ビタミン C 欠乏群とビタミン C を与えたコントロール群から精子を採取し、BS-seq によって DNA メチロームを決定し、各領域の DNA メチル化レベルを比較した（図 3）。その結果、約 3,000 の領域でビタミン C 欠乏により高メチル化していることが明らかになった。一方、低メチル化した領域は 30 にも満たず、ビタミン C 欠乏による DNA メチル化の変化は健康異常による細胞全体としての撹乱によって生じているというよりも、脱メチル化酵素の機能低下によって生じている可能性が示唆された。高メチル化の傾向は特に CpG アイランドで顕著であり、多くの CpG アイランドが高メチル化していた。今後、このようにして生じた高メチル化が受精後に引き継がれ、仔のエピゲノムや表現型に影響を与えるのかどうかを検証していく予定である。さらに、現在、Tet1、Tet2、Tet3 のトリプル flox マウスを導入すべく、手続きを進めており、精原細胞と精母細胞で Cre を発現させる STRA8-Cre と合わせることで、ビタミン C 欠乏と Tet1/2/3 欠損が同じような表現型を示すのか、つまりビタミン C 欠乏による精子の高 DNA メチル化は Tet 酵素群の機能不全で説明できるのかを検証していく予定である。

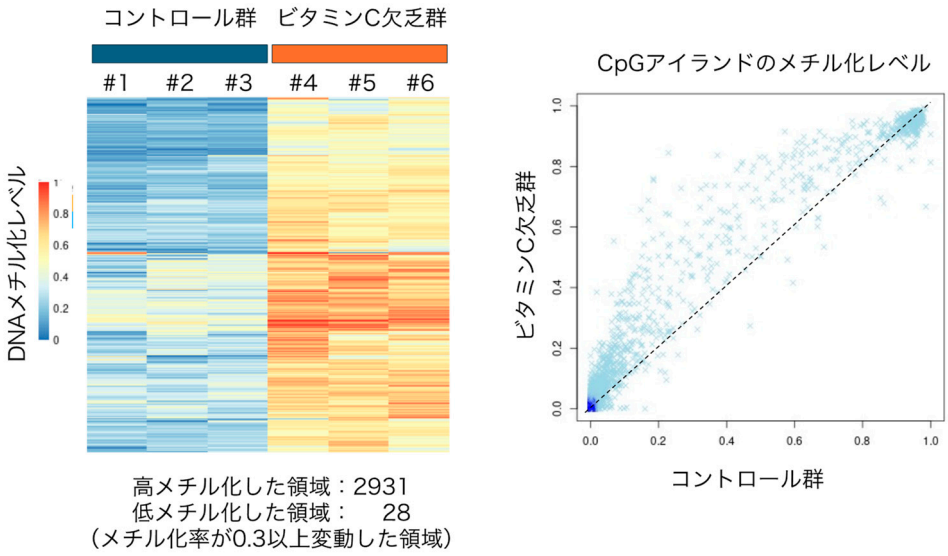


図 3. 精子における DNA メチル化解析（BS-seq）の結果

共同研究者・謝辞

Smp30-KO マウスは東京都健康長寿医療センター研究所の石神昭人博士より分与いただいた。本研究の共同研究者は、名古屋大学大学院生命農学研究科ゲノム・エピゲノムダイナミクス学研究室の大学院生である武野香澄、下向結貴、ビバリー・ボイボイの 3 名である。

文　献

1） Kondo Y, Inai Y, Sato Y, Handa S, Kubo S, Shimokado K, Goto S, Nishikimi M, Maruyama N, Ishigami A. Senescence marker protein 30 functions as gluconolactonase in L-ascorbic acid biosynthesis, and its knockout mice are prone to scurvy. Proc Natl Acad Sci U S A 2006 Apr 11;103(15):5723-8. PMID: 16585534 DOI: 10.1073/pnas.0511225103

2） Inoue K., Ichiyanagi K., Fukuda K., Glinka M., and Sasaki H. Switching of dominant retrotransposon silencing strategies from posttranscriptional to transcriptional mechanisms during male germ-cell development in mice. PLoS Genet 2017 Jul 27;13(7):e1006926 PMID: 28749988 DOI: 10.1371/journal.pgen.1006926

3） Ichiyanagi K., Li Y., Watanabe T., Ichiyanagi T., Fukuda K., Kitayama J., Yamamoto Y., Kuramochi-Miyagawa S., Nakano T., Yabuta Y., Seki Y., Saitou M., and Sasaki H. Locus- and domain-dependent control of DNA methylation at mouse B1 retrotransposons during male germ cell development. Genome Res 2011 Dec;21(12):2058-66. PMID: 22042642 DOI: 10.1101/gr.123679.111.

4） Tachibana M, Nozaki M, Takeda N, Shinkai Y. Functional Dynamics of H3K9 Methylation during Meiotic Prophase Progression. EMBO J. 2007 Jul 25;26(14):3346-59. PMID: 17599069 DOI: 10.1038/sj.emboj.7601767.

5） Yoshida K, Maekawa T, Ly NH, Fujita S, Muratani M, Ando M, Katou Y, Araki H, Miura F, Shirahige K, Okada M, Ito T, Chatton B, Ishii S. ATF7-Dependent Epigenetic Changes Are Required for the Intergenerational Effect of a Paternal Low-Protein Diet. Mol Cell 2020 May 7;78(3):445-458.e6. PMID: 32197065 DOI: 10.1016/j.molcel.2020.02.028