

## ウシ精子頭部 DNA の全体的なメチル化状態の検討方法の開発

岸 本 学<sup>1</sup>、甲 田 俊 夫<sup>1</sup>、加 藤 博 己<sup>2,3</sup>、三 谷 匡<sup>2</sup>、  
松 本 和 也<sup>1,2,3</sup>、佐 伯 和 弘<sup>1,2,3</sup>、細 井 美 彦<sup>1,2,3</sup>、入 谷 明<sup>1,2,3</sup>

### 要 約

CpG 配列におけるシトシン残基のメチル化はゲノムにおける主要なエピジェネティックな修飾であり、遺伝子発現の制御に重要な役割を演じている。

近年、ゲノム中の全体的な DNA のメチル化状態は、薄層クロマトグラフィー、Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) 法や Representational Difference Analysis (RDA) 法によって研究されている。しかしながら、これらの方法は複雑であり、制限酵素によるゲノムの処理を必要とする。それゆえに、これらの方法から得られる情報は、使用した制限酵素によって切断できる DNA 塩基配列に限られている。本研究では、ウシ精子における全体的な DNA メチル化の状態を解析する簡便な方法を確立するために、メチル化シトシンを免疫蛍光抗体染色する方法をウシ精子 DNA に用いる方法の開発を試みた。

本研究中のメチル化シトシンの免疫蛍光抗体染色法は、Benchaiら (2003) がヒト精子を用いて開発した方法を基にした。種間差により、Benchaiらによって開発された方法をウシ精子に用いてもメチル化シトシンの検出ができなかったため、方法中の手技を幾つか変更した。ウシ凍結融解精子はパーコール洗浄によって卵ク液および混入体細胞を分離した。洗浄後、精子を 0.25M DTT と 1% SDS を用いて室温にて処理した。処理精子をサイトスピン 4 を用いてスライドガラス上へ展開し ( $30 \times g$ ,  $5 \times 10^4$  cells/ml) 室温にて風乾した。風乾した精子標本を室温にてメタノール:氷酢酸 (3:1) の固定液へ浸漬して固定し、その後、室温にて 1% Triton X と 1% SDS を用いて処理した。処理後、DNA を 6N HCl を用いて変性し、精子 DNA 中のメチル化シトシンを免疫蛍光抗体染色法によって染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像を撮影した。撮影された画像を画像解析ソフトウェアによって解析した。精子頭部中、ヨウ化プロピジウムによって染色された領域を頭部 DNA の領域とし、その領域中に存在する FITC の蛍光を示す領域をメチル化シトシンの領域とし、それぞれの領域の面積を画像解析ソフトウェアによって計測し、その面積比を算出した。面積の計測は一定の紫外線強度の下で行われた。精子頭部中の全体の DNA 面積に対するメチル化シトシンの面積比は、種雄牛 A においては 34.6% ( $9.98 \pm 5.39 \mu\text{m}^2$ ,  $28.25 \pm 4.98 \mu\text{m}^2$ ,  $n=248$ ) であり、種雄牛 B においては 39.3% ( $12.29 \pm 5.39 \mu\text{m}^2$ ,  $31.74 \pm 5.96 \mu\text{m}^2$ ,  $n=165$ )、また種雄牛 C においては 40.6% ( $13.67 \pm 4.84 \mu\text{m}^2$ ,  $33.70 \pm 5.69 \mu\text{m}^2$ ,  $n=46$ ) であった。種雄牛 A と、種雄牛 B および C の精子頭部の DNA メチル化状態には有意な差が存在した ( $P < 0.01$ )。この種雄牛間のシトシンのメチル化状態の差異が意味することについては、今後の詳細な研究が必要である。

### 緒 言

近年ゲノムのエピジェネティクスの研究が進み、その 1 つであるシトシンのメチル化は、クロマチン構造の変化や直接的な転写因子の結合阻害などを介して、組織特異的・時期特異的な遺伝子発現に重要な役割を担い、発生および細胞分化を支配していると考えられている。

1. 近畿大学大学院生物理工学研究科生物工学専攻 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

3. 財団法人わかやま産業振興財団 〒649-6261 和歌山県和歌山市小倉 60

産業動物であるウシにおいて、同じ1頭の種雄牛から採集された精液から得られた産子群内において、老齢期に得られた精液を用いて得られた産子は、若年期に得られた精液を用いて得られた産子よりも産肉成績が劣ることが統計的に報告された(藤中ら、2004)。現在のところその原因は不明であるが、種雄牛のゲノムそのものにジェネティックな変化がないことから、種雄牛の加齢による精子ゲノムのエピジェネティックスの変化がその原因となっている可能性が考えられる。現在のところ、個体の加齢とその配偶子である精子のDNAのメチル化状態への影響や精子DNAのメチル化状態の変化が次世代の表現型へ影響を及ぼすことの詳しい機構はわかっていない。一般に哺乳類の精子DNAは高メチル化状態にあり、受精後前核期に精子由来DNAは急激な脱メチル化を受ける。ヒトにおいては、DNAのメチル化状態の低い精子を用いた場合は、メチル化状態の高い精子を用いた場合に比較して妊娠率が低いことが報告されている(Benchaib *et al.*, 2005)。また、マウスにおいて、2細胞期に異常なメチル化パターンを示す胚は、その後の胚発生を停止することが示されている(Shi *et al.*, 2002)。精子DNAのメチル化状態とその精子を用いた受精および妊娠に関しての直接的な関係は不明であるが、精子のエピジェネティックな変化がその後の発生や次世代における表現型に影響を及ぼす可能性が考えられる。

DNAのエピジェネティックな修飾である、CpG配列中のシトシンのメチル化状態を解析する方法としては、Bisulfite法、RLGS法、RDA法等が存在する。また、核内のメチル化シトシンを直接視覚化する方法として免疫蛍光抗体染色法が使用されている。我々は本研究において、簡便に精子頭部DNAの全体的なメチル化状態の解析を行う方法として、ヒトにおいて報告のある抗5メチルシトシン抗体を用いた免疫蛍光抗体染色法(Benchaib *et al.*, 2003)を、ウシの精子に適用する開発を行った。

## 材料と方法

### 精子洗浄

ウシ凍結融解精液を30%、45%重層Percoll液を用いて、500×g、10分間遠心を行い洗浄した。

### 免疫蛍光抗体染色および観察

0.25M dithiothreitol (DTT, Nacalai Tesque, SP14128-04) および1% SDSを用いて精子DNAの膨化処理を行った。その後、サイトスピン4(Thermo Electron Corporation)を用いてスライドガラスに精子を展開し、12時間風乾しメタノール：酢酸＝3：1溶液を用いて4℃で20分間固定を行った。その後、1% Tritonを用いて、室温で一晩透過処理を行い、1% SDSを用いてタンパク質を除去した。そして、6N HClを用いて、室温で15分間精子DNAの変性処理を行い、Borax(Nacalai Tesque, SP31223-85)を用いて室温で10分間中和及び洗浄を行い、1% FBSを用いて4℃で一晩ブロッキング処理を行った。マウス抗5メチルシトシン抗体(CALBIOCHEM®, NA81)を用いて、室温で20分間一次抗体反応を行い、FITC標識ヤギ抗マウスIgG抗体(Cosmo Bio, SC-2072)を用いて室温で15分間二次抗体反応を行って5メチルシトシンをFITC標識した。その後、1μg/ml ヨウ化プロピジウム(PI, Nacalai Tesque, SP29004-41)を用いて4℃で2時間DNAの染色を行い、VECTASHILD mounting Medium(VECTOR, H-1000)を用いて封入した。封入したサンプルを共焦点レーザー顕微鏡を用いて5メチルシトシンの蛍光を観察した。そして、得られた画像を画像解析ソフトLumina Vision(MITANI CORPORATION)を用いて、PIで染色された面積中の5メチルシトシンの割合を解析した。

なおウシ精子DNAの染色条件の検討はDeanら(2001)、Rensら(2001)および須永ら(2003)の方法を参考にして行った。

## 結 果

### 精子頭部の DTT 処理時間が精子頭部膨化へ及ぼす影響

DTT 処理時間を処理無、30 秒間および 120 秒間それぞれ行い比較した。その結果、30 秒間処理を行った場合に、精子頭部の膨化が促進され、観察が容易になった。しかし、120 秒間行くと、精子頭部が著しく変形し、観察が困難になり、また DNA が漏出することによって考えられる、PI の蛍光が精子頭部の周辺に観察された。よって、DTT 処理は 30 秒間行うこととした。(表 1. および図 1.)

表 1. 精子頭部の DTT による処理時間が精子頭部膨化へ及ぼす影響

	計測精子数	精子頭部面積 (PI面積) ( $\mu\text{m}^2$ , Mean $\pm$ SD)	最大精子頭部面積 ( $\mu\text{m}^2$ )	最小精子頭部面積 ( $\mu\text{m}^2$ )
無	88	25.18 $\pm$ 4.91 <sup>a</sup>	36.73	16.87
30秒間	87	32.32 $\pm$ 6.00 <sup>b</sup>	61.65	24.34
120秒間	51	52.23 $\pm$ 19.15 <sup>c</sup>	104.24	30.87

異文字間に有意差あり  $P < 0.01$

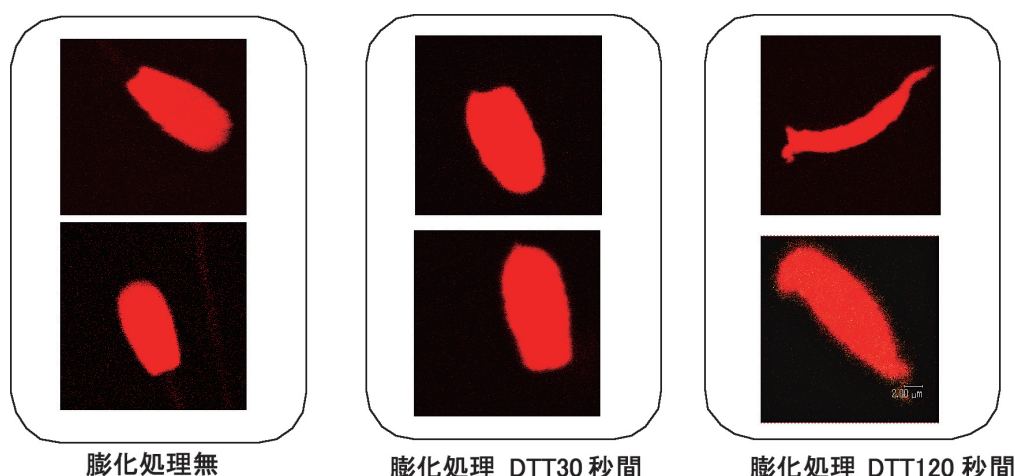


図 1. 精子頭部の DTT による処理時間が精子頭部膨化へ及ぼす影響

精子頭部の DTT 処理時間を無、30 秒間および 120 秒間行い、PI により DNA の染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。共焦点レーザー顕微鏡から得られた画像を画像解析ソフトを用いて PI で染色された面積を計測した。

### サイトスピン 4 を用いたスライドガラスへのウシ精子の展開条件

精子濃度について、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$  精子 /ml まで 10 倍ずつ 4 段階に渡ってサイトスピン 4 を用いたスライドガラスへのウシ精子の展開を行ったところ、 $1 \times 10^4$  と  $1 \times 10^5$  精子 /ml の間が精子同士の重なりもなく観察しやすいため、この実験系では  $5 \times 10^4$  精子 /ml でサイトスピン 4 を用いたスライドガラスへのウシ精子の展開を行うこととした。またサイトスピン 4 で精子を展開する際の遠心力について、 $140 \times g$  及び  $70 \times g$  では精子頭部の変形や破壊が観察されたが、 $30 \times g$  で行うと、精子頭部の変形や破壊は観察されず、精子同士の重なりもない状態で展開できた。このため、この実験系ではサイトスピン 4 で精子を展開する際の遠心力は  $30 \times g$  で行うこととした。(図 2.)



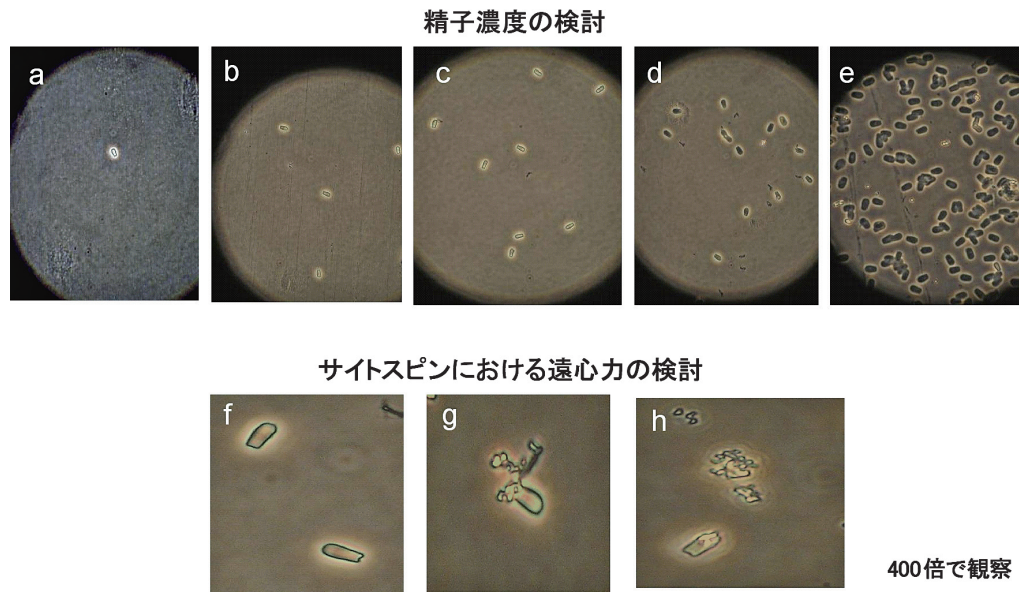


図2. サイトスピンを用いたウシ精子のスライドガラスへの展開条件の検討

上段はウシ凍結融解精子を洗浄後、それぞれ (a)  $1 \times 10^3$ 、(b)  $1 \times 10^4$ 、(c)  $5 \times 10^4$ 、(d)  $1 \times 10^5$  および (e)  $1 \times 10^6$  精子/ml に調製しサイトスピンの際の最適精子濃度を検討した。下段は、精子濃度決定後、それぞれ (f)  $30 \times g$ 、(g)  $70 \times g$ 、(h)  $140 \times g$  とサイトスピンの回転数を検討した。

#### SDS 処理による精子タンパク質除去処理時間の影響

精子中に存在する核タンパク質であるプロタミンと DNA の強力な結合が、抗 5 メチルシトシン抗体のメチル化シトシンへの結合を妨げる可能性があるため、抗 5 メチルシトシン抗体で処理する前に十分にプロタミンを分解・除去するために SDS 処理による精子核タンパク質の分解処理を行った。この処理を行うことによって、精子頭部 DNA が PI によってよく染色され、またメチル化シトシンも抗 5 メチルシトシン抗体によってよく染色されている様子が確認できた。また、SDS 処理時間が 1 時間では、精子の細胞膜らしき部位に不均一な PI の蛍光が観察された。しかし、一晩処理することによって精子の細胞膜らしき部位に観察される不均一な PI の蛍光が解消され、観察が容易になったため、この実験系では固定後の SDS によるタンパク質の分解・除去処理の時間は一晩行うこととした。(図 3.)

#### ウシ精子頭部 DNA の全体的なメチル化状態の解析

これまでに開発した方法を用いて、ウシ精子頭部を染色することにより、精子頭部 DNA および 5 メチルシトシンを視覚化し、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行うことが可能となった。精子頭部 DNA の面積を PI で染色された領域として測定し、精子頭部 DNA 中の 5 メチルシトシン量を FITC で染色された面積として測定し、これらの面積より精子頭部 DNA 中の全体的なシトシンのメチル化状態を面積率として、算出することが可能となった (図 4.)。

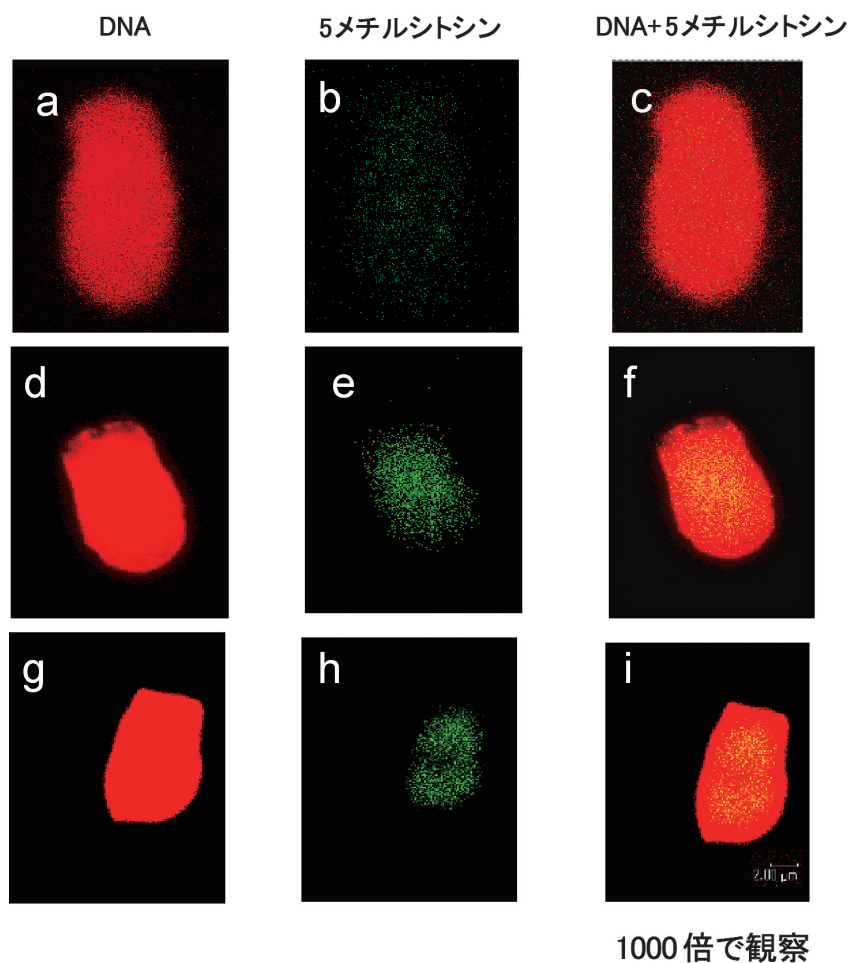


図 3. SDS 処理による精子タンパク質分解処理時間が免疫蛍光抗体染色法による精子頭部 DNA メチル化状態の解析に及ぼす影響

上段 (a, b, c) : SDS 処理無し、中段 (d, e, f) : SDS 処理 1 時間、下段 (g, h, i) : SDS 処理時間一晩でそれぞれウシ精子を処理し、精子タンパク質を分解後、抗体反応および PI 反応処理した精子頭部の共焦点レーザー顕微鏡画像

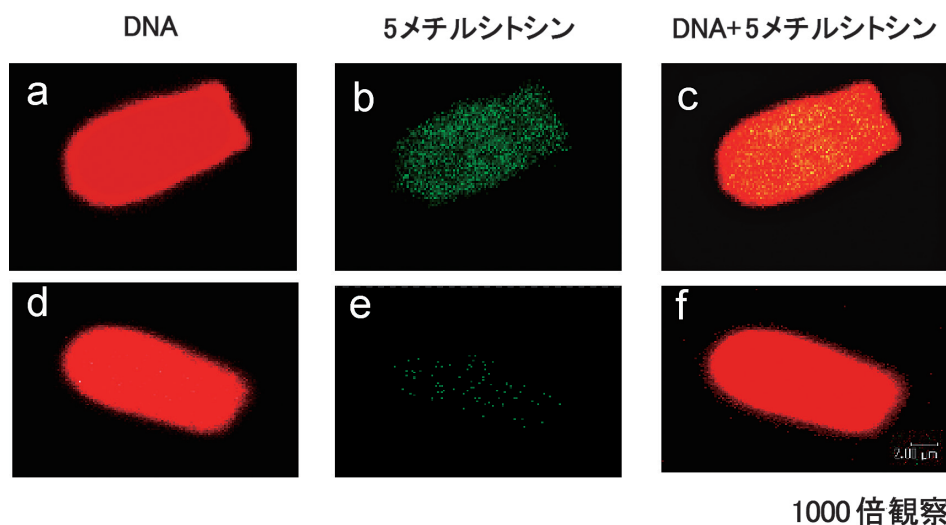


図 4. 免疫蛍光抗体染色法によるウシ精子頭部 DNA5 メチルシトシンの検出  
上段 (a, b, c) : 今回開発した方法を用いた精子 DNA5 メチルシトシン染色像  
中段 (d, e, f) : 一次抗体 (抗 5 メチルシトシン抗体) 反応無処理像

### 種雄牛個体間における精子頭部 DNA の全体的なメチル化状態の解析

3 頭の種雄牛精子を用いて、開発した間接免疫抗体蛍光染色を行い、画像解析ソフトで精子頭部の全体的なメチル化状態を解析した結果、種雄牛 A と種雄牛 B および C の精子頭部 DNA の全体的なメチル化状態に有意な差 ( $P < 0.01$ ) が存在することが示された (表 2.)。

表 2. 免疫蛍光抗体染色法による 3 頭の種雄牛の精子頭部 DNA の全体的なメチル化状態の解析

精子使用種雄牛	計測精子数	計測精子頭部面積 (PI面積) $\mu\text{m}^2$ Mean $\pm$ SD	5MC面積 (FITC面積) $\mu\text{m}^2$ Mean $\pm$ SD	精子頭部DNA中の 5MCの面積率 (%)
A	248	28.25 $\pm$ 4.98	9.98 $\pm$ 5.39	34.63 <sup>a</sup>
B	165	31.74 $\pm$ 5.96	12.29 $\pm$ 5.39	39.30 <sup>b</sup>
C	46	33.70 $\pm$ 5.69	13.67 $\pm$ 4.84	40.61 <sup>b</sup>

異文字間に有意差あり  $P < 0.01$

### 考 察

今回開発した方法を用いることによって、ウシ精子頭部 DNA の全体的なシトシンのメチル化状態を検出することが可能となった。しかし、この方法で検出された 5 メチルシトシンが、精子頭部中の全ての 5 メチルシトシンを反映しているという裏づけはまだなされていない。このため、今後、同一ウシ精子を用いて、以前に確立されている RLGS 法や RDA 法等を用いて、精子ゲノムの全体的な DNA のメチル化状態を解析し、この方法による結果と比較・検討する必要があると考えられる。

今回検討した各種雄牛の精子サンプルでは、精子頭部 DNA の全体的なシトシンのメチル化状態について種雄牛間に有意差が見られた ( $P < 0.01$ )。この種雄牛間の精子頭部 DNA の全体的なシトシンのメチル化状態の差がどのような意味を持ち、生理的な現象をもたらしているのかについては、今後、各種雄牛の人工授精成績やその産子の産肉成績などから遡及的に検討する必要があると考えられた。

今回開発した方法では、ウシ精子に染色処理を施すのに 5 日間、そして共焦点レーザー顕微鏡を用いた画像データの収集と解析に約 1 日と、全工程で約 1 週間程度の時間を要することから、この方法を実際のウシ精子の評価に用いるにはかなりの時間を要する。そこで、工程に必要な時間を短縮するための検討として、各処理溶液の濃度の検討や、フローサイトメトリー等を用いた精子頭部の 5 メチルシトシンの解析方法を検討する必要があると考えられる。

### 謝 辞

本研究に使用した黒毛和種の凍結精液は岐阜県畜産研究所より提供された。本研究の一部は、日本文部科学省による 21 世紀 COE プログラム「食資源動物分子工学研究拠点」および科学技術振興事業団・和歌山県地域結集型共同研究事業「アグリバイオインフォマティクスの高度活用技術の開発」の研究助成によりおこなわれた。

## 参 考 文 献

- 1 . 藤中邦、岩本英治、道後泰治. 兵庫県黒毛和種雄牛の加齢に伴う産肉能力低下の有無. 肉用牛研究会報 76:15-17. 2004
- 2 . Benchaib M, Braun V, Ressnikof D, Lornage J, Durand P, Niveleau A, Guerin JF. Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. Hum. Reprod. 20 (3) :768-773. 2005
- 3 . Shi W, Haaf T. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. Mol. Reprod. Dev. 63 (3) :329-34. 2002
- 4 . Benchaib M, Ajina M, Lornage J, Niveleau A, Durand P, Guerin JF. Quantitation by image analysis of global DNA methylation in human spermatozoa and its prognostic value in in vitro fertilization: a preliminary study. Fertil. Steril. 80 (4) :947-53. 2003
- 5 . Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. Proc Natl Acad Sci U S A. 20;98 (24) :13734-8. 2001
- 6 . Rens W, Yang F, Welch G, Revell S, O'Brien P.C.M, Solanky N, Johnson L.A, Ferguson Smith M.A. An X-Y paint set and sperm FISH protocol that can be used for validation of cattle sperm separation procedures. Reproduction 121:541-546. 2001
- 7 . 須永弥咲、木村浩孝、Che Li mei、伊藤雅夫、河野友宏. 免疫染色法による DNA5-メチルシトシンの検出. J. Mamm. Ova Res. 20:55-57. 2003

## 英文要旨

## Development of an examination method of a methylation state of bull sperm DNA

Manabu Kishimoto<sup>1</sup>, Toshio Koda<sup>1</sup>, Hiromi Kato<sup>2</sup>, Tasuku Mitani<sup>2</sup>,  
Kazuya Matsumoto<sup>1,2</sup>, Kazuhiro Saeki<sup>1,2</sup>, Yoshihiko Hosoi<sup>1,2</sup> and Akira Iritani<sup>1,2</sup>

Methylation of cytosine base in CpG dinucleotide sequence (DNA methylation) is a major epigenetic modification of the genome and plays an important role to regulate gene expression. Recently, global DNA methylation in genome was studied by using a TLC, Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) method and/or Representational Difference Analysis (RDA) method. However, these methods are complicated and need to use restriction enzymes. Therefore, the information derived from those methods is restricted in the region of the DNA sequence which is able to be cleaved by restriction enzymes. In this study, to establish a simple method to estimate global DNA methylation level in bovine spermatozoa, we tried to develop the DNA methylation analyzing method by using immunostaining of 5-Methylcytosine.

The immunostaining method for 5-Methylcytosine in this study was based on the method developed by Benchaib et al. (2003 Fertil. Steril. 80, 947-952) for human spermatozoa. Because of the species difference, we modified some treatments to apply to bovine spermatozoa. Frozen-thawed bovine spermatozoa were washed by using 30 and 45% Percoll gradient solution. After washing, spermatozoa were treated with 0.25M DTT and 1% SDS at room temperature (RT). Then, treated spermatozoa were spread on a slide glass with Cytospin4 (30×g, 5×10<sup>4</sup> cells/ml) and air-dried at RT. Air-dried bovine spermatozoa specimens were fixed in Methanol: Glacial Acetic acid (3:1) solution at RT, treated with 1% Triton X and 1% SDS at RT and DNA was denatured with 6N HCl at RT. After the denaturation, 5-Methylcytosine in sperm DNA was analyzed by immunofluorescence technique with mouse anti 5-Methylcytosine antibody and FITC conjugated goat anti mouse IgG antibody. The total sperm DNA was counter stained with Propidium Iodide (PI). Stained samples were observed with a confocal laser scanning microscope and obtained images were analyzed with the fluorescence image analysis software. The area which was clearly stained with PI in each sperm head was designated and measured as the area of total sperm DNA. And the number of the dot which showed the fluorescence of FITC within the total sperm DNA area was designated and measured as the area of 5-Methylcytosine in total sperm DNA. The area measurement was performed with same light strength. Three bovine spermatozoa samples derived from different bulls which are used daily for calf production by A.I. were examined with this DNA methylation analyzing method. The ratio of the mean total area of the 5-Methylcytosine in sperm DNA to the mean total area of the sperm DNA was 34.6% in bull A (9.98+5.39μm<sup>2</sup>, 28.25+4.98μm<sup>2</sup>, n=248), 39.3% in bull B (12.29+5.39μm<sup>2</sup>, 31.74+5.96μm<sup>2</sup>, n=165) and 40.6% in bull C (13.67+4.84μm<sup>2</sup>, 33.70+5.69μm<sup>2</sup>, n=46). There was significant difference in the ratio between bull A and bull B, C (P<0.01). More research is required to evaluate the mean of this individual difference of DNA methylation between bulls.

1. Division of Biological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, 649-6493, Japan

2. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Wakayama, 642-0017, Japan