

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15174

研究課題名(和文)クロモセーター形成による細胞分化機構の解析

研究課題名(英文)Role of chromocenter formation in cellular differentiation

研究代表者

富澤 信一 (TOMIZAWA, Shinichi)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00704628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：精子幹細胞は自己複製と分化を繰り返すことによって精子形成を長期的に支える重要な細胞である。精子幹細胞が前駆細胞に分化するためには様々な遺伝子の発現が変化が必要があるが、そこにはエピジェネティックな制御や核内の染色体の高次構造変換が関与していることが推測されている。実際、精子幹細胞分化時には、クロモセーターが顕著に形成されるという現象が確認されている。本研究ではこれが精子幹細胞分化にどのような役割を果たすのか調べるために、実験系を構築することを計画した。そこで、過去の報告に基づきクロモセーターの精製実験を試みたが、少量の細胞で実施することは困難であり、様々な追加検討を要することが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Spermatogonial stem cells support a lifelong process of spermatogenesis. Epigenetic factors and higher-order nuclear architecture are implicated to regulate changes in expression of a number of genes important for spermatogonial stem cell differentiation. During this process, it is reported that apparent chromocenter formation as well as a series of epigenetic changes occur. This study aimed to establish a method to investigate the role of chromocenter formation in the differentiation step. However, the chromocenter isolation protocol based on a published literature did not appear to work for a small number of cells, and further optimization was considered necessary.

研究分野：医歯薬学

キーワード：生殖細胞 クロモセーター 遺伝子発現制御 幹細胞分化 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の精子形成には、精子幹細胞が前駆細胞に分化し、その後減数分裂に移行するという過程が存在し、この精子幹細胞システムが持続的な配偶子産生を可能にしていると考えられている。精子幹細胞は自己複製と分化を繰り返しており、それぞれの過程には複数のタンパク質が関与していることがこれまでの研究により示されている (de Rooij DG and Russell LD. *J Androl.* 2000 21(6): 776-798.)。また一方で、精子幹細胞が前駆細胞に分化する際には幹細胞性や精子形成に関わる様々な遺伝子の発現状態が変動するが、精子幹細胞においてこのような大きな遺伝子発現変化を引き起こすために必要な分子機構は明確ではない。

遺伝子発現をゲノム全体的なレベルで制御する機構としては、核内の染色体の高次構造によるものや、エピジェネティクスによるものが主に知られている。まず、核内で DNA を構成しているクロマチンは動的であり、核内の染色体の配置や立体構造は、遺伝子発現の制御に重要であることが示されている (Gorkin DU et al., *Cell Stem Cell.* 2014 14(6): 762-775.)。例えば、核の周縁部に位置して核膜を裏打ちする核ラミナと相互作用しているクロマチンは一般的には遺伝子発現抑制的なヘテロクロマチンである一方で、核内の転写ファクトリーと呼ばれる領域では RNA ポリメラーゼ II により複数の遺伝子の転写が活発に行われていると考えられる。次に、エピジェネティクスは DNA 以外の因子 (DNA のメチル化などの修飾や、クロマチンを構成するヒストンタンパク質の修飾など) が遺伝子の転写に影響を及ぼすことにより発現制御を行う機構である。DNA メチル化や特定のヒストン修飾はヘテロクロマチンの形成や核内の染色体配置と密接な関連があると言われており、これら複数の因子が複雑に連携しながら遺伝子発現を制御していることが考えられている。

近年、精子幹細胞分化が起きる際には、同じタイミングでエピジェネティックな状態が大きく変化するという現象が存在することが確認された (エピジェネティックスイッチと呼ぶ) (Shirakawa T. et al., *Development.* 2013 140(17): 3565-3576.)。特に、DNA メチル化に必要なタンパク質 (Dnmt3a, Dnmt3b) の発現レベルやヒストン修飾 (H3K9me2, H3K9me3 等) の状態が、精子幹細胞から前駆細胞への分化時に大きく変化する。さらに、DNA メチル化の維持に必要なタンパク質として知られる Np95 を生後のマウスでノックアウトすると、精子幹細胞が分化できなくなるという表現型がみられる他、逆に Dnmt3b を強制発現させると前駆細胞への分化が亢進するという現象も認められた。これらのことから、一連のエピジェネティックな因子が精子幹細胞の分化にとって重要な遺伝子発現制御をゲノム全体的に行って

いることが推測された。

また、エピジェネティックスイッチに伴って、精子幹細胞分化時には特徴的な核内形態変化が起きる。中でも最も特徴的なのは、精子幹細胞の核にはあまり認められないクロモセーターが、前駆細胞に分化するのと同時に顕著に観察されるようになるという現象である。このことから、核内では精子幹細胞分化の時点で大規模な染色体の構造変換が起こることがうかがえる。また、ヘテロクロマチンに關与する DNA メチル化やヒストン修飾の変化が同時に起きることから、クロモセーター形成とエピジェネティックスイッチの間には密接な関連があることも予想できる。しかし、このクロモセーター形成が具体的に精子幹細胞の分化とどのような関連があるのか、またこれがエピジェネティックスイッチの引き金となっているのかなどの疑問について調べたという報告はこれまでのところ、存在しない。

クロモセーターは遺伝子発現抑制型のヘテロクロマチンが凝集した結果として顕微鏡により観察される構造体であり、その存在は分化が進んだあらゆる細胞種で確認されている。一般的に、クロモセーターはセントロメアに含まれるサテライト DNA やそれに関連したタンパク質で構成されていることが知られているが (Guenatri M. et al., *J Cell Biol.* 2004 166(4): 493-505.)、これは主に免疫染色実験などの形態学的手法によって得られた証拠に基づくモデルであり、実際のクロモセーターにはセントロメア以外にどのような DNA がどの程度含まれるのか、また、その他に RNA やタンパク質がどの程度含まれているのか、などといった情報はこれまでのところ得られていない。

2. 研究の目的

哺乳類の細胞において普遍的な構造体として核内に観察されるクロモセーターの存在は古くから知られている。これは主にセントロメアのサテライト DNA や関連タンパク質などによって構成される遺伝子発現抑制的な構造体であると考えられてきた。しかし、クロモセーターの中に含まれる DNA はこれまでのところ網羅的に解析されていないため、その詳細な実態については現在も十分に明らかにされたとは言えない。ところが、精子幹細胞が前駆細胞に分化する際には DNA メチル化やヒストン修飾に関わる様々なエピジェネティクス関連因子の変化が起こり、それと並行してクロモセーターの顕著な形成が確認されるため、それらが総合的に幹細胞分化に関わる重要な機能を有している可能性が推測された。

そこで本研究では、精子幹細胞や前駆細胞の核内のクロモセーターに含まれる DNA の塩基配列を網羅的に同定し、精子幹細胞分化におけるクロモセーターの詳細な役割を理解することを計画した。マウスの精子幹細胞分

化システムにおいては精子幹細胞と前駆細胞でクロモセンターの形成度に顕著な違いがみられることから、一般的に他の細胞においてもみられるクロモセンターを理解するための最初の段階として、このシステムが適していることが考えられた。

現在では、次世代シーケンサーを用いた解析手法の進歩により、様々なエピジェネティックな修飾のゲノム全体的な状態を比較的簡便に調べることが可能となっている。また最近ではごく少量のサンプルからでも次世代シーケンサー解析ができるプロトコルも開発されている。このような技術を応用して、これまで情報が乏しかったクロモセンターに含まれる DNA の塩基配列を同定することができれば、今後様々な細胞種における同様な解析にも応用できる汎用性の高い実験系が確立できることが考えられた。

3. 研究の方法

まず、過去の報告 (Zatsepina et al., *Methods Mol Biol.* 463: 169-80) をもとに、クロモセンターを細胞の核内から高純度に単離することを試みることにした。これは、細胞から核を精製したのちに低イオン強度の溶液や遠心分離による分画を利用してクロモセンターを精製する方法である。

この実験の再現を行うためには、細胞から核を効果的に精製することが重要であると考えられたため、本研究ではこれに INTACT 法 (isolation of nuclei tagged in specific cell types) (Deal RB and Henikoff S. *Dev Cell.* 2010 18(6): 1030-1040.) を組み合わせる方法を検討することとした。これは核膜に局在するタンパク質を標的にして高効率に核を精製する実験手法である。本研究では INTACT 法を用いるために、核膜タンパク質の一種である Sun1 が GFP によって標識されたマウス (Sun1-sfGFP) を導入し、このマウスの細胞をクロモセンター精製に用いることを考えた。

次に、クロモセンターが高純度に採取できていることを免疫染色法で確認した上で、そこから DNA を抽出、精製し、次世代シーケンサー用のライブラリーを作製することとした。それを次世代シーケンサーで解析することによって得られた塩基配列の情報をもとに、クロモセンターに含まれる DNA 領域がマウスゲノムのどの領域に相当するのか同定することを計画した。

4. 研究成果

現在までに、クロモセンターが核小体やユークロマチンに比べて低イオン強度溶液による処理に耐性を示すことを利用し、マウスの細胞からクロモセンターを単離したとの報告がされている (Zatsepina et al., *Methods Mol Biol.* 463: 169-80)。この手法では低イオン強度の溶液による処理に加えて超音波処理や遠心分離によってクロモセ

ンターを高純度に単離し、免疫染色によって精製度を確認している。

本研究では Sun1-sfGFP マウスを導入し、そのマウスに由来する培養細胞を用いて過去の報告の再現実験を試みた。ところが、最終的に免疫染色によって確認できるレベルの量のクロモセンターを得ることはできなかった。この最大の理由としては、本実験で使用した細胞の量が少なかったため、実験の複数のステップにおける損失の結果、その後の実験に移行することのできる量のクロモセンターを得ることが極めて困難であったことが考えられた。この結果を受け、今後は生体マウスの組織を用い、大量のサンプルから実験を開始することが必要であると同時に、それ以外の条件に関しても最終的な収量を向上するための検討を複数の実験ステップに関して追加で行う必要があると考えられた。そのようにして再現性の高い実験系を確立した上で、精子幹細胞や前駆細胞といった、より少量の細胞からクロモセンターを採取するためのプロトコルをさらに構築していくことを考えたい。

一方で、精子幹細胞分化における核内形態の変化に関しては、エピジェネティックな修飾がどのように変化するかという側面からも次世代シーケンサーを用いた詳細な解析を進めている。複数のヒストン修飾のようなエピジェネティックな因子がクロモセンターの形成と密接な関係を示すことも推測されるため、このようなデータを活用した解析が有用であると思われる。今後、最終的には精子幹細胞分化の過程で生じる顕著なクロモセンター形成に関して、その具体的な役割や、エピジェネティック スイッチに伴って起きる様々な変化との関連を詳細に解明していきたい。

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)

[学会発表](計2件)

Tomizawa S, Kobayashi Y, Shirakawa T, Peters AHFM, Anastassiadis K, Stewart AF, Ohbo K

Kmt2b regulates spermatogonial stem cell differentiation and marks primed genes for developmental potential.

EMBO Conference: From Functional Genomics to Systems Biology.

Heidelberg (Germany)

2016年11月12日

Tomizawa S, Kobayashi Y, Shirakawa T, Dahl A, Alexopoulou D, Anastassiadis K, Stewart AF, Ohbo K

Role of histone methyltransferase Mll2 for adult testicular germ cell differentiation.

Gordon Research Conference, Chromatin
Structure & Function.
Les Diablerets (Switzerland)
2016年5月22日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~finemorp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富澤 信一 (TOMIZAWA, Shinichi)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00704628