

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19K06616  
研究課題名(和文)ゴノサイトにおけるクロマチンダイナミクスの解析

研究課題名(英文) Analysis of chromatin dynamics in gonocyte

研究代表者

山中 総一郎 (Yamanaka, Soichiro)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

研究者番号：80711845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞は次世代に受け継がれる遺伝情報が格納された運搬体であり、その質的維持は種の存続に必須の働きを持つ。雄の生殖能の維持には精子幹細胞が重要な働きを持つことが知られているが、その精子幹細胞がどのような過程を経て分化しているかについては不明な点が多い。精子幹細胞の前駆細胞はゴノサイトと呼ばれ、この細胞ではクロマチンがダイナミックに変化することを本研究で見出してきた。さらに、ゴノサイトクロマチンの特異なダイナミクスに関与が疑われる因子群を抽出し、Morc1遺伝子に着目した。Morc1変異体個体を用いた解析からゴノサイトクロマチン動態の異常が発見され、現在さらなる分子機構の解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

無精子症は男性不妊症の原因の約10%を占める。精子の供給源となる「精子幹細胞」の機能不全は無精子症の一つの病因として挙げられる。マウスにおいて、雄性不稔の表現型を示す変異体は多数存在するが、その根本的な原因が理解されている例は少ない。それら変異体の中には、精子幹細胞からの分化ではなく、精子幹細胞になる過程に異常があるケースがある。さらに、生殖細胞がいかなる過程を経て精子幹細胞へと成熟するかに関する知見は極めて乏しい。本研究では、この前駆細胞でのクロマチン変化の解析を行い、その特異な振る舞いを明らかにした。今後、この前駆細胞で起きるイベントがどのように生殖能の維持に寄与するかを解明する。

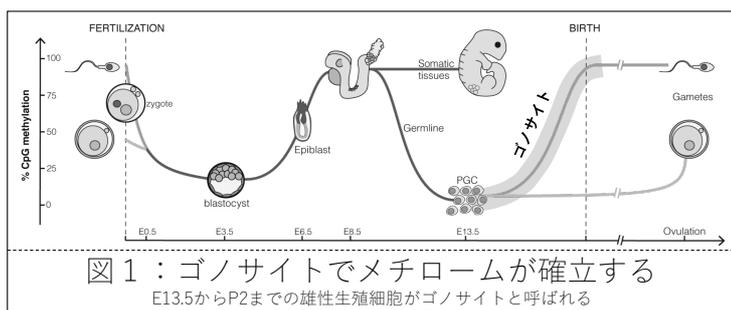
研究成果の概要(英文)：Germ cell transmits the genetic information to next generation. Maintenance of its quality is crucial to preserve species. Spermatogonial stem cell (SSC), in particular, plays a pivotal role in male fertility. Albeit its biological importance, how it is developed from progenitor cell, called gonocyte, is unclear. Under this research grant, I revealed a highly dynamic nature of chromatin in gonocyte. Next, I narrowed down the candidate factors that would be involved in this chromatin dynamics, and focused on Morc1 gene. Using morc1 KO mice, I found that several key chromatin dynamics were lost in this mutant mice. These data suggest that a specialized machinery ensures the integrity of chromatin in germ cells for proper male fertility.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：クロマチン 生殖細胞 エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

生命の歴史や記憶はゲノム上に集積する。現存するゲノムは、その種が過去に辿ってきた道程を反映するとともに、個体の一生を支え、さらに次世代へと受け継がれる。申請者は、体内で唯一、次世代へと遺伝情報が継承



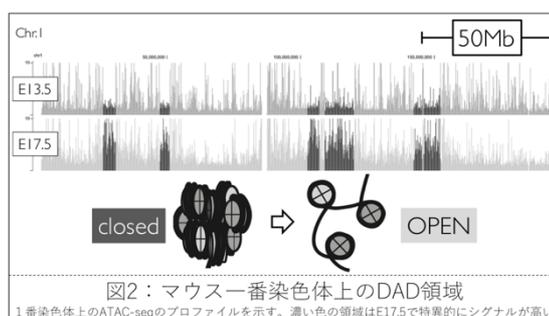
される生殖細胞を用いて「生命の記憶がクロマチン上にどのように堆積していくか」を研究する。

細胞分裂の際に、親細胞でのエピゲノム状態(DNAメチル化、ヒストン修飾)は、DNA複製の際に働く種々の経路によって娘細胞の染色体でも維持される。ゲノム上のコンパクトなクロマチン領域であるヘテロクロマチンにおいても、複製フォーク上でそのゲノムが一時的にほどかかれている。この局所的な“クロマチンの緩み”により、ヘテロクロマチン状態を維持する酵素群が娘鎖に一時的に接近できるというモデルが考えられている(Chen et al, 2008, Nature)。では、細胞周期が停止したような細胞集団ではどのようにそのエピゲノムが形成、維持されているのだろうか？

哺乳類の生活環の中でリプログラミングは二度起こる。一度目は受精卵、二度目は生殖細胞で起こる。その結果、胚盤胞と胎生13.5日目(E13.5)の生殖細胞でゲノムのメチル化レベルは基底状態となる。その後、生殖細胞では産まれるまでのおよそ7日間にメチロームが確立する(図1、網掛け)。メチローム形成は発生に必須であり、この過程に重要な働きを持つDnmt3aやDnmt3lを欠失させた個体はそれぞれ胚性致死や不稔の表現型を示す。ゴノサイトは、E13.5から生後2日目(P2)までのおよそ10日間の生殖細胞を指し、興味深いことに「最初の7日間はG1/G0期で細胞周期停止を起こす」。つまり、細胞周期が停止している期間にゲノム全体のメチロームが確立する。そこで申請者は、このゴノサイトの時期をモデルにして「S期を介さないエピゲノム形成」のメカニズムを解析する。申請者は現在までに分裂酵母を用いたヘテロクロマチン研究を行ってきた(Zofall et al, 2012, Science; Yamanaka et al, 2013, Nature)。これらの知見をもとに最終的には、「親世代のエピゲノム状態がどのように配偶子に受け渡されているか」を明らかにする。

## 2. 研究の目的

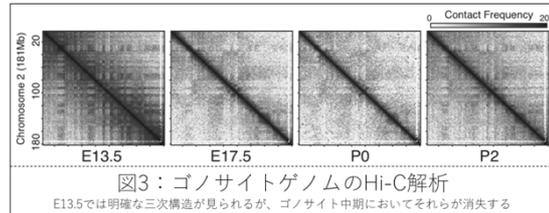
10日間に渡るゴノサイトのうち、最初の7日間に全メチロームが確立する。このDNAメチル化は、ユークロマチンだけでなくヘテロクロマチンを含む全ゲノム上で起こる。つまり、この時期のメチル化は「配列選択性」が無い。また、Dnmt3aやDnmt3lといったDNAメチル化を担う酵素群はDNA結合ドメインを持たない。



このことから、ゴノサイトで起きる新規メチル化では、DNAメチル化酵素側の活性化に加えて、ゲノム側が「メチル化を受けやすくなるような質的变化」を起こしていることが強く示唆される。

そこで我々はまず、ゴノサイトクロマチンの「弛緩の程度」を明らかにすることにした。

ATAC-seq 法によりクロマチンの“緩み具合”を非常に簡便に、少量の細胞から明らかにすることが出来る。これをゴノサイトに適用したと



ころ、産まれる数日前(E17.5)というタイミングで一過的に“開いた”クロマチン構造を取るゲノム領域を発見し、それを Differentially Accessible Domain (DAD)と名付けた(図2)。更に以下のことをこれまでに明らかにしている (Yamanaka et al., 2019, Dev.Cell)。1) DAD は体細胞ではヘテロクロマチン構造を取っているが、ゴノサイトの時期にユークロマチン化する。2) DAD 領域が緩んだ後、その領域に DNA メチル化が誘導される。3) ゴノサイトクロマチンの 3D 構造は一過的にほどかれる(図3)。以上の知見は、ゴノサイトのクロマチンが全体として緩んだ状態にあり、「S 期の複製フォーク上でゲノムがほどかれること」と本質的に類似していることを示している。そこで本研究では、このゴノサイトクロマチンのダイナミックな変化を担う因子を同定し、その生物学的意義を明らかにする。

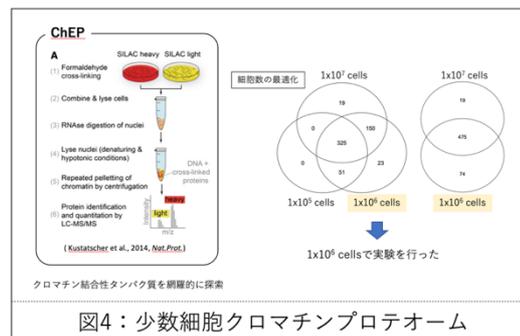
ゴノサイトは生殖細胞研究、エピゲノム研究の両方向から極めて重要な発生段階であることが以前から認識されていたが、ゴノサイトの稀少性がその解析を非常に困難なものとしてきた。胎子の精巣は E13.5 の時点で直径がおよそ 1mm 程度と非常に小さく、そこから得られるゴノサイトは 1 精巣あたり 1000 細胞程度である。申請者は次世代シーケンサをベースにした手法をさらに改良することで、少数のゴノサイトのクロマチン状態をこれまで詳細に明らかにしてきた。

ゲノムの 3D 構造は、ES 細胞と MEF 細胞など極めて異なった性質を持つ細胞群を比較した場合でも非常によく保持されている。これは、ゲノムの 3D 構造は外界の環境に応じて変化し得るような可塑的なものでなく、全ての遺伝子発現プログラムの礎となる最も堅固なものであることを示唆している。それに対して、申請者が発見したゴノサイトクロマチンの「3D 構造の緩み」はこれまでの常識を覆すものであり、当該分野へのインパクトは非常に大きい。

### 3. 研究の方法

#### ・クロマチンプロテオーム

Chromatin Proteome 法 (Kustatscher et al, 2014, Nat. Prot.) は、全ゲノムのクロマチンに結合するタンパク質を網羅的に同定する方法である。当該手法には  $1 \times 10^7$  もの細胞が必要である。しかし、ゴノサイトをこの細胞数集めることは現実的では



ない。そこで ES 細胞を用いて、この手法に供する細胞数を減らすことが、同定されるタンパク質のバラエティにどのような影響を及ぼすかを検証した。すると、 $1 \times 10^7$  細胞で実験したものと同程度の種類のタンパク質が  $1 \times 10^6$  細胞を用いた実験でも検出された。そこで、 $1 \times 10^6$  細胞のゴノサイトを用いたクロマチンプロテオームを行った (図4)。

・野生型マウス、及び KO マウスを用いた ATAC-seq, ChIP-seq, RNA-seq による解析  
生殖細胞が蛍光を発するトランスジェニックマウスを用いることでゴノサイトを単離する。このゴノサイトを ATAC-seq, ChIP-seq, RNA-seq 用にそれぞれ 5000 細胞、20000 細胞、20000 細胞単離し実験を行った。

・RNA-seq からの発現変動パターン

ゴノサイトを4つのステージ (E13.5, E16.5, P0, P3) に分割し、それぞれのステージでの RNA-seq を行う。その発現変動パターンからゴノサイトのクロマチン変換に寄与する因子群を同定する

#### 4. 研究成果

ゴノサイトを用いたクロマチンプロテオームを行った。E13.5 のゴノサイトを  $1 \times 10^6$  細胞単離することは事実上不可能であったため、P1~P3 の時期のゴノサイトを単離し、再度クロマチンプロテオームを行った。その結果、Dnmt3a, Kdm1b, Brdt, Rec8 といったクロマチンタンパク質群がゴノサイト中期に濃縮することを見出した。Brdt や Rec8 はそれぞれ成体雄マウスの減数分裂特異的に発現上昇する遺伝子群であり、ゴノサイト期にそれらの因子の発現が見られるのは意外な結果であった。そこで次に、ゴノサイトでのトランスクリプトーム解析を行った。

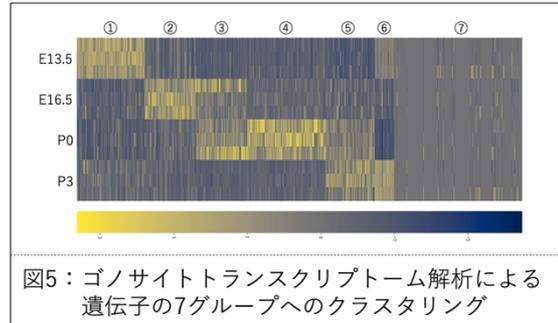


図5：ゴノサイトトランスクリプトーム解析による遺伝子の7グループへのクラスタリング

ゴノサイト発生の時系列 (E13.5, E16.5, P0, P3) に沿ったトランスクリプトームを解析したところ、ゴノサイト期の発生に伴った遺伝子群の発現ダイナミクスが明らかとなった (図5)。これら遺伝子群を発現プロファイルからクラスタリングしたところ、中でもグループ2の遺伝子群に *de novo* DNAメチル化に参与する遺伝子群が濃縮していた (図5, 図6)。グループ2

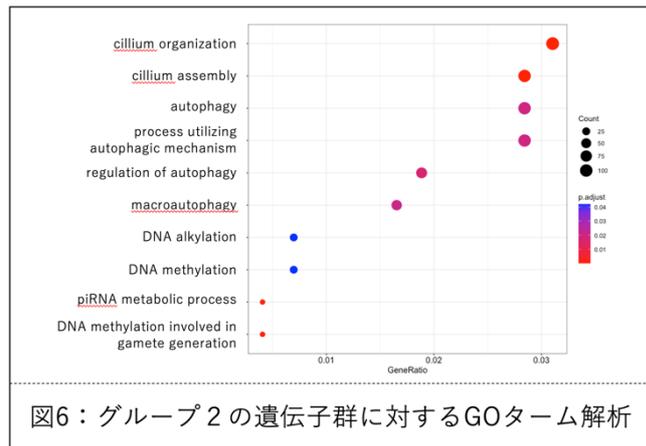


図6：グループ2の遺伝子群に対するGOターム解析

には他にも成熟精子で特異的に発現している遺伝子群や、減数分裂期に発現上昇する遺伝子群が多く見られた。以上の結果は、クロマチンプロテオームで得られた考察と同様に、成体雄マウスの減数分裂時における遺伝子発現プログラムがゴノサイトで一度顕在化することを示している。つまり、ゴノサイトという胎仔期生殖細胞において、成体精巣での発現パターンがプログラムされている可能性がある。実際、ここで得られたグループ2の遺伝子群の精子形成過程における発現変動プロファイルを確認したところ、精子形成過程の特異的タイミングでその発現が一過的に上昇していた。そこで、成体マウスにおいて生殖細胞の減数分裂過程に特異的に発現する遺

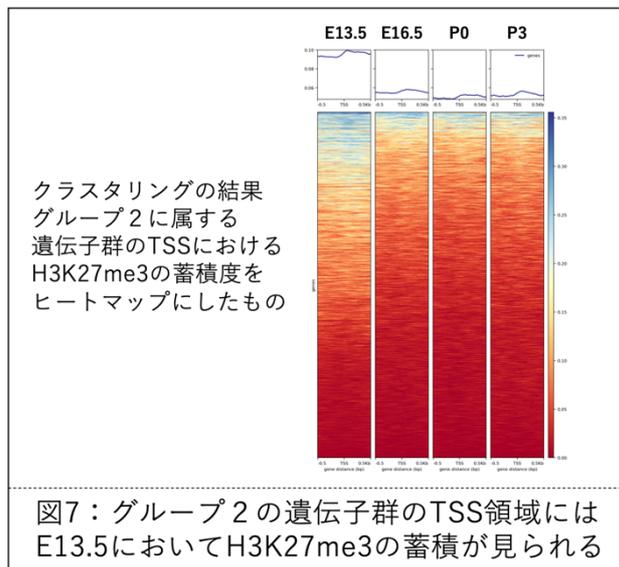


図7：グループ2の遺伝子群のTSS領域にはE13.5においてH3K27me3の蓄積が見られる

伝子の発現パターンをゴノサイトで検証したところ、3500 程度存在する減数分裂期特異的遺伝子群のうち、3300 の遺伝子が既に胎仔期に発現上昇することが見いだされた。これら遺伝子群の胎仔期における発現上昇メカニズムを解明するために、発現に抑制的に働く H3K27me3 の遺伝子上におけるパターンを検証したところ、ゴノサイト初期で高いレベルにあった H3K27me3 がゴノサイト中期にかけて減少することが見いだされた (図 7)。今後、ゴノサイト中期にかけて発現上昇する遺伝子群に関する詳細な解析を行うとともに、減数分裂開始プログラムのシグナルとしてもっとも広く知られているレチノイン酸の寄与についても解析を進める。

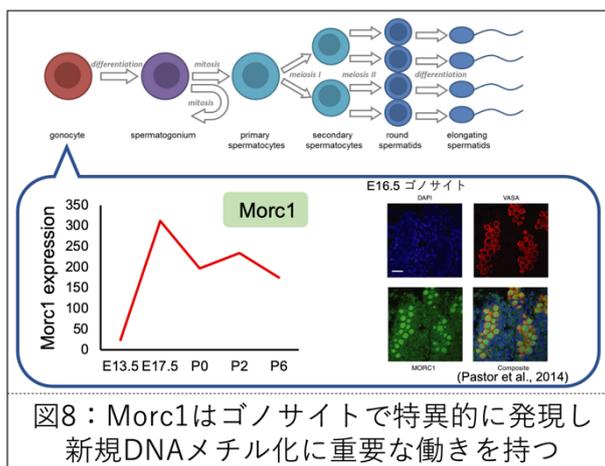


図8: Morc1はゴノサイトで特異的に発現し新規DNAメチル化に重要な働きを持つ

上記のプロテオーム、トランスクリプトーム解析から、ゴノサイトクロマチンに寄与する因子として Morc1 に着目し、その KO マウスの解析を行った。Morc1 はゴノサイト中期に発現上昇するタンパク質で、生後数日で発現が消失する。Morc1 欠損マウス個体は機能的な精子が産生されないなど、重篤な雄性不稔の表現型を示し、さらにトランスポゾン上の DNA メチル化に異常が見られる (図 8)。我々が見出したゴノサイトにおけるクロマチン弛緩はトランスポゾン領域が DNA メチル化を受けることに先立って起こる。このことから、Morc1 がゴノサイトクロマチン弛緩に与える影響を解析することとした。Morc1 KO のゴノサイトを用いて ATAC-seq を行ったところ、ゲノム上の 7000 箇所以上のトランスポゾン領域においてクロマチンアクセシビリティが上昇することが見いだされた (図 9)。

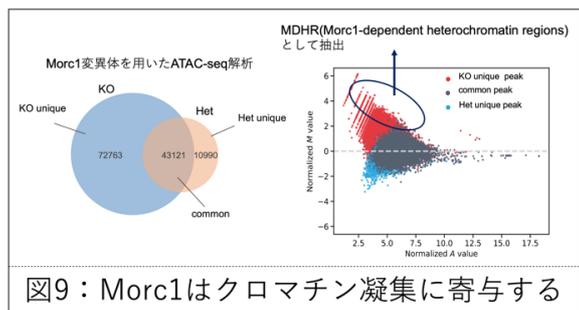


図9: Morc1はクロマチン凝集に寄与する

このことは、当初の予想に反して Morc1 はトランスポゾン領域のクロマチンを凝集させることに寄与していることを示す。さらに、Morc1 KO マウスにおいては上記のトランスポゾン上での H3K9me3 の量が減少していた (図 10)。これらの結果は、Morc1 が特定のトランスポゾンの TSS 領域に H3K9me3 を蓄積させ、その領域でのクロマチンを凝集させることに寄与することを示す。現在、Morc1 によるゴノサイトクロマチンへの影響を詳細に解析するために、Morc1 KO におけるトランスクリプトーム解析も並行して行っている。

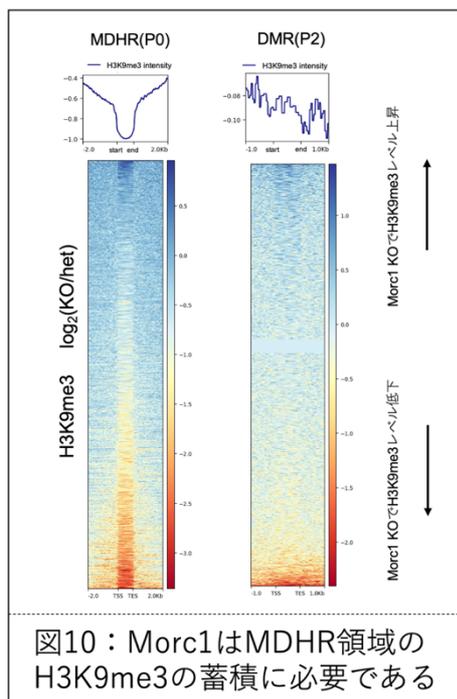


図10: Morc1はMDHR領域のH3K9me3の蓄積に必要である

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Onishi Ryo, Soichiro Yamanaka, Mikiko Siomi	4. 巻 22
2. 論文標題 piRNA- and siRNA-mediated transcriptional repression in Drosophila, mice, and yeast: new insights and biodiversity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO Report	6. 最初と最後の頁 e53062
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202153062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Chikuma Shunsuke, Yamanaka Soichiro, Nakagawa So, Ueda Mahoko Takahashi, Hayabuchi Hodaka, Tokifuji Yukiko, Kanayama Masashi, Okamura Tadashi, Arase Hisashi, Yoshimura Akihiko	4. 巻 206
2. 論文標題 TRIM28 Expression on Dendritic Cells Prevents Excessive T Cell Priming by Silencing Endogenous Retrovirus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1528 ~ 1539
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2001003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamanaka Soichiro, Nishihara Hidenori, Toh Hidehiro, Eijy Nagai Luis Augusto, Hashimoto Kosuke, Park Sung-Joon, Shibuya Aoi, Suzuki Ana Maria, Tanaka Yujiro, Nakai Kenta, Carninci Piero, Sasaki Hiroyuki, Siomi Haruhiko	4. 巻 51
2. 論文標題 Broad Heterochromatic Domains Open in Gonocyte Development Prior to De Novo DNA Methylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 21 ~ 34.e5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.devcel.2019.07.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 名取達哉、関真秀、鳴海良平、足立淳、鈴木穰、塩見美喜子、山中総一郎
2. 発表標題 ゴノサイトにおける一過的なトランスポゾン脱抑制のクロマチン基盤の解析
3. 学会等名 第93回日本遺伝学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 名取達哉、関真秀、鈴木穰、塩見美喜子、山中総一郎
2. 発表標題 ゴノサイトー過的なクロマチン弛緩を駆動する分子機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山弦、塩見美喜子、山中総一郎
2. 発表標題 ゴノサイトにおいてDNAメチル化関連因子Morc1タンパク質が担う核内動態
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 名取達哉、関真秀、鈴木穰、塩見美喜子、山中総一郎
2. 発表標題 シングルセルRNA-seq法を用いたゴノサイトにおけるクロマチン動態の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山中総一郎
2. 発表標題 マウス胎仔期生殖細胞におけるクロマチンリプログラミング
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中総一郎
2. 発表標題 シングルセルRNA-seq法を用いたゴノサイトにおけるクロマチン動態の解析
3. 学会等名 第36回染色体ワークショップ
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山中総一郎	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本生化学会	5. 総ページ数 3
3. 書名 生化学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学 生物科学専攻 塩見研究室HP  <a href="http://www-siomi lab.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/index.html">http://www-siomi lab.biochem.s.u-tokyo.ac.jp/index.html</a></p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------