

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：32701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06073・19K21196

研究課題名（和文）生命の連続性に迫る 減数分裂の開始・進行の分子機構の解明

研究課題名（英文）Establishment of germline-specific epigenome in mouse spermatogenesis

研究代表者

前澤 創（Maezawa, So）

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：90548174

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：精子形成期において、生殖細胞が分化し減数分裂期へ移行する際には、体細胞型の遺伝子発現プロファイルから生殖細胞特有の遺伝子発現プロファイルへと切り替わる。本研究では、マウス精子形成期をモデルに、生殖細胞特異的なエピゲノム変化及びクロマチン構造変化の解明を目的とした。クロマチンの開閉状態は、減数分裂期の前後においてプロモーター領域よりも遺伝子間領域で大きく変化しており、エンハンサーの活性化状態が変化していることが示唆された。活性化エンハンサーをゲノムワイドに解析した結果、生殖細胞特異的なスーパーエンハンサーを同定し、さらに、生殖細胞特異的転写因子A-MYBが、その形成に機能することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では生殖細胞特異的な遺伝子発現を制御する活性化エンハンサーの動態を解明した。また、本研究によって新規に同定されたスーパーエンハンサーによって、精子形成期後期の分化進行に重要な遺伝子が制御されていることを見出した。さらに、A-MYB依存的なスーパーエンハンサーの形成機構を明らかにした。A-MYB依存的な生殖細胞特異的な遺伝子発現は鳥類の精巣においても認められており、本研究で見出された分子機構は、進化的に保存された重要な精子形成遺伝子発現機構であると考えられる。本研究成果は、生体外での生殖細胞分化を制御する発生工学への応用や、ヒトの生殖医療の改善に役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Due to bursts in the expression of thousands of germline-specific genes, the testis has the most diverse and complex transcriptome of all organs. Much of this unique gene expression takes place when mitotic germ cells differentiate to enter into meiotic prophase. Here, analyzing the male germline of mice, we demonstrate that the genome-wide reorganization of super enhancers (SEs) drives bursts of germline gene expression after the mitosis-to-meiosis transition. At the mitosis-to-meiosis transition, mitotic SEs resolve while meiotic SEs are established. Meiotic SEs are associated with the activation of key germline genes, thereby defining the cellular identity of germ cells. This SE switching is regulated by the establishment of meiotic SEs via A-MYB (MYBL1), a key transcription factor for germline genes. Prior to entry into meiosis, meiotic SEs are preprogrammed in mitotic spermatogonia, serving to ensure the unidirectional differentiation of spermatogenesis.

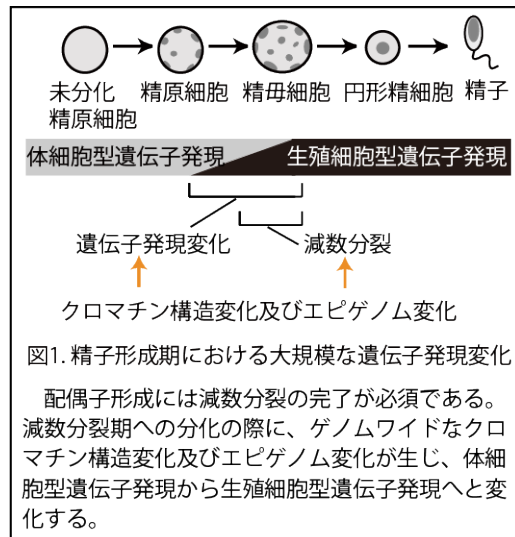
研究分野：生殖科学

キーワード：生殖細胞 エピジェネティクス クロマチン エンハンサー 精子形成 A-MYB

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精子形成期において、生殖細胞が分化し減数分裂期へ移行する際には、数千もの遺伝子発現が変化し、体細胞型の遺伝子発現プロファイルから生殖細胞特有の遺伝子発現プロファイルへと切り替わる (Hasegawa et al, *Dev Cell*, 2015)。我々はマウス精子形成期をモデルに、生殖細胞特異的なエピゲノム変化及びクロマチン構造変化によって遺伝子発現プロファイルの変化をもたらされることを明らかにした (Maezawa et al., *Genes Dev.*, 2017; *PNAS*, 2018; *J. Cell Sci.*, 2018; *Biol. Reprod.*, 2019) (図1)。興味深いことに、クロマチンの開閉状態は、減数分裂期の前後においてプロモーター領域よりも遺伝子間領域で大きく変化していた (Maezawa et al, *Nucleic Acids Res.*, 2018)。そのため、エンハンサーの活性化状態が生殖細胞特異的な遺伝子発現プロファイルの制御に機能していることが示唆されたが、詳細な分子機構は不明であった。



2. 研究の目的

本研究では、まず、マウス精子形成期における各分化段階のエンハンサー活性化状態を明らかにすることを目指した。近年、細胞の運命決定に関与する遺伝子群の発現を制御するエピゲノム機構としてスーパーエンハンサーという概念が報告されている。そこで本研究では、生殖細胞特異的なスーパーエンハンサーを同定し、その制御機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス精巣からの生殖細胞の単離

本研究では、C57BL/6N 野生型マウス、及び *A-myb* 変異マウス (*Myb11^{reproD}*) (Bolcun-Filas et al, *Development*, 2011)を用いた。精原細胞の単離では、6~8 日齢のマウスから精巣を摘出し、コラゲナーゼ及びトリプシンを用いて細胞分散処理を行った。細胞分散液を、抗 KIT 抗体融合マイクロビーズ及び抗 THY1 抗体融合マイクロビーズを用いて、autoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec)により、それぞれ分化型精原細胞及び未分化精原細胞を単離した。精母細胞及び精細胞の単離では、成体マウスから精巣を摘出し、BSA グラジエントを利用した STA-PUT 法を用いて単離した。上述の方法で単離した細胞の精製度は、分化マーカーを用いた免疫染色法にて 90%以上であることを確認した。

(2) ChIP-seq 解析及びスーパーエンハンサーの同定

単離した生殖細胞を固定し、クロマチン画分を調整し、超音波破碎により断片化した。その後、抗 H3K27ac 抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行なった。免疫沈降物を用いて、ChIPmentation 法に従い次世代シーケンシング用の DNA ライブラリを調整した。得られた ChIP-seq データを BioWardrobe Experiment Management System を用いて解析した。MACS2 を用いて H3K27ac ピーク領域を同定し、さらに ROSE (Rank Ordering of Super-Enhancers) アルゴリズム (Whyte et al, *Cell*, 2013)を用いてスーパーエンハンサーを同定した。

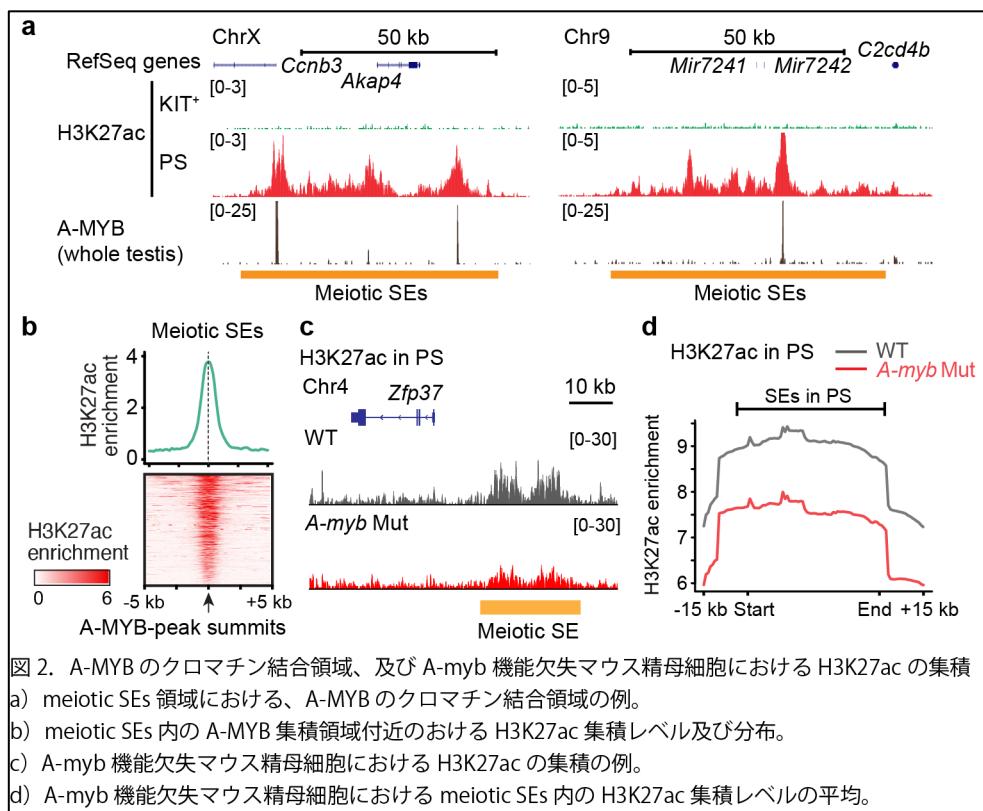
4. 研究成果

(1) マウス精子形成期における活性化型エンハンサー及びスーパーエンハンサーの同定

マウス精子形成期におけるエンハンサー活性化状態を明らかにするために、精巣から精子幹細胞を含む未分化型精原細胞、分化型精原細胞、減数分裂期の精母細胞、減数分裂の完了した円形精子細胞を単離し、活性化エンハンサーの指標であるヒストン修飾 H3K27ac のゲノムワイドな分布を ChIP-seq 法により解析した。H3K27ac の分布は、分化型精原細胞から精母細胞への分化の過程で大きく変化しており、これは体細胞型から生殖細胞特異的な遺伝子発現プロファイルへと変化する時期と一致していた。つまり、分化型精原細胞において活性化しているエンハンサーが減数分裂期への移行に伴い不活化し、一方で、精母細胞において新たなエンハンサーが活性化していることを示唆していた。また、一部の H3K27ac が局所的にクラスターを形成していたことから、スーパーエンハンサーの形成が示唆された。スーパーエンハンサーは、細胞の運命決定に関連する重要な遺伝子の近傍に見出され、それら遺伝子を強力に発現上昇させる機能を有するゲノム領域として提案されている。そこで、スーパーエンハンサーを同定するための ROSE アルゴリズムを用いて、精子形成期の各分化段階で形成されるスーパーエンハンサーを同定した。同定されたスーパーエンハンサーの分布を比較解析したところ、スーパーエンハンサーは減数分裂期の前後で大きく変化し、特に減数分裂期移行後に多くのスーパーエンハンサーが新たに形成されていることが示唆された。減数分裂期移行後に形成されたスーパーエンハンサー (meiotic SEs) の近傍には、精子形成に必須の遺伝子が存在しており、精母細胞や円形精子細胞で 10~1000 倍に発現上昇していた。すなわち、meiotic SEs が、減数分裂期移行後の特異的な遺伝子発現プロファイルの形成に機能していることが示唆された。

(2) 生殖細胞特異的転写因子 A-MYB が、meiotic SEs の形成に機能する

一般的にエンハンサー領域には標的遺伝子の発現を制御する転写因子の結合領域が含まれている。精子形成期特異的な遺伝子発現を制御する転写因子を同定するために、減数分裂期以降の特異的なエンハンサー領域に含まれる転写因子結合モチーフの探索を行なった。同定された転写因子結合モチーフの中でも最も有意な集積を示していたのが A-MYB 結合モチーフ (GGCAGTT) で

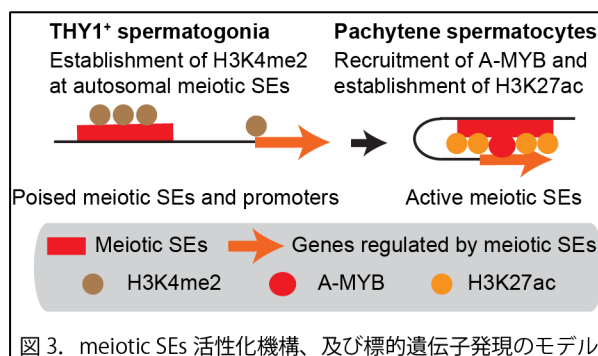


あった。これまでに、A-MYB は生殖細胞特異的な転写因子として同定されており、*A-myb* 機能欠失マウスは不妊の表現系を示す。ゲノムワイドな A-MYB な分布とエンハンサー領域との関連を検討するために、マウス精巣組織を用いた既存の A-MYB ChIP-seq データを解析し、精母細胞における活性化エンハンサー領域 (H3K27ac 分布) と比較した。その結果、A-MYB は精母細胞における活性化エンハンサー領域に局在しており、特に meiotic SEs の中央に集積していることが示された (図 2a, b)。A-MYB の集積が meiotic SEs の形成に必要であるかを検討するために、*A-myb* 機能欠失マウスの精母細胞における H3K27ac の分布を解析したところ、meiotic SEs で H3K27ac の集積が減少していることが示された (図 2c, d)。これらの結果から、A-MYB が meiotic SEs の形成に機能することが示唆された。

(3) meiotic SEs は、未分化精原細胞において準備状態にある

これまでに、減数分裂期以降の精母細胞や精細胞で発現する遺伝子群のプロモーター領域は、未分化精原細胞において RNA ポリメラーゼ II や活性化型ヒストン修飾 H3K4me2 が集積した準備状態にあることが報告されている。meiotic SEs の形成機構を明らかにするために、未分化精原細胞における meiotic SEs 領域のエピジェネティックな状態を解析したところ、H3K4me2 が集積していることが示された。meiotic SEs 領域における H3K4me2 の集積は、減数分裂期移行の精母細胞や精細胞では減少していた。また、meiotic SEs 領域以外に形成される活性化エンハンサー領域では H3K4me2 の集積はみられなかった。以上から、meiotic SEs は、未分化精原細胞において H3K4me2 の集積を伴う準備状態にあることが示唆された。

これらの結果から、meiotic SEs の標的となる精子形成関連遺伝子群は、次の(1)~(3)によって発現が制御されていると考えられる (図 3)。(1) 未分化精原細胞において meiotic SEs 領域及びプロモーター領域に H3K4me2 が集積した準備状態が形成される。(2) 減数精子形成期へ移行後に A-MYB などの転写因子が集積する。(3) H3K27ac が集積した活性化状態へ変化し、標的遺伝子の発現が誘導される。本研究では生殖細胞特異的なスーパーエンハンサーを同定し、特に A-MYB 依存的に meiotic SEs が形成されることを明らかにした。A-MYB 依存的な生殖細胞特異的遺伝子発現は鳥類の精巣においても示されていることから、MYB 依存的な meiotic SEs の形成は進化的に保存された精子形成遺伝子発現機構なのかもしれない。本研究において同定されたスーパーエンハンサーは、減数分裂期の前後で大きく変化することが示された。今後、減数分裂期へ分化が進行する過程をより詳細に解析することにより、体細胞型スーパーエンハンサーの消失及び meiotic SEs の活性化について、段階的な分子機構を解明したい。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Maezawa S, Hasegawa K, Alavattam KG, Funakoshi M, Sato T, Barski A, and Namekawa SH	4. 巻 131(17)
2. 論文標題 SCML2 promotes heterochromatin organization in late spermatogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1242/jcs.217125	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 該当する
1. 著者名 Maezawa S, Alavattam KG, Tatara M, Nagai R, Barski A, and Namekawa SH	4. 巻 100(2)
2. 論文標題 A rapidly evolved domain, the SCML2 DNA-binding (SDB) repeats, contributes to chromatin binding of mouse SCML2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol Reprod.	6. 最初と最後の頁 409-419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1093/biolre/iory181	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 該当する
1. 著者名 Alavattam KG, Maezawa S, Sakashita A, Khoury H, Barski A, Kaplan N and Namekawa SH	4. 巻 26(3)
2. 論文標題 Attenuated chromatin compartmentalization in meiosis and its maturation in sperm development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat. Struct. Mol. Bio.	6. 最初と最後の頁 175-184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s41594-019-0189-y	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 該当する
1. 著者名 Sakashita A, Maezawa S, Alavattam KG, Yukawa M, Barski A, Pavlicev M, Namekawa SH	4. 巻 in press
2. 論文標題 Endogenous retroviruses drive species-specific germline transcriptomes in mammals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat. Struct. Mol. Bio.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する

1. 著者名 Maezawa S, Sakashita A, Yukawa M, Chen X, Takahashi K, Alavattam KG, Nakata I, Weirauch MT, Barski A, and Namekawa SH	4. 巻 in press
2. 論文標題 Super-enhancer switching drives a burst in germline gene expression at the mitosis-to-meiosis transition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat. Struct. Mol. Bio.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 前澤創
2. 発表標題 マウス精子形成期におけるクロマチン構造変化による遺伝子発現制御機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前澤創
2. 発表標題 Genome-wide establishment of meiotic super-enhancers drives expression of spermatogenesis- specific genes
3. 学会等名 3R&3C Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前澤創
2. 発表標題 生命の連続性に迫るー生殖細胞のエピゲノム形成機構
3. 学会等名 形態解析ワークショップー多様な顕微鏡を用いて (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前澤創
2. 発表標題 Super-enhancer switching drives a burst in germline gene expression at the mitosis-to-meiosis transition
3. 学会等名 第13回エピジェネティクス 研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前澤創
2. 発表標題 Super-enhancer switching drives a burst in germline gene expression at the mitosis-to-meiosis transition
3. 学会等名 2019年遺伝研 研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前澤創
2. 発表標題 Super-enhancer switching drives a burst in germline gene expression at the mitosis-to-meiosis transition
3. 学会等名 EpiBio2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前澤創
2. 発表標題 Polycomb suppresses a female gene regulatory network in Sertoli cells
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 麻布大学 ヒトと動物の共生科学センター	4. 発行年 2020年
2. 出版社 大学教育出版	5. 総ページ数 164
3. 書名 動物共生科学への招待	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 協力 者	行川 賢 (Namekawa Satoshi)	シンシナティ小児病院医療センター・生殖科学部門・准教授	