

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15108

研究課題名（和文）生殖系列における内在性レトロウイルス由来エンハンサーの確立機構の解明

研究課題名（英文）Epigenetic regulation of ERV-driven enhancer in germline development

研究代表者

坂下 陽彦（Sakashita, Akihiko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：60893873

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：生物進化の過程でゲノム中に組み込まれた特定の内在性レトロウイルス（ERVs）は、精子形成過程において減数分裂期特異的に種特異的な転写活性調節を担うエンハンサーとして機能する。本課題では特にエピゲノム制御因子に着目し、マウス精子形成過程におけるERVsエンハンサーの活性調節機構を検証した。その結果、精原細胞期ではクロマチン抑制因子であるKRAB-ZFPによりERVsエンハンサーは抑制され、減数分裂への移行とともに精子形成のマスター転写制御因子であるA-MYBによって活性化され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

一般的にERVsは、転移活性による変異原性のために体細胞系列では抑制的エピゲノム修飾によって強固に抑制されている。本研究の遂行によって、精子形成過程においてはKRAB-ZFPならびにA-MYBの発現を介した宿主の緻密な制御機構によって、特定のERVsは種特異的な転写活性調節を担う減数分裂期特異的なエンハンサーとしての役割を担うことが明らかになった。現在まで、多様な生物種の精子形成過程において種特異的な遺伝子が多く発現し、受精時における異種間の交雑を防ぐことが報告されているが、本課題によって明らかにしたERVエンハンサーとその制御機構は、この精子形成特有の転写制御機構の理解に貢献する。

研究成果の概要（英文）：Endogenous retrovirus (ERV) is reminiscence of ancestral retroviral infection to host germline cells and now account for ~10% of mammalian genome. Our recent study showed that specific type of ERVs act as meiotic enhancers and drive species-specific germline transcriptomes. In this study, we investigated epigenetic regulatory machinery for ERV enhancers during mouse spermatogenesis, and found that (1) KRAB-ZFPs which exclusively expressed in spermatogonial stage, act as repressors of ERV enhancer; (2) After the mitosis-to-meiosis transition, ERVs acquire enhancer activity in a A-MYB and its binding partners-dependent manner. Besides, based on IP-MS using a A-MYB specific antibody, our current study also has provided molecular resource by which to define key factors regulating progression of spermatogenesis, with A-MYB transcription factor.

研究分野：発生生物学

キーワード：エピゲノム 精子形成 内在性レトロウイルス KRAB-Zincフィンガー A-MYB エンハンサー レトロトランスポゾン 転写制御

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

精子形成は精巣内に存在する雄性生殖細胞と支持体細胞の相互作用により維持されている。精原細胞は有糸分裂により自己複製を行い、減数分裂を経て成熟精子へと分化していく。この機構の破綻は無精子症および精上皮腫等の疾患に繋がる可能性があるため、段階的に厳密な制御を受けていなければならない。近年までに、マウス精子形成過程における網羅的な転写産物解析を通して、減数分裂期以降の後期精子形成細胞（精母細胞・円形精子）では、体細胞や精原細胞とは全く異なる特殊な遺伝子発現パターンを持つことが明らかにされている。この大規模な転写産物の変遷をもたらす制御機構については不明であったが、申請者はこれまでの研究において、生物進化の過程で宿主ゲノムに組み込まれた内在性レトロウイルス（Endogenous Retrovirus: ERV）が減数分裂期特異的に種特異的な転写活性調節を担うエンハンサーとして機能し、精子形成に必須となる近傍遺伝子群の発現を惹起することを明らかにした。しかしながら、ERV がどのように減数分裂期特異的にエンハンサー機能を獲得するか、その詳細なエピゲノム制御機構は未だ明らかにされていない。本研究では、精子形成過程において ERV の減数分裂期特異的なエンハンサー機能の獲得を可能とするクロマチン制御因子を明らかにすることを目的とし、以下の解析を実施した。

### 2. 研究の目的

本課題によって、ERV エンハンサーの抑制および活性化を担うエピゲノム制御因子群を明らかにする。先行研究に基づく、ERV の感染と共に宿主ゲノムの防御機構として進化した KRAB-Zinc フィンガー (KZFP) タンパク質が、減数分裂以前（精原細胞期）において ERVs エンハンサーを抑制し、減数分裂移行時に精子形成のマスター転写制御因子である A-MYB によってエンハンサー機能が付与される可能性が高い。従って、KZFP と A-MYB の機能および相互作用因子に着目し、ERV を介した生殖系列特異的な遺伝子発現制御機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

提案者はすでに先行研究によって、KZFP の一種である GM14326 と精子形成のマスター転写制御因子である A-MYB が ERV エンハンサー上に結合することを見出している。また、培養細胞において GM14326 および A-MYB のリコンビナントタンパク質の発現を誘導した結果、核内において相分離凝集体様の特徴的な構造体を形成することが明らかになった。このことから、GM14326 および A-MYB は自身を中心とした複合体を形成することが強く示唆され、これらのクロマチン構造因子群の相互作用によって ERV エンハンサーが構築されることが想定される。従って本研究では、抗 GM14326 ならびに抗 A-MYB 抗体を用いた免疫沈降後質量分析 (IP-MS) を実施し、GM14326 および A-MYB と共に ERV エンハンサーの活性調節を担うクロマチン制御因子群を網羅的に明らかにし、同定されたクロマチン因子群の精子形成過程における機能を検証する。

### 4. 研究成果

#### 4-1. 精原細胞期における ERVs の抑制機構の同定

上述の通り、精子形成において ERVs は減数分裂時にのみその機能を発揮することから、それ以外の時間軸では ERV を機能的に抑制する機構が存在することが想定される。申請者は、精原細胞期における ERV エンハンサーの抑制に関与する分子として、ERV の感染と共に宿主ゲノムの防御機構を担うために進化した KRAB-Zinc フィンゲータンパク質群 (KZFPs) に着目した。まず初めに、RNA-seq 法により精子形成細胞ならびに体細胞組織においてマウスゲノムがコードする全 KZFPs ( $n = 363$ ) の発現を検証した結果、85 種類の KZFPs が精原細胞特異的な発現を示すことが明らかになった (図 1a)。さらに、既報の KZFPs ChIP-seq データを用いて各 KZFP の結合領域を同定したところ、85 種類中 3 つの KZFPs 結合サイトが減数分裂期における ERV エンハンサー領域と有意にオーバーラップしていた。以上の解析結果から、これら 3 つの KZFPs が精原細胞期において ERVs エンハンサーの活性を抑えていることが強く示唆される。実際、KZFP の結合が観られる ERVs 領域のヒストン修飾状態を ChIP-seq 法により検証すると、精原細胞期においては遺伝子発現の抑制マークである H3K9me3 修飾が有意に濃縮している一方で、減数分裂期の精母細胞においては有意に活性化マークである H3K27ac 修飾が濃縮されていた。

また、先行研究において未分化生殖系列細胞であるマウス ES 細胞と体細胞系譜の代表である繊維芽細胞に、設計した siRNA を導入したところ、Gm14326 の KD により ERV エンハンサーの一つである RLTR10B/ERVs の脱抑制が観られた。このことから、体細胞系列ならびに精原細胞において、Gm14326 は ERV エンハンサーの抑制を担う可能性が極めて高い。そのため、減数分裂以降の ERV エンハンサーの活性化が生じる発生ステージにおいても Gm14326 の恒常的な発現を誘導することで ERV エンハンサーの機能が阻害されることが予想される。この仮説を実証するため、生殖系列特異的に恒常的に Gm14326 を発現する Vasa-Gm14326 トランスジェニック (Tg) マウスを作成し、ERV エンハンサーの機能阻害や精子形成の破綻が生じるかどうか検証を行った。

野生型雌マウスとの交配試験により、作製した Vasa-Gm14326 Tg 雄マウスの稔性を検証したところ、コントロール雄マウスと同等の稔性を持つことが明らかになった。また、Vasa-Gm14326 Tg 雄マウスの精巣組織切片の免疫組織学的な解析の結果、明確な精子形成の破綻は観察されなかった。しかしながら、FACS により分取した Vasa-Gm14326 Tg パキテ期精母細胞では、ERV エンハンサーを構成する一部の ERV が、減数分裂期においても抑制状態にあることが RNA-seq 解析から明らかになった。このことは、Gm14326 が ERV エンハンサーの抑制機構の一端を担っていることを示唆する。

#### 4-2. 減数分裂期における ERVs の活性化機構の同定

申請者らは先行研究によって、減数分裂期特異的に ERVs エンハンサー上に精子形成のマスター転写因子である A-MYB が結合し、近傍の生殖系遺伝子群の発現を惹起することを明らかにした。しかしながら、A-MYB の重要性を検討するため、この分子がほとんど発現していない ES 細胞において単独発現誘導したところ、予想外にも ERV エンハンサー活性化および近傍遺伝子群の発現上昇は見られなかった。このことは、A-MYB は ERV エンハンサーの構築に必須であるものの、他の相互作用因子と共役して ERV エンハンサーの活性化を担っていること示唆している。そこで本研究では、ERVs エンハンサーの活性化を担う A-MYB の共役因子を明らかにするため、免疫沈降 (IP) グレードの抗 A-MYB 抗体を作製し、IP 後質量分析により精巣組織における A-MYB 相互作用タンパク質群を網羅的に同定した (図 1b)。A-MYB の相互作用因子群には多数の転写因子が含まれており、ERVs エンハンサー領域のモチーフ解析を行ったところ、これらの転写因子の結合モチーフが濃縮されていることが明らかになった。

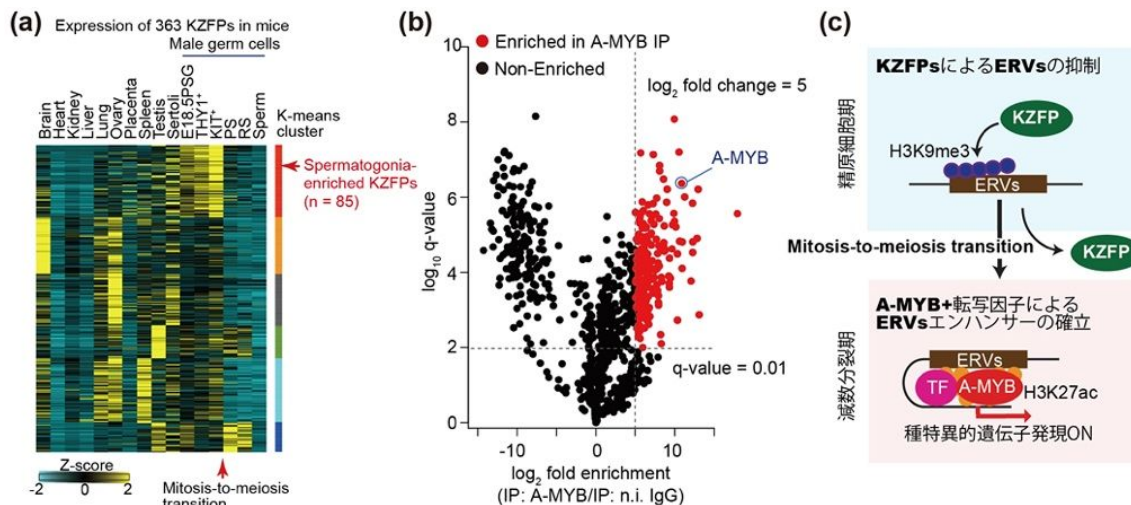


図 1. 精子形成過程における ERVs エンハンサーの活性制御機構  
 (a) 精子形成細胞、体細胞組織における KZFPs 発現解析結果。(b) 抗 A-MYB 抗体を用いた精巣における IP-MS 結果。赤丸は A-MYB IP 群で有意に濃縮されている相互作用因子を示す。(c) KZFP および A-MYB による ERVs エンハンサーの制御モデル図。

本研究の遂行により、精子形成における ERVs エンハンサー活性制御機構の一端が明らかになった (図 1c)。今後は、(2-1) (2-2) で同定した制御候補因子の Gain-of-function ならびに Loss-of-function 実験をマウス個体や培養細胞を用いて行い、真に ERVs エンハンサーの活性制御に寄与するか検証を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Zhou Shumin, Sakashita Akihiko, Yuan Shuiqiao, Namekawa Satoshi H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Retrotransposons in the Mammalian Male Germline	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sexual Development	6. 最初と最後の頁 1~19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000520683	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hada Masashi, Miura Hisashi, Tanigawa Akie, Matoba Shogo, Inoue Kimiko, Ogonuki Narumi, Hirose Michiko, Watanabe Naomi, Nakato Ryuichiro, Fujiki Katsunori, Hasegawa Ayumi, Sakashita Akihiko, Okae Hiroaki, Miura Kento, Shikata Daiki, Arima Takahiro, Shirahige Katsuhiko, Hiratani Ichiro, Ogura Atsuo	4. 巻 36
2. 論文標題 Highly rigid H3.1/H3.2-H3K9me3 domains set a barrier for cell fate reprogramming in trophoblast stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 84~102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/gad.348782.121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akihiko Sakashita, Masaru Ariura, Satoshi H. Namekawa	4. 巻 -
2. 論文標題 CRISPR-mediated activation of transposable elements in embryonic stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akihiko Sakashita, Chikara Takeuchi, So Maezawa, Satoshi H. Namekawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Bioinformatics pipelines for identification of super-enhancers and 3D chromatin contacts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shikata Daiki, Matoba Shogo, Hada Masashi, Sakashita Akihiko, Inoue Kimiko, Ogura Atsuo	4. 巻 13
2. 論文標題 Suppression of endogenous retroviral enhancers in mouse embryos derived from somatic cell nuclear transfer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	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) 10.3389/fgene.2022.1032760	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hu Mengwen, Yeh Yu-Han, Munakata Yasuhisa, Abe Hironori, Sakashita Akihiko, Maezawa So, Vidal Miguel, Koseki Haruhiko, Hunter Neil, Schultz Richard M., Namekawa Satoshi H.	4. 巻 13
2. 論文標題 PRC1-mediated epigenetic programming is required to generate the ovarian reserve	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-022-31759-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------