

令和元年5月17日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04317

研究課題名(和文) 精子形成における多機能性ゲノム配列の網羅的探索と作用機序および生理的意義

研究課題名(英文) Genome-wide identification of multi-functional dual promoter-enhancers and their physiological roles during mouse spermatogenesis

研究代表者

木村 敦 (KIMURA, Atsushi)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：90422005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：精子形成は精子のもととなる精原細胞が体細胞分裂、減数分裂、精子変態という3つのステップを経て精子になる過程である。今回我々は、減数分裂期に精子形成に不可欠な遺伝子が数多く転写活性化されるメカニズムを、ヒストン修飾と遺伝子の転写パターンの網羅解析およびレポーター解析とゲノム編集によって調べた。その結果、精原細胞が減数分裂中に一次精母細胞に分化する過程で、多機能性ゲノム配列である dual promoter-enhancer (DPE) が重要な役割を果たすことを発見した。また、long noncoding RNAの寄与についても明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

6組に1組の夫婦が不妊に悩んでいると言われるうえ、不妊の原因の半分は男性側にあるとされている現代社会において、精子形成のメカニズムを解明することは急務である。中でも減数分裂期に多くの遺伝子が転写活性化することは精子形成の正常な進行に不可欠であり、本研究はそのために必要な重要因子の1つが多機能性ゲノム配列の dual promoter-enhancerであることを示したものである。生殖生物学やゲノム生物学などの分野で重要な意義を持つと同時に、将来的には不妊の原因解明などにもつながる成果である。

研究成果の概要(英文)：Spermatogenesis is the process to generate mature sperms through three steps: mitosis, meiosis, and spermiogenesis. Here we investigated a mechanism by which many essential genes to meiosis are transcriptionally activated by genome-wide analyses of histone modifications and transcripts as well as by the reporter gene assay and genome editing. We found that a multi-functional genomic element, dual promoter-enhancer (DPE), plays important roles in transcriptional activation during meiosis. In addition, we showed the involvement of long noncoding RNAs in this transcriptional regulation.

研究分野：生殖ゲノム生物学

キーワード：ゲノム エピジェネティクス 精子形成 遺伝子発現調節 dual promoter-enhancer long noncoding RNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精子形成は、有糸分裂によって増殖した精原細胞が減数分裂を行って精細胞となり、精子変態によって精子になる一連の過程のことである。精子形成では多くの遺伝子が特異的に転写活性化されて機能を発揮することが重要であり、減数分裂中の一次精母細胞の時期には特に重要な遺伝子が転写活性化される。しかし、その転写活性化の分子メカニズムは理解が進んでいなかった。

我々はマウスの一次精母細胞で特異的に転写活性化される *Tcam1* 遺伝子の研究によって、この時期の転写活性化に dual promoter-enhancer (DPE) と呼ばれる多機能性ゲノム配列が機能することを発見した()。DPE とはプロモーターとエンハンサーの活性を併せ持つゲノム配列のことで、我々が発見した DPE は、マウスの精母細胞において *Tcam1* 遺伝子のエンハンサーとして機能すると同時に *Smarca2* 遺伝子と *lncRNA-Tcam1* を駆動する両方向性のプロモーターとしても機能するものだった。同様の配列がヒトでも存在することなどから() この時期の転写活性化にはより多くの DPE が機能していることが推測された。

2. 研究の目的

本研究の大目標は、精子形成で起きる特異的な遺伝子の転写活性化メカニズムを明らかにすることである。上述した背景にもとづいて、マウスの精子形成において一次精母細胞期の転写活性化に多くの DPE が機能している、という仮説の検証を行い、さらには DPE の作用機序や DPE 以外の転写活性化因子についても解析を行った。これにより、精子形成メカニズムの一端を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

我々の研究によるとマウス精巣生殖細胞の DPE はモノメチル化ヒストン H3 リジン 4 (H3K4me1) とトリメチル化ヒストン H3 リジン 4 (H3K4me3) という 2 つのヒストン修飾を同時に受けているクロマチン領域であった()。そこで、本研究ではクロマチン免疫沈降と次世代シーケンサーによる DNA 配列決定 (ChIP-seq 解析) を行って、H3K4me1 と H3K4me3 の両方でマークされたクロマチン領域を網羅的に同定した。同時に RNA-seq 解析も行って、転写活性化されている遺伝子の同定も行った。

解析に用いたサンプルはマウス精巣から単離した精原細胞と一次精母細胞およびマウス精母細胞由来の細胞株である GC-2spd(ts)細胞であった。精原細胞は生後 7~8 日齢のマウス精巣から他研究室によって確立された方法によって単離した()。一方、一次精母細胞は、我々が確立した方法によって成体マウスの精巣からセルソーターを用いて単離した()。

同定した DPE のいくつかの配列をクローニングしてその DPE 活性を検証した。つまり、DPE 配列を直接ルシフェラーゼ遺伝子につないだコンストラクトを用いたレポーター解析によってプロモーター活性を検証し、TK (Thymidine Kinase) プロモーターで駆動されるルシフェラーゼ遺伝子の下流に DPE 配列をつないだコンストラクトを用いたレポーター解析によってエンハンサー活性を検証した。さらに、ゲノム編集技術を用いて GC-2spd(ts)細胞内で DPE 配列を削った時の周辺遺伝子の発現も検証した。

今回の網羅解析では、我々がすでに同定済みである *Tcam1* 遺伝子座の DPE ももちろん検出された。そこで、この DPE 配列の一部を削ったコンストラクトシリーズを作成してレポーター解析を行うことで DPE 活性を担うコア配列の同定を行い、ノックダウンを組み合わせることで DPE 活性に関わる転写因子の同定も行った。

DPE 以外の転写活性化因子としては long noncoding RNA (lncRNA) に注目した。*Tcam1* 遺伝子座において DPE が調節する遺伝子の 1 つが *lncRNA-Tcam1* であったため、まずはその機能解析を行った。この lncRNA が精母細胞の核に局在することから *lncRNA-Tcam1* の過剰発現によって誘導される遺伝子を RNA-seq 解析などによって同定した。また、精巣特異的遺伝子が 6 つ並ぶ 9 番染色体上の *Prss/Tessp* 遺伝子座でも一次精母細胞で転写活性化を担う可能性のある lncRNA を 2 つ同定したので、それらの発現パターンと機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) サンプルの収集

生後 7~8 週齢のオスマウスより合計 68 個の精巣を単離して $4\sim 6 \times 10^5$ 個の精原細胞を得ることに成功した。生細胞の割合は 7 割程度だった。一方、生後 2~6 ヶ月のオスマウス 9 匹 (精巣 18 個) からはセルソーターを用いて 3×10^6 個の一次精母細胞を得た。蛍光顕微鏡による核の観察の結果、この一次精母細胞分画は 85%以上の純度であった。GC-2spd(ts)細胞は 6 cm ディッシュで培養したものを網羅解析に用いた。RNA-seq 解析の結果、精原細胞と一次精母細胞ではそれぞれのマーカー遺伝子が複数高いレベルで発現していることが確認された。精原細胞ではいくつかの体細胞マーカー遺伝子の発現も検出され、一次精母細胞では (精細胞マーカーの) *Prrm1* の発現が検出されたものの、今回用いたサンプルは概ね高い純度であることが確認された。GC-2spd(ts)細胞については、多くの精母細胞特異的遺伝子が発現していなかったことから、減数分裂中の細胞としての性質を失いつつあると推測されたが、それでもいくつかのマーカー遺伝子の発現は見られたため、現状では依然として最適な精母細胞のモデルであると言える。

(2) H3K4me1 と H3K4me3 の両方でマークされた配列の解析

ChIP-seq 解析の結果、得られたピークの数には次の通りであった。H3K4me1 ピークは、精原細胞で 13077 ケ所、一次精母細胞で 9286 ケ所、GC-2spd(ts)細胞で 47209 ケ所であった。H3K4me3 ピークは、精原細胞で 2995 ケ所、一次精母細胞で 3036 ケ所、GC-2spd(ts)細胞で 34872 ケ所であった。そして、これらのデータを合わせたところ、H3K4me1 と H3K4me3 の両方でマークされたゲノム領域の数が、精原細胞で 178 ケ所、一次精母細胞で 231 ケ所、GC-2spd(ts)細胞で 12048 ケ所あることがわかった。一次精母細胞で検出されたものの中には、我々がすでに報告済みの *Tcam1* 遺伝子座の DPE も含まれていたことから、実験はうまくいったものと判断した。しかし、これらのゲノム配列の多くが、遺伝子から離れた領域に位置していた。

我々は検出されたこれらの配列から、ピークの高さが特に高かった 3 つのゲノム配列をクローニングして、その DPE 活性を調べた。GC-2spd(ts)細胞を用いたレポーター解析の結果、これらは 3 つとも極めて低いプロモーター活性を示し、1 つのみが TK プロモーターに対する有意なエンハンサー活性を示した。また、これら 3 つの配列に隣接する領域が転写されているか精巢を用いた RT-PCR によって調べたところ、いずれも転写されていないことがわかった。したがって、ここで検出した多くの配列は DPE ではなく単なるエンハンサーとして機能するものであることが推測された。

(3) 発現している遺伝子すぐ上流の H3K4me1 でマークされた配列の解析

我々は新たな DPE 配列候補として、転写されている遺伝子のすぐ上流に位置する H3K4me1 ピークを解析することにした。ChIP-seq 解析と RNA-seq 解析のデータから、活性化されている遺伝子の転写開始点から 500 塩基以内にある H3K4me1 ピークを選択した。その結果、精原細胞では 526 ケ所、一次精母細胞では 4496 ケ所、GC-2spd(ts)細胞では 121 ケ所が検出された。

これら新たな DPE 候補配列から 11 ケ所の配列をクローニングして、その DPE 活性を検証した。GC-2spd(ts)細胞を用いたレポーター解析の結果、程度に差はあるものの 11 個すべての配列がコントロールよりも高いプロモーター活性を示し、6 個が TK プロモーターに対して有意なエンハンサー活性を示した。そこで、これらのうち 2 つの遺伝子座について DPE 配列を Crispr/Cas9 システムを用いたゲノム編集によって GC-2spd(ts)細胞のゲノムから削った細胞クローンを作成した。そして定量的 RT-PCR によって解析したところ、いずれの細胞でも DPE 配列すぐ下流の遺伝子の発現が低下し、1 つの遺伝子座では隣接する別な遺伝子の発現も低下した。したがって、これらの配列はいずれも GC-2spd(ts)細胞でプロモーターとして機能しており、エンハンサーとしても機能しているものと考えられる。

以上の結果から、活性化された遺伝子すぐ上流の H3K4me1 でマークされたゲノム領域は DPE として機能する配列であると考えられる。その数は、精原細胞から一次精母細胞にかけて 8.5 倍も増えていることから、多機能性ゲノム配列 DPE が精子形成において減数分裂期の転写活性化に極めて重要な機能を果たすものであると結論される。

(4) *Tcam1* 遺伝子座の DPE の作用機序

では、一次精母細胞で機能する DPE はどのようなメカニズムでプロモーター活性とエンハンサー活性を同時に発揮するのだろうか。我々は、最初に同定した DPE であり上述の網羅解析でも検出された *Tcam1* 遺伝子座の DPE 配列を用いて、その作用機序の解析を行った。

この DPE は 274 塩基の GC リッチな配列であるが、ここではエンハンサー活性とプロモーター活性を担うコア配列の同定を行った。具体的には、この DPE を上流から順に 20 塩基ずつ削った配列を作成して、その DPE 活性を GC-2spd(ts)細胞を用いたレポーター解析によって調べた。その結果、上流から 161 ~ 180 番目の塩基を削った際にエンハンサー活性が有意に減少し、181 ~ 220 番目の配列を削った際にプロモーター活性が有意に減少した。そこで、この連続した 60 塩基をまるごと削った場合と、別な配列に置換した場合の DPE 活性を調べたところ、エンハンサー活性は最大 50% 程度、プロモーター活性は最大 95% 程度減少することがわかった。つまり、この DPE のコア配列は 161 ~ 220 番目にある 60 塩基の配列であることがわかった。

次に、この 60 塩基に結合する転写因子を検索したところ 37 個の転写因子が同定された。これらの転写因子について他種における DPE 配列への結合ポテンシャルを比較し、精原細胞、一次精母細胞、GC-2spd(ts)細胞における発現を定量的 RT-PCR で調べた結果、13 個に絞り込むことができた。これらのうち、精巢における機能が示唆されている ARNT と E2F5 について shRNA によるノックダウンを行ったところ、GC-2spd(ts)細胞において効率よく発現を減少させることができた。この時の DPE 活性をレポーター解析によって調べたところ、エンハンサー活性はいずれの転写因子のノックダウンによっても影響を受けなかった一方で、プロモーター活性は ARNT のノックダウンによって有意に減少した。したがって、*Tcam1* 遺伝子座の DPE では ARNT がそのプロモーター活性に寄与すると考えられる。このことは、1 つの DPE でもプロモーター活性とエンハンサー活性を担う転写因子の構成が異なることを示唆しており、DPE には複数の転写因子が関与することを示している。

(5) lncRNA による転写活性化について

精巢はさまざまな組織の中でも特にたくさんの lncRNA を発現するが()、機能解析は始まったばかりである。我々は、減数分裂中の転写活性化に機能する DPE 以外の因子として精巢 lncRNA の解析を行った。まずは *Tcam1* 遺伝子座に存在する *lncRNA-Tcam1* を調べた。この lncRNA は一次精母細胞の核に多く存在することから、この時期の転写活性化に関わること

が予想された。我々は、すでに樹立していた *lncRNA-Tcam1* 過剰発現細胞を用いて RNA-seq 解析を行い、この *lncRNA* の発現によって誘導される遺伝子を探索した。その結果、26 遺伝子が検出されたが、これらを他の過剰発現細胞クローンでの発現解析、精巣での発現解析、Tet-Off 誘導系での発現誘導の再現実験によって絞り込んだところ、6 つの免疫関連遺伝子が選択された。したがって、*lncRNA-Tcam1* は精巣で免疫防御を増強するための因子であると考えられる。

次に、精子形成に特に重要であると考えられるマウス 9 番染色体上の *Prss/Tessp* 遺伝子座に注目した。この遺伝子座には精巣特異的なプロテアーゼ遺伝子が 6 つも存在していて機能的重要性が明らかであるうえ、遺伝子間の転写も盛んであった。我々はこの領域から 2 つの新規な精巣特異的 *lncRNA* を発見し、それぞれ *lncRNA-HSVIII* と *Tesra* と名づけた。*lncRNA-HSVIII* は減数分裂過程で核局在から細胞質局在へと変化することがわかったものの、その機能を明らかにすることはできなかった。しかし、*lncRNA-HSVIII* すぐ下流の領域が *Prss42/Tessp-2* 遺伝子のエンハンサーとして機能することがわかった。一方、*Tesra* も一次精母細胞の核に多く存在することからその転写調節活性を調べたところ、やはり *Prss42/Tessp-2* 遺伝子を転写活性化することができ、実際に *Tesra* 転写産物がこの遺伝子のプロモーター領域に結合していることがわかった。以上のことから、減数分裂の進行に不可欠であると考えられている *Prss42/Tessp-2* 遺伝子は 1 つのエンハンサーと 1 つの *lncRNA* (*Tesra*) によって協働的に転写活性化されることが判明した。

(6) まとめ

本研究では、マウスの精子形成において一次精母細胞期の転写活性化に多くの DPE が機能している、という仮説を概ね支持する結果を得ることに成功し、その DPE 活性の発揮には複数の転写因子による調節が必要であることも示唆された。さらには DPE 以外の因子として *lncRNA* が精子形成中の転写活性化に重要な役割を果たす可能性が示された。これらの成果はいずれも精子形成のメカニズムを解明することに大きく近づくものであり、生殖生物学、ゲノム生物学、RNA 機能学などの分野において重要な意義を持つものである。

< 引用文献 >

- Kurihara *et al.* (2014) *J. Mol. Biol.* 426: 3069-3093.
Kurihara and Kimura (2015) *FEBS Lett.* 589: 540-547.
Zhang *et al.* (2011) *Development* 138: 3159-3168.
Yoneda *et al.* (2013) *Biol. Reprod.* 88: 118.
Necsulea *et al.* (2014) *Nature* 505: 635-640.
Washietl *et al.* (2014) *Genome Res.* 24: 616-628.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- Satoh Y., Takei N., Kawamura S., Takahashi N., Kotani T., and Kimura A.P. (2019) A novel testis-specific long noncoding RNA, *Tesra*, activates the *Prss42/Tessp-2* gene during mouse spermatogenesis. *Biology of Reproduction* 100: 833-848 【査読有・オープンアクセス】
木村敦, 佐藤優衣, 丸山優樹 (2018) マウス精巣減数分裂過程の一次精母細胞における転写活性化機構. 比較内分泌学 第 44 巻 164 号, p58-62 【査読無】
Kurihara M., Otsuka K., Matsubara S., Shiraiishi A., Satake H., and Kimura A.P. (2017) A testis-specific long noncoding RNA, *lncRNA-Tcam1*, regulates immune-related genes in mouse male germ cells. *Frontiers in Endocrinology* 8: 299 【査読有・オープンアクセス】
Yoneda R.*, Satoh Y.*, Yoshida I., Kawamura S., Kotani T., and Kimura A.P. (2016) A genomic region transcribed into a long noncoding RNA interacts with the *Prss42/Tessp-2* promoter in spermatocytes during mouse spermatogenesis, and its flanking sequences can function as enhancers. *Molecular Reproduction and Development* 83: 541-557 (*equal contribution) 【査読有・表紙に採用・Top-cited recent MRD Articles にリストアップ】

[学会発表] (計 12 件)

- 佐藤優衣、武井夏海、川村翔平、高橋伸彦、小谷友也、山本雄広、渡辺健宏、松原伸、佐竹炎、木村敦「マウス精巣特異的 *lncRNA Tesra* の発現パターンと転写活性化における機能」第 41 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜、2018 年 11 月 28 ~ 30 日)
酒井友里、酒井義岳、佐藤優衣、木村敦「マウス精母細胞で機能する dual promoter-enhancer の作用メカニズム」第 41 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜、2018 年 11 月 28 ~ 30 日)
Bandara A.M.T.K., Matsubara S., Shiraiishi A., Satake H., and Kimura A.P. 「Transcriptional regulation by genome regions with H3K4me1 and H3K4me3 marks in mouse spermatocytes」第 43 回日本比較内分泌学会大会 (東北大学青葉山コモンズ、2018 年 11 月 10 日)
木村敦「マウス精子形成の一次精母細胞における転写活性化メカニズム」日本動物学会第 89 回大会シンポジウム: 第 8 回ホメオスタシスバイオロジーシンポジウム「脊椎動物の配偶子形成における恒常性維持のための転写・翻訳調節」(札幌コンベンションセンター、2018 年 9 月 15 日)【招待講演】
佐藤優衣、武井夏海、川村翔平、小谷友也、木村敦「*lncRNA Tesra* によるマウス精母細胞

特異的 *Tessp-2* 遺伝子の転写活性化機構の解析」第 40 回日本分子生物学会年会 ConBio2017 (神戸ポートアイランド、2017 年 12 月 6~9 日)

酒井友里、酒井義岳、佐藤優衣、木村敦「マウスの精子形成で機能する dual promoter-enhancer のコア配列の同定」日本動物学会第 88 回大会 (富山県民会館、2017 年 9 月 23 日)

Otsuka K., Kurihara M., Matsubara S., Shiraiishi A., Satake H., and Kimura A.P. “Mouse testicular germ cell-specific *lncRNA-Tcam1* can activate interferon-related genes” 50th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (Marriot Wardman Park, Washington D.C., U.S.A., July 15, 2017)

Satoh Y., Yoneda R., Yoshida I., Kawamura S., Kotani T., and Kimura A.P. “A regulatory mechanism to activate the mouse spermatocyte-specific *Prss42/Tessp-2* gene” 50th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (Marriot Wardman Park, Washington D.C., U.S.A., July 15, 2017)

酒井義岳、酒井友里、佐藤優衣、木村敦「マウス精巣における dual promoter-enhancer のエンハンサーコア配列の同定とヒトゲノム配列との比較」第 41 回日本比較内分泌学会大会 (北里大学相模原キャンパス、2016 年 12 月 10 日)

大塚海、栗原美寿々、松原伸、白石慧、佐竹炎、木村敦「マウス精巣生殖細胞特異的な *lncRNA-Tcam1* が調節する標的遺伝子の同定」第 39 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜、2016 年 11 月 30 日)

木村敦「マウス精子形成において特異的に転写される長鎖非コード RNA による遺伝子活性化 / Gene activation by long noncoding RNAs specifically transcribed during mouse spermatogenesis」BMB2015 ワークショップ: 長鎖非コード RNA のフロンティア: 生化学、分子生物学、医学からのアプローチ (神戸ポートアイランド、2015 年 12 月 2 日)【招待講演】

佐藤優衣、米田竜馬、吉田郁也、木村敦「マウス精母細胞における *Tessp-2* 遺伝子の転写活性化機構 / Transcriptional activation of the *Tessp-2* gene in mouse spermatocytes」BMB2015 (神戸ポートアイランド、2015 年 12 月 1 日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：佐竹 炎

ローマ字氏名：SATAKE Honoo

所属研究機関名：公益財団法人サントリー生命科学財団

部局名：生物有機化学研究所

職名：主幹研究員

研究者番号 (8 桁)：20280688

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：松原 伸

ローマ字氏名：MATSUBARA Shin

研究協力者氏名：白石 慧

ローマ字氏名：SHIRAIISHI Akira

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。