

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20062014

研究課題名（和文） 精細胞形成過程における性染色体不活性化のエピジェネティック制御メカニズム

研究課題名（英文） Epigenetic regulation of mammalian spermatogenesis

研究代表者

古関 明彦 (KOSEKI HARUHIKO)

独立行政法人理化学研究所・免疫器官形成研究グループ・グループディレクター

研究者番号：40225446

研究成果の概要（和文）：

精子形成過程でおこる減数分裂と精子細胞分化は、様々なヒストン修飾の変化を伴う。ここでは、減数分裂前期に起こる傍セントロメア領域で起こるヒストン H3K9 メチル化、ポリコム群による H2A モノユビキチン化、セントロメアの凝集テロメアを核膜に結合させることで相同染色体の対合を促進することを示した。一方、ヒストン高アセチル化は、酵母ピッコロ複合体のオルソログによって媒介され、ヒストンから TP への置換を促進することで、精子細胞の成熟に必須であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Although it is well accepted that spermatogenesis and spermiogenesis are accompanied by sequential changes of chemical modifications of histone tails, their biological impacts and underlying mechanisms are poorly understood until now. In this study, we focus on the role of H3K9 methylation and H2A monoubiquitination mediated by Polycomb complexes during meiotic prophase and histone hyperacetylation in round spermatids. We found H3K9 methylation and its recognition played critical role to regulate centromere dynamics and chromosome pairing. Polycomb turned out to possess distinct labor for chromosome pairing by promoting telomere/nuclear envelope interaction. We finally demonstrated mammalian ortholog of yeast piccolo complexes were essential for global histone hyperacetylation in round spermatids and for histone/TP replacement.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	15,800,000	0	15,800,000
2009年度	23,700,000	0	23,700,000
2010年度	23,700,000	0	23,700,000
2011年度	19,700,000	0	19,700,000
2012年度	19,700,000	0	19,700,000
総計	102,600,000	0	102,600,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：マウス、精子形成、減数分裂、ヘテロクロマチン、セントロメア、ヒストン修飾、ポリコム群

1. 研究開始当初の背景

精子形成における減数分裂は、分裂前期

(prophase)に2つのチェックポイント制御を受けると考えられている。ひとつは、常染色

体あるいは性染色体の偽常染色体領域 (Pseudoautosomal region; PAR)における相同領域のペアリングと相同組換えをモニターするシステムである。一方、性染色体や転移を伴う染色体など非相同領域にもかかわらず対合し分離する染色体では、異なるメカニズムが用いられている。対合しえなかった染色体は、ヘテロクロマチンに特有のクロマチン修飾を受け、そこでは転写は不活性化される (Meiotic sex chromosome inactivation; MSCI, または Meiotic unsynapsed chromosome inactivation; MUSC)。通常、パキテン期にこれらのチェックポイントは作用する (パキテンチェックポイント) し、これらの過程が正常に行われ得なかった精細胞は、アポトーシクに排除されると考えられている。

性染色体における減数分裂前期から減数分裂期にかけておこるヘテロクロマチン構造は XY 体として光顕的にされる。XY 体におけるクロマチン構造は必ずしも定常的なものではなく、細胞周期の進行に伴ってダイナミックに変換していくことが最近示されてきた。リン酸化ヒストン H2AX (γ H2AX)あるいはモノユビキチン化 H2A (uH2A)による修飾、アセチル化ヒストン H3 や RNA ポリメラーゼ II (PolII)の排除は、パキテン期を通じて観察される一方、リシン 9 (K9)や-4 (K4)をメチル化されたヒストン H3 などは、パキテン期の後期に初めて蓄積が観察される。最近我々は、クロマチン修飾因子であるポリコム群の性染色体への結合はパキテン期にダイナミックに変遷するだけでなく、それが XY 体のクロマチン構造の変換に寄与していることを明らかにしてきた (高田・古関、投稿中)。

ポリコム群タンパクは、クロマチン上にタンパク複合体を領域特異的に構成し、形態形成、転写制御、細胞周期などに寄与する遺伝子群の転写調節を行う。ポリコム群は、少なくとも 2 種類の複合体 (Polycomb Repressive Complex 1; PRC1 と -2; PRC2) を形成する。一般的に体細胞では、PRC2 によって K27 がトリメチル化されたヒストン H3 が PRC1 の集積を促し、PRC1 によるヒストン H2A のモノユビキチン化が転写抑制を行うと考えられている。XY 体が形成されると、PRC2 とトリメチル化ヒストン H3K27 は XY 体から排除され、Ring1B を除く PRC1 はパキテン期の後半になると同様に XY 体から排除される。ポリコム群タンパクのひとつである Scmh1 を欠損したマウスでは、パキテン期後半における PRC1 と PRC2 の XY 体からの排除がおこりえなくなり、その結果として減数分裂に向けての XY 体のクロマチン構造変換が障害される。Scmh1 変異マウスを PRC1 の構成成分である Phc2 を欠損したマウスと交配すると、Scmh1 欠損による精子形成異常や XY 体での

障害がキャンセルされたことから、Scmh1 は PRC1 の構成成分であるにもかかわらず XY 体においては拮抗的に作用することが遺伝学的に示された。最も有力な作業仮説は、Scmh1 は PRC1 の XY 体からの排除を媒介する制御サブユニットであり、その排除が XY 体の機能的な成熟に必要であるということである。

2. 研究の目的

本研究では、精子形成期減数分裂前期に現れる XY 体におけるポリコム群の機能とその発現メカニズムを明らかにすることを目的としている。我々の今までの研究から、XY 体においてポリコム群は、ヒストン H2A モノユビキチン化の E3 リガーゼとして機能しうることと、パキテン期の進行に伴うポリコム群の XY 体からの排除が精子形成に不可欠であることを示してきた。これらの発見を基盤として、本研究では、特に、①XY 体におけるヒストン H2A モノユビキチン化の意義とその制御メカニズムの解明と、②Scmh1 による XY 体からのポリコム群排除の意義とその分子メカニズムの解明を目指す。①については、E3 リガーゼとして同定されている Ring1B と Ring1A の変異マウスを用いて、XY 体におけるヒストン H2A モノユビキチン化にこれらが必須であるか否かを明らかにする。また、そうであった場合、ヒストン H2A モノユビキチン化が XY 体の維持に必要なものであるのか、また、MSCI に必要であるのかを明らかにする。②については、パキテン期後期にポリコム群が XY 体から排除されると時期にヒストン H3-K9 のメチル化が XY 体においておこる。ポリコム群の排除が H3-K9 メチル化に必要なプロセスであるのか、また、H3-K9 メチル化は精子形成に必要なものであるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ヒストン H3K9 メチル化を媒介する Suv39、G9a、それらを認識する HP1g を欠損するマウスを用いて、ヒストン H3K9 メチル化が、どのように減数分裂に寄与するのかを明らかにする。
- (2) 減数分裂後におこる精子形成過程におこるヒストンアセチル化のメカニズムを明らかにし、その生物学的意義を明らかにする。
- (3) PRC1 の触媒サブユニットである Ring1A と Ring1B を減数分裂初期にノックアウトし、減数分裂へのインパクトを明らかにし、さらにその制御メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

- (1) ヒストン H3K9 メチル化を介した相同染色体対合制御メカニズムの解明

セントロメアは、有糸分裂だけでなく減数分裂にあたって重要な機能を果たす。減数分裂前期における相同染色体同士のペアリングは、セントロメアあるいは傍セントロメアヘテロクロマチン (PCH) の会合を介して開始されると考えられている。この会合が十分におこらないと、それに引き続く対合と組み換えもおこらないことがヒストン H3K9 トリメチル化酵素である *Suvh1/h2* 欠損マウスを用いた解析から示された。このことから、PCH における H3K9 トリメチル化は、ペアリングに必須であることが示された。しかしながら、H3K9 トリメチル化がどのように読み取られるのかは未知であった。ヘテロクロマチンタンパク-1 (HP1 γ) は、体細胞セントロメアのヘテロクロマチン領域に局在するタンパクとして同定されたものであるが、減数分裂前期を通じて PCH に局在する。HP1 γ を欠損したマウスは雌雄ともに不妊となるが、その過程ではパキテン期における不十分な対合や異常な対合がおこる。また、HP1 γ はヒストン H3K9 のトリメチル化を認識し、それを H3K9 ジメチル化に変換するのに必要なことが明らかになった。H3K9 のトリメチル化がおこらない変異マウスでもジメチル化がおこらない変異マウスにおいても、HP1 γ を欠損したマウスと同様の表現型が見られたことから、H3K9 トリメチル化 \rightarrow HP1 γ \rightarrow H3K9 ジメチル化が引き続いておこるカスケードが、染色体の正常な対合の維持に必要であることが明らかになった。これらの変異マウスでは、いずれもレプトテン期に起こる PCH の凝集がおこりづらくなり、相同染色体との対合も顕著に遅くなることを示した。このことは、ヒストン H3K9 メチル化を介した PCH の凝集は、相同染色体間でおこるホモロジーサーチ過程を促進する過程であることを示唆している。

(2) 精子形成過程におけるヒストンアセチル化の意義

精子の成熟は、ヒストンからプロタミンへの変換を伴い、これによって精子ゲノムは高度に凝縮される。プロタミンへの置換に先立ち、ゲノムワイドなヒストン高アセチル化、トランジションタンパク (TP) への置換が順次起こり、その後プロタミンに置換される。この過程で TP への置換が必須であることはすでに示されているが、ヒストン高アセチル化の意義は明らかにされていない。ここでは、piccolo 複合体のオルソログの機能を解析した。piccolo 複合体オルソログは、ポリコム群のひとつである Enhancer of Polycomb-1 (Epc1)、ヒストンアセチル化酵素のひとつである Tip60、DMAP1、Max などを含んでいる。

Epc1 を欠損したマウスの解析から、Epc1 は円形精子細胞でおこるヒストンの高アセチル化と、それに引き続くヒストンから TP への置換に必須の過程であることを明らかにした。この過程で Epc1 は、ヒストンアセチル化酵素のひとつである Tip60 のコファクターとして作用することを、Tip60 との共局在と Tip60 ノックアウトマウスにおける表現型の相同性から結論づけた。すなわち、円形精子細胞でおこるヒストンの高アセチル化は、酵母で見出された piccolo 複合体のホモログによって媒介され、その過程は TP \rightarrow プロタミンへの置換に必須であることを示した。

(3) 精子形成過程における PRC1 の機能発現メカニズムの解明

精子形成過程におこる性染色体 (XY 体) でおこるヒストン H2A モノユビキチン化などから、ポリコム群タンパクは、精子形成過程でも重要な役割を果たすと考えられてきたが、まだ実験的な証明は与えられていない。Stra8-CRE を用いて、Ring1 ファミリーを精母細胞特異的にノックアウトしたところ、HP1 γ と同様な対合の異常が惹起される事が示された。しかしながら、XY 体でおこるヒストン H2A モノユビキチン化は正常であること、顕著なセントロメアの異常は伴わないことが示された。しかしながら、テロメアの核膜への結合が障害されることが示された。このことは、テロメアとセントロメアは、異なるメカニズムを介して、相同染色体のペアリングを促進することを示している。

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)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Ku M, Jaffe JD, Koche RP, Rheinbay E, Endoh M, Koseki H, Carr SA, Bernstein BE. H2A.Z landscapes and dual modifications in pluripotent and multipotent stem cells underlie complex genome regulatory functions. *Genome Biol.* 13:R85 (2012) 査読有
2. Endoh M, Endo TA, Endoh T, Isono K, Sharif J, Ohara O, Toyoda T, Ito T, Eskeland R, Bickmore WA, Vidal M, Bernstein BE, Koseki H. Histone H2A Mono-Ubiquitination Is a Crucial Step to Mediate PRC1-Dependent Repression of Developmental Genes to Maintain ES Cell Identity. *PLoS Genet.* 8:e1002774 (2012) doi: 10.1371/journal.pgen.1002774 査読有
3. Hisada K, Sanchez C, Endo TA, Endoh M, Roman-Trufero M, Sharif J, Koseki H, Vidal

- M. RYBP represses endogenous retroviruses and preimplantation- and germ line-specific genes in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 32:1139-49 (2012) 査読有
4. Takada Y, Naruse C, Costa Y, Shirakawa T, Tachibana M, Sharif J, Kezuka-Shiotani F, Kakiuchi D, Masumoto H, Shinkai Y, Ohbo K, Peters AH, Turner JM, Asano M, Koseki H. HP1γ links histone methylation marks to meiotic synapsis in mice. *Development.* 138:4207-17 (2011) 査読有
 5. Casanova M, Preissner T, Cerase A, Poot R, Yamada D, Li X, Appanah R, Bezstarosti K, Demmers J, Koseki H, Brockdorff N. Polycomblike 2 facilitates the recruitment of PRC2 Polycomb group complexes to the inactive X chromosome and to target loci in embryonic stem cells. *Development.* 138:1471-82 (2011) 査読有
 6. Li X, Isono KI, Yamada D, Endo TA, Endoh M, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Otte AP, Casanova M, Kitamura H, Kamijo T, Sharif J, Ohara O, Toyada T, Bernstein BE, Brockdorff N, Koseki H. Mammalian Polycomblike Pcl2/Mtf2 is a novel regulatory component of PRC2 that can differentially modulate Polycomb activity at both the Hox gene cluster and at Cdkn2a genes. *Mol Cell Biol.* 31: 351-364 (2011) 査読有
 7. Oka A, Mita A, Takada Y, Koseki H, Shiroishi T. Reproductive isolation in hybrid mice due to spermatogenesis defects at three meiotic stages. Spermatogenic Disruptions at Three Meiotic Stages in Hybrid Males Between House Mouse Subspecies or Species. *Genetics* 186: 339-351(2010) 査読有
 8. Pereira CF, Piccolo FM, Tsubouchi T, Sauer S, Ryan NK, Bruno L, Landeira D, Santos J, Banito A, Gil J, Koseki H, Merckenschlager M, Fisher AG. ESCs require PRC2 to direct the successful reprogramming of differentiated cells toward pluripotency. *Cell Stem Cell.* 6:547-556 (2010) 査読有
 9. Majewski IJ, Ritchie ME, Phipson B, Corbin J, Pakusch M, Ebert A, Busslinger M, Koseki H, Hu Y, Smyth GK, Alexander WS, Hilton DJ, Blewitt ME. Opposing roles of polycomb repressive complexes in hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 116:731-739 (2010) 査読有
 10. Puschendorf M, Terranova R, Boutsma E, Mao X, Isono K, Brykczynska U, Kolb C, Otte AP, Koseki H, Orkin SH, van Lohuizen M, Peters AH. PRC1 and Suv39h specify parental asymmetry at constitutive heterochromatin in early mouse embryos. *Nat Genet.* 40:411-20 (2008) 査読有
- [学会発表] (計 14 件)
1. 古関明彦、Polycomb potentiates Meis2 activation in midbrain by mediating precursory interaction of promoter with tissue-specific enhance, RCAI-Michigan Joint Workshop, 2013 年 1 月 16 日、米国、アナーバー
 2. 古関明彦、Mechanisms underlying Polycomb repression、文部科学省新学術領域「細胞運命制御」、2012 年 11 月 6 日、日本、京都
 3. 古関明彦、ポリコム群の機能発現メカニズム、第 4 回シグナルネットワーク研究会、2012 年 5 月 18 日、日本、大阪
 4. 古関明彦、SAM domain-mediated polymerization of mammalian polyhomeotic homologues mediates recruitment of PRC1 to Polycomb target genes and their condensation、3rd X-inactivation meeting、2011 年 7 月 23 日、英国、オックスフォード
 5. 古関明彦、Polycomb-dependent regulation for differentiation programs of stem cells and progenitors、アジアエピゲノムワークショップ/ 第五回日本エピジェネティクス研究会、2011 年 5 月 19 日、日本、熊本市
 6. 古関明彦、Polycomb-dependent regulation for differentiation programs of stem cells and progenitors、第 16 回国際分化学会国際会議、2010 年 11 月 16 日、日本、奈良市
 7. 古関明彦、The role of Polycomb body to mediate Hox repression、東京大学分子細胞生物学研究所 核内情報研究分野 シンポジウム、2010 年 11 月 2 日、日本、東京都
 8. 古関明彦、遺伝現象におけるエピジェネティック制御とリプログラミング、第 62 回日本細胞生物学会大会、2010 年 5 月 19 日、日本、大阪市
 9. 古関明彦、HP1g links histone H3K9 methylation to homologous chromosome pairing during meiotic prophase、The Epigenetics 2009 Australian Scientific Conference@Epigenetics and Development、2009 年 12 月 2 日、オーストラリア、ブリスベン
 10. 古関明彦、ES 細胞におけるポリコム群の動き、第 42 回日本発生生物学会年会、2009 年 5 月 29 日、日本、京都
 11. 古関明彦、Histone H2A ubiquitinylation subdivides bivalent genes into PRC1-dependent and -independent domains in ES cells、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会、合同大会、

2008年12月9日

12. 古関明彦、Polycom repression mediates pluripotency of ES cells、Cold Spring Harbor Laboratory、2008年10月31日、アメリカ、ニューヨーク
13. 古関明彦、Mouse development: embryogenesis、EMBO Practical Course on Anatomy and Embryology of the Mouse、2008年9月6日、クロアチア、ザグレブ
14. 古関明彦、Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the coretranscriptional regulatory circuitry to maintain ES cell identity、Shanghai Cancer Institute、2008年7月3日、中国、上海

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古関 明彦 (KOSEKI HARUHIKO)

独立行政法人理化学研究所・免疫器官形成研究グループ・グループディレクター

研究者番号：40225446

(2) 研究分担者

柴原 慶一 (SHIBAHARA KEI-ICHI)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・准教授

研究者番号：20263098

(3) 連携研究者

高田 幸 (TAKADA YUKI)

独立行政法人理化学研究所・免疫器官形成研究グループ・研究員

研究者番号：40392013