

令和元年6月7日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15549

研究課題名(和文)精子幹細胞分化に機能する新規遺伝子の同定

研究課題名(英文)Identification of genes required for spermatogonial stem cell differentiation

研究代表者

富澤 信一(Tomizawa, Shinichi)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00704628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、精子形成を司る精子幹細胞の増殖・分化機構の理解を目指し、遺伝子発現制御機構の網羅的な解析を実施した。まず、マウスの精巣から精子幹細胞と前駆細胞をセルソーターで高純度に採取し、最先端のシングルセル解析法(M&T-seq)により、個々の細胞におけるmRNAの発現状態とDNAメチル化状態を並行して解析した。その結果、精子幹細胞集団には一定の多様性が存在し、それぞれの細胞集団において特異的に発現する遺伝子やDNAメチル化状態が存在する可能性が示された。さらに、組織学的解析とヒストン修飾解析を併せることで、精子幹細胞の分化においてヒストン修飾酵素Kmt2bが必須であることを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、正常な精子形成に欠かせない精子幹細胞の増殖・分化を司る分子機構を明らかにするものである。本研究の成果から、精子幹細胞集団の遺伝子発現制御機構に関する重要な知見が得られたと共に、ヒストン修飾酵素の一つであるKmt2bが精子形成に必要な多くの遺伝子の発現を制御し、精子幹細胞分化において重要な役割を担うことが示された。これらは、原因が明らかでない男性不妊症の研究に対して有用な情報を提供すると同時に、組織幹細胞研究分野の今後の発展に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed genome-wide transcriptome and epigenome analyses to understand the proliferation and differentiation mechanisms of spermatogonial stem cells (SSCs) in mammals. We collected mouse SSCs and progenitor spermatonia from mouse testis and analysed mRNA and DNA methylation status at the single cell level (M&T-seq). We found that SSCs are potentially heterogeneous with subpopulations showing different transcription and methylation status. Furthermore, from histological and histone modification analyses, we found that a histone methyltransferase Kmt2b plays an essential role for SSC differentiation.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス 生殖細胞 幹細胞 発生

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

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の雄の精巣内では長期にわたり精子形成が行われる。そして、その精子形成を根本から支えるのは精子幹細胞の持続的な増殖と分化である。これまでにマウスをはじめとする哺乳類の精子幹細胞において特異的に発現する遺伝子が多数同定され(de Rooij DG and Russell LD. *J Androl.* 2000 21: 776-798)、優れたマウス精子幹細胞の長期培養系も確立されてきたように(Kanatsu-Shinohara M. et al., 2003 *Biol. Reprod.* 69: 612-616)、この分野においては活発な研究が進められてきた。

精子幹細胞の維持や分化において働く多くの遺伝子を制御する上で重要であると考えられるのは、DNAメチル化、ヒストン修飾、非コードRNAなどといった、DNAの塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現を変化させる「エピジェネティック」な因子である。例えば、活性型のヒストン修飾が特定の遺伝子の制御領域に導入されると、その遺伝子が発現するようになる。しかし、多種多様なエピジェネティックな因子やそれに関わるタンパク質が存在する中で、精子幹細胞においてどの因子がどのようなタイミングで重要な働きをしているかという点に関しては、この現象の複雑さゆえ不明な点が多く残されている。

マウスの精子幹細胞が前駆細胞へ分化する際には、細胞核内に存在する染色体の高次構造やヒストン修飾などをはじめとするエピジェネティックな状態がダイナミックに変化するという現象が観察されている。具体的には、精子幹細胞が前駆細胞に分化し、c-Kit タンパク質を発現する段階になると、遺伝子発現抑制性のヒストン修飾である H3K9me2 や H3K9me3 の全体的なパターンが大きく変化し、それと同時に抑制性の染色体構造として知られるヘテロクロマチンの量が増加する。さらには、DNAメチル化の導入に必要とされる酵素である Dnmt3a タンパク質の量もこの段階から増加する(Shirakawa T. et al., *Development* 2013 140: 3565-3576)。加えて、DNAメチル化の導入に必要な別のメチル化酵素 Dnmt3b の過剰発現や、DNAメチル化維持に必要な Uhrf1 の欠損をマウスの精巣で誘導させると、正常な精子幹細胞分化が阻害される(Shirakawa T. et al., *Development* 2013 140: 3565-3576)。これらのことから、少なくとも DNAメチル化やいくつかのヒストン修飾を含む一連のエピジェネティックな制御機構は、精子幹細胞が正常に分化する上で極めて重要な役割を果たしていると考えられる。ところが、これらの因子が具体的にどのような遺伝子を介して精子幹細胞分化を制御するのか、さらにはどのようなタンパク質がこれらエピジェネティックな変化に必要なのかなど、詳細については不明な点が多い。そのため、精子幹細胞の維持や分化に関わる新たな因子の同定や、そのエピジェネティックな制御との関連を調べることが、全体的なメカニズムを解明していく上で重要であると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では精子幹細胞の分化前後の細胞の遺伝子発現の状態やゲノム全体的なエピジェネティックな状態を、次世代シーケンサーを用いた最先端の手法を活用して網羅的に解析することにより、精子幹細胞の維持や分化に必要な分子機構や、そこに重要な役割を有する遺伝子を同定することを目的とした。

これまでに我々は、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析(RNA-seq)やDNAメチル化解析(BS-seq)などから、新生仔マウスの精子幹細胞や前駆細胞において特異的に発現する遺伝子やDNAメチル化の状態を詳細に同定し、報告した(Kubo N. et al., *BMC Genomics* 2015 16:624)。しかし、これまでの通常の解析では各細胞集団を数万個以上集め、それをプールしたサンプルを用いているため、個々の細胞内における遺伝子発現の状態やエピジェネティックな状態の違いを可視化することはできなかった。ところが近年、一細胞解析技術、すなわちシングルセル解析の手法が発展したことで、様々な幹細胞集団内における不均一性の存在が明らかになってきた。そこから、精子幹細胞の集団内にも一定の不均一性が存在する可能性が考えられる。つまり、今後は個々の細胞を観察し、それぞれが分化方向に向かう際にどのような変化が生じるのか理解することが重要だと考えられる。

そこで、本研究では最先端のシングルセル解析法を用い、一つひとつの精子幹細胞や前駆細胞における遺伝子発現状態やDNAメチル化の状態を解析し、分化における新たな知見を得ることを計画した。さらに、精子幹細胞分化に関わる可能性のあるエピジェネティックな因子を選定し、その機能を詳細に調べることを試みた。精子幹細胞では数多くのエピジェネティックな因子が発現しているが、中でもヒストン修飾酵素 Kmt2b は、生後に欠損させると雄マウスが不妊になることが知られている(Glaser S. et al., *Epigenetics Chromatin* 2009 2:5)。これまでに、Kmt2b の作用がどのようにして不妊に繋がるのか、その分子メカニズムは知られていなかったが、我々は Kmt2b が精子幹細胞で発現していれば、その維持や分化に対して重要な働きを有する可能性があると考え、Kmt2b のノックアウトマウスモデルを用いてその可能性を詳細に検討することを考えた。

### 3. 研究の方法

精子幹細胞の分化に伴って細胞内で起きる変化を捉えるために、マウスの精子幹細胞や前駆細胞で発現するマーカー遺伝子(GFRa1, Ngn3, c-Kit)を指標とし、セルソーターを用いて GFRa1+/c-Kit-, Ngn3+/c-Kit- の 2 集団と、前駆細胞を含む GFRa1+/c-Kit+, Ngn3+/c-Kit+ の 2 集団の細胞を成体マウスから分取し、シングルセルソートを実施した。この実験には、

GFRa1-EGFP ノックインマウスと、Ngn3-EGFP トランスジェニックマウスを使用した。次に、採取した細胞を用い、近年開発された最先端シングルセル解析技術(scM&T-seq: Angermueller C. et al., *Nat Methods*. 2016 13:229-232.)を用い、同一のシングルセルから mRNA と DNA を分離し、それぞれからシングルセル RNA-seq ライブラリ、シングルセル BS-seq ライブラリを調整した。これを次世代シーケンサーで解析することにより、mRNA の発現と DNA メチル化パターンの変化を同時にシングルセルレベルで解析することを試みた。

一方で、Kmt2b の精子幹細胞維持や分化に対する影響を調べるために、Kmt2b のタモキシフェン誘導型の条件的ノックアウトマウスを用い(Graser S. et al., *Development* 2006 133:1423-32)、生後のマウスにおいて Kmt2b をノックアウトして精巢の組織学的解析を実施した。さらに Kmt2b の精子幹細胞における役割を効率的に調べるために、培養系精子幹細胞(GS 細胞: Kanatsu-Shinohara M. et al., 2003 *Biol. Reprod.* 69: 612-616)を新生仔マウスの精巢から樹立した。次に Kmt2b 欠損および野生型の GS 細胞から mRNA を抽出、精製し、次世代シーケンサー用ライブラリを調整した後、シーケンス解析を行った(mRNA-seq)。さらに、Kmt2b が導入することが知られているヒストン修飾 H3K4me3 が Kmt2b の欠損によりどう変化するか調べ、影響を受けた遺伝子を同定するために、上記 GS 細胞からクロマチンを抽出し、次世代シーケンサーを用いたクロマチン免疫沈降解析(ChIP-seq)を実施した。これらのデータを並行して解析することにより、Kmt2b の精子形成、中でも特に精子幹細胞における役割を調べた。

#### 4. 研究成果

これまでに、精子幹細胞を含む GFRa1+/c-Kit-, Ngn3+/c-Kit- の 2 集団と、前駆細胞を含む GFRa1+/c-Kit+, Ngn3+/c-Kit+ の 2 集団をシングルセルソートにより採取し scM&T-seq を実施したところ、mRNA の発現状態から 4 つの細胞集団が予想される分化の時系列に従った分布を示すことが確認された。さらに、既知の精子幹細胞マーカー遺伝子(GFRa1, Plzf 等)や前駆細胞マーカー遺伝子(c-Kit 等)が予測通りの時期に発現していたことから、正確なデータが得られたことが確認できた。その上で、精子幹細胞が分化する際に c-Kit の発現開始と同時に発現始める遺伝子や、c-Kit を発現する前の未分化な細胞で特異的に発現する遺伝子を新規に同定することができた。今後の解析により、遺伝子近傍の DNA メチル化の変化と遺伝子発現変化の相関性を解析し、精子幹細胞の維持や分化に関わる重要遺伝子を新たに同定することにつながる予定である。

一方で、精子形成に必須であることが示されているヒストン H3K4me3 酵素 Kmt2b が精子幹細胞の維持や分化に関わるかどうかを調べるために、ノックアウトマウスを用いて解析した結果、Kmt2b 欠損精巢内の精上皮組織では生殖細胞が顕著に減少していることが確認された。詳細に解析するために精子幹細胞マーカー Plzf や前駆細胞マーカー c-Kit を用いて免疫染色を行ったところ、Kmt2b 欠損時でも Plzf 発現細胞は残存しているものの、c-Kit 発現細胞は野生型マウスの精巢と比較して有意に減少していることが明らかになった。この結果から、Kmt2b は精子幹細胞の維持には大きな影響を与えないものの、その分化に必須な役割を有することが示唆された。次に、Kmt2b が精子形成をどのような分子機構で制御しているか解析するために、樹立した野生型および Kmt2b 欠損 GS 細胞を用いて RNA-seq とヒストン修飾の ChIP-seq を行うことで、Kmt2b がどのようなゲノム領域を標的とし、どの遺伝子に影響を与えているか調べた。その結果、RNA-seq では Kmt2b の欠損により有意に影響を受けた遺伝子は少なかったものの(25 遺伝子のみ)、H3K4me3 のレベルが有意に減少する遺伝子は 1,000 個以上存在した。これら影響を受けた遺伝子の中には、精子幹細胞分化に関与する遺伝子が含まれることが予想されたが、興味深いことに、その 1,000 個以上の遺伝子の多くは精子幹細胞期では無く、精子形成後半、あるいは胚発生に関わることが知られる遺伝子であった。そして、それら胚発生に関わる遺伝子の多くは H3K4me3 と同時に遺伝子発現抑制型の H3K27me3 をプロモーターに有する bivalent 型の遺伝子であった一方、精子形成後半に関わる遺伝子の多くは H3K27me3 を持たない monovalent 型の遺伝子であることが示された。これらの遺伝子は両方とも精子幹細胞の時期には発現レベルが低いため、Kmt2b が H3K4me3 を導入すると、何らかのメカニズムにより精子幹細胞では発現レベルを低く維持し、必要な時期(精子形成後半や受精後の胚発生期)が来ると高発現するようになるという可能性が示唆された。これらの結果より、Kmt2b は精子幹細胞分化において重要な役割を担うことが分かったほか、予想外の結果として精子幹細胞において将来の遺伝子発現を予め準備する役割も担っている可能性が考えられた。今後の解析により、このような発現準備が決まった遺伝子セットに対して行われるメカニズムや、それが特定の時期まで発現しないようになっている仕組みを解明していくことを目指す。さらに、マウスの精子幹細胞において明らかになった上記の分子機構は、ヒトの男性不妊症の発症機構の一端を担う可能性を有しており、今後の発展が期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Tomizawa S, Kobayashi Y, Shirakawa T, Watanabe K, Mizoguchi K, Hoshi I, Nakajima K, Nakabayashi J, Singh S, Dahl A, Alexopoulou D, Seki M, Suzuki Y, Royo H, Peters AHFM, Anastassiadis K, Stewart AF, Ohbo K

Kmt2b conveys monovalent and bivalent H3K4me3 in mouse spermatogonial stem cells at germline and embryonic promoters

*Development* 2018 145:dev169102 査読有

[学会発表](計 6 件)

Tomizawa S, Kobayashi Y, Shirakawa T, Hoshi I, Nakajima K, Royo H, Nakamura Y, Peters AHFM, Anastassiadis K, Stewart AF, Yoshida S, Ohbo K

Kmt2b is required for spermatogenic programs through both bivalent and monovalent priming of the spermatogonial stem cell epigenome.

The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro. 福岡. 2017年7月26~28日

Tomizawa S, Kobayashi Y, Shirakawa T, Hoshi I, Nakajima K, Royo H, Peters AHFM, Anastassiadis K, Stewart AF, Ohbo K

Kmt2b is required for spermatogenesis through both bivalent and monovalent priming of the spermatogonial stem cell epigenome.

EMBO conference: Nuclear structure and dynamics. L'Isle sur la Sorgue. 2017年10月4~8日

Tomizawa S, Kobayashi Y, Shirakawa T, Hoshi I, Nakajima K, Royo H, Peters AHFM, Anastassiadis K, Stewart AF, Ohbo K.

Role and priming activity of Kmt2b for the spermatogonial stem cell epigenome.

第123回日本解剖学会総会全国学術集会 東京 2018年3月28~30日

Kobayashi Y, Tomizawa S, Ono M, Ohbo K.

Role of a mammalian histone H3K4me3 methyltransferase Kmt2b for spermatogonial stem cell differentiation and migration.

第123回日本解剖学会総会全国学術集会 東京 2018年3月28~30日

尾野道男、小林裕貴、富澤信一、大保和之

Kmt2b (H3K4メチル化酵素) 遺伝子欠損マウスにおける精細管の微細形態

第123回日本解剖学会総会全国学術集会 東京 2018年3月28~30日

小林裕貴、尾野道男、溝口敬太、夏目幸治、富澤信一、河越龍方、水木信久、小倉淳郎、大保和之

エピジェネティック機構を介した精子発生制御メカニズム

第124回日本解剖学会総会全国学術集会 新潟 2019年3月26~29日

[その他]

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~finemorp/>

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。