

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02383

研究課題名（和文）世代を超えて受け継がれる、代謝-エピゲノムクロストークの解明

研究課題名（英文）Interplay between epigenetics and metabolism in transgenerational inheritance

研究代表者

前澤 創（Maetzawa, So）

東京理科大学・創域理工学部生命生物科学科・准教授

研究者番号：90548174

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内代謝変化は、エピジェネティクス因子の機能や活性に影響を与え、エピゲノム変化をもたらす。精子形成の進行に伴う代謝系の変動や、栄養状態によって変化するエピゲノムの継世代影響が示唆されているが、代謝物によるエピゲノムへの影響は不明である。本研究では、マウス精子形成期の生殖細胞を用いたメタボローム解析を実施し、分化進行に伴って変化する代謝系を明らかにした。特に、メチル基供与体であるSAMの合成に機能するSGOC代謝が活性化する分化段階を同定した。また、SGOC代謝の阻害試験により、生殖細胞にエピゲノム異常が生じ、さらに分化遅延が生じていたことから、SGOC代謝が精子形成に機能することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、マウス精子形成期において代謝状態が変化すること、さらに代謝状態がエピゲノム形成へ影響を与えることを見出した。今後、精子形成を司る代謝調節システムや、代謝産物がエピゲノム制御に与える分子機構を明らかにすることにより、精子形成に重要な栄養環境の解明に繋がり、将来的に生体外精子形成技術などの再生医学への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：A father's diet can have a significant effect on the future health of his offspring. Although metabolites in spermatogenesis can alter the epigenome in sperm, it remains unclear what and how the nutrient condition affects the germline epigenome established in spermatogenesis. Here we aimed to understand the metabolome dynamics in spermatogenesis. We conducted integrated transcriptomic, proteomic, and metabolomic analyses of male germ cells in mouse spermatogenesis and demonstrated differentiation stage-dependent changes in these processes. We observed that SGOC pathway is consistently upregulated in spermatogonia and spermatocytes, suggesting their involvement in epigenetic changes preceding in males. We further demonstrated that SGOC is important for the progression of spermatogenesis through the establishment of H3K4me1. Our findings shed light on the unrevealed mechanisms of the metabolism-epigenome crosstalk in spermatogenesis.

研究分野：生殖科学

キーワード：精子形成 エピジェネティクス 代謝 生殖細胞

### 1. 研究開始当初の背景

生殖細胞系列は、初期胚発生における運命決定、配偶子への分化、受精を介した個体発生、全能性の再獲得といったサイクルにより、生命の次世代への継承を担う。配偶子形成期において、生殖細胞は細胞分裂を繰り返して細胞数を増やし、ある時期が来ると減数分裂を起こし、やがて精子もしくは卵に分化する。生殖細胞特有の現象である減数分裂は、種の多様性を生み出すと共に、配偶子形成に不可欠なプロセスである。配偶子形成期において、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配偶子形成期特有の遺伝子発現プロファイルへと切り替わる。我々はマウス精子形成期をモデルに、減数分裂移行期にみられる大規模な遺伝子発現変化が、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もたらされることを明らかにした。特に、生殖細胞特異的なポリコーム因子 SCML2 により、次世代の発生に必要な遺伝子のプロモーター領域に、活性化型ヒストン修飾と抑制型ヒストン修飾の両方を有する特徴的なエピジェネティックマークが形成されることを見出した。精子形成過程において、9割以上のヒストンはヒストン様タンパク質であるプロタミンに置き換わるが、この特徴的なエピジェネティックマークを有するヒストンは精子でも保持されており、次世代へ受け継がれる。このようなエピゲノムの世代を超えた伝達は、次世代やその先の世代の発生や行動に影響を与える。配偶子形成期のエピゲノムは、栄養環境などの外部要因によって変化し、低タンパク質、葉酸欠乏、ビタミン欠乏、高脂質などの環境下で飼育されたマウスでは精子中のエピゲノム異常が生じることが示されている。さらに、ヒトでは加齢に伴う精子中の DNA 低メチル化によって、次世代のうつ病発症リスクの向上が示されている。このように、細胞内代謝変化がエピゲノム変化をもたらす「代謝-エピゲノムクロストーク」が、配偶子形成期において機能し、エピゲノム変化が代謝記憶として世代を超えて影響を与えていると考えられるが、その実態は未解明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、マウス精子形成期をモデルに、代謝状態の変化によるエピゲノムへの影響を明らかにし、さらに配偶子形成過程の進行や次世代の発生に及ぼす影響を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

精子形成期においてどのような代謝経路が活性化されているかを調べるために、精子形成期の代表的な4つの分化段階の細胞(未分化精原細胞、分化精原細胞、精母細胞、精細胞)を分取し、メタボローム解析を実施した。精子形成期の各分化段階の生殖細胞は、フローサイトメーターを用いたセルソーティングで分取した。得られた細胞から代謝物質を抽出し、曾我朋義博士(慶應義塾大学)の協力のもと、キャピラリー電気泳動と高感度高選択質量分析装置を組み合わせた分析方法「CE-MS法」によりメタボロームデータを取得した。得られた代謝物データを元に、すでに取得済みのトランスクリプトームデータやプロテオームデータと統合し、分化に伴って変動する代謝経路を同定し、エピゲノムへ影響を与える可能性の高い代謝経路、およびその制御因子を推定した。推定された代謝経路の制御因子を標的に、マウスを用いた阻害剤投与試験を実施した。精子形成期における分化進行への影響やエピゲノム動態への影響を、分化マーカーやエピゲノムマークに対する抗体を用いた蛍光免疫染色法や形態観察により評価した。

### 4. 研究成果

マウス精巣より代表的な4つの分化段階の細胞(未分化精原細胞、分化精原細胞、精母細胞、精細胞)を分取し、メタボローム解析を実施した。いずれかの分化段階で検出された129の代謝物について、分化進行に伴う代謝物量の変動を解析した(図1A)。各分化段階で特徴的な代謝物が検出されたが、特に、減数分裂期の前後で代謝物の変動が顕著であった。有意な変動を示した代謝物を抽出し、MetaboAnalyst 5.0

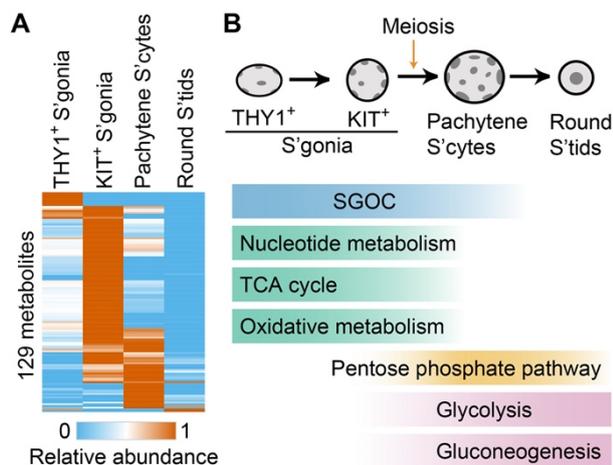


図1. マウス精子形成期の代表的な分化段階の生殖細胞を用いたメタボローム解析

A. CE-MS法によって検出された129の代謝物について、相対量の変動をk平均法にてクラスタリング解析し、ヒートマップ表示した。細胞の体積あたりの代謝物量で標準化し、3回の実験の平均値を用いた。S'gonia, 精原細胞。S'cytes, 精母細胞。S'tids, 精子細胞。

B. 統合解析によって明らかになったマウス精子形成期における代謝系の変動の一例。SGOC, Ser-Gly-one-carbon metabolism.

を用いてエンリッチメント解析 (Metabolite set enrichment analysis) を実施し、分化進行に伴って変化する代謝経路を推定した。さらに、抽出された代謝経路で機能する酵素群について、それらのタンパク質量および遺伝子発現量の変動を、それぞれ取得済みのプロテオームデータおよびトランスクリプトームデータを用いて解析し、各分化段階で重要な機能を担っていると考えられる代謝経路を絞り込んだ。その一例として、図 2B に示すように、減数分裂前の分化段階においては核酸代謝、TCA 経路、酸化代謝経路が機能することが示唆された。また、減数分裂後の分化段階においては、ペントースリン酸経路、解糖系、糖新生が亢進していることが示唆された。減数分裂期にあたる精母細胞以降の分化段階においては、乳酸をエネルギー源として用いること、血液精巣閉鎖の形成により嫌気的環境におかれることから、エネルギー代謝を大きく変化させていると考えられる。このエネルギー代謝の変換は、関連する酵素群をコードする多数の遺伝子発現変化によって制御されており、生殖細胞に特異的にプログラムされた機構であるといえる。今後、これらの遺伝子群の発現制御機構を明らかにすることで、生殖細胞特異的なエネルギー代謝変換機構に迫る予定である。一方で、精原細胞から精母細胞をとおして、Ser-Gly-one-carbon metabolism (SGOC 代謝) が機能していることが示唆された (図 1B)。SGOC 代謝は、DNA メチル化やヒストンメチル化修飾の際のメチル化供与体である SAM の生成に機能することから、代謝を介したエピゲノム調節機構が働いていると考えられる。

続いて、精子形成期における SGOC 代謝の機能を明らかにするために、SGOC 代謝に機能する因子を標的とした阻害剤投与実験を行い、精子形成期の分化進行への影響を検討した。マウス精子形成は、生後約 7 日から始まり、約 1 週間で精母細胞へと分化が進行する。そこで、生後 7 日齢のマウスに代謝阻害剤を 7 日間投与した後、精巣を摘出し、免疫染色にて分化進行への影響を解析した。その結果、阻害剤投与により、分化型精原細胞の割合が増加し、ザイゴテン期精母細胞やパキテン期精母細胞の割合が低下していた (図 2A および 2B)。すなわち、代謝経路の攪乱により、減数分裂期への移行が阻害されていることを示唆していた。これまでに、減数分裂期への移行に伴い、複数のヒストンメチル化マークが変動し、減数分裂やその後の精子形成に必須の遺

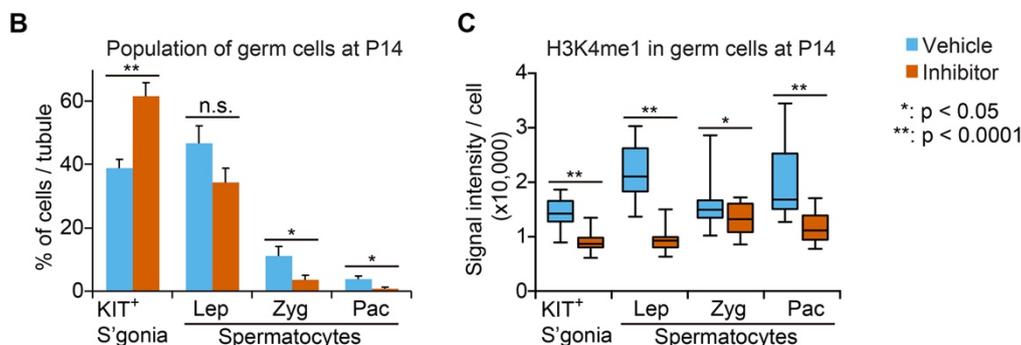
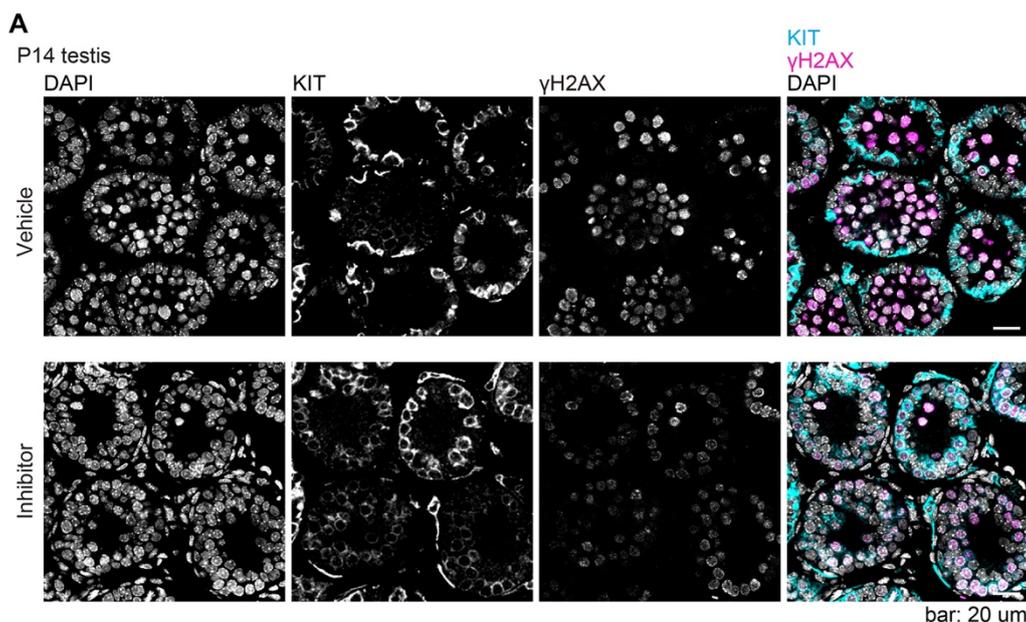


図 2. 代謝経路の攪乱による精子形成期の分化進行への影響

A. 生後 7 日齢にマウスに、代謝阻害剤を 7 日間投与したのち精巣を摘出し、免疫染色により精子形成期の分化進行を調べた。KIT は分化型精原細胞、 $\gamma$ H2AX は精母細胞のマーカー。

B. 分化型精原細胞、レプトテン期、ザイゴテン期、パキテン期精母細胞を計数し、その比率を表示した。統計解析は Mann-Whitney U-test による。

C. 免疫染色にて、分化型精原細胞、レプトテン期、ザイゴテン期、パキテン期精母細胞における H3K4me1 のシグナル強度を定量解析した結果。統計解析は Mann-Whitney U-test による。

伝子発現が制御されていることを明らかにしている。そこで、阻害剤投与によるヒストンメチル化への影響を免疫染色にて検討したところ、分化型精原細胞から精母細胞をとおして H3K4me1 のレベルが大きく減少していた。H3K4me1 はエンハンサー領域に形成され、H3K27ac の形成によるエンハンサーの活性化の準備段階として知られている。我々は精子形成に必須の遺伝子群が生殖細胞特異的なスーパーエンハンサーによって発現上昇すること、そして精原細胞においてすでに準備段階にあることを見出している。本研究では、代謝阻害剤の投与により、精子形成の進行に必要なエンハンサー領域のエピゲノムが影響を受け、分化進行に必要な遺伝子発現に異常が生じていると考えられる。現在、トランスクリプトーム解析による遺伝子発現異常の解析、および CUT&Tag 法を用いて異常が生じた H3K4me1 のゲノム領域の特定を進めている。

本研究から、マウス精子形成期における代謝経路の変動が明らかになり、分化進行に伴ったエネルギー代謝の変換や、SGOC 代謝のエピゲノム調節への影響が示唆された。今後、代謝経路の変動をもたらす上流の遺伝子発現制御機構を明らかにするとともに、エピゲノムへ影響を与える代謝メカニズムについて研究を進める。特に、本研究で焦点を当てた SGOC 代謝について、DNA メチル化を含めた複数のエピゲノムマークへの影響や、エピゲノムの変動が生じやすいゲノム領域を同定する。さらに、減数分裂後の精子細胞への分化進行やエピゲノム変化の継世代影響について明らかにする予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sakashita Akihiko, Takeuchi Chikara, Maezawa So, Namekawa Satoshi H.	4. 巻 2577
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 123 ~ 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2724-2_9	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 該当する
1. 著者名 Tatara Mayu, Ikeda Taiyo, Namekawa Satoshi H., Maezawa So	4. 巻 2577
2. 論文標題 ATAC-Seq Analysis of Accessible Chromatin: From Experimental Steps to Data Analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 65 ~ 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2724-2_5	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 該当する
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 Notomi Yusuke, Kazawa Tomoki, Maezawa So, Kanzaki Ryohei, Haupt Stephan Shuichi	4. 巻 39
2. 論文標題 Use of Visual Information by Ant Species Occurring in Similar Urban Anthropogenic Environments	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 529-544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs220035	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 該当する

1. 著者名 Alavattam Kris G., Maezawa So, Andreassen Paul R., Namekawa Satoshi H.	4. 巻 79
2. 論文標題 Meiotic sex chromosome inactivation and the XY body: a phase separation hypothesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	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) 10.1007/s00018-021-04075-3	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 該当する

1. 著者名 Sakashita Akihiko, Ooga Masatoshi, Otsuka Kai, Maezawa So, Takeuchi Chikara, Wakayama Sayaka, Wakayama Teruhiko, Namekawa Satoshi H	4. 巻 51
2. 論文標題 Polycomb protein SCML2 mediates paternal epigenetic inheritance through sperm chromatin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 6668 ~ 6683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkad479	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 So, Yukawa Masashi, Hasegawa Kazuteru, Sugiyama Ryo, Iizuka Mizuho, Hu Mengwen, Sakashita Akihiko, Vidal Miguel, Koseki Haruhiko, Barski Artem, DeFalco Tony, Namekawa Satoshi H.	4. 巻 14
2. 論文標題 PRC1 suppresses a female gene regulatory network to ensure testicular differentiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Death and Disease	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/s41419-023-05996-6	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 Hu Mengwen, Yeh Yu-Han, Maezawa So, Nakagawa Toshinori, Yoshida Shosei, Namekawa Satoshi H	4. 巻 52
2. 論文標題 PRC1 directs PRC2-H3K27me3 deposition to shield adult spermatogonial stem cells from differentiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 2306 ~ 2322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkad1203	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6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1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エピゲノムおよびクロマチン制御機構
3. 学会等名 第3回有性生殖研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 前澤創
2. 発表標題 生命の連続性を担う、生殖細胞のエピゲノム形成機構
3. 学会等名 日本医科大学・東京理科大学 第9回合同シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022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15回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前澤創
2. 発表標題 Dynamic nuclear lamina-chromatin interactions during spermatogenesis
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前澤創
2. 発表標題 Dynamic nuclear lamina-chromatin interactions during spermatogenesis
3. 学会等名 The International Symposium "Totipotency and Germ Cell Development" (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前澤創
2. 発表標題 Single-cell ATAC-seq reveals stage-specific gene regulatory landscape during mammalian spermatogenesis
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

〔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
研究 分担者	林 陽平  (Hataishi Yohei)  (00588056)	東北大学・加齢医学研究所・助教   (11301)	
研究 分担者	大我 政敏  (Ohga Masatoshi)  (40644886)	麻布大学・獣医学部・講師   (32701)	

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			
米国	UC Davis	CCHMC		