

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860137

研究課題名(和文) 精巣幹細胞分化における核内形態変化およびエピジェネティック、スイッチの役割

研究課題名(英文) The role of nuclear structure and an epigenetic switch in 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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類は精子幹細胞の自己複製、分化システムによって長期にわたり持続的に精子形成を行うことができることが知られている。ところが、精子幹細胞の維持や分化が起きる分子機構は十分に理解されていない。本研究では精子幹細胞が前駆細胞に分化する際に起きる大規模な細胞核内の形態変化やエピジェネティックな変化に着目した。これらの変化は細胞の遺伝子発現プログラムに重要であるため、精子幹細胞が分化する際に細胞の性質を転換させる上で重要な機能を有する可能性が考えられた。そこで本研究ではマウスより精子幹細胞と前駆細胞をセルソーターにて純化し、それぞれの細胞集団のエピジェネティックな状態を詳細に同定した。

研究成果の概要(英文)：It is well established that long-term spermatogenesis in mammals is supported by spermatogonial stem cells (SSCs). However, the molecular mechanisms governing SSC maintenance and differentiation is poorly understood. This study focused on dynamic changes in nuclear structure and epigenetic status that occur during SSC differentiation. These changes are important for gene expression programs and hence may greatly contribute to the conversion of cellular characteristics as SSCs differentiate. To identify the epigenetic changes in more detail, SSCs and progenitor cells were sorted and the global epigenetic status of each cell population was analyzed.

研究分野：医歯薬学

キーワード：生殖細胞 エピジェネティクス ヒストン修飾 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の精子幹細胞は自己複製と分化を繰り返すことで、精子形成プロセスを長期にわたって支えるという重要な役割を果たしている。精子幹細胞の研究分野では、幹細胞において特異的に発現する遺伝子や幹細胞の維持に機能すると考えられる遺伝子に関して多くの重要な知見が得られてきた(de Rooij DG and Russell LD. *J Androl.* 2000 21(6): 776-798.)。また、精子幹細胞を長期培養することのできる優れた実験系も確立しており(Kanatsu-Shinohara M. et al., 2003 *Biol. Reprod.* 69(2): 612-616.)、この効率的なシステムを利用した研究も盛んに進められている。しかし、精子幹細胞が分化するにあたって必要な核内の分子機構の多くはいまだ謎である。

そのような中、近年の研究により、精子幹細胞の分化時には核内形態やエピジェネティクスに関わる因子の状態が大規模に変化することが明らかになった(エピジェネティックスイッチと呼ぶ)(Shirakawa T. et al., *Development.* 2013 140(17): 3565-3576.)。エピジェネティクスは、DNA やヒストン修飾といったゲノム修飾などの因子により、DNAの配列を変化させることなく遺伝子発現を制御する機構のことで、哺乳類の発生にとって不可欠の現象である。精子幹細胞分化におけるエピジェネティックスイッチでは、特定の種類のヒストン修飾の総量(H3K9me2等)やDNAメチル化導入に必要な酵素の発現量(Dnmt3a, Dnmt3b)などが分化とともに大きく変動することが免疫染色の実験で確認された。さらに、DNAメチル化の複製に必須の因子として働くことが知られるNp95を生後のマウスで欠損させると精子幹細胞の分化が障害されることや、Dnmt3bを強制発現させると前駆細胞への分化誘導が促進されることも示された。

これらのようなエピジェネティックな因子は細胞の全ての遺伝子の発現状態を正しく制御する上で不可欠であるため、細胞の性質を大きく変化させるという重要なプロセスにも大きく寄与している。つまり、このような精子幹細胞分化の際に起こる核内形態やエピジェネティックな状態の変化は、分化にとって極めて重要な分子基盤として働いている可能性が考えられた。さらに、数多く存在するエピジェネティックな修飾は、それぞれが相互作用しながら遺伝子発現に影響を与えることから、上記で確認されているもの以外のエピジェネティックな修飾もこのスイッチに関与し、精子幹細胞分化という大きな変換点において重要な役割を果たしている可能性も十分に考えられた。

2. 研究の目的

上記の通り、精子幹細胞分化時に起きるエピジェネティックスイッチの現象は免疫染色実験によって確認されていたが、具体的

ヒストン修飾等のエピジェネティックな状態がゲノム上のどの位置で変化し、どのような種類の遺伝子の発現に影響を与えているかという情報はこれまで全く存在しなかった。そこで本研究では、それを詳細に調べるために、ヒストン修飾等のエピジェネティックな状態の変化を、次世代シーケンサーを用いた塩基配列決定法により詳細に解析することで、それぞれのエピジェネティックな修飾の変化が実際に起きるゲノム上の位置情報を同定することとした。それにより、エピジェネティックスイッチがどのような種類の遺伝子に影響を与えるのか特定し、それが精子幹細胞の分化に対してどのような機能を果たすのか明らかにしておくことを目的とした。

3. 研究の方法

マウスの精巣を採取した後、酵素処理を行うことにより細胞懸濁液を作製し、セルソーターを用いて精子幹細胞と前駆細胞をそれぞれ分取した。各細胞集団の同定は、マウスの精原細胞の中でも幹細胞や前駆細胞のマーカーとして用いられているGFRa1、Ngn3、Kitなどのレポーターを組み合わせることにより行った。具体的には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、GFRa1-EGFP+/Kit+を精子幹細胞、Ngn3-EGFP+/Kit+を前駆細胞として分離した。分取された各細胞集団の純度はqRT-PCRによりそれぞれの細胞集団や体細胞に特徴的な遺伝子の発現を調べることで確認した。

次に、それらの細胞からDNAあるいはクロマチンを抽出、精製し、それをDNAメチル化やヒストン修飾の解析に用いた。DNAメチル化はPBAT(Post-Bisulfite Adapter Tagging)法(Miura F. et al., *Nucleic Acids Res.* 2012 40(17): e136.)、またヒストン修飾解析はクロマチン免疫沈降法を応用したChIP-seq法(Mikkelsen et al., *Nature.* 2007 448(7153): 553-560.)により解析するために、それぞれに適した次世代シーケンサー用のライブラリーを作製した。完成したライブラリーは品質評価および定量を行った後、Illumina社HiSeqシーケンサーを用いて解析した。得られたデータはマウスゲノムの参照配列にマッピングし、正規化した後に遺伝子領域などにおけるリード数を定量することにより比較解析した。

ヒストン修飾に関しては、エピジェネティックスイッチに関与する可能性のある数多くの修飾の種類の中でも遺伝子の転写活性化や抑制と高い相関性があり、他の細胞系譜において多くのデータが得られているH3K4me3、H3K27me3、H3K27ac等から調べることとした。

4. 研究成果

本研究において次世代シーケンサーを

用いた PBAT 法により DNA メチル化解析を実施した結果、マウスから分取した精子幹細胞と前駆細胞で DNA メチル化の状態が異なる領域を多く同定することができたため、遺伝子発現との相関について解析を行うことができた。これらには遺伝子のプロモーターや遺伝子コード領域に加え、遺伝子と重複しない領域も多く含まれていた。また同時に、遺伝子発現の調節と DNA メチル化の相関を理解するためには多くの場合 DNA メチル化以外にもヒストン修飾を含む複数のエピジェネティックな因子をあわせた総合的な解析が必要なが明らかになった。

次に、各種ヒストン修飾の状態を調べるための ChIP-seq の実験にあたっては、まずセルソーターを用いて採取した少量の精子幹細胞や前駆細胞から再現性の高いデータを得るための実験系を確立する必要があった。そこで、過去に報告されている ChIP-seq の実験系 (micro ChIP 法) をもとにして改良し (Dahl JA and Collas P. 2008 *Nat. Protoc.* 577 3(6), 1032-1045.)、数万個程度の細胞からヒストン修飾の ChIP-seq (H3K4me3 と H3K9me2) を実施した。すると、その場合においても、再現性が高く、良好な品質のヒストン修飾データが得られることが確認できた。そのため、その手法を用いて精子幹細胞と前駆細胞それぞれの細胞集団における H3K4me3, H3K27me3, H3K27ac 等の遺伝子発現制御に重要な既知のヒストン修飾について調べた。その結果、遺伝子発現の活性化と相関するヒストン修飾 H3K4me3 および遺伝子発現の抑制と相関するヒストン修飾 H3K27me3 が精子幹細胞分化に伴って変化する遺伝子領域が同定され、さらに、遺伝子のエンハンサーと関連性の高い H3K27ac が分化とともに変化する領域についても多数同定された。本研究ではそれらの領域が精子幹細胞分化に対して具体的にどのような役割を有するのかを解明するまでには至らなかったものの、エピジェネティック スイッチに関わる動きの一部が実際にゲノムのどの場所で起きているかを代表的なエピジェネティックな修飾に関して同定することができたため、今後の研究につながる重要な結果が得られたと考えられる。

本研究のデータをもとに、今後はその他の修飾も含めた全体的なエピジェネティック スイッチが精子幹細胞分化に与える影響を解析していく予定である。さらに、本研究で解析することができなかった H3K9me2 などの大規模な変化を示す修飾についても、精子幹細胞と前駆細胞を用いて詳細な解析を進めていくことが必要である。

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2件)

Kubo N, Toh H, Shirane K, Shirakawa T,

Kobayashi H, Sato T, Sone H, Sato Y, Tomizawa S, Tsurusaki Y, Shibata H, Saito H, Suzuki Y, Matsumoto N, Suyama M, Kono T, Ohbo K, Sasaki H.

DNA methylation and gene expression dynamics during spermatogonial stem cell differentiation in the early postnatal mouse testis.

BMC Genomics 16(1)624, 2015

doi: 10.1186/s12864-015-1833-5

査読: 有

Ohbo K, Tomizawa S.

Epigenetic regulation in stem cell development, cell fate conversion, and reprogramming.

Biomolecular Concepts 6 1-9, 2015

doi:

<https://doi.org/10.1515/bmc-2014-0036>

査読: 有

[学会発表](計3件)

Tomizawa S, Shirakawa T, Dahl A, Alexopoulou D, Anastassiadis K, Stewart A F, Ohbo K.

Role of histone methyltransferase Mll2 for male germ cell development.

Keystone Symposia Conference, Transcriptional and Epigenetic Influences on Stem Cell States.

Steamboat Springs, Colorado (USA)

2015年3月26日

Tomizawa S, Kobayashi Y, Shirakawa T, Dahl A, Alexopoulou D, Anastassiadis K, Stewart AF, Ohbo K.

Role of histone methyltransferase Mll2 for adult testicular germ cell differentiation.

Gordon Research Conference, Chromatin Structure & Function.

Les Diablerets (Switzerland)

2016年5月22日

Tomizawa S, Kobayashi Y, Shirakawa T, Peters AHFM, Anastassiadis K, Stewart AF, Ohbo K.

Kmt2b regulates spermatogonial stem cell differentiation and marks primed genes for developmental potential.

EMBO Conference: From Functional Genomics to Systems Biology.

Heidelberg (Germany)

2016年11月12日

[その他]

ホームページ等

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

6 . 研究組織

(1)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

(2)研究協力者

伊藤 隆司 (ITO, Takashi)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：90201326