

## 49. 哺乳類精子形成期における細胞運命決定機構の解明

前澤 創

東京理科大学 理工学部 応用生物科学科 前澤研究室

Key words : 精子形成, エピジェネティクス, クロマチン, 減数分裂, ATAC-seq

### 緒言

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 (図 1a, 1b) [1]。これまでに我々はマウス精子形成期をモデルに、減数分裂移行期の前後で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 [2~6]。例えば、減数分裂期直前の分化段階である分化型精原細胞から、減数分裂期移行後のパキテン期精母細胞への分化進行の過程において、体細胞型遺伝子群のシスエレメントのクロマチン開閉状態がオープンからクローズへ、精子形成期特異的遺伝子群のシスエレメントのクロマチン開閉状態がクローズからオープンへと変化する [3]。これらのクロマチン開閉状態はエンハンサー活性と強い相関を示し、一部の活性化エンハンサーはスーパーエンハンサーを形成し、精子への分化運命の決定に機能していた [6]。しかし、このような精子形成の進行に必須なクロマチン動態変化が、減数分裂期への移行と進行の過程で、どのような段階を経て調節されているかは不明であった。そこで本研究では、減数分裂移行期の分化段階に焦点を当て、精子形成の進行に重要な遺伝子発現を制御するクロマチン動態の解明を目的とした。

### 方法

#### 1. Omni ATAC-seq 法によるオープンクロマチン解析

8~12 週齢の性成熟したオスマウスから精巣を摘出し、コラゲナーゼ及びトリプシンを用いて細胞分散処理を行った。細胞懸濁液に Hoechst33342 を加えて核染色し、フローサイトメーターを用いて目的の分化段階の生殖細胞を分取した [7]。Omni ATAC-seq ライブラリーは、Corces らの手法に従って調製し [8]、NextSeq (Illumina) を用いてシーケンシングを実施した。シーケンシングデータを、Bowtie2 を用いてマウスゲノム mm10 にマッピングし、MACS2 を用いてピーク領域を同定した。各分化段階のピーク領域を k 平均法によりクラスタリングし、HOMER を用いて変動ピーク領域のアノテーションやモチーフ解析を行った。そして、モチーフ解析によって検出された転写因子の ChIP-seq データを公共データベースより入手し、転写因子の結合領域におけるクロマチン開閉状態の変動を解析した。さらに、エピジェネティックマークの分布を示す ChIP-seq データとの統合解析を行った。

#### 2. ATAC-see 法によるオープンクロマチン領域の可視化

ATAC-see は先行研究に基づいて行った [9]。単一細胞処理をした細胞懸濁液に 1% paraformaldehyde を加えて細胞を固定したのち、界面活性剤を用いて細胞透過処理を行った。蛍光標識オリゴ DNA と結合させた Tn5 transposase を加えて、37°C で 30 分間インキュベートすることにより、オープンクロマチン領域を蛍光標識した。その後、免疫染色のための抗体反応を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

## 結果および考察

### 1. 減数分裂移行期にクロマチン開閉状態は文化段階特異的に変化する

減数分裂移行期におけるクロマチン開閉状態を明らかにするために、4つの代表的な分化段階の生殖細胞（分化型精原細胞、プレレプトテン期精母細胞、レプトテン期/ザイゴテン期精母細胞、パキテン期精母細胞）を分取し、Omni ATAC-seq法を用いてクロマチン開閉状態の変動を解析した。その結果、減数分裂移行期には数万領域ものクロマチン開閉状態が段階的に変化する事が示された(図1c)。分化段階特異的にクロマチン開閉状態が変化する領域を抽出し、転写因子の結合モチーフ解析を実施したところ、各分化段階のオープンクロマチン領域において転写因子結合モチーフ配列が有意に検出された。そこで、モチーフ解析によって検出された転写因子のクロマチン結合とクロマチン開閉状態との関連性を明らかにするために、精子形成に機能することが知られている5つの転写因子(DMRT1、DMRT6、STRA8、MEIOSIN および RFX2)のChIP-seqデータを公共データベースより入手し、それらのクロマチン結合領域におけるクロマチン開閉状態を調べた(図1d)。

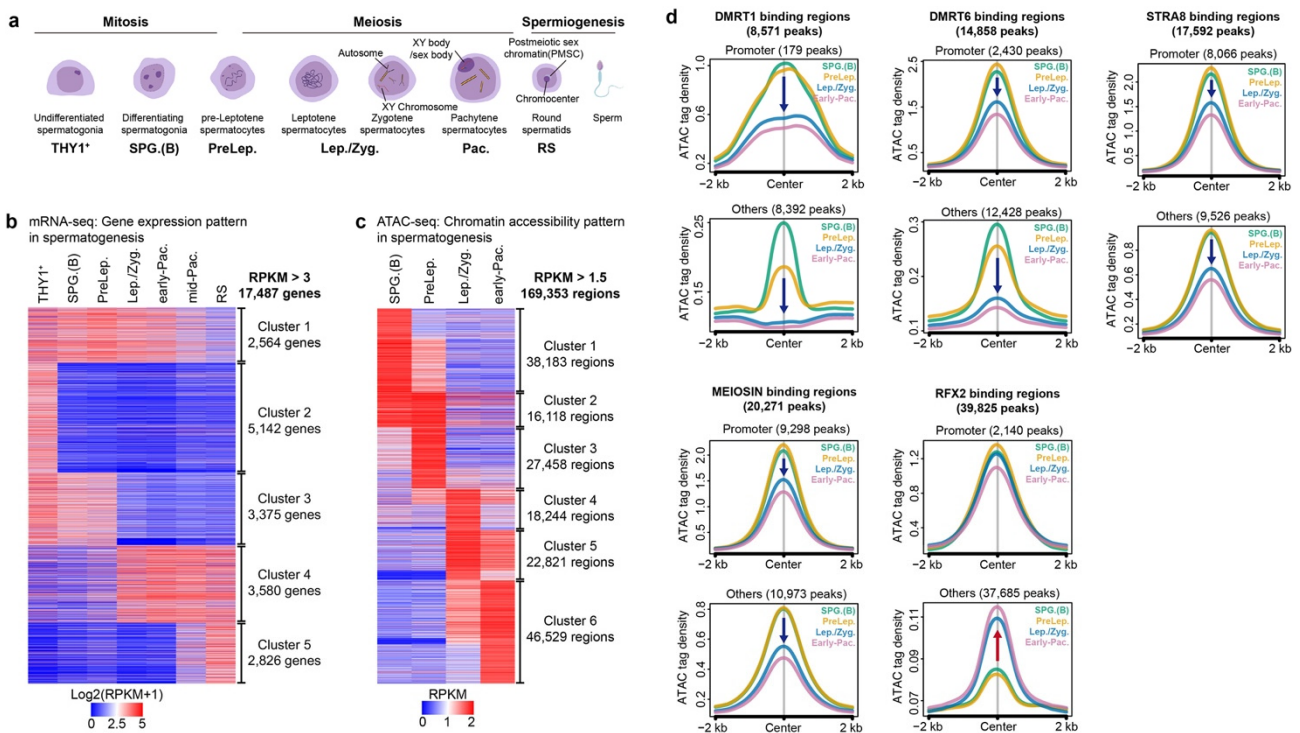


図1. マウス精子形成期の減数分裂期におけるクロマチン開閉状態変化

- マウス精子形成期における、生殖細胞の分化進行の概要。本研究では分化型精原細胞 (SPG.(B))、プレレプトテン期精母細胞 (PreLep.)、レプトテン期/ザイゴテン期精母細胞 (Lep/Zyg)、パキテン期精母細胞 (Pac.) に焦点を当てて解析した。
- RNA-seq法による、マウス精子形成期における遺伝子発現変化。
- ATAC-seq法による、減数分裂期移行期におけるクロマチン開閉状態の変化。
- 精子形成期で機能する代表的な転写因子のクロマチン結合領域付近 (結合領域の中心 $\pm$ 2 kb) におけるクロマチン開閉状態の変化。

その結果、精原細胞で機能する DMRT1 および DMRT6 の結合領域は、プロモーター領域およびその他の遠位制御領域ともにプレレプトテン期以前に弛緩しており、レプトテン期/ザイゴテン期以降に凝縮する傾向がみられた。また、減数分裂関連遺伝子の発現を促進し、減数分裂の開始を制御する STRA8 および MEIOSIN の結合領域においても、

DMRT1 や DMRT6 と同様のクロマチン開閉状態の変化がみられた。一方で、減数分裂後の鞭毛形成関連遺伝子の発現を促進する RFX2 の結合部位については、プロモーター領域ではクロマチン開閉状態に変化がみられなかったものの、遠位制御領域ではレプトテン期/ザイゴテン期以降にクロマチンが弛緩することが示された。つまり、プレレプトテン期からレプトテン期にかけて、クロマチン開閉状態の切り替えが生じており、体細胞分裂期や減数分裂の開始に機能する転写因子の結合領域がクローズした後に、精子の形態形成に機能する転写因子の結合領域（遠位制御領域）がオープンになることが示された。

## 2. 精子形成期におけるオープンクロマチン領域の空間的配置の可視化

続いて、クロマチン開閉状態変化を視覚的に捉えるために、オープンクロマチン領域の空間的配置を検出する ATAC-seq 法を用いた生殖細胞観察を実施した結果、未分化精原細胞、分化型精原細胞、およびプレレプトテン精母細胞ではオープンクロマチン領域がクラスターを形成していることが示された (図 2a、2b)。直径  $2\mu\text{m}$  以上の巨大なオープンクロマチンクラスターは、DAPI 染色によるシグナルが観察されない領域に位置していたことから、核小体に存在する rRNA 遺伝子を含む染色体領域であると考えられる。また、 $1\mu\text{m}$  に満たない小さなクラスターは、転写活性化領域を含むユークロマチン領域のクラスターであると考えられる。一方で、レプトテン期やザイゴテン期の精母細胞ではオープンクロマチンクラスターが消失していたことから、減数第 1 分裂前期に活性化される相同組換えにより転写活性が抑制されていることを示唆していた。さらに、パキテン期精母細胞や精子細胞へと分化が進行すると再びオープンクロマチンクラスターが形成されていたことから、スーパーエンハンサーの形成などによる転写活性の上昇を反映しているものと考えられる (図 2c、2d)。興味深いことに、パキテン期精母細胞で観察された  $3\mu\text{m}$  を超える巨大なオープンクロマチンクラスターは、性染色体不活化領域 (XY body) と一致していた。精母細胞において性染色体は、凝集体を形成し不活化されて転写と相同組み換えが抑制されることが知られている (Meiotic sex chromosome inactivation: MSCI)。本研究結果より、XY body は転写が抑制されているにも関わらず、クロマチンが弛緩していることが示された。

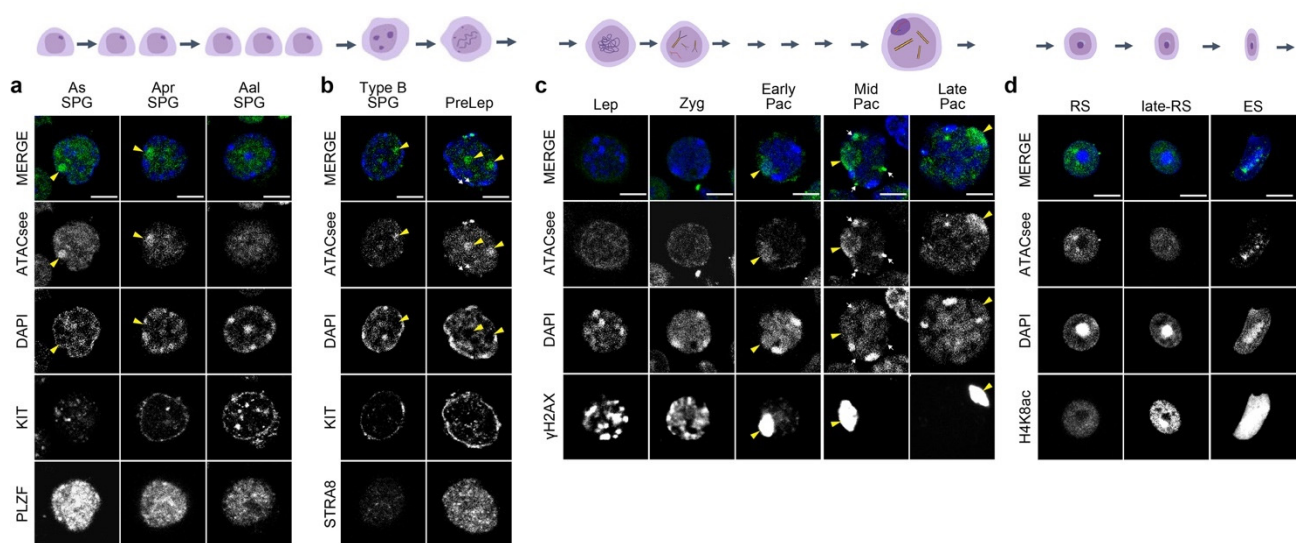


図 2. ATAC-seq 法によるマウス精子形成期のオープンクロマチン動態解析

- 精原細胞におけるオープンクロマチン領域。PLZF は未分化精原細胞のマーカー。KIT は分化型精原細胞のマーカー (スケールバー:  $5\mu\text{m}$ )。
- プレレプトテン期精母細胞におけるオープンクロマチン領域。STRA8 はプレレプトテン期のマーカー (スケールバー:  $5\mu\text{m}$ )。
- 精母細胞におけるオープンクロマチン領域。 $\gamma\text{H2AX}$  は性染色体不活化領域 (XY body) のマーカー (スケールバー:  $5\mu\text{m}$ )。
- 精母細胞におけるオープンクロマチン領域。H4K8ac はヒストン-プロタミン置換に先駆けて形成されるエピジェネティックマーク (スケールバー:  $5\mu\text{m}$ )。

### 3. 減数分裂期における性染色体不活化の開始機構

精母細胞でみられた XY body に形成されるオープンクロマチンクラスターの機能を明らかにするために、減数分裂移行期における性染色体上のクロマチン開閉状態の変動を解析した。その結果、性染色体では常染色体とは異なり、20 kb 以上にわたる広範囲なオープンクロマチン領域が、レプトテン期/ザイゴテン期以降に性染色体全体に形成されていた (図 3a)。また、直前の分化段階であるプレレプトテン期において、ヒストンメチルトランスフェラーゼ PRDM9 の結合モチーフを含む領域が時期特異的にオープンクロマチンを形成していた。PRDM9 は、減数第 1 分裂前期に常染色体にて相同組換えのホットスポットを規定する因子である。ChIP-seq 解析から、性染色体において PRDM9 によって規定される DNA2 本鎖切断 (DSBs) が生じているかを調べたところ、性染色体上の PRDM9 結合領域において、PRDM9 依存的にヒストン H3 のリシン残基 (K4 および K36) がトリメチル化され (図 3a、3b)、SPO11 による DSBs が生じていることが示された (図 3a、3c)。常染色体では SPO11 による DSBs 後、速やかに相同組換えが生じ、組換え後にクロズドクロマチン構造をとるが (図 3c 左)、性染色体では、DSBs 領域を起点に周辺クロマチンが広く弛緩していた (図 3c 右)。XY body は、DNA 損傷応答修復 (DDR) 因子が性染色体へ集積することで形成され、精子形成の正常な進行に必須である。本研究から、減数分裂移行期における PRDM9 の性染色体への結合と、それに伴う SPO11 による DSBs をきっかけにオープンクロマチンが性染色体全体へ形成されることが示唆された。本現象は、クロマチン凝集を伴わない、液-液相分離を介した転写不活化領域の形成に機能していると推測される。

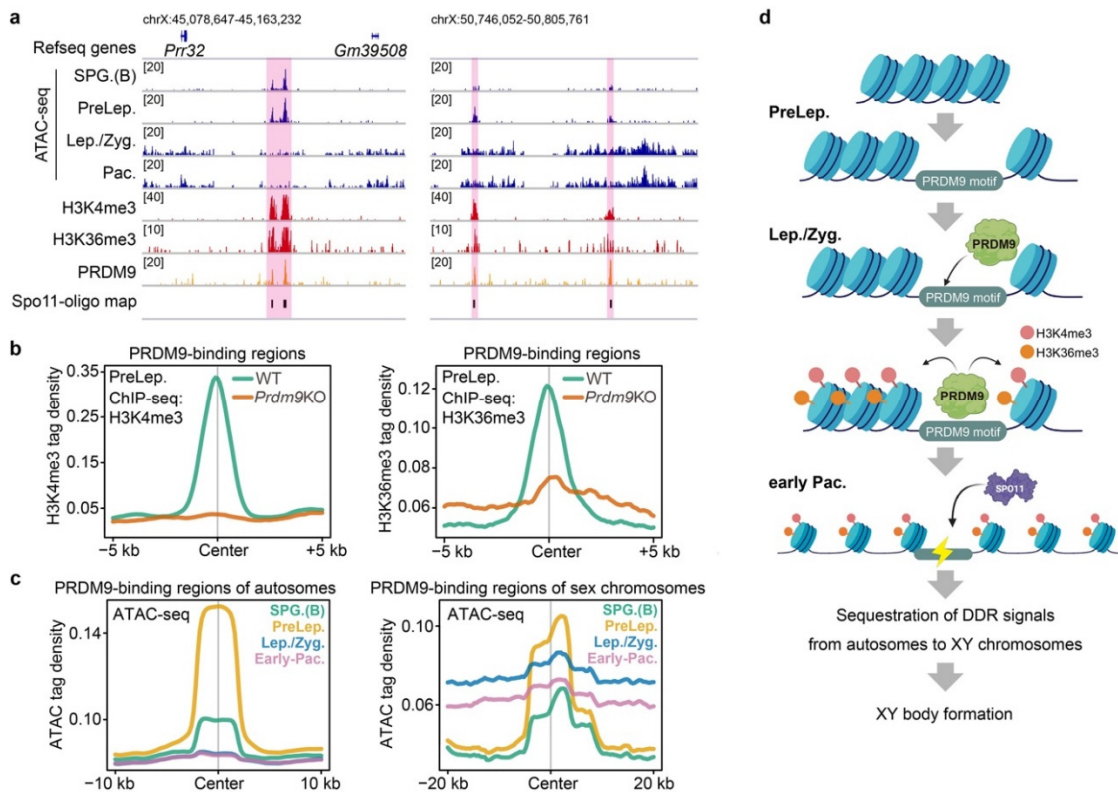


図 3. 性染色体特異的に形成されるオープンクロマチン動態

- X 染色体上の PRDM9 結合領域付近における、クロマチン開閉状態 (ATAC-seq)、ヒストン修飾 (H3K4me3, H3K36me3)、DNA2 本鎖切断 (Spo11-oligo map) の一例。
- PRDM9 結合領域付近 (結合領域の中心  $\pm 2$  kb) におけるヒストン修飾 (左: H3K4me3, 右: H3K36me3) の分布。
- PRDM9 結合領域付近 (結合領域の中心  $\pm 2$  kb) におけるクロマチン開閉状態の変化 (左: 常染色体, 右: 性染色体)。
- XY body 形成機構のモデル。

## 共同研究者・謝辞

本研究を遂行するにあたり、ATAC-seq 解析にご協力いただいた奈良県立医科大学医学部の小林久人博士および東京農業大学生物資源ゲノム解析センターの皆様、統合解析において有益なご助言をいただいた米国カリフォルニア大学デービス校の行川賢博士に感謝の意を表す。最後に、本研究は上原記念生命科学財団研究助成金および科研費新学術領域研究「配偶子インテグリティの構築」の助成により遂行された。この場を借りて深く感謝致します。

## 文 献

- 1) Hasegawa K, Sin HS, Maezawa S, Broering TJ, Kartashov AV, Alavattam KG, Ichijima Y, Zhang F, Bacon WC, Greis KD, Andreassen PR, Barski A, and Namekawa SH. SCML2 establishes the male germline epigenome through regulation of histone H2A ubiquitination. *Dev. Cell* 2015 Mar 9;32(5):574-88. doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.014. Epub 2015 Feb 19. PMID: 25703348
- 2) Maezawa S, Hasegawa K, Yukawa M, Sakashita A, Alavattam KG, Andreassen PR, Vidal M, Koseki H, Barski A, Namekawa SH. Polycomb directs timely activation of germline genes in spermatogenesis. *Genes Dev.* 2017 Aug 15;31(16):1693-1703. doi: 10.1101/gad.302000.117. Epub 2017 Sep 18. PMID: 28924034
- 3) Maezawa S, Yukawa M, Alavattam KG, Barski A, Namekawa SH. Dynamic reorganization of open chromatin underlies diverse transcriptomes during spermatogenesis. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jan 25;46(2):593-608. doi: 10.1093/nar/gkx1052. PMID: 29126117
- 4) Maezawa S, Hasegawa K, Yukawa M, Kubo N, Sakashita A, Alavattam KG, Sin HS, Kartashov AV, Sasaki H, Barski A, Namekawa SH. Polycomb protein SCML2 facilitates H3K27me3 to establish bivalent domains in the male germline. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 May 8;115(19):4957-4962. doi: 10.1073/pnas.1804512115. Epub 2018 Apr 23. PMID: 29686098
- 5) Maezawa S, Hasegawa K, Alavattam KG, Funakoshi M, Sato T, Barski A, and Namekawa SH. SCML2 promotes heterochromatin organization in late spermatogenesis. *J. Cell Sci.* : 2018 Sep 3;131(17). pii: jcs217125. doi: 10.1242/jcs.217125. PMID: 30097555
- 6) Maezawa S, Sakashita A, Yukawa M, Chen X, Takahashi K, Alavattam KG, Nakata I, Weirauch MT, Barski A, Namekawa SH. Super-enhancer switching drives a burst in gene expression at the mitosis-to-meiosis transition. *Nat Struct Mol Biol.* 2020 Oct;27(10):978-988. doi: 10.1038/s41594-020-0488-3. Epub 2020 Sep 7. PMID: 32895557
- 7) Gaysinskaya V, Soh IY, van der Heijden GW, Bortvin A. Optimized flow cytometry isolation of murine spermatocytes. *Cytometry A.* 2014 Jun;85(6):556-65. doi: 10.1002/cyto.a.22463. Epub 2014 Mar 24. PMID: 24664803
- 8) Corces MR, Trevino AE, Hamilton EG, Greenside PG, Sinnott-Armstrong NA, Vesuna S, Satpathy AT, Rubin AJ, Montine KS, Wu B, Kathiria A, Cho SW, Mumbach MR, Carter AC, Kasowski M, Orloff LA, Risca VI, Kundaje A, Khavari PA, Montine TJ, Greenleaf WJ, Chang HY. An improved ATAC-seq protocol reduces background and enables interrogation of frozen tissues. *Nat Methods.* 2017 Oct;14(10):959-962. doi: 10.1038/nmeth.4396. Epub 2017 Aug 28. PMID: 28846090
- 9) Chen X, Shen Y, Draper W, Buenrostro JD, Litzgenburger U, Cho SW, Satpathy AT, Carter AC, Ghosh RP, East-Seletsky A, Doudna JA, Greenleaf WJ, Liphardt JT, Chang HY. ATAC-seq reveals the accessible genome by transposase-mediated imaging and sequencing. *Nat Methods.* 2016 Dec;13(12):1013-1020. doi: 10.1038/nmeth.4031. Epub 2016 Oct 17. PMID: 27749837