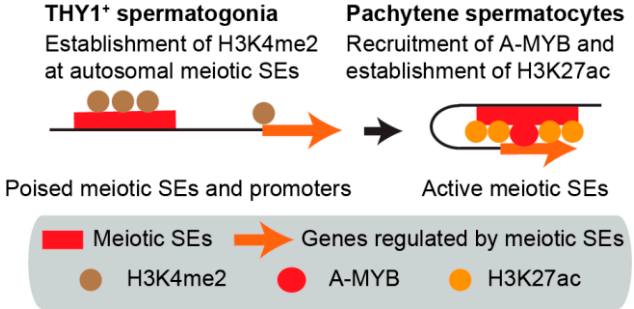
151　生命の連続性を担う生殖細胞エピゲノム形成機構の解明	前澤　創

【目的】精子形成期において、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生殖細胞特有の遺伝子発現プロファイルへと切り替わる。これまでに、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遺伝子発現プロファイルの変化がもたらされることが示されている。興味深いことに、クロマチンの開閉状態は、減数分裂期の前後においてプロモーター領域よりも遺伝子間領域で大きく変化していた。そのため、エンハンサーの活性化状態が生殖細胞特異的な遺伝子発現プロファイルの制御に機能していることが示唆されたが、詳細な分子機構は不明であった。本研究では、マウス精子形成期における活性化エンハンサーの同定、及びその分子機構の解明を目的とした。

【方法】マウス精巣から精子形成期の代表的な分化段階の生殖細胞を単離した。単離した細胞を用いて、活性化エンハンサーの指標であるヒストン修飾 H3K27ac のゲノムワイドな分布を ChIP-seq 法により明らかにした。さらに ROSE（Rank Ordering of Super-Enhancers）アルゴリズムを用いて生殖細胞特異的なスーパーエンハンサーを同定した。

【結果】マウス精子形成期におけるエンハンサー活性化状態を明らかにするために、精巣から生殖細胞を単離し、活性化エンハンサーの指標であるヒストン修飾 H3K27ac のゲノムワイドな分布を ChIP-seq 法により解析した。活性化エンハンサーの分布は、分化型精原細胞から精母細胞への分化の過程で大きく変化していた。また、一部の活性化エンハンサーが局所的にクラスターを形成していることを見出し、ROSE アルゴリズムにより各分化段階でスーパーエンハンサーを同定した。特に、減数分裂期移行後に多くのスーパーエンハンサー（meiotic SEs）が形成されており、その近傍には、精子形成に必須の遺伝子が存在していた。減数分裂期以降の特異的なエンハンサー領域に含まれる転写因子結合モチーフの探索の結果、生殖細胞特異的な転写因子である A-MYB 結合モチーフが同定された。マウス精巣における A-MYB のクロマチン結合領域を解析したところ、meiotic SEs 領域内に存在していることが明らかになった。A-MYB の集積が meiotic SEs の形成に必要であるかを検討するために、*A-myb* 機能欠失マウスの精母細胞における H3K27ac の分布を解析したところ、meiotic SEs で H3K27ac の集積が減少していることが示された。これらの結果から、A-MYB が meiotic SEs の形成に機能することが示唆された。meiotic SEs の形成機構を明らかにするために、未分化精原細胞における meiotic SEs 領域のエピジェネティックな状態を解析したところ、H3K4me2 が集積していることが示された。meiotic SEs 領域における H3K4me2 の集積は、減数分裂期移行の精母細胞や精細胞では減少していた。また、meiotic SEs 領域以外に形成される活性化エンハンサー領域では H3K4me2 の集積はみられなかった。以上から、meiotic SEs は、未分化精原細胞において H3K4me2 の集積を伴う準備状態にあることが示唆された。本研究から、次の 1〜3 に示される、meiotic SEs の標的となる精子形成関連遺伝子群の発現制御機構が明らかになった。1. 未分化精原細胞において meiotic SEs 領域及びプロモーター領域に H3K4me2 が集積した準備状態が形成される。2. 減数精子形成期へ移行後に A-MYB などの転写因子が集積する。3. H3K27ac が集積した活性化状態へ変化し、標的遺伝子の発現が誘導される。

マウス精子形成期におけるスーパーエンハンサー（meiotic SEs）の形成機構



151. 生命の連続性を担う生殖細胞エピゲノム形成機構の解明

前澤　創

*麻布大学 獣医学部 動物応用科学科 比較毒性学研究室

Key words：精子形成，エピジェネティクス，生殖細胞，スーパーエンハンサー，A-MYB

緒　言

生殖細胞は生命の連続性を担う唯一の細胞である。その能力を支える分子機構の解明は、生命科学において最も本質的で重要な課題の１つである。生殖細胞は、細胞分裂を繰り返して細胞数を増やすが、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。精子形成期において、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生殖細胞特有の遺伝子発現プロファイルへと切り替わる（図 1）[1]。我々はマウス精子形成期をモデルに、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遺伝子発現プロファイルの変化がもたらされることを明らかにした［2〜7］。興味深いことに、クロマチンの開閉状態は、減数分裂期の前後においてプロモーター領域よりも遺伝子間領域で大きく変化していた[3]。そのため、エンハンサーの活性化状態が生殖細胞特異的な遺伝子発現プロファイルの制御に機能していることが示唆されたが、詳細な分子機構は不明であった。本研究では、マウス精子形成期におけるエンハンサー活性化状態をゲノムワイドに解析し、生殖細胞特異的なスーパーエンハンサーを同定した。さらに、生殖細胞特異的転写因子 A-MYB が、生殖細胞特異的スーパーエンハンサーの形成に機能することを明らかにした［8］。

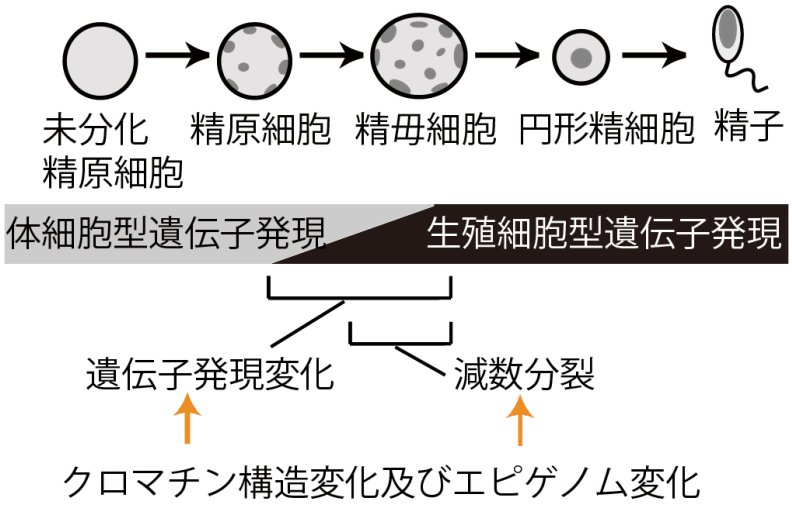


図 1. 精子形成期における大規模な遺伝子発現変化
配偶子形成には減数分裂の完了が必須である。減数分裂期への分化の際に、ゲノムワイドなクロマチン構造変化及びエピゲノム変化が生じ、体細胞型遺伝子発現から生殖細胞型遺伝子発現へと変化する。

*現在の所属：東京理科大学 理工学部 応用生物科学科

方　法

1.　マウス精巣からの生殖細胞の単離

本研究では、C57BL/6N マウスを用いた。野生型マウス、*A-myb* 変異マウス（*Mybl1*^{repro9}）［9］、及び *Scml2* ノックアウト（KO）マウス［1］を用いた。精原細胞の単離では、6～8 日齢の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。細胞分散液を、抗 KIT 抗体融合マイクロビーズ及び抗 THY1 抗体融合マイクロビーズを用いて、autoMACS Pro Separator（Miltenyi Biotec）により、それぞれ分化型精原細胞及び未分化精原細胞を単離した。精母細胞及び精細胞の単離では、成体マウスから精巣を摘出し、BSA グラジエントを利用した STA-PUT 法を用いて単離した。上述の方法で単離した細胞の精製度は、分化マーカーを用いた免疫染色法にて 90%以上であることを確認した。

2. ChIP-seq 解析及びスーパーエンハンサーの同定

単離した生殖細胞を固定し、クロマチン画分を調製し、超音波破砕により断片化した。その後、抗 H3K27ac 抗体を用いたクロマチン免疫沈降（ChIP）を行なった。免疫沈降物を用いて、ChIPmentation 法に従い次世代シーケンシング用の DNA ライブラリを調製した。得られた ChIP-seq データを BioWardobe Experiment Management System を用いて解析した。MACS2 を用いて H3K27ac ピーク領域を同定し、さらに ROSE（Rank Ordering of Super-Enhancers）アルゴリズム［10］を用いてスーパーエンハンサーを同定した。

結果および考察

1. マウス精子形成期における活性化型エンハンサー及びスーパーエンハンサーの同定

マウス精子形成期におけるエンハンサー活性化状態を明らかにするために、精巣から精子幹細胞を含む未分化型精原細胞、分化型精原細胞、減数分裂期の精母細胞、減数分裂の完了した円形精子細胞を単離し、活性化エンハンサーの指標であるヒストン修飾 H3K27ac のゲノムワイドな分布を ChIP-seq 法により解析した。H3K27ac の分布は、分化型精原細胞から精母細胞への分化の過程で大きく変化しており、これは体細胞型から生殖細胞特異的な遺伝子発現プロファイルへと変化する時期と一致していた（図 2a、b）。つまり、分化型精原細胞において活性化しているエンハンサーが減数分裂期への移行に伴い不活化し、一方で、精母細胞において新たなエンハンサーが活性化していることを示唆していた。また、一部の H3K27ac が局所的にクラスターを形成していたことから、スーパーエンハンサーの形成が示唆された。スーパーエンハンサーは、細胞の運命決定に関連する重要な遺伝子の近傍に見出され、それら遺伝子を強力に発現上昇させる機能を有するゲノム領域として提案されている［10］。そこで、スーパーエンハンサーを同定するための ROSE アルゴリズムを用いて、精子形成期の各分化段階で形成されるスーパーエンハンサーを同定した。同定されたスーパーエンハンサーの分布を比較解析したところ、スーパーエンハンサーは減数分裂期の前後で大きく変化し、特に減数分裂期移行後に多くのスーパーエンハンサーが新たに形成されていることが示唆された（図 2c、d）。減数分裂期移行後に形成されたスーパーエンハンサー（meiotic SEs）の近傍には、精子形成に必須の遺伝子が存在しており、精母細胞や円形精細胞で 10～1,000 倍に発現上昇していた（図 2e、f）。すなわち、meiotic SEs が、減数分裂期移行後の特異的な遺伝子発現プロファイルの形成に機能していることが示唆された。

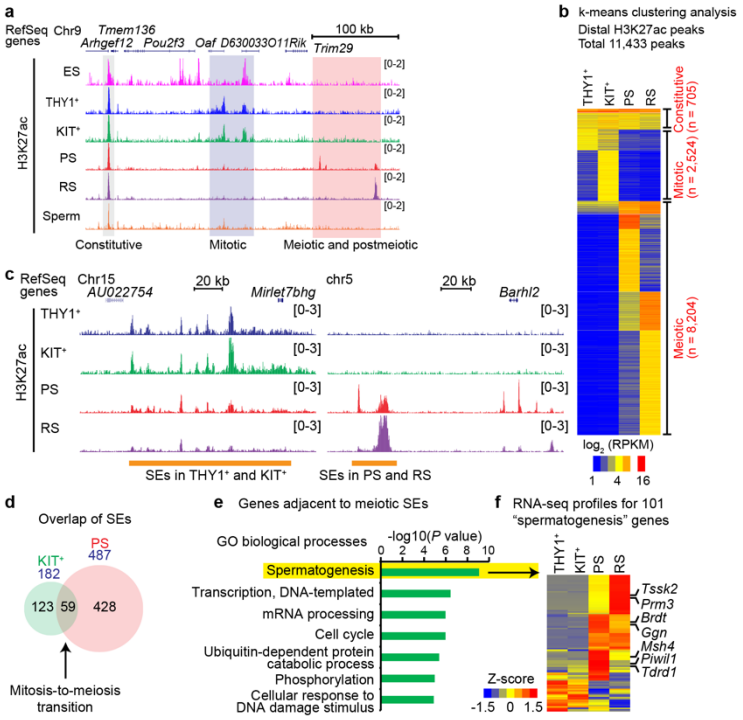


図 2. マウス精子形成期における活性化型エンハンサー及びスーパーエンハンサーの同定

a) 精子形成期の代表的な分化段階における活性化エンハンサーの分布例。THY1^{+}：未分化精原細胞、KIT^{+}：分化型精原細胞、PS：パキテン期精母細胞、RS：円形精細胞。

b) 同定された活性化エンハンサー領域のクラスター解析。

c) 同定されたスーパーエンハンサー（SEs）のゲノム領域の例。

d) 分化型精原細胞ー精母細胞間におけるスーパーエンハンサーのオーバーラップ。

e) meiotic SEs 近傍の遺伝子群の Gene Ontology（GO）解析。

f) GO term 'Spermatogenesis'に含まれた遺伝子の発現レベルを示したヒートマップ。

2. 生殖細胞特異的転写因子 A-MYB が、meiotic SEs の形成に機能する

一般的にエンハンサー領域には標的遺伝子の発現を制御する転写因子の結合領域が含まれている。精子形成期特異的遺伝子発現を制御する転写因子を同定するために、減数分裂期以降の特異的なエンハンサー領域に含まれる転写因子結合モチーフの探索を行った。同定された転写因子結合モチーフの中でも最も有意な集積を示していたのが A-MYB 結合モチーフ（GGCAGTT）であった。これまでに、A-MYB は生殖細胞特異的な転写因子として同定されており、*A-myb* 機能欠失マウスは不妊の表現系を示す。ゲノムワイドな A-MYB な分布とエンハンサー領域との関連を検討するために、マウス精巣組織を用いた既存の A-MYB ChIP-seq データを解析し、精母細胞における活性化エンハンサー領域（H3K27ac 分布）と比較した。その結果、A-MYB は精母細胞における活性化エンハンサー領域に局在しており、特に meiotic SEs の中央に集積していることが示された（図 3a、b）。A-MYB の集積が meiotic SEs の形成に必要であるかを検討するために、*A-myb* 機能欠失マウスの精母細胞における H3K27ac の分布を解析したところ、meiotic SEs で H3K27ac の集積が減少していることが示された（図 3c、d）。これらの結果から、A-MYB が meiotic SEs の形成に機能することが示唆された。

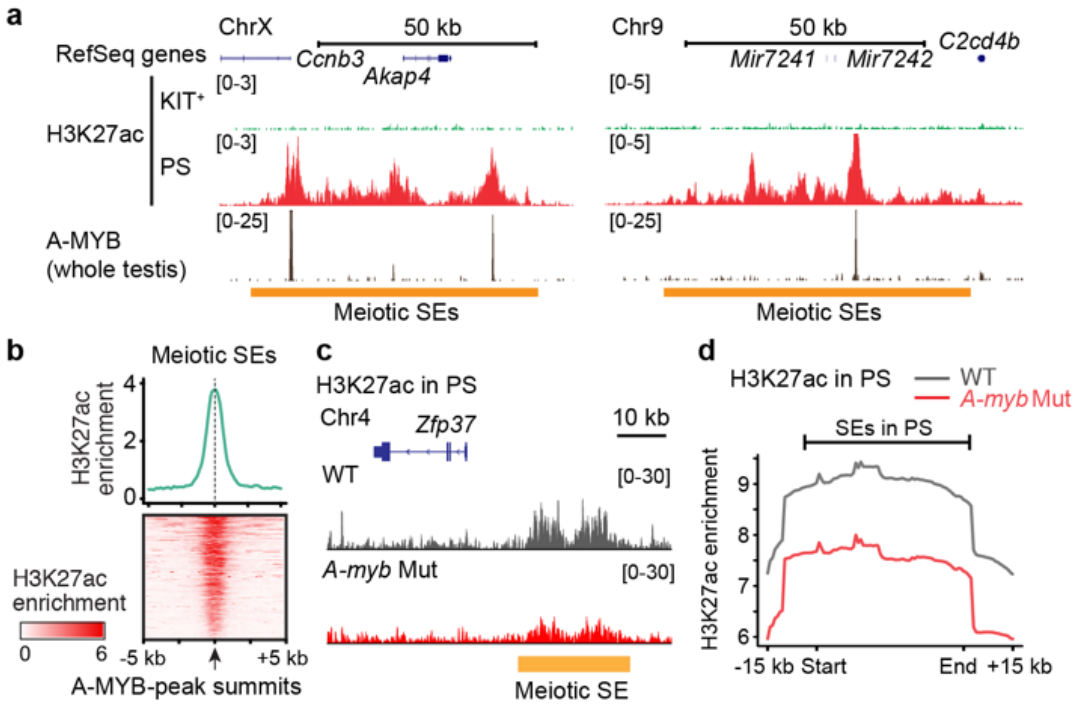


図 3. A-MYB のクロマチン結合領域、及び *A-myb* 機能欠失マウス精母細胞における H3K27ac の集積

a) meiotic SEs 領域における A-MYB のクロマチン結合領域の例。

b) meiotic SEs 内の A-MYB 集積領域付近のおける H3K27ac 集積レベル及び分布。

c) *A-myb* 機能欠失マウス精母細胞における H3K27ac の集積の例。

d) *A-myb* 機能欠失マウス精母細胞における meiotic SEs 内の H3K27ac 集積レベルの平均。

3. meiotic SEs は、未分化精原細胞において準備状態にある

これまでに、減数分裂期以降の精母細胞や精細胞で発現する遺伝子群のプロモーター領域は、未分化精原細胞において RNA ポリメラーゼⅡや活性化型ヒストン修飾 H3K4me2 が集積した準備状態にあることが報告されている。meiotic SEs の形成機構を明らかにするために、未分化精原細胞における meiotic SEs 領域のエピジェネティックな状態を解析したところ、H3K4me2 が集積していることが示された（図 4a、b）。meiotic SEs 領域における H3K4me2 の集積は、減数分裂期移行の精母細胞や精細胞では減少していた。また、meiotic SEs 領域以外に形成される活性化エンハンサー領域では H3K4me2 の集積はみられなかった。以上から、meiotic SEs は、未分化精原細胞において H3K4me2 の集積を伴う準備状態にあることが示唆された。

これらの結果から、meiotic SEs の標的となる精子形成関連遺伝子群は、次の 1～3 によって発現が制御されていると考えられる （図 4c）。1. 未分化精原細胞において meiotic SEs 領域及びプロモーター領域に H3K4me2 が集積した準備状態が形成される。2. 減数精子形成期へ移行後に A-MYB などの転写因子が集積する。3. H3K27ac が集積した活性化状態へ変化し、標的遺伝子の発現が誘導される。本研究では生殖細胞特異的なスーパーエンハンサーを同定し、特に A-MYB 依存的に meiotic SEs が形成されることを明らかにした。A-MYB 依存的な生殖細胞特異的遺伝子発現は鳥類の精巣においても示されていることから、MYB 依存的な meiotic SEs の形成は進化的に保存された精子形成遺伝子発現機構なのかもしれない。本研究において同定されたスーパーエンハンサーは、減数分裂期の前後で大きく変化することが示された。今後、減数分裂期へ分化が進行する過程をより詳細に解析することにより、体細胞型スーパーエンハンサーの消失及び meiotic SEs の活性化について、段階的な分子機構を解明したい。

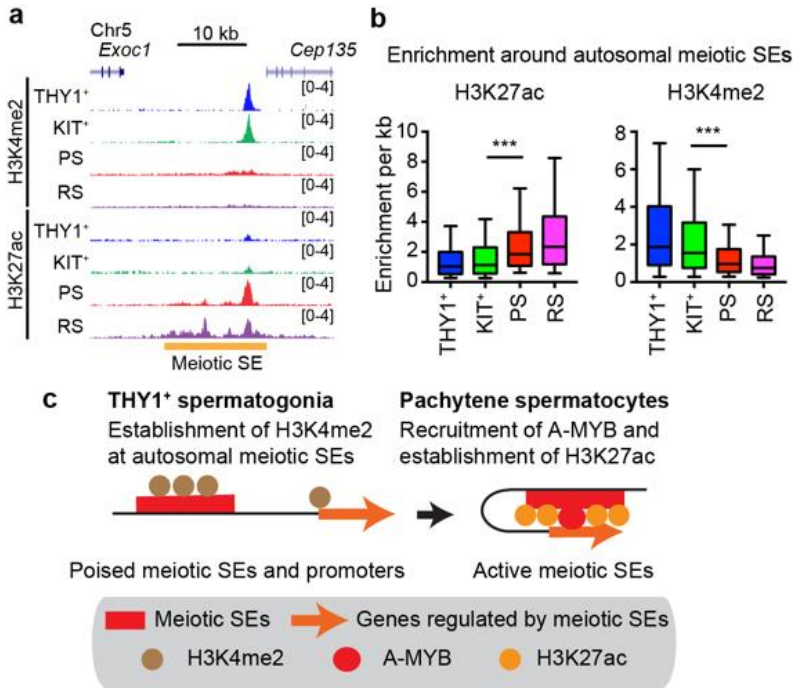


図 4. 未分化精原細胞における meiotic SEs 領域内の H3K4me2 の集積

a) meiotic SEs 領域における精子形成期を通した H3K4me2 及び H3K27ac 集積レベルの例。

b) meiotic SEs 領域における精子形成期を通した H3K4me2 及び H3K27ac 集積レベルの変化。

c) meiotic SEs 活性化機構、及び標的遺伝子発現のモデル。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究先は、シンシナティ小児病院医療センター生殖科学部門 Namekawa 研究室、アレルギー免疫部門 Barski 研究室、生物医学情報&発生生物学部門 Weirauch 研究室である。本研究遂行に協力頂いた共同研究者に感謝する。

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, Andreassen PR, Vidal M, Koseki H, Barski A, and 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; 31 : 1693-1703

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 5.

4) Maezawa S, Hasegawa K, Yukawa M, Kubo N, Sakashita A, Alavattam KG, Sin H, Kartashov AV, Sasaki H, Barski A, and 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, Alavattam KG, Tatara M, Nagai R, Barski A, and Namekawa SH. A rapidly evolved domain, the SCML2 DNA-binding (SDB) repeats, contributes to chromatin binding of mouse SCML2. Biol Reprod. 2019 Feb 1;100(2):409-419. doi: 10.1093/biolre/ioy181. PMID: 30137219

7) Alavattam KG, Maezawa S, Sakashita A, Khoury H, Barski A, Kaplan N and Namekawa SH. Attenuated chromatin compartmentalization in meiosis and its maturation in sperm development. Nat. Struct. Mol. Bio. : 2019 Mar;26(3):175-184. doi: 10.1038/s41594-019-0189-y. Epub 2019 Feb 18. PMID: 30778237

8) Maezawa S, Sakashita A, Yukawa M, Chen X, Takahashi K, Alavattam KG, Nakata I, Weirauch MT, Barski A, and Namekawa SH. Super-enhancer switching drives a burst in germline gene expression at the mitosis-to-meiosis transition. Nat. Struct. Mol. Bio. : in press.

9) Bolcun-Filas E, Bannister LA, Barash A, Schimenti KJ, Hartford SA, Eppig JJ, Handel MA, Shen L, Schimenti JC. A-MYB (MYBL1) transcription factor is a master regulator of male meiosis. Development. 2011 Aug;138(15):3319-30. doi: 10.1242/dev.067645. PMID: 21750041

10) Whyte WA, Orlando DA, Hnisz D, Abraham BJ, Lin CY, Kagey MH, Rahl PB, Lee TI, Young RA. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. Cell. 2013 Apr 11;153(2):307-19. doi: 10.1016/j.cell.2013.03.035. PMID: 23582322