

「エピジェネティクスの制御と生命機能」研究領域 領域活動・評価報告書

—平成21年度採択研究課題—

研究総括 向井 常博

1. 研究領域の概要

本研究領域は、エピジェネティクスの制御と生命機能の解明という視点をもった研究を対象とします。より詳しくは、エピジェネティクスの制御機構の解明、様々な生命現象とエピジェネティクスの関わり、エピジェネティクスの多様性や異常がかかわる疾患の解析を対象とします。それらの研究を通してエピジェネティクスの生命機能としての分子基盤を明らかにする事で、細胞リプログラミングに立脚した幹細胞作製・制御による革新的医療基盤技術の創出を目指します。

具体的な研究内容としては、1)動植物を問わずさまざまなモデル生物を用いてエピジェネティクスの制御機構をいろいろな角度から追求し、明らかにする、2)エピジェネティクスの個体差・多様性を探るとともに、エピジェネティクスの異常にもとづく疾患の解析を行なう、3)エピジェネティクスの解析や制御に資する技術の開発を行う、といった課題が考えられます。

2. 中間評価対象の研究課題・研究者名

件数： 2件(うち、通常型2件、)

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 研究実施期間

平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月(※平成 27 年 3 月終了予定)

4. 中間評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見・中間評価結果などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(中間評価の流れ)

平成 25 年1月 評価会開催(アドバイザーによる中間評価)

平成 25 年2月 研究総括による中間評価

平成 25 年2月 被評価者への結果通知、研究計画見直し

5. 中間評価項目

(1)研究の進捗状況と今後の見込み

(2)研究成果の現状と今後の見込み

6. 研究結果(中間評価)

総論:両名ともエピジェネティクスの根源に関わる重要かつ難しいテーマに取り組んでいる。まだ十分な成果は出ていないが、切り込むとつかりとなる重要な現象をつかんでおり、現状の研究計画通り進めてもらえば、期待できる重要な成果が得られるとおもわれるが、いずれも競争が激しい研究分野なので、海外の研究者に遅れることなく論文を早く出すことが重要。

1. 浦研究者「ヒストンh3k36メチル化酵素WHSC1による核構造体を介した新規DNA複製機構の解明」

中間評価: ヒストン H3K36 メチル化酵素 Whsc1 欠損マウスの異常に改めて着目し、胸腺の消失、脾臓細胞減少などから Whsc1 が損傷応答に重要である可能性を示した。ついで Whsc1 の DNA 切断と修復における役割の可能性をB細胞の分化系を用いて示し、遺伝子の組換えに着目したことで新たな展開が見えてきた。Whsc1 欠損の表現型が p53 欠損で抑制されるなど予備データも蓄積されつつあり、今後の展開に期待が持てる。

一方ではこの方向でいいのか、あるいはクロマチン修飾が重要な役割を果たしているのかなど常に検証を加えながら進めることが必要である。

今後の展開： B 細胞分化過程で、ゲノム組み換えが起こる遺伝子座に着目し、Whsc1 の欠損に伴う転写の異常、ゲノムの異常ならびにクロマチン修飾の異常を解析する。さらに Whsc1 のヒストン修飾活性の生物学的意義を検討し、転写と共役した DNA 損傷応答への H3K36me の関与を検証する。

2. 岡田研究者「精子細胞の分化・成熟過程におけるヒストン修飾の重要性の解明」

中間評価： マウス精子幹細胞において、エピジェネティックマーク(ヒストン H3K79 のメチル化)がその未分化細胞の維持にかかわっていることを、H3K79 メチル化酵素 DOT1L のノックアウトマウスを用いて明らかにした。ついで H3K79 は精子幹細胞の未分化性維持に重要な遺伝子群の転写活性化にかかわっていることが明らかになった。一方、成熟精子における残存ヒストンの生理的役割の解明については、一部成果が出ているがまだ手探り状態の状況にある。

順調に成果が出ている面もあるが、後者の課題については戦略を立て特色ある研究を展開する必要がある。

今後の展開： 精子幹細胞のクロマチン修飾(メチル化)による制御機構の全体像を明らかにする。一方精子クロマチン構造の解明については、H3.3 と転写調節・クロマチン構造保持との関連性の探索をはじめ、エピジェネティック修飾の遺伝機構解明につながる知見に焦点を当てる。

7. 評価者

研究総括 向井 常博 西九州大学 学長

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成 25 年 3 月末現在)

牛島 俊和 国立がん研究センター・上席副所長
 角谷 徹仁 国立遺伝学研究所総合遺伝研究系・教授
 金児-石野 知子 東海大学兼行科学部 教授
 古関 明彦 理化学研究所 免疫アレルギー化学総合研究センター グループディレクター
 佐々木 裕之 九州大学生体防御研究所 所長
 白髭 克彦 東京大学分子細胞生物学研究所 教授
 眞貝 洋一 理化学研究所基幹研究所 主任研究員
 田嶋 正二 大阪大学蛋白質研究所エピジェネティクス研究所 教授
 中西 理 武田薬品(株) 研究本部 主席部員
 広瀬 進 国立遺伝学研究所 名誉教授

(参考)

件数はいずれも、平成25年3月末現在。

(1) 外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	3	3	6
口 頭	7	8	15
その他	12	4	16
合 計	22	15	37

(2) 特許出願件数

国 内	国 際	計
0	0	0

(3) 受賞等

・岡田 由紀

平成 23 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞(平成23. 4)

(4) 招待講演

国際 9件

国内 4件

別紙

「エピジェネティクスの制御と生命機能」領域 中間評価実施 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研 究 課 題 名 (研究実施場所)	現 職(平成 25 年 3 月末現在) (応募時所属)	研究費(3 年間) (百万円)
浦 聖恵 (兼任)	ヒストンh3k36メチル化酵素WH SC1による核構造体を介した新規 店写機構の解明 (大阪大学医学研究科)	大阪大学医学研究科 准教授 (大阪大学医学研究科 助教)	48
岡田 由紀 (兼任)	精子細胞の分化・成熟過程におけ るヒストン修飾の重要性の解明 (東京大学分子細胞生物学研究 所)	東京大学分子細胞生物學研究所 特任准教授 (京大生命科学研究系キャリアパス形 成ユニット 特定准教授)	56

研究報告書

「ヒストン H3K36 メチル化酵素 WHSC1 による核構造体を介した新規転写制御機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年9月～平成27年3月

研究者: 浦 聖恵

1. 研究のねらい

近年、急速に進展した、ゲノムワイドの転写因子やクロマチン修飾さらに DNA 配列異常や RNA などの情報の集積は、転写因子の結合やヒストン修飾状態によって、単純に遺伝子の転写活性化状態を正か負にするのではなく、転写開始から伸長・終結までの多段階反応を互いに共役させながら進行して、さらに転写以外の DNA 代謝反応とも共役する大きな核構造体の存在を示唆する。エピジェネティクス制御を真に理解するためには、この既存の概念を越えた転写制御機構を根底から明らかにすることが欠かせない。

ヒストン H3, 36 番目リシン残基のメチル化 (H3K36me) は、種を越えて進行中の転写活性領域に分布を示すが、転写との直接の繋がりが未だに判然としない。酵母では、ヒストン H3K36me は唯一 Set2 によって担われており、ヒトでは5つの Set2 類似タンパク質が同定されている。WHSC1 はその一つで、ヒト4番染色体短腕の片アレル欠損によって発症する口蓋裂や発育不良、精神遅滞の症状を特徴とする 4p 症候群 (Wolf-Hirschhorn syndrome, WHS) の欠損領域に遺伝子は位置している。また、多発性骨髄腫の患者の多くが、この遺伝子座で転座していることから multiple myeloma SET protein (MMSET) とも呼ばれて来たが、ヒストン修飾能も含めて一切機能が不明であった。私たちは再構成クロマチンと ES 細胞・マウスを用いた生化学的、遺伝学的解析から、マウス Whsc1 が核内で H3K36me3 特異的なヒストンメチル化酵素であり、Whsc1 遺伝子の欠損が転写異常によって心臓形成異常などの正中線に沿った様々な形態異常を引き起こし、4p 症候群の主要な原因遺伝子である事をつきとめた。興味深いことに、Whsc1 は ES 細胞や胎児組織で特定の転写制御因子や、核構造体タンパク質、さらに hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) と複合体を形成している。そこで本研究では、Whsc1 による遺伝子転写制御の機構解析を通して、ヒストン修飾 H3K36me3 の制御と機能を明らかにし、さらに転写制御因子と細胞核構造を転写の多段階反応において機能的に結びつけ、エピジェネティクス制御の基盤となる新たな遺伝子情報発現制御機構の解明に発展させることを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

Whsc1 遺伝子のホモ欠損マウスは、胎性中期から様々な程度の成長遅延を示して出生直後に大半が死亡する。Whsc1 は全身で広く発現するが、特に胎仔では神経上皮細胞で発現が高く、欠損マウスは頸椎 C7 が胸椎化したホメオティック変異や胸骨の骨化遅延などの骨の異常を示す。そこで最初に ES 細胞分化系で Whsc1 の機能解析を試みた。Whsc1

欠損 ES 細胞は、未分化状態では野生型に比べて細胞形態、増殖に何ら異常が認められないが、分化誘導に伴って *Whsc1* 欠損による増殖抑制が認められる。*Whsc1* 欠損による遺伝子発現変動をマイクロアレイを用いて網羅的に調べたが、未分化・分化に関わらず、細胞周期を含めて特定の遺伝子群の顕著な発現異常は見出せなかった。

ところで *Whsc1* 遺伝子はハプロ不全を示し、ヘテロ欠損マウスで、脱毛など早期老化を示す。さらにその 1 割ほどで、著しい成長遅延や骨形成異常、さらに感染症や胸腺の消失、脾臓細胞数の減少など、DNA 損傷応答と密接に関わるリンパ球系の異常が認められた。また一方で、*Whsc1* 複合体解析から、転写因子とともに DNA 損傷応答因子と複合体を形成する事を見出し、*Whsc1* が転写反応と DNA 損傷反応を共役させるのではないかと考えを修正した。

折しも遺伝子ノックダウンの系で *WHSC1* が DNA 二本鎖切断 (DSB) 部位に、ヒストン H4K20me を介して 53BP1 をリクルートして損傷応答に寄与すると報告されたが、私たちの *Whsc1* ノックアウトの系で DSB に対する高感受性も 53BP1 の集積異常も認められない (業績 2)。依然として謎につつまれた *Whsc1* の分子機能に迫るため、DNA 損傷応答を積極的に細胞分化に取り込んだリンパ球の分化過程で *Whsc1* の機能解析を行った。

胎仔肝臓の造血幹細胞を用いた ex vivo 培養系および骨髓移植解析の結果、*Whsc1* が IgH 遺伝子座の組み換えに関わって、遺伝子欠損マウスでは骨髓における B 細胞初期分化さらに、脾臓 B 細胞のクラススイッチ組み換え (CSR) 段階で細胞増殖が抑制されて分化異常を示すことが明らかになった。この異常は *p53* 遺伝子欠損によって回復される。以上の結果を踏まえ、転写と共役した DNA 損傷応答に H3K36 メチル化酵素 *Whsc1* は機能するとのモデルを提唱する。

(2) 詳細

① ES細胞における機能解析

(1) 胚様体 (EB) 形成過程で *Whsc1* 欠損により細胞増殖速度が抑制される。

Whsc1 は *Sal11*, *Sal14* 及び *Nanog* などの未分化細胞特異的な転写因子と複合体を形成しているが、未分化状態では *Whsc1* 欠損による細胞形態、増殖に何ら異常が認められず、

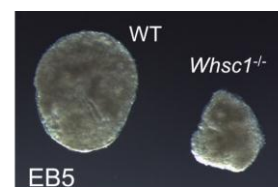


図1: *Whsc1* 欠損による EB 成長阻害

分化誘導に伴って細胞増殖抑制が認められる (図 1)。未分化および EB 形成後 10 日経過した分化細胞 (EB10) において、*Whsc1* 欠損による遺伝子発現変化を網羅的にマイクロアレイで調べたところ、*Whsc1* 欠損 EB10 では野生型に比較して未分化細胞特異的な遺伝子の発現上昇と免疫システムに関わる遺伝子の発現群抑制の傾向が見られるが、細胞増殖異常に結びつく遺伝子を含めて、特定の遺伝子群の顕著な発現異常は見出せなかった。

(2) *Whsc1* は DNA 損傷応答タンパク質と DNA 損傷ストレス未添加時に、特異的に相互作用している。

未分化 ES 細胞核において、*Whsc1* は主にクロマチンフラクションに存在し、*Whsc1* 抗体を用いた免疫沈降解析から転写因子の他に、DNA 二本鎖切断応答に関わる 53BP1, Tip60

と平常状態で複合体を形成していることを見出した。Whsc1が転写領域をマークするH3K36me酵素活性を有することから、これらの結果は、Whsc1が転写に伴うDNAストレス応答に関与する可能性を示唆する。

② 胎仔肝臓 (Fetal Liver, FL) 細胞を用いたリンパ球細胞分化解析

(1) Whsc1は造血能力に関与し、中でもB細胞分化に必要である。

遺伝子欠損マウスは出生直後に致死のため、E14.5 FL細胞を野生型成体マウスの骨髄に競合および非競合条件で移植して4ヶ月経過した骨髄、脾臓、胸腺のFACS解析を行った。その結果Whsc1欠損マウスでは造血幹細胞の数が減少し、造血能力が野生型に比較して著しく低いことが判明した。また造血細胞分化では、特にB細胞の比率が末梢血で低下し、骨髄では、B細胞分化に伴ってV(D)J遺伝子組み換えが起こる段階を追ってB細胞の数の減少が認められた(図2)。また、脾臓細胞培養で、クラススイッチ組み換え反応(CSR)誘導によるB細胞成熟にもWhsc1が必要なことが明らかになった。

Whsc1の分子機能に迫るためにFL細胞から造血幹細胞をソートし、OP9ストローマ細胞上で培養してB細胞分化を誘導した。

その結果、IgM 発現immature B細胞への分化がWhsc1欠損によって著しく抑制される結果を得た。同時に、IgH遺伝子座の組み換えをPCR法で解析したところ、V(D)J組み換え反応の最初のD-J_H組み換えの段階から遅延が確認された。

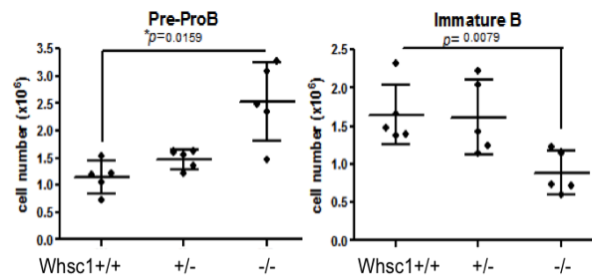


図2 骨髄におけるB細胞分化異常

(2) P53欠損によって、Whsc1欠損によるB細胞分化異常は回復される。

P53/Whsc1ダブルヘテロ欠損マウスを交配し、得られたP53/Whsc1ダブル欠損マウスE14.5のFL造血幹骨髄をex vivo B細胞分化系で培養すると、Whsc1欠損によるB細胞分化異常は回復され、細胞増殖能も回復した(図3)。P53はゲノムDNA損傷に応答することから、Whsc1がDNA損傷修復に直接関与する可能性も含めて、ゲノム維持に関わる可能性が強く示唆された。

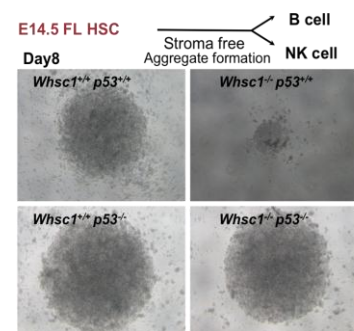


図3 Whsc1欠損による異常はp53欠損によって回復する

以上の結果を踏まえて、高等真核生物では転写活性化自体をクロマチンDNA損傷の危機と見なし、ゲノム機能を維持する転写-DNA損傷応答ファクトリーが存在し、この核内の特殊な場でWhsc1はH3K36メチル化を介して機能する新規の“転写-DNA損傷応答共役モデル”をここに提唱する（図4）。

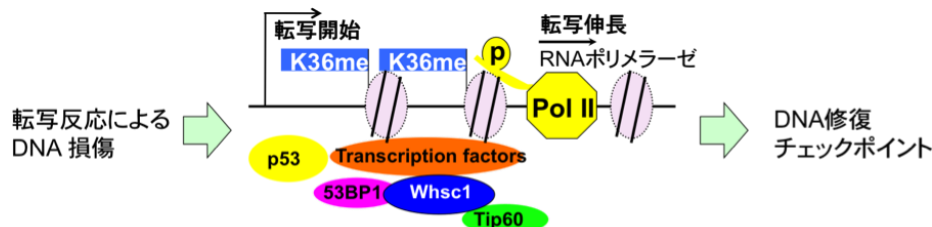


図4 転写-DNA損傷応答を共役させるWhsc1の機能モデル

3. 今後の展開

Whsc1 が単純に転写活性調節でなく、また外因性の DNA 損傷応答ではなく、転写と密接に関わる内因性の DNA 損傷応答に関与することから、その機能を発生・分化にともなってプログラムされた DNA 切断ゲノム領域に絞って、均一な分化段階の細胞で解析することが極めて重要になる。3年間の研究で遺伝子再編成を伴う B 細胞分化過程に Whsc1 が機能することを突き止め、その個体異常を *ex vivo* で再現し、分離精製することが可能な細胞培養実験系が確立した。そこでこの B 細胞分化系を用いて、①Whsc1 複合体を再検証し、特に IgH 遺伝子座に着目して②それら構成因子のゲノム上の分布を特定の分化段階の B 細胞で明らかにして、③RNA ポリメラーゼの分布及び Whsc1 欠損による転写異常をに対比することにより、より具体的な機能モデルを構築する。その一方で④V(D)J 組み換えは非相同末端結合(non-homologous end-joining; NHEJ)によって進行することから、人為的に非相同末端結合を起こす細胞で、既存の DNA 修復過程にヒストン H3K36me とその酵素 Whsc1 を組み込む研究を開始する。

最終的に、⑤H3K36 メチル化ヒストンを用いた再構成クロマチン系で、Whsc1 による転写-DNA 損傷応答の分子機能モデルを検証する。以上の研究を進めることにより、酵母からヒトまで種を越えて進行中の転写活性領域に分布 H3K36me の謎に、転写-DNA 損傷応答共役にゲノム機能維持の新しい視点を持ち込んでこたえられる事が期待される。細胞老化とガン化、そして生物進化の接点を分子レベルで明らかにする可能性がでて来た。

4. 自己評価

当初、Whsc1 欠損 ES 細胞を出発材料にして、個体における遺伝子発現、分化異常を反映する分化系を模索し、生化学的に手法を駆使して Whsc1 の詳細な分子機能解析を行って、転写の開始、伸長、終結、核外輸送の共役させる新規の転写機構に到達することをめざして研究を開始した。ところが、まず、ES 細胞分化系で、*in vivo*を反映して、特定の細胞に高効率に分化させることができずにつまずいた。そもそも H3K36me の転写制御への関わりはメチル化酵素欠損によって明確な転写異常が突き止められずに、多細胞生物全般で未だに不明である。様々に分化した ES 細胞が混ざった状態で、Whsc1 欠損による微妙な転写異常を見出すことは難しいと判断し、計画の甘さを反省して、欠損マウスの異常から推察された DNA 損傷応答に視点を変えた。しかし放射線照射による DNA 二本鎖切断では、Whsc1 欠損 MEF と野性株で感受性の差は見られない。ここで曖昧な差を深追いせずに、Whsc1 が応答する DNA 損傷

は、外部環境から与えられるものでなく、発生・分化に伴う転写反応や、プログラムされた遺伝子組み換え自体ではないかと発想を転換させた。この考えに基づいて研究材料を再吟味したことによって、ようやく研究を軌道に乗せることができた。正常な転写を維持するためには、ゲノム維持が欠かせず、転写自体が DNA 不安定化の要因になる。新規の核構造を介した転写制御機構を H3K36me を糸口に解明することをめざして開始した研究を、ここで、当初のねらいを越え、転写とDNA損傷応答を共役させる新規のゲノム機能制御機構に向けた研究に発展させる事ができた。今後、転写制御の進化に繋がる研究に発展させることができると考える。

5. 研究総括の見解

ヒストン H3K36 メチル化酵素 whsc1 欠損マウスの異常に改めて着目し、胸腺の消失、脾臓細胞減少などから whsc1 が損傷応答に重要である可能性を示した。ついで whsc1 の DNA 切断と修復における役割の可能性を B 細胞の分化系を用いて示し、遺伝子の組換えに着目したことで新たな展開が見えてきた。whsc1 欠損の表現型が p53 欠損で抑制されるなど予備データも蓄積されつつあり、今後の展開に期待が持てる。一方ではこの方向でいいのか、あるいはクロマチン修飾が重要な役割を果たしているのかなど常に検証を加えながら進めることが必要である。

成果は必ずしも十分とはいえないが、この計画で進めて欲しい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Kashiwagi K., Nimura K., *Ura K. and *Kaneda Y. DNA methyltransferase 3b preferentially associates with condensed chromatin. <i>Nucleic Acids Res.</i> , 39, 874-888, 2011 |
| 2. Andrea H., Yinghua G., Anbazhagan R., Kiyoe U. , Gunnar S., Anyong X., Jagesh S. and Ralph S. Impact of histone H4 lysine 20 methylation on 53BP1 responses to chromosomal double strand breaks, <i>PLoS ONE</i> , 7, e49211, 2012 |

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. **Kiyoe Ura.** “A histone H3 lysine 36 methyltransferase links developmental transcription factors to Wolf-Hirschhorn syndrome.” International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities, 淡路島, 2011, 1.
2. **Kiyoe Ura.** “Role of histone methylation and histone variants in developmental gene regulation.” CDB Symposium 2011, 神戸, 2011, 3.
3. **浦 聖恵,** “ヒストンの多種多様性を介したエピジェネティック制御” 第5回日本エピジェネティクス研究会年会シンポジウム, 熊本, 2011, 5.
4. **Kiyoe Ura.** Regulation and Function of Histone Diversity in Development Gene Regulation. 第35回日本分子生物学会, 横浜 2012, 12.
5. **Kiyoe Ura,** Takafumi Yokota, Makiko Kajio, Atsushi Iwama and Yasufumi Kaneda. “Histone H3 lysine 36 methyltransferase Whsc1 controls the programmed DNA-damage response during V(D)J recombination” The 8th 3R Symposium, Awaji 2012, 11.

研究報告書

「精子細胞の分化・成熟過程におけるヒストン修飾の重要性の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 岡田 由紀

1. 研究のねらい

遺伝子配列に依存しない遺伝子発現調節機構のひとつであるエピジェネティクスは、細胞の基本的な生命維持のみならず、細胞の分化や癌化などにも重要な役割を有する。中でも、幹細胞研究や発生工学領域における遺伝子情報のリプログラミングに重要なエピジェネティック制御の解明は現在最も注目を集めている分野であり、基礎研究のみならず、疾患治療や新たな技術開発などに結びつくような研究成果が強く期待される。

生殖細胞におけるエピジェネティック研究は古くから研究が盛んな分野であるが、従来の解析方法に十分量の試料を調整することがしばしば困難であったことから、その解析は特定の遺伝子(産物)の細胞全体での増減や局在の検出に限定されるという問題があった。しかし近年、次世代シーケンサーや高感度のマスペクトロメトリーなどの技術革新により、微量な試料からゲノムワイドレベルの網羅的な解析が可能となった。

そこで本研究では、従来法では解析が困難であった二種類の生殖細胞群～精子幹細胞と成熟精子～について、これらの細胞における未知のエピジェネティック調節機構を明らかにし、生殖工学分野の新たな技術開発や男性不妊等の疾患治療に有用な基礎的知見を提供することを目的とする。具体的には、下記(A)(B)の課題を提案する。

(A) 精子幹細胞におけるクロマチン構造と遺伝子発現の検討

(B) 成熟精子における残存ヒストンのクロマチン構造と遺伝子発現の検討

2. 研究成果

(1) 概要

これまでに(A)(B)それぞれについて、ノックアウトマウスの樹立や生化学的手法、次世代シーケンサーや LC-MS を用いた網羅的解析を施行し、研究を進めている。

精子幹細胞においてはヒストン H3K79 のメチル化がその未分化性の維持に重要な役割を果たすことを見出した。生殖細胞特異的に H3K79 メチル化酵素 DOT1L をノックアウトしたマウスを作製した結果、雄マウスは第二次性徴期以降に不妊となった。DOT1L を欠損した精子幹細胞は *in vitro* 培養で自己複製による未分化状態が維持できなかったことから、DOT1L 欠損マウスは精子幹細胞の枯渇により不妊になると考えられた。その分子機序を解明するために ChIP-seq 解析でメチル化 H3K79 のゲノム局在を検討した結果、メチル化 H3K79 は転写が亢進している遺伝子上に濃縮していたことから、H3K79 メチル化は精子幹細胞の未分化性維持に重要な遺伝子群の転写活性化に寄与していることが明らかとなった。

一方成熟精子においては、LC-MS 解析により機能未知のものを含め 14 種類のヒストンバリエーションの存在を確認した。そのうちのひとつである H3 バリエーション H3.3 について ChIP-seq を

行ったところ、約 600 の遺伝子のプロモーター近傍にその局在が認められた。さらに RNA-seq を行って精子内遺伝子発現を検討した結果、減数分裂後の転写産物の残存と思われる mRNA やタンパク分解系の遺伝子をコードする RNA が多く認められた。しかし RNA-seq と H3.3 ChIP-seq との共局在を検討した結果、有意なオーバーラップや機能的濃縮を示唆する所見は得られなかった。このことから、精子成熟途中で残存したが成熟後は機能的に重要でない転写産物と、成熟精子内あるいは受精時に重要な機能をもつ転写産物との識別が今後の大きな課題であると考えられた。

(2) 詳細

研究テーマ(A) 精子幹細胞におけるクロマチン構造と遺伝子発現の検討

【背景と目的】

哺乳類の精子形成過程は、始原生殖細胞期のインプリンティング情報の確立、減数分裂期の染色体相同組み換え・分配、さらに減数分裂後のヒストン除去～クロマチン凝集など、ダイナミックかつユニークなジェネティック/エピジェネティック情報の変化が起こる。これらの変化におけるヒストン修飾の重要性は長年の研究により着実に明らかにされつつあるが、依然その意義が未解明なヒストン修飾が数多く残されている。

そこで精巣内生殖細胞に高発現しているヒストン 3 リジン 79 (H3K79)メチル化酵素 DOT1L を一例とし、そのノックアウトマウスの解析を基盤として、精子幹細胞におけるクロマチンダイナミクスと転写制御の解明を目的とした。

【方法と結果】

Vasa(Mvh)-Cre マウスとの交配によって E16-P1 で DOT1L を生殖細胞特異的に除去した結果、ノックアウトマウスは、生後 6 週目までは正常な精子形成を示したが、それ以降に顕著な精巣萎縮を呈し、12 週目には生殖細胞が完全に脱落して不妊となった(図1)。病理組織学的には 5-6 週目に精原細胞の増殖が停止し、それ以降「精子の素」が供給されない、即ち精子幹細胞 (Spermatogonial stem cell; SSC) の異常が示唆された。ノックアウト(KO)マウスから採取した SSC およびタモキシフェン添加によって培養後 DOT1L KO を誘導した SSC はいずれも *in vitro* 培養で未分化状態を維持できずに分化した(図2)。

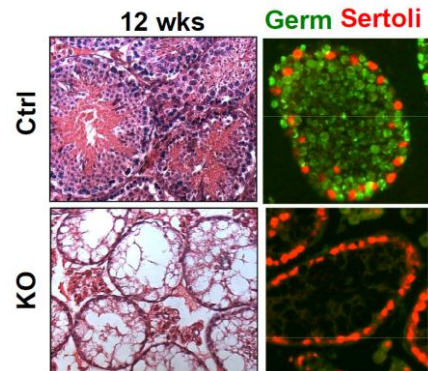


図1. 精巣特異的 DOT1L ノックアウトマウスの精巣組織像(12 週齢)。ノックアウト(KO、下段)では生殖細胞が顕著に脱落している。

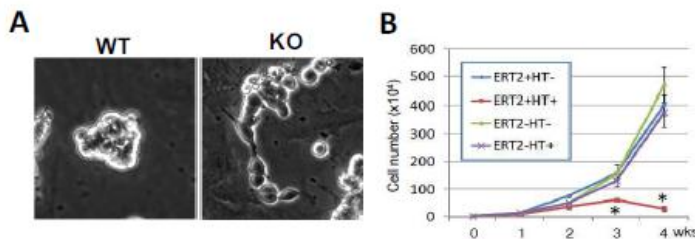


図2. DOT1L KO 精子幹細胞の形態と増殖。(A) KO マウスから樹立した精子幹細胞はコロニーせず、鎖状の分化した形態を示す。(B) タモキシフェン処理(HT)により KO を誘導した SSC(赤線)はその増殖が停止する。

次に遺伝子発現を検討した結果、DOT1L KO SSC では複数の未分化マーカーの発現が低下していた。さらに Chromatin immunoprecipitation-sequence (ChIP-seq) でゲノム上における H3K79 メチル化の局在を検討した結果、H3K79 メチル化の約 90%が遺伝子コード領域に局在しており、ほぼ全ての既報の SSC マーカー遺伝子上に濃縮していた(図3)。逆に分化マーカーや、他細胞で H3K79 メチル化の報告がある遺伝子上には局在しなかったことから、H3K79 メチル化は SSC におけるグローバルな活性化マークであると考えられた(図4)。

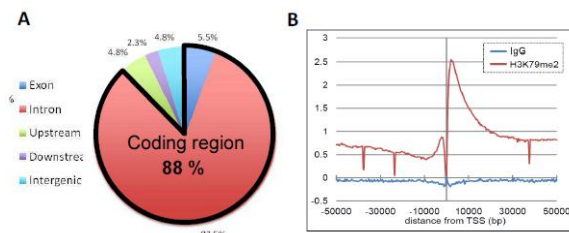


図3. メチル化 H3K79 のゲノム上の局在。(A) メチル化 H3K79 の 88%が遺伝子コード領域に局在する。(B) メチル化 H3K79 は転写開始点(TSS)直後に一過性のピークを形成する。

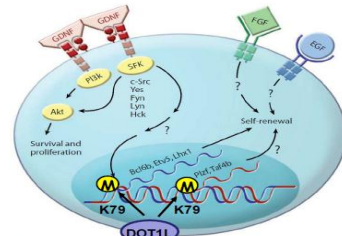
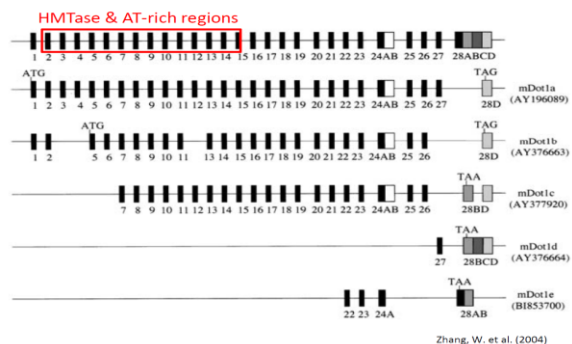


図4. 精子幹細胞における DOT1L の役割のモデル図。DOT1L は精子幹細胞の未分化維持に関与するシグナルの下流で、標的遺伝子の転写活性化に寄与する。Oatley & Brinster, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2008 より改変

研究テーマ(A') 成熟精子における残存ヒストンのクロマチン構造と遺伝子発現の検討

精巣における DOT1L の発現パターンを把握するために ISH を施行した。その結果、DOT1L mRNA はクロマチンが凝集した精子細胞～精子で最も強い発現が認められた。さらに減数分裂後の精子細胞には、体細胞や減数分裂前の二倍体細胞には認められない特異的なバリエントが優位に発現していた。このバリエントは、体細胞型 (mDOT1La) がエクソン 27 のあとエクソン 28D にスプライシングされるのに対し、27 と 28D の間に 28B が存在し、その結果、体細胞型には存在しない 197 アミノ酸を C 末端側にコードしていた(図5)。これを mDOT1Lt と命名し、配列情報を NCBI に登録した (Kusumoto & Okada, Genbank# JF508521.1)。このバリエントはマウスのみならずヒトにも存在した。



精巣 (半数体) 特異的な mDOT1L (mDOT1Lt) : 197aa larger than mDOT1La



図5. マウスの DOT1L スプライシングバリエント(上段)と、本研究で同定した精巣半数体細胞特異的バリエント DOT1Lt(下段枠内)の遺伝子構造。

研究テーマ(B) 成熟精子における残存ヒストンのクロマチン構造と遺伝子発現の検討

【背景と目的】

生体を構成する細胞の中で唯一ヒストンの存在意義が不明確な細胞が成熟精子である。精子の成熟過程でヒストンの大部分がプロタミンと呼ばれる精子特異的塩基性蛋

白によって除去され、DNA が高次に凝集する。その結果、転写因子の DNA への結合が阻害され、また転写因子自身の転写翻訳も抑制されるため、成熟精子における転写活性化機構はほぼ完全に抑制されていると考えられてきた。しかし実際精子ゲノムの 15-20 %は依然ヒストン構造を保持しており、この残存ヒストンにはアセチル化や H3.3 バリエントなど転写活性化に寄与する修飾形態が、体細胞に比較して多く認められることが知られている。そこで本研究では、この残存ヒストンの生理学的意義の解明を目標とした。具体的には以下の疑問点について検討している（図 6）。

- ① どんな遺伝子がヒストン画分に存在するか（規則性の有無）
- ② ヒストンの局在と転写活性に相関があるか
- ③ どのように転写活性が保持されているか
- ④ これらの機構は受精に重要であるか

【方法と結果】

10 週齢のマウス精巣状態から精子を採取し、10~20mM DTT 存在下で MNase 処理をして精子ヒストン画分を可溶化した。この画分を LC-MS/MS を用いて解析

し、精子ヒストンに存在するヒストンバリエントのプロファイリングを試みた。その結果、H3.3 に加えて TH2B や CENP-A など既知のものを含む 10 数種類のバリエントが同定された。特に H2A は比較的多数のバリエントが同定された。さらに修飾では、H4 のアセチル化と、H3K79 メチル化が確認された（図 7）。

次にこのヒストン画分を用いて、抗 pan H3 抗体と抗 H3.3 抗体で ChIP-seq を行い、H3.3 のゲノム上の局在を解析した。その結果、H3.3 は約 600 遺伝子の転写開始点およびその近傍（±5Kbp）に濃縮傾向を認めた。これらの遺伝子の中には、精子のクロマチン凝集に関わる Tnp/Prm ファミリーや、精子の運動性・卵への侵入に必須の機能を有する遺伝子群が含まれていた（図 8）。

H3.3 は体細胞では転写が活性化しているクロマチンに組み込まれる。そこで精子においても H3.3 の局在と転写活性化に相関がみられるかについて検討するため、RNA-seq を施行した。その結果得られた上位 500 遺伝子について解析したところ、精子形成に関連する遺伝子の発現が有意に上昇しており、特にプロタミンなど減数分裂後の転写産物の残存と思われる mRNA が多く認められた。また興味深いことにタンパク分解経路（ユビキチン-プロテアソーム経路）関連遺伝子も有意に発現しており、精子成熟におけるダイナミックなタンパク分解を反映していると考えられた。しかし H3.3 との共局在について

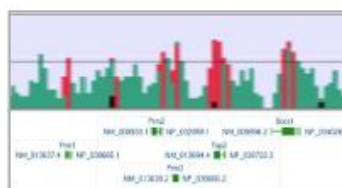


図 8. マウス Chr.6 Prm-Tnp コード領域で見られた H3.3 の局在（遺伝子は左から Prm1、Prm2、Prm3、Tnp2、Socs1）。赤いピークが、pan H3 に比較して H3.3 が濃縮していた部分を示す。

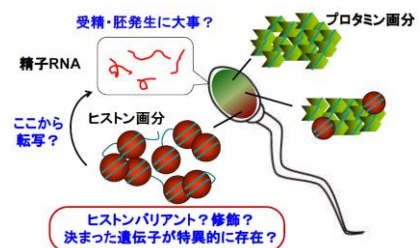


図 6. 精子残存ヒストンの疑問点。

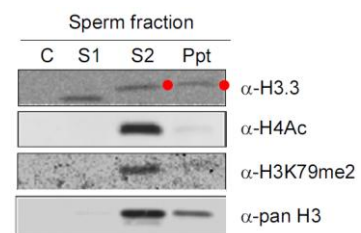


図 7. 精子残存ヒストンの修飾、C:細胞質画分、S1:DTT 処理画分、S2:DTT+MNase 処理画分、Ppt:ペレット画分。

有意なオーバーラップや機能的濃縮を示唆する所見は得られなかった。従って、精子成熟途中で残存したが成熟後は機能的に重要でない転写産

物と、成熟精子内あるいは受精時に重要な機能をもつ転写産物との識別が今後の大きな課題であると考えられた。

(B) 成熟精子における残存ヒストンのクロマチン構造と遺伝子発現の検討

成熟精子ヒストンの LC-MS 解析によって同定したバリエントを表1に示す。このうち H2aa は理化学研究所・石井らのグループによって、胚性ヒストンとして受精卵のリプログラミングに重要な役割を果たすことが報告されている (CREST 公開報告書より)。さらに H2aa には H2A に

H2A	H2B	H3	H4
H2A	H2B	H3	H4
H2aa	TH2B	CENPA	
H2AJ	SubH2Bv	H3.3	
H2AL1		H3.1T	
H2AL2			
H2AZ			

表1 成熟精子で検出されたヒストンバリエント

は存在しない特異的なリン酸化が認められたことから、このリン酸化が H2aa の機能に影響するかどうかを検討中である。他のバリエントの中で減数分裂後に顕著にその発現が増加するものについては、精子幹細胞で遺伝子をノックダウンし、それを移植することによって、*in vivo* でその表現型を観察中である。

3. 今後の展開

(A) 精子幹細胞におけるクロマチン構造と遺伝子発現の検討

これまでに得られた結果に加え、さらなる検討の余地がある点は次の 2 つである。今後は ChIP-seq などを行いこれらの疑問点に答える。①精子幹細胞の未分化性維持に重要な遺伝子の多くは、性成熟前の一過性の精子形成にも必須であるものが多く、ゲノムワイドのグローバルな転写活性化調節という結果は DOT1L KO マウスで見られた性成熟後の精子形成に特異的な表現型を説明できない。②DOT1L KO 時には SSC 分化マーカーの発現上昇が認められた。すなわち、その転写活性化が DOT1L/H3K79 メチル化に依存する遺伝子とそうでない遺伝子が存在するが、その違いは何に起因するか。

(B) 成熟精子における残存ヒストンのクロマチン構造と遺伝子発現の検討

LC-MS で同定した精子のヒストン修飾について、ChIP-seq でその局在を検討する。RNA-seq は手技的改善を図り、さらに small RNA の網羅性を高めた解析を予定している。最終的にヒストン局在・修飾と遺伝子発現との相関を明らかにする。これにより精子内の遺伝子転写と受精卵への RNA の持ち込み、あるいは精子残存ヒストンの受精における寄与を示唆する知見が得られると期待される。受精に重要であることが示唆される候補については、受精卵でノックダウンを施行し機能的な解析を行う。

4. 自己評価

(A) 本研究によって、過去の報告が少ない精子幹細胞のエピジェネティック調節機構において重要なエピジェネティック因子を同定できた。当初のねらいのひとつは、精子幹細胞におけるクロマチン修飾と遺伝子発現の相関を検討することで、ES 細胞や他の組織幹細胞との類似点・相違点を明らかにし、ES 細胞や iPS 細胞から精子幹細胞への誘導等の実用化に有用な知見を提供することであったが、昨年、H3K79 メチル化は線維芽細胞の iPS 化を抑制することが報告された (Onder *et al.*, Nature, 2012)。毛包幹細胞でも、分化前後で H3K79

メチル化の標的遺伝子が増加することが報告されている(Lien *et al.*, Cell Stem Cell, 2011)。これらを考慮すると、H3K79 メチル化局在と遺伝子発現に対する影響は細胞の分化度と大きく相関する一方で、その表現型には細胞特異性があることが伺える。従って本研究の成果は、組織幹細胞特有のエピジェネティックマークとその制御機構に有用な知見を提供したと考える。

(B) 精子 RNA が受精卵に持ち込まれるという既知の事実に基づき、その RNA と精子内転写との関連性および受精への影響を明らかにすることが本研究の発案時のねらいであった。しかしその後、精子(父親)由来のエピジェネティック情報が子孫に遺伝するという報告がなされたことから(Carone *et al.*, Cell, 2010, Ng *et al.*, Nature, 2010, Seong *et al.*, Cell, 2011)、精子由来のエピゲノム状態は精子内の転写調節だけでなく、受精卵のいわゆる「初期化」にも影響する可能性が強く示唆されている。これまでに得られた成果はまだこのメカニズムに直接迫るものではないが、今後より多くの、残存精子エピジェネティック状態に関する知見を得ることで、エピジェネティック遺伝を制御するクロマチン構造の解明に貢献できると期待される。

5. 研究総括の見解

マウス精子幹細胞において、エピジェネティックマーク(ヒストン H3K79 のメチル化)がその未分化細胞の維持にかかわっていることを、H3K79 メチル化酵素 DOT1L のノックアウトマウスを用いて明らかにした。ついで H3K79 は精子幹細胞の未分化性維持に重要な遺伝子群の転写活性化にかかわっていることが明らかになった。一方、成熟精子における残存ヒストンの生理的役割の解明については、まだ手探り状態の状況にある。

順調に成果が出ている面もあるが、後者の課題については戦略を立て特色ある研究を展開して欲しい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

Yamagata K, Okada Y*, “Understanding paternal genome demethylation through live-cell imaging and siRNA”. *Cell Mol Life Sci.* 68(10):1669–79, 2011.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【主要な学会発表】

- 第 33 回日本分子生物学会年会(シンポジウム)(2010 年 12 月, 神戸)
Title: DOT1L/KMT4, an H3K79 methyltransferase, is required for the maintenance of spermatogonial stem cells
- 第 16 回日本生殖内分泌学会年会(2011 年 11 月, 東京)
Title: Investigation of the role of DOT1L, an H3K79 methyltransferase, during

spermatogenesis

- The 6th Japanese-French Frontiers of Science Symposium (Jan 2012, France)
Title: Investigation of the role of DOT1L, an H3K79 methyltransferase, during spermatogenesis
- Cold Spring Harbor Asia 2012 “Epigenetics, Chromatin & Transcription”
(Apr 2012, China) (Oral presentation)
Title: Investigation of the role of H3K79 Methylation in Spermatogonial Stem Cells

【受賞】

平成 23 年度 若手科学者賞

【著書】

牧野吉倫、岡田由紀. 「精子形成のエピジェネティック制御機構」、実験医学 30 (18), 羊土社、2012.