

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 川瀬 雅貴

論文題目 雄マウス生殖細胞発生過程におけるエピゲノムダイナミクス

### 論文審査担当者

主 査 名古屋大学教授 一柳 健司

委 員 名古屋大学教授 隅山 健太

委 員 名古屋大学教授 吉村 崇

委 員 名古屋大学助教 飯田 敦夫

委 員 名古屋大学助教 大谷 仁志

## 論文審査の結果の要旨

川瀬雅貴は、ノックアウトマウスと各種大規模シーケンシング技術を用いて、雄性生殖細胞の発生過程におけるエピジェネティック制御システムの役割の一端を明らかにした。以下の要旨を記載する。

生殖細胞は次世代にゲノム情報を伝達する唯一の細胞であり、そのゲノムの忠実性を維持するため、塩基置換や転座の発生を抑えるとともに、ゲノムに散在するレトロトランスポゾンの転移を抑えなければならない。レトロトランスポズンは一般的にエピジェネティックな制御機構によって転写抑制されているが、生殖細胞の発生過程では、遺伝子発現パターンの大規模なリプログラミングがあり、エピジェネティック修飾も大きく増減するため、その間、どのようにレトロトランスポズンを制御しているのかを解明することは遺伝学的、細胞生物学的、進化学的に重要であるとともに、動物生産や生殖医療など社会的な側面からも重要である。

生殖細胞で特異的に発現する piRNA は小分子 RNA の一種で、主にレトロトランスポゾンの抑制に関わることが明らかにされているが、その発現プロファイルの発生ダイナミクスは正確に分かっていなかった。そこで、川瀬は公共データベースから piRNA の大規模シーケンシングデータ (small RNA-seq) を再解析し、piRNA 発現プロファイルはマウスの成長に合わせて変化するのではなく、生殖細胞の発生ステージによって変化することを明らかにした。さらに、転移活性を持つ若いレトロトランスポゾンの piRNA は DNA メチル化が激減する前駆精原細胞の時期に非常に多く発現し、その後、発生が進むと発現量が大きく低下しており、piRNA のレトロトランスポゾンに対する制御機構は生殖細胞の発生初期にのみ働いていることを示唆する結果を得た。

次に、ヒストン H3 の 9 番目のリジンのトリメチル化 (H3K9me3) に注目し、この修飾を担う SETDB1 の生殖細胞特異的ノックアウトマウスを作製した。このマウスでは第一減数分裂前期のザイゴテンでアポトーシスによって精母細胞が死に、不妊になることを明らかにした。さらにノックアウト精母細胞における mRNA 発現プロファイル (mRNA-seq)、DNA メチル化パターン (WGBS)、ヒストン修飾パターン (ChIP-seq)、クロマチン弛緩パターン (ATAC-seq) を大規模シーケンシングによって明らかにし、野生型精母細胞と比較したところ、遺伝子については性染色体連鎖遺伝子群が顕著に発現増加していることを明らかにした。これらの細胞はザイゴテンの次のステージ (パキテン) で強い発現抑制を受けることが知られていたが (meiotic sex chromosome silencing)、この現象に SETDB1 が関与し、その影響は前の発生ステージから既に出はじめることが分かった。

ゲノムに約 800 種類あるレトロトランスポゾンに関しては、多くのもので H3K9me3 量が減少し、特に ERVK ファミリーの内在性レトロウイルスの発現が大きく上昇していることを明らかにした。一方、これまで DNA メチル化の消失によって発現上昇することが知られていた L1 は H3K9me3 の低下があるにもかかわらず、発現上昇しておらず、SETDB1 や H3K9me3 の関与が小さいことを明らかにした。さらに SETDB1 と Dnmt3L (DNA メチル化に関わり、変異体で L1 が発現上昇する) の二重欠損変異体を作製し、同じく精母細胞を回収して RNA 発現を調べたところ、SETDB1 遺伝型とは無関係に Dnmt3L 欠損による L1 発現上昇が同程度確認されたことから、L1 は主に DNA メチル化によって抑制されていると結論づけた。SETDB1 欠損と Dnmt3L 欠損のレトロトランスポゾン抑制への影響を比較したところ、LINE-1 に限らず、多くのレトロトランスポゾンで Dnmt3L 欠損による発現上昇が大きく、ES 細胞などと比較して、精母細胞では H3K9me3 よりも DNA メチル化による抑制系が重要になると結論づけた。そして、これは精母細胞がこの後、ヒストンを失っていきプロタミンへと置換されることを考えると、理にかなった宿主の戦略だと論じた。最後に、ATAC-seq によって SETDB1 欠損体では新たに数千のクロマチン弛緩領域が出現することを明らかにし、その中には ERVK のプロモーターの他に、CTCF という DNA に結合し、クロマチンの三次元空間分布を制御するタンパク質の結合配列も含まれていることを発見した。しかも、その大部分は B2 ファミリーに属するレトロトランスポゾンによって作られたものであった。従って、SETDB1 による H3K9me3 化は、若い ERVK コピーの転写を抑えるとともに、過去にレトロトランスポゾン転移によって増幅してしまった CTCF 結合配列に CTCF が結合して異常なクロマチン高次構造を作ることを抑える働きもあると考えられる。この機能のおかげで、例え B2 が転移したとしても、正しい遺伝子発現プログラムが維持されるのではないか、つまり、B2 転移によってできた傷の絆創膏のような役割が H3K9me3 にあるのではないかと論じた。

このように川瀬は、生殖細胞発生過程のエピジェネティック制御機構について、遺伝学、細胞生物学、大規模データ解析技術等を駆使して取り組み、piRNA の役割に新たな視点を与えるとともに、生殖細胞発生過程における H3K9me3 の役割について、レトロトランスポゾン抑制だけでなく、抑制的性染色体テリトリーの構築やクロマチン高次構造の制御にも関わる可能性を示唆した。したがって、本委員会は本論文が博士(農学)の学位論文として十分な価値を有すると認め、論文審査に合格と判定した。