

# 生命の連続性を担う 生殖細胞のエピゲノム形成機構

東京理科大学 理工学部 応用生物科学科 准教授 まえざわ そう  
前澤 創

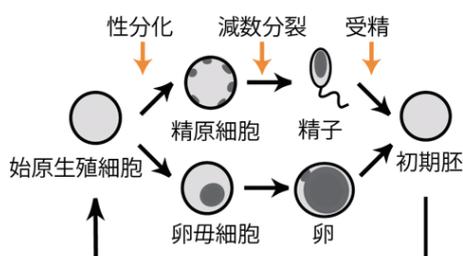
## はじめに

人の体を構成する細胞は、基本的に体細胞と生殖細胞に分類される。体細胞は、脳や内臓、筋肉や骨、皮膚といった体を構成する細胞のことで、一世代限りの分化（特定の機能を持つ細胞に変化すること）を遂げる。一方、生殖細胞は、精子や卵に分化し、受精後に次世代の個体を作り出す能力を再獲得することができる。

精子や卵は、その元になる細胞（幹細胞）が変化して作られ、その過程では遺伝子の発現が大きく変化する。遺伝子発現変化が結果として細胞の状態や種類を規定していくが、それを決めるのはエピゲノムである。また、生殖細胞には、受精後に全能性を再び獲得するための特殊なエピゲノムが形成され、それが生命の連続性に重要な役割を担っている。本稿では、精子形成過程で生じる、細胞核内の染色体構造変化「クロマチン構造変化」と、使う遺伝子と使わない遺伝子を決める機構の変化「エピゲノム変化」に焦点を当て、その制御機構について最新の知見を交えて紹介する。

## 生殖サイクルと生殖科学研究の重要性

生殖サイクルは、有性生殖を行う生物にとって種の保存に必須の過程であり、生殖細胞が、性分化、配偶子形成、受精を経て生殖サイクルがまわることにより、生命に連続性がうまれる【図1】。真核生物の大半は有性生殖を行っており、多くの種で進化的に維持されてきた。生殖サイクルには、生物種を超えて共通に備わった分子機構が数多く存在している一方で、生物種毎の繁殖戦略に有利にはたらくように種特異的に進



【図1】生殖サイクル

化した分子機構も存在する。

生殖サイクルに異常が生じることは不妊症の原因となりうる。不妊は身近な問題であり、現在日本国内で不妊治療や検査を受ける夫婦は5.5組に1組存在し（国立社会保障・人口問題研究所「第15回出生動向基本調査（2015年）」）、年々増加傾向にある。体外受精と顕微授精の総治療数も年間45万件を超え、今や14人に1人が体外受精で生まれている（日本産科婦人科学会「ARTデータブック（2019年）」）。晩婚化や晩産化が進む日本では、妊孕性（生殖機能とほぼ同義）の低下から不妊治療に向き合う層が今後も増加することが見込まれる。実際に、40歳以上での出産割合は2010年には8.3%だったが、2019年には12.0%にまで上昇している（厚生労働省「人口動態統計（2019年）」）。

不妊の原因は、男性側、女性側、あるいはその両方にある場合があり、女性側の要因としては、排卵や着床の異常が知られている。また、男性側に原因がある場合も約半数の割合で存在し、造精機能障害や性機能障害が知られている。原因不明の不妊も全不妊症の10~25%を占めるとされており、原因の解明が待たれている。

不妊症が社会問題になっているのはヒトだけではない。畜産業界でも肉用牛や乳牛の人工授精による受胎率の低下が認められており、平成元年から26年にかけて約15%の低下がみられている。これは動物の大型化による肥満や、性ホルモン分泌異常などにより、受精や着床へ悪影響が生じていると考えられている。ヒトと動物に共通した社会問題である不妊症の要因には、環境などの外的要因や、遺伝などの内的要因が関係しており、不妊症の改善を目指した生殖細胞分化、受精、着床といった生殖サイクルの分子機構の解明が求められている。

## 配偶子ができるまで

精子や卵などの配偶子がつくられる過程を配偶子形成といい、配偶子のもとになる細胞「始原生殖細胞」は胎生期に生じる。始原生殖細胞の段階では、まだ精

子になるか卵になるかは決まっていない。その後、ホルモンや周囲の体細胞の影響を受けて、将来精子になる精原細胞、または将来卵になる卵原細胞に分化する。

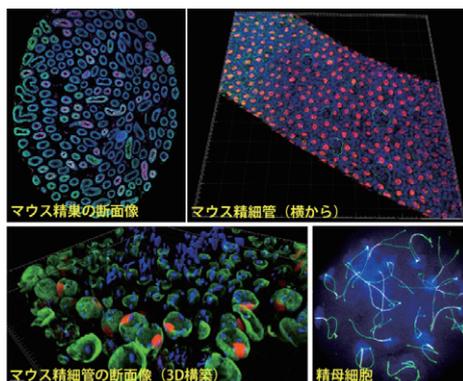
配偶子形成では、減数分裂と呼ばれる特殊な細胞分裂と遺伝子の組換えが起こり、父親、母親由来の染色体を組換えることで配偶子の多様性を生み出している。卵形成では、卵原細胞は誕生前に減数分裂のプロセスを開始して一次卵母細胞となり、一旦減数分裂のプロセスが停止した状態で誕生する。誕生後、第二次性徴期に女性ホルモンにさらされることにより、減数分裂のプロセスが再開され二次卵母細胞となる。排卵後、受精を期に減数分裂を完了した（染色体数の半減した）卵となる。一方、精子形成では、胎生期に減数分裂の開始を抑制する機構がはたらいており、精巣に精原細胞が溜まった状態で誕生する。誕生後、第二次性徴期に男性ホルモンにさらされると、減数分裂のプロセスが開始され、生涯にわたり精子が産生される。

### 精子形成期のエピゲノム制御

男性由来の主な不妊の原因である造精能力の異常については、不明な点が多く残されている。ストレスや加齢などの要因により、精子の形状や運動性に異常が生じるが、その詳細なメカニズムはわかっていない。そのため、精子形成機構の解明は、不妊治療への応用に不可欠であると考えられている。

精巣内には、精細管と呼ばれる管が存在し、そこで精子形成が行われる【図2】。管の外側から内側へ、精子形成が進行する。精子形成は、未分化状態の精原細胞から始まり、減数分裂期にあたる精母細胞を経て、半数体の精細胞ができる。その後、成熟期を経て精子ができる。未分化精原細胞から精子が出来るまで、マウスだと約40日（43日）、ヒトだと約70日（65-75日）要する。

精子形成期では他の分化系列には見られないほどダイナミックに遺伝子発現が変化し、全遺伝子のうち約3,000遺伝子は精巣でのみ特異的に発現する。これまでの研究から、減数分裂期へ分化が進行する際に大規模な遺伝子発現変化が生じることがわかってきた。この

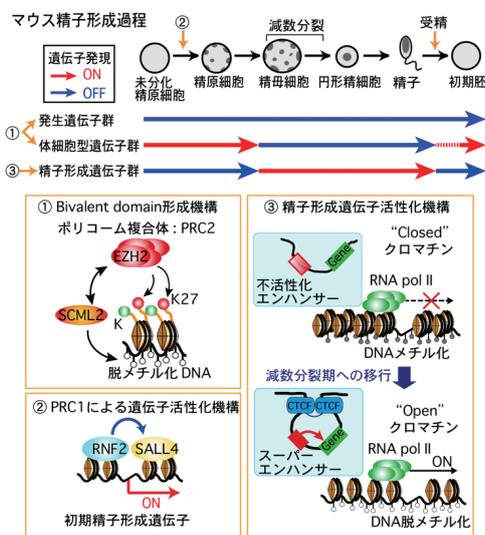


【図2】 精巣、精細管、精母細胞の免疫傾向染色像

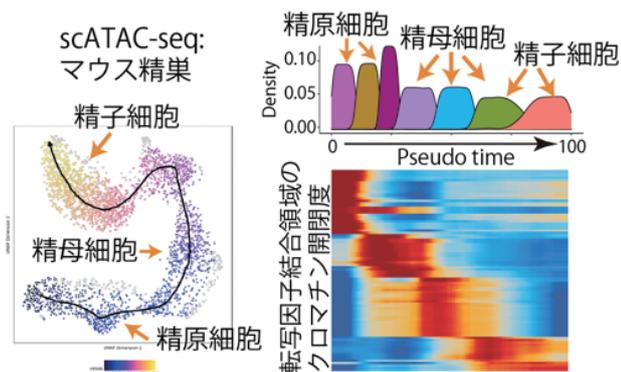
時期には、数千もの体細胞型の遺伝子発現が抑制され、一方で数千もの精子形成に特有の遺伝子発現が活性化される (Hasegawa et al. *Dev. Cell*, 2015)。その際には、細胞核内の染色体構造変化「クロマチン構造変化」と、使う遺伝子と使わない遺伝子を決める機構の変化「エピゲノム変化」が生じる。筆者らは、主に次世代シーケンス解析を利用したエピゲノム研究をとおして、以下の①～③に記した、マウス精子形成期における特殊なクロマチン構造変化やエピゲノム変化の制御機構を明らかにした【図3】。

① 体細胞型遺伝子群の発現抑制機構 (Maezawa et al. *PNAS*, 2018; *J. Cell Sci.*, 2018; *Biol. Reprod.*, 2018)

ポリコームタンパク質群（ポリコーム因子）は、その標的となるDNAの特定の部分で巨大な複合体であるポリコーム複合体（PRC）を形成し、通常、標的遺伝子の発現を抑制する。ポリコーム複合体には、PRC1およびPRC2の2種類が存在する。生殖細胞には、特別なポリコーム因子が存在し、そのひとつがSCML2 (Scm Polycomb Group Protein Like 2) である。SCML2は、PRC1およびPRC2の両方と相互作用し、体細胞型遺伝子群や次世代の発生に機能する遺伝子群に抑制性のヒストン修飾を導入することで遺伝子発現を抑制する。興味深いことに、抑制型のヒストン修飾H3K27me3が形成されるプロモーター領域では、活性型ヒストン修飾H3K4me2が共存した、バイバレント修飾（相反する2つの修飾を受けている状態）が導入される。この特殊なエピジェネティックマークを有するヒストンは精子でも保持されており、次世代へ受け継がれることから、生殖細胞系列が受精後に分化万能性を獲得するための役割を担っていると考えられる。



【図3】 精子形成期に特徴的なエピゲノム形成機構



【図4】分化進行に伴うクロマチン開閉状態の変動

② 精子形成の開始に機能する遺伝子群の活性化機構 (Maezawa et al, *Genes Dev.*, 2017)

未分化型の精原細胞が分化を開始する際にも、ポリコム複合体 PRC1 が機能する。精子形成の開始に機能する遺伝子は、胎生期では PRC1 によって抑制されているが、精子形成が開始するタイミングでは PRC1 によって活性化する。その際、PRC1 の構成因子が変化することで、複合体としての機能が抑制型から活性化型へ変化する。PRC1 の標的遺伝子の多くは発生や分化に関連しており、その発現は生殖サイクルをとおして活性化と抑制をくり返すことが知られている。このことから PRC1 は、転写を再活性化する可能性を維持しながら転写を抑制する役割を担っていると考えられる。

③ 精子形成期特異的な遺伝子群の活性化機構 (Maezawa et al, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2020; *Nucleic Acids Res.*, 2018)

精子形成期における活性化エンハンサーの網羅的な解析により、精子特有の機能（卵には存在しない機能）を付与する遺伝子群の近傍には、スーパーエンハンサーと呼ばれるクラスター化した活性化エンハンサーが存在することが示された。スーパーエンハンサーとは、細胞のアイデンティティの決定や疾患に関連する遺伝子の発現制御にはたらくゲノム領域として 2017 年に提唱された。筆者らは体細胞型および生殖細胞特異的なスーパーエンハンサーを同定し、減数分裂期を境に切り替わることで、遺伝子発現プロファイルの変化をもたらすことを明らかにした。さらに、スーパーエンハンサーの切り替えには複数の制御因子が関与していることが示されており、今後それらの因子が機能するタイミングが解明されることで、不妊の原因究明や体外精子形成技術への応用が期待される。

## エピゲノムを制御し、分化運命を決める因子とは

哺乳類の精子形成は、自己増殖を行う精原細胞が減数分裂や形態変化を経て成熟した精子へと分化していく、複雑かつ精密に制御された発生過程である。筆者らを含め国内外の研究グループより、精子形成期の代表的な分化段階における、遺伝子発現、エピゲノム、クロマチン構造などのプロファイルは明らかになりつつある。一般的に、精子形成に限らず体細胞を含めたいずれの分化系列においても、細胞分化は連続的に進行する。特定の分化段階の細胞集団を分取して解析する従来の研究手法では、技術的な制約から分取することができない分化段階の細胞や、存在量の少ない細胞集団のプロファイルを捉えることが難しかった。近年、1 細胞レベルで遺伝子発現やエピゲノムなどのプロファイルを捉える技術が開発され、発生過程の個々の細胞集団や組織中の微小環境全体の多様性を解析できるようになり、このような「シングルセル解析」は生命科学に大きな潮流を生み出している。筆者らは、2019 年に登場した、1 細胞レベルでクロマチンの開閉状態を解析することが可能なシングルセル ATAC-seq 法を用いて、マウス精子形成期における分化運命決定機構の解明に挑んでいる。一般的なエピゲノム制御因子や転写因子は弛緩したクロマチンを認識して機能するため、分化進行に伴うオープンクロマチン領域を網羅的に同定し、その領域に含まれる DNA 配列の特徴を抽出することにより、分化進行を制御する転写因子等を推定することができる。これまでに、シングルセル RNA-seq 法との統合解析によって、分化運命を制御する転写因子や、細胞種特異的なエンハンサー領域を明らかにした【図4】。

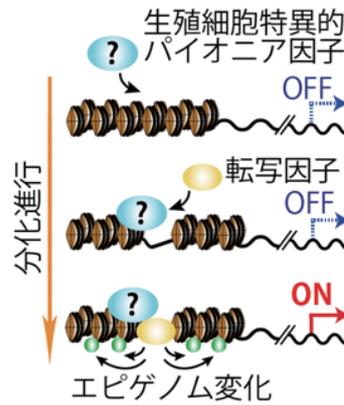
生殖細胞において、どのようにエピゲノムの変化が開始し、その後の様々な現象が引き起こされるのか。細胞が分化する際には、エピゲノムの変化を導くカギとなる因子が存在するはずである。現在までに、様々な細胞系列において、パイオニア因子と呼ばれるエピゲノム制御因子が、分化運命決定に機能することが報告された。多くの転写因子は、弛緩したクロマチン領域に結合するが、パイオニア因子は、細胞の性質を決定させる重要な遺伝子付近のエンハンサー領域において、凝集したクロマチンに結合し弛緩させ、周囲のエピゲノム環境を活性化状態へと変化させる機能を有する。これまでに、体細胞リプログラムに機能する SOX2 や OCT4、肝細胞初期分化に機能する FOXA2 がパイオニア因子として同定されている (Magnani et

al, *Trends in Genet.*, 2011; Zaret and Carroll, *Genes Dev.*, 2011). パイオニア因子は、エピゲノム変化の鍵となる非常に重要な機能を担っている。これまでパイオニア因子を同定する過程では、弛緩したクロマチン領域のモチーフ解析から候補因子を予測し、遺伝子発現変化から候補因子を絞り込み、さらに生化学的解析や欠損マウスを用いた解析によってその機能を検討する手法がとられてきた。直接的にパイオニア因子を探索する技術は確立されていないため、これまでに同定された

パイオニア因子は 10~20 因子程度に過ぎない。筆者らは、生殖細胞特異的なパイオニア因子を同定すべく、アフィニティ精製、サイズ分画、質量分析を組み合わせ、パイオニア因子を効率良くスクリーニングする実験系の構築を目指している【図 5】。

### 環境要因によるエピゲノムの揺らぎと継世代影響

生殖細胞特異的に形成されるエピゲノムの一部は、精子や卵でも維持されており、次世代へ受け継がれる。エピゲノムの世代を超えた伝達は、次世代やその先の世代の発生や行動に影響を与える。また、配偶子形成期のエピゲノムは、栄養環境や加齢などの要因によって変化し、うつ病をはじめとする疾患の原因になり得ることが明らかになってきた。例えば、老化により精子中の DNA メチル化が、特定のゲノム領域において増減することが示された (Potabattula et al, *Aging Cell*, 2020; Yoshizaki et al, *EMBO Rep.*, 2021)。さらに、精子中のヒストン修飾 H3K4me3 が葉酸欠乏や肥満の代謝センサーとして機能する (Lismer et al, *Dev. Cell*, 2021; Pepin et al, *Mol. Metab.*, 2022)、精子中の H3K9me2 がタンパク質欠乏により減少する (Yoshida et al, *Mol. Cell*, 2020)、精子中の DNA メチル化が栄養制限により減少する (Radford et al, *Science*, 2014) といった、代謝調節に基づく生殖細胞特異的なエピゲノム制御機構の存在が明らかになりつつある。すなわち、細胞内代謝変化がエピゲノム変化をもたらす「代謝-エピゲノムクロストーク」が、配偶子形成期において機能し、エピゲノム変化が代謝記憶として世代を超えて影響を与えていると考えられる。しかし、加齢や環境要因による代謝状態変化が、精子形成期のどの分化段階で、どのような分子機構によってエピゲノム変化をもたらすの



【図 5】生殖細胞特異的なパイオニア因子

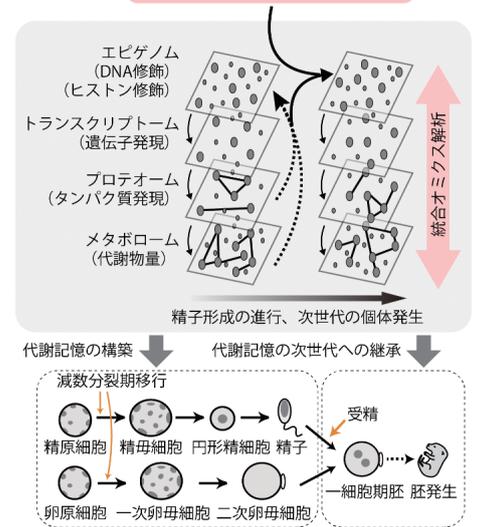
かは不明である。筆者らは、未解明な部分が多いこの学問領域において、どのような栄養成分が生殖細胞のエピゲノムに影響し、その情報が次世代へ継承される

のかを調べている【図 6】。今後、環境要因による生殖細胞エピゲノムの揺らぎや継世代影響に関する詳細な機構への理解が進むことが期待される。

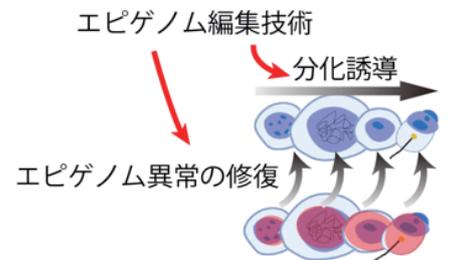
### おわりに

人工多能性幹細胞 iPS 細胞を用いた再生医学研究の発展から、哺乳類の配偶子形成を生体外 (in vitro) で進行させる技術開発が進んでいる。従来、生体外で生殖細胞分化を制御する際には、組織特異的に機能する転写因子の導入やサイトカインなどの添加、または体細胞との共培養による手法がとられてきた。しかし、分化誘導に十分な要因の探索や適切な組み合わせの決定には非常に多くの労力が必要とされてきた。この数年で、生殖細胞の分化に伴うエピゲノムやクロマチン構造の変化が解明されつつあり、さらにエピゲノム編集技術が発展したことにより、多能性幹細胞などのエピゲノムを直接的に生殖細胞様へ書き換えることを目的とした、新たな生殖細胞分化誘導技術の開発が可能になった。エピゲノム編集による生殖細胞エピゲノム的人為的制御が可能になることで、成体外での配偶子形成や機能回復が容易になり、ヒト生殖医療の改善だけでなく、絶滅危惧種の保全にも貢献する【図 7】。

エピゲノム攪乱要因：栄養環境、老化



【図 6】配偶子形成期における代謝記憶の構築、及び次世代への継承の理解を目指して



【図 7】生殖細胞エピゲノム的人為的制御