



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on multifunctional genome elements functioning in mouse spermatogenesis [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Atthanayake Mudiyansele, Thusitha Kosala Bandara
Description	担当：理学部図書室
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第14394号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/82021
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	AMTK_Bandara_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士 (生命科学) 氏 名 ATTHANAYAKE MUDIYANSELAGE
Thusitha Kosala Bandara

審査担当者	主査	准教授	木 村 敦
	副査	教 授	勝 義 直
	副査	教 授	黒 岩 麻 里
	副査	准教授	荻 原 克 益

学 位 論 文 題 名

Studies on multifunctional genome elements functioning in mouse spermatogenesis
(マウス精子形成で機能する多機能性ゲノムに関する解析)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

精子形成は精原細胞の増殖、減数分裂、精子変態という 3 つのステップからなり、それぞれ多くの遺伝子が特異的に転写活性化して機能することが必須である。特に減数分裂における一次精母細胞では多くの重要遺伝子が発現するが、その転写活性化メカニズムは明らかではない。当研究室では、マウス一次精母細胞において転写活性化に寄与する多機能性ゲノム dual promoter-enhancer (DPE) を *Tcam1* 遺伝子座において発見したが、実際にどのくらいの数の DPE が遺伝子発現を調節するのかは不明であった。著者は、次世代シーケンサーを用いた網羅解析を行い、減数分裂で機能する DPE をくまなく同定して、その転写調節活性を確認した。その結果、一次精母細胞で特に多くの DPE が転写調節に関わることを明らかにした。また、この解析過程で、著者はさらに別な種類の多機能性ゲノム dual enhancer-silencer (DES) の存在も明らかにし、精子形成において多機能性ゲノムが極めて重要な役割を果たす可能性を提示した。

本研究では、生後 7~8 日齢のマウス精巣から単離した精原細胞、成体マウスの精巣からセルソーターによって回収した一次精母細胞、マウス精母細胞由来の細胞株である GC-2spd(ts)細胞を用いて Chromatin immunoprecipitation-sequencing と RNA-sequencing を行った。そして、発現が確認された遺伝子の転写開始点から 500 塩基以内に検出されるヒストン H3K4 モノメチル化ピークを探索した。その結果、精原細胞で 337 か所、一次精母細胞で 2176 か所、GC-2spd(ts)細胞で 69 か所の DPE 候補配列を同定した。このうち 13 か所を任意に選びだしてクローニングし、*in vitro* レポーター解析を行ったところ、10 個がプロモーター活性を示し、8 個がエンハンサー活性を示した。さらに、13 個のうち 5 個について、GC-2spd(ts)細胞で CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集を行い、DPE 配列を欠失させたときの効果を調べたところ、4 個についてはその欠失によって DPE 候補配列直下の遺伝子発現が有意に減少し、1 個についても減少傾向が見られた。このことは、GC-2spd(ts)細胞においてこれらの DPE 候補配列が実際にプロモーターとして機能していることを示す。これに加えて、3 個については、近傍の遺伝子発現の有意な減少が観察されたため、エンハンサーとして機能していることが考えられる。具体的には、*Speer4cos* プロモーター、*Plin3* プロモーター、*Sp110* プロモーターに同定された DPE 候補配列は、それぞれ *Cacna2d1*、*Fem1a*、*A630001G21Rik* をエンハンサーとして活性化することがわかった。このうち *Plin3* はレポーター解析でエンハンサー活性が検出されておらず、*Sp110* はレポーター解析でどちらの活性とも検出されなかった DPE 候補であった。したがって、レポーター解析で DPE 活性が検出できなかった配列でも実際には DPE として機能している可能性が高いと言えることができる。以上の結果から、

著者は、今回同定した DPE 候補配列の多くが実際に DPE として機能している可能性が高いと結論した。そして、一次精母細胞では特に多くの DPE が検出されたことから、マウス精子形成の一次精母細胞で見られる多くの遺伝子の転写活性化に DPE が重要な役割を果たすことが示唆された。

著者は今回の網羅解析で、ヒストン H3K4 モノメチル化レベルが特に高いピークを発見し、この領域が同時にヒストン H3K27 トリメチル化レベルも高いことを見出した。*Kctd16* 遺伝子のイントロンにあるこの領域を、著者は DES-K16 と名づけて解析を行った。まず、レポーター解析では DES-K16 が明確なエンハンサー活性を示した。次に GC-2spd(ts)細胞において CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集法によって DES-K16 を欠失させたところ、近傍の *Yipf5* 遺伝子の発現が減少した。このことは DES-K16 が *Yipf5* 遺伝子のエンハンサーであることを示す。驚くべきことに、この細胞ではもともと発現が検出されなかった *Kctd16* 遺伝子が、DES-K16 の欠失によって転写活性化することが判明した。したがって、DES-K16 はエンハンサー活性とサイレンサー活性を併せ持つ DES であることがわかった。このことは、減数分裂過程において一次精母細胞で *Yipf5* の発現レベルが上昇し、*Kctd16* の発現が減少することと一致していた。

以上を要するに、著者は、マウス精子形成における転写活性化に多機能性ゲノムが重要な機能を果たすという新知見を得たものであり、生殖生物学ならびにゲノム生物学分野において多大な貢献をするものである。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。