

## 44. ヒストン脱メチル化酵素による生殖細胞の機能制御

立花 誠

\*徳島大学 疾患酵素学研究センター 応用酵素・疾患代謝研究部門

Key words : ヒストン脱メチル化, エピジェネティクス, 生殖細胞

### 緒 言

生殖細胞は、個体の遺伝情報を次世代に伝えることができる唯一の細胞系譜である。ヒストン修飾やDNAメチル化によるエピジェネティック制御は、遺伝情報を変えないゲノムの管理方法であり、生殖細胞の出現から配偶子の形成に至る過程において、極めて重要な役割を有している。ヒストンH3の9番目のリジン残基(H3K9)のメチル化修飾は、転写が抑制されたクロマチンの代表的なエピジェネティックマークであり、その触媒酵素や認識分子は、分裂酵母からヒトに至るまで高度に保存されている。我々は、過去の研究成果によって、H3K9のメチル化修飾が生殖細胞の様々な分化の過程で大きく変動することを見いだしていた。本研究では、その生理的な意義を明らかにすることが目的である。具体的には、H3K9脱メチル化酵素の遺伝子改変マウスを作出し、その表現型解析を行った。減数分裂や幹細胞維持などの雄性生殖細胞の様々な機能において、H3K9脱メチル化によるエピジェネティック制御は重要な役割を有することが明らかになった。

### 方 法

本研究では、生殖細胞特異的なCreドライバーマウスとしてVasa-Creトランスジェニックマウスを用いた。この系統のマウスでは、受精後およそ14日以降の生殖細胞でCreを発現する。このため、胎生の後期、あるいはそれ以降の発生段階での生殖細胞特異的なコンディショナルノックアウトの解析が可能となっている。本研究で解析の対象とする分子は、H3K9脱メチル化酵素であるJmjd1aとJmjd1bである<sup>1)</sup>。これらをコードする遺伝子にloxPが2つ付加されたマウス(*Jmjd1a*<sup>flox</sup>、*Jmjd1b*<sup>flox</sup>)は、当研究室で作製済みである。これらのマウスとVasa-Creマウスを交配し、生殖細胞特異的にJmjd1aあるいはJmjd1b、またはその両者を生殖細胞で欠損させたマウスを樹立し、解析の対象とした。

具体的には、*Vasa-Cre*<sup>+</sup>; *Jmjd1a*<sup>flox/+</sup>; *Jmjd1b*<sup>flox/+</sup> 雄マウスを、*Jmjd1a*<sup>flox/flox</sup>; *Jmjd1b*<sup>flox/flox</sup>、*Jmjd1a*<sup>flox/flox</sup>; *Jmjd1b*<sup>+/+</sup>、*Jmjd1a*<sup>+/+</sup>; *Jmjd1b*<sup>flox/flox</sup> の3種の雌マウスのそれぞれと交配した。その結果、図1に示すように*Jmjd1a*、*Jmjd1b*の遺伝子量が異なっている6種類の雄マウスを得た。これらのマウスにおける生殖細胞の遺伝子型を図1右に示した。なお、簡略化するため、今後は図1右[Genotype of germ cells]の表記にて遺伝子型を記載する。

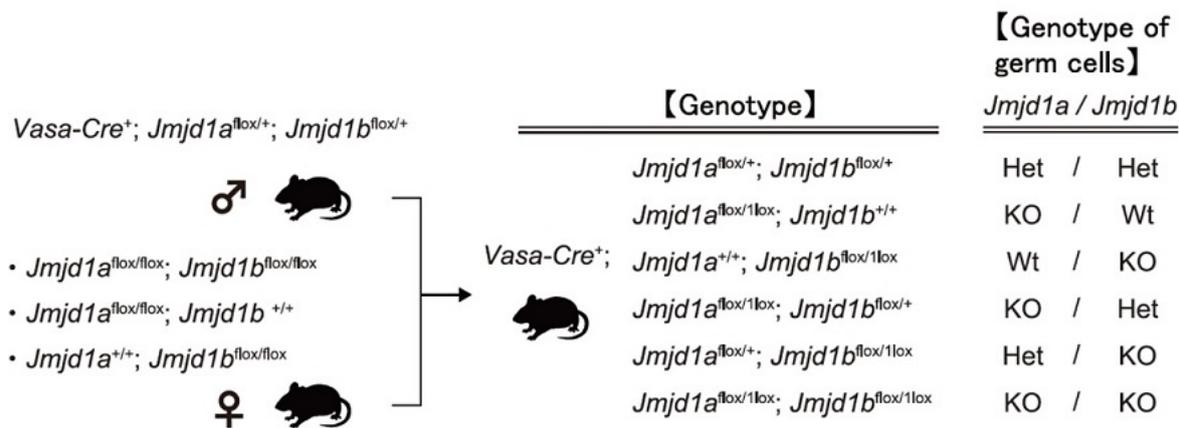


図1. 生殖細胞特異的 *Jmjd1a/b* 欠損マウスの作製

生殖細胞特異的な Cre ドライバーマウスには *Vasa-Cre* マウスを用いた。上記の左にあるような雌雄の組み合わせによる交配で、右 [Genotype] に示す 6 通りのマウスを獲た。生殖細胞における *Jmjd1a/b* の遺伝子型 [Genotype of germ cells] を右に示した。

得られたマウスについて、出生直後に PCR によるゲノタイプを行って各遺伝子の型を判別した。生後 3 日、15 日、成体（およそ 3 ヶ月齢）のそれぞれのマウスから精巣を摘出し、湿重量を測定した。精巣をブアン氏液にて固定した後、パラフィンにて包埋した。ミクロトームで切片を作製し、雄性生殖細胞の分化の状態について、ヘマトキシリン-PAS 染色による精細管の組織観察を行った。また、生殖細胞を特異的に認識する TRA98 抗体およびセルトリ細胞を認識する抗 Sox9 抗体で二重染色を行い、分化段階に応じた生殖細胞の同定とその数の増減について観察した。また、必要に応じて精巣上体尾部を成体マウスより単離し、精子数をカウントした。

## 結 果

*Jmjd1a*-KO; *Jmjd1b*-WT では精子の伸長過程が阻害されていた。これは、通常方法による *Jmjd1a* 全身欠損マウスの表現型と一致していた。このことは、*Jmjd1a*-KO マウスにおける精子形成不全の表現型は、体細胞側の機能不全ではなく、生殖細胞側の機能不全に起因することを示している。一方で、*Jmjd1a*-WT; *Jmjd1b*-KO では生殖細胞の分化異常は観察されなかった。次に、*Jmjd1a* と *Jmjd1b* の遺伝子量による影響を調べるために、以降に記した遺伝子型の精巣の組織解析を行った。*Jmjd1a*-KO; *Jmjd1b*-Het の生殖細胞の分化を調べた結果、*Jmjd1a*-KO; *Jmjd1b*-WT より表現型の重篤化が観察された。具体的には、殆どの生殖細胞で減数分裂が完了せず、減数分裂前期で生殖細胞の分化が停止していた。*Jmjd1a*-WT; *Jmjd1b*-KO と *Jmjd1a*-Het; *Jmjd1b*-KO の表現型を比較した結果、後者は前者に比べて精子数の減少が観察された。これらの結果から、*Jmjd1a* と *Jmjd1b* には、遺伝的に相乗的相互作用があることが明らかになった。

さらに、*Jmjd1a/b* の双方が完全に無くなった場合の生殖細胞の分化を解析した。*Jmjd1a*-KO; *Jmjd1b*-KO の精細管には半数体細胞、減数分裂期細胞、精原細胞のいずれの生殖細胞も存在していなかった（図2）。これにより、*Jmjd1a* と *Jmjd1b* は雄性生殖細胞の維持に必須であることが明らかになった。

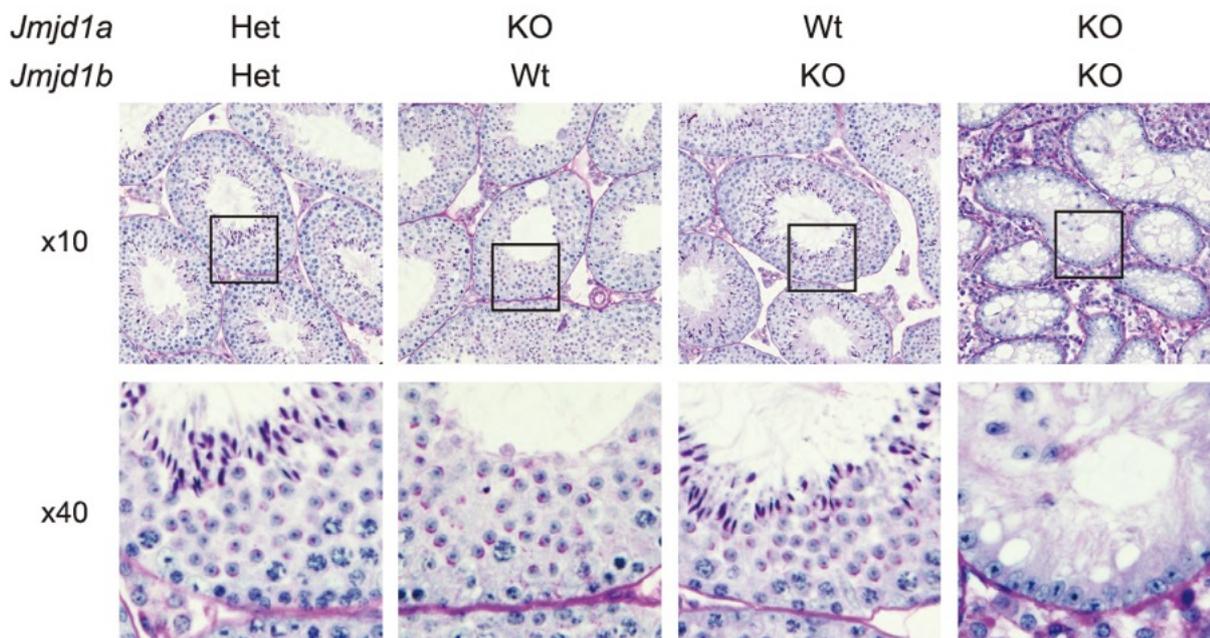


図2. 生殖細胞特異的に *Jmjd1a/b* を欠損させたマウスにおける、雄性生殖細胞の分化過程の表現型

Vasa-Cre ドライバによって、H3K9 脱メチル化酵素 *Jmjd1a*、*Jmjd1b* を生殖細胞特異的に欠損させたマウスの精細管（3ヶ月齢）をヘマトキシリン-PAS 染色し、携帯観察を行った。*Jmjd1a*-Het; *Jmjd1b*-Het 精巣における生殖細胞の分化過程は正常であった。対して、*Jmjd1a*-KO; *Jmjd1b*-WT 精巣では、精子の伸長過程が阻害されていた。*Jmjd1a*-WT; *Jmjd1b*-KO 精巣では、成熟した精子が存在し、分化過程における顕著な異常は観察されなかった。*Jmjd1a*-KO; *Jmjd1b*-KO 精巣は最も重篤な表現型を示し、この精細管には、未分化精原細胞及びそれ以降の分化過程の生殖細胞が全く存在していなかった。本精細管の基底膜付近に見られる細胞核は、セルトリ細胞に由来する。

## 考 察

*Jmjd1a/b* 欠損による雄性生殖細胞分化の表現型を図3にまとめた。これまでの研究結果は、生殖細胞の分化において、*Jmjd1a* と *Jmjd1b* に部分的な機能重複があることを示している。また、*Jmjd1a* と *Jmjd1b* の遺伝子量は、雄性生殖細胞の分化過程の進行に重要な因子であった。本研究で明らかになった最も重要な点は、*Jmjd1a* と *Jmjd1b* が減数分裂や精子形成過程の伸長反応のみならず、未分化精原細胞の維持にも必須であることであった。これまでの我々の研究により、胎生期の雄性生殖細胞の H3K9 のメチル化のレベルは、体細胞のそれに比べて低いことが分かっていたが<sup>2, 3)</sup>、その生理的な意義は分かっていた。本研究の成果により、胎生期における H3K9 の低メチル化は未分化な生殖細胞の保持に必要なことを強く示唆している。

今後は、H3K9 の脱メチル化がどのような遺伝子の制御に関わっているのかに着目して研究を進めたいと考えている。

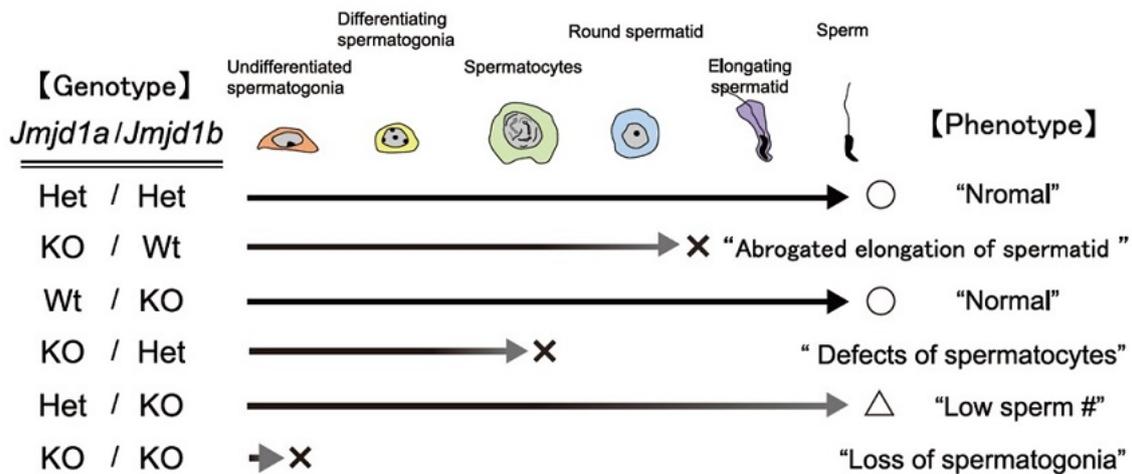


図3. 生殖細胞特異的に *Jmjd1a/b* を欠損させたマウスの表現型

本研究では、Vasa-Cre ドライバーマウスによって、生殖細胞特異的に H3K9 脱メチル化酵素である *Jmjd1a/b* を欠損させたマウスを作製した。これらのマウスにおける、雄性生殖細胞の分化過程の表現型解析を行った結果を図に示した。*Jmjd1a*、*Jmjd1b* の遺伝子量が生殖細胞の各分化の過程に重要な因子であること、*Jmjd1a* と *Jmjd1b* が未分化型精原細胞の維持に必須であることが明らかになった。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、徳島大学疾患酵素学研究センター 応用酵素・疾患代謝研究部門の黒木俊介助教、岡下修己助教、矢野雅司技術職員、並びに理化学研究所眞貝細胞記憶研究室の眞貝洋一主任研究員、福田幹子研究員である。最後になりましたが、本研究課題に助成頂いた上原祈念生命科学財団に厚く御礼を申し上げます。

### 文 献

- 1) Kenichi Yamane, Charalambos Toumazou, Yu-ichi Tsukada, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Jiemin Wong, Yi Zhang. JHDM2A, a Jmjc-Containing H3K9 Demethylase, Facilitates Transcription Activation by Androgen Receptor Cell (2006) 125: 483-495; doi: 10.1016/j.cell.2006.03.027.
- 2) Yoshiyuki Seki, Masashi Yamaji, Yukihiro Yabuta, Mitsue Sano, Mayo Shigeta, Yasuhisa Matsui, Yumiko Saga, Makoto Tachibana, Yoichi Shinkai, Mitunori Saitou. Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice Development (2007) 134: 2627-2638; doi: 10.1242/dev.00561.
- 3) Makoto Tachibana, Masami Nozaki, Naoki Takeda, Yoichi Shinkai. Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression The EMBO Journal (2007) 26: 3346-3359; doi: 10.1038/sj.emboj.7601767.