

## 116. 雄性生殖細胞におけるヒストン脱メチル化の機能解析

黒木 俊介

\*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 : エピジェネティクス, ヒストン脱メチル化, 雄性生殖細胞

### 緒言

ヒストン修飾や DNA メチル化を介したエピジェネティック制御は、細胞の正常な分化・維持に重要な役割を有している。そのうちで、ヒストン H3・9 番目リジン (H3K9) のメチル化は転写の抑制に働くエピジェネティック修飾であり、メチル化酵素と脱メチル化酵素の間の拮抗した働きにより可逆的に制御されることが考えられている。我々は、H3K9 メチル化を軸としたエピゲノムの観点から、「性の決定」や「生殖細胞分化」といった「種の世代サイクルを支える生命現象」を解明することを目標に研究を進めてきた。例えば前者においては、H3K9 脱メチル化酵素 *Jmjd1a* が哺乳類の性決定遺伝子 *Sry* の発現を誘導し、雄への性決定に寄与することを報告した<sup>1)</sup>。後者においては、H3K9 メチル化酵素 G9a や GLP が生殖細胞の減数分裂期の進行に必須であること報告してきた<sup>2)</sup>。しかしながら、生殖細胞における H3K9 脱メチル化酵素ファミリーの役割については、まだ不明な点が多く残されている。そこで本研究では、精子の形成と維持における H3K9 脱メチル化酵素の役割を明らかにすることを目的とした。

### 方法

H3K9 脱メチル化酵素 *Jmjd1* ファミリーには、*Jmjd1a*, *b* および *c* の 3 種類が存在する。私たちは最近、これらの遺伝子欠損マウスを用いた一連の解析から、少なくともグローバルなヒストン H3K9 脱メチルの酵素活性を有するのは *Jmjd1a* と *Jmjd1b* の 2 つであることを報告した<sup>3)</sup>。この結果は、*Jmjd1a* と *Jmjd1b* が個体発生のレベルにおいて、機能的に重複することを示唆している。そこで、生殖細胞系列においても *Jmjd1a* と *Jmjd1b* が相補的に機能すると仮定し、その役割を明らかにする目的で *Jmjd1a* と *Jmjd1b* の生殖細胞特異的な Cre-LoxP 条件的欠損マウスを新たに作出した。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 (Tg) を用いた。この系統マウスは胎生 14 日以降の生殖細胞系列に Cre を発現する。よって、標的遺伝子を 2 つの loxP 配列で挟んだ flox マウスと交配することで、生殖細胞特異的な遺伝子欠損を誘導することができる。本研究の標的遺伝子である *Jmjd1a* と *Jmjd1b* の flox マウス (*Jmjd1a*<sup>flox</sup> と *Jmjd1b*<sup>flox</sup>) は当研究室で樹立済みであった。これらのマウスを *Vasa-Cre* Tg マウスと交配し、*Jmjd1a* または *Jmjd1b* の単独、またはその両方を生殖細胞で欠失したマウスを樹立し解析した。

具体的には、*Vasa-Cre*<sup>+</sup>; *Jmjd1a*<sup>flox/+</sup>; *Jmjd1b*<sup>flox/+</sup> の雄マウスを *Jmjd1a*<sup>flox/flox</sup>, *Jmjd1b*<sup>flox/flox</sup> または *Jmjd1a*<sup>flox/flox</sup>; *Jmjd1b*<sup>flox/flox</sup> の 3 種類の雌と交配した。結果、*Jmjd1a* と *Jmjd1b* の遺伝子量の異なる計 6 種類の遺伝子型のマウスを得た。

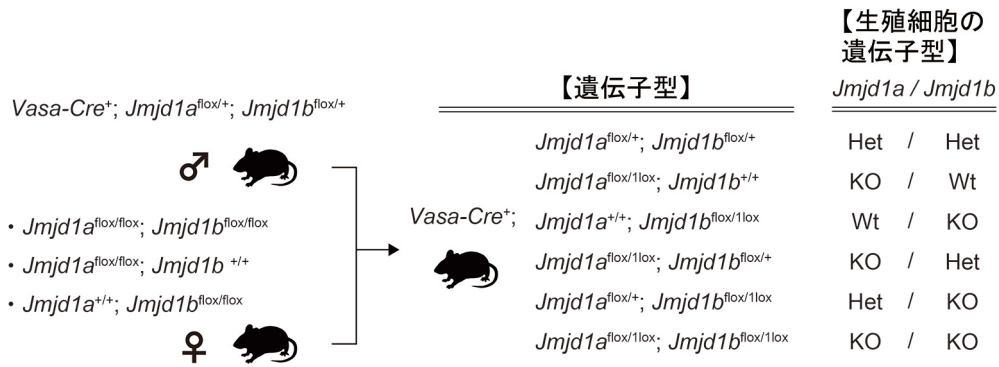


図1. 生殖特異的な *Jmjd1a/Jmjd1b* 欠損マウスの作製

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。

左に図示した組み合わせで交配した結果、「遺伝子型」に示す6通りのマウスを得た。各々のマウスにおける生殖細胞がもつ *Jmjd1a/Jmjd1b* の遺伝子型を「生殖細胞の遺伝子型」として示す。

以降は、図1の「生殖細胞の遺伝子型」に従って遺伝子型を表記する。

## 結果

得られた遺伝子欠損マウスの成体より精巣を採取し、ヘマトキシリン-PAS 組織染色により精細管の組織学的観察を行った。

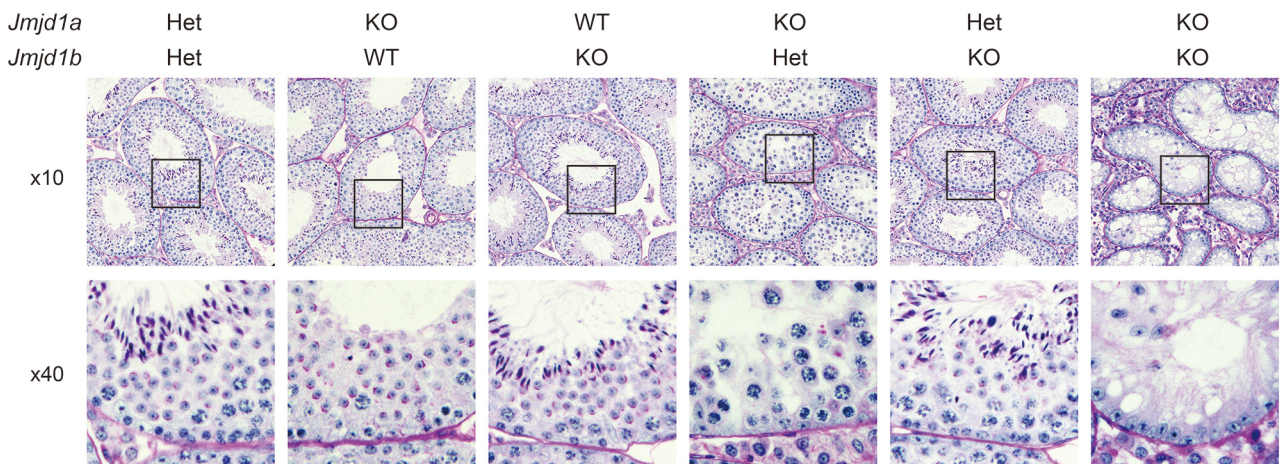


図2. 生殖細胞特異的に *Jmjd1a/Jmjd1b* を欠損させたマウスにおける、雄性生殖細胞の分化・維持の表現型

各ジェノタイプの雄マウス（3ヶ月齢）の精巣組織切片にPAS-ヘマトキシリン染色を行い、精子形成を観察した。上段は倍率×10倍。下段は、上段の枠内の拡大像を示す。

結果、*Jmjd1a*-KO;*Jmjd1b*-WT では精子細胞の伸長過程が阻害されていた。これは、コンベンショナルな *Jmjd1a* 欠損マウスに報告された表現型<sup>4)</sup>と一致しており、精子形成不全が cell autonomous な現象であることを示していた。

一方で、*Jmjd1a*-WT;*Jmjd1b*-KO では顕著な異常は観察されなかった。興味深いことに、二重欠損マウスの生殖細胞は *Jmjd1a*/*Jmjd1b* の遺伝子量に依存して、単独欠損とは異なる重篤な異常を呈した。すなわち、*Jmjd1a*-KO;*Jmjd1b*-Het ではほとんどの生殖細胞が減数分裂を完了せず、減数分裂前期で分化が停止していた。さらに、*Jmjd1a*-KO;*Jmjd1b*-KO においては、未分化な精原細胞を含めた全ての生殖細胞が欠失していた。これらの結果は、生殖細胞の分化や維持において、*Jmjd1a* と *Jmjd1b* の間に機能重複が存在することを示唆していた。

次に、最も重篤な表現型である *Jmjd1a*-KO;*Jmjd1b*-KO に注目して解析を進めた。未分化生殖細胞の欠失がどの時期に起こるか調べる目的で、生後 3、7、15 日の精巣から組織切片を作製し、Tra98 抗体（生殖細胞マーカー）と anti-Sox9 抗体（セルトリ細胞マーカー）による組織免疫二重染色を行った。

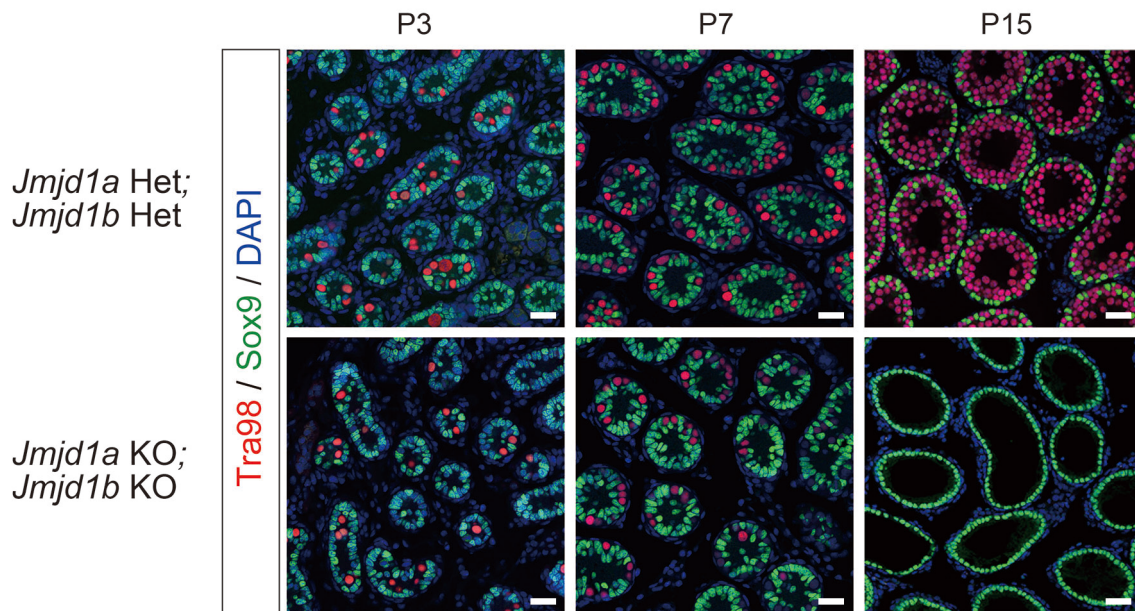


図 3. *Jmjd1a* KO; *Jmjd1b* KO における生後の生殖細胞欠失  
anti-Sox9 抗体（緑）と Tra98 抗体（赤）による生後 3, 7, 15 日目精巣の二重組織免疫染色。  
核を DAPI（青）により対比染色した。スケールバーは 50  $\mu$ m を示す。

その結果、*Jmjd1a*-KO; *Jmjd1b*-KO の Tra98 陽性の生殖細胞数は、生後 3 日時点では対照群と顕著な差はなかった。しかし生後 7 日で生殖細胞の減少が見られ、生後 15 日の時点では生殖細胞はほぼ完全に消失した。これらの結果から、*Jmjd1a* と *Jmjd1b* は出生後の精原細胞の維持に必須であることが示唆された。

次に、精原細胞において *Jmjd1a* と *Jmjd1b* が発現制御する遺伝子を明らかにする目的で、生後 3 日目の *Jmjd1a*/*Jmjd1b* 欠損マウスの精巣から未分化生殖細胞（EpCAM<sup>+</sup>細胞）を FACS ソーティングにより回収し、RNA-Sequence 法で網羅的な遺伝子発現プロファイルを取得し比較した。

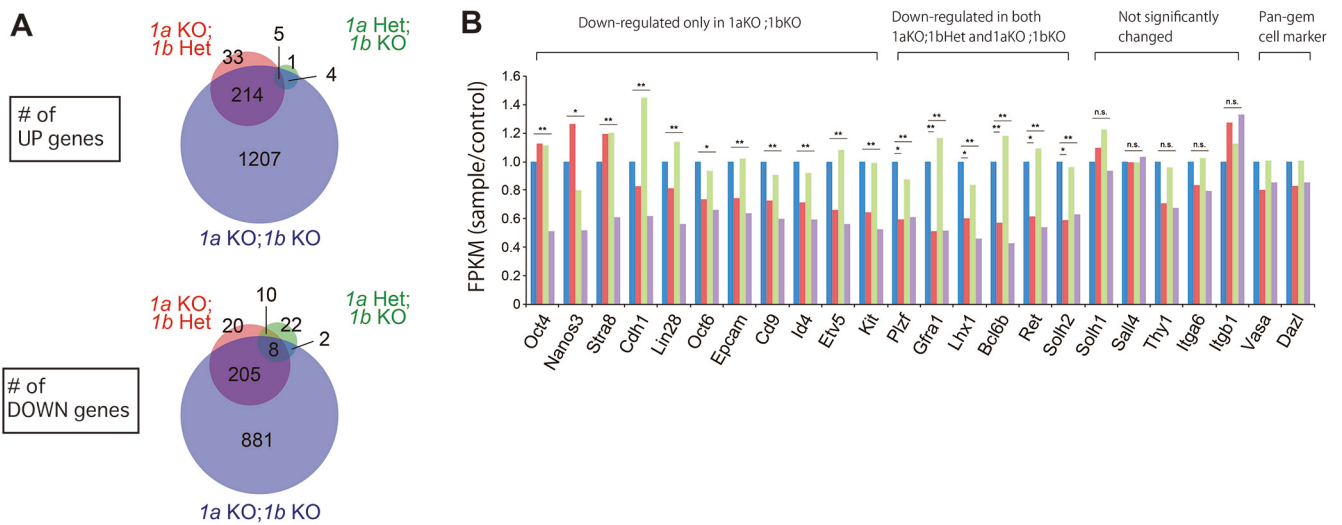


図 4. *Jmjd1a/Jmjd1b* 欠失による未分化精原細胞の遺伝子発現変化

(A) 生後 3 日目の各ジェノタイプのマウス精巣から生殖細胞 (EpCAM 陽性細胞) を精製し、RNA-sequence 解析を実施した。コントロールを比較して有意 ( $q$  値  $< 0.05$ ) に発現が変化した遺伝子の数をベン図で記した。

(B) *Jmjd1a/Jmjd1b* 欠損の生殖細胞において発現が低下した生殖細胞関連遺伝子を示した。

\* $q$  値  $< 0.05$ , \*\* $q$  値  $< 0.01$ 。

*Jmjd1a/Jmjd1b* は遺伝子の活性化に働くことが予想されることから、*Jmjd1a/Jmjd1b* 欠損によって発現減少する遺伝子に注目した。その結果、有意に発現が減少した遺伝子 ( $q$  値  $< 0.05$ ) の数は、*Jmjd1a*-KO; *Jmjd1b*-Het では 243 個、*Jmjd1a*-Het; *Jmjd1b*-KO では 42 個、そして *Jmjd1a*-KO; *Jmjd1b*-KO では 1,094 個であった。*Jmjd1a*-KO; *Jmjd1b*-KO のみで発現が低下した遺伝子のなかには、*Pou5f1*, *Nanos3*, *Lin28* など精原細胞の分化・維持における重要性が報告されている遺伝子が含まれていた。これらの結果は、*Jmjd1a* と *Jmjd1b* が相乗的に生殖細胞に必須の遺伝子群の活性化に寄与することを示唆していた。

## 考 察

本研究によって、雄性生殖細胞の分化・維持にヒストン脱メチル化酵素 *Jmjd1a/Jmjd1b* が相乗的な機能をもつことを遺伝学的に示された。主に *Jmjd1a* を欠損した時に表現型が顕在化したことから、雄性生殖細胞の分化において dominant な役割をもつのは *Jmjd1a* であり、*Jmjd1b* は supportive に働くことが示唆される。*Jmjd1a* が優位に働く理由は不明だが、今後生殖細胞における *Jmjd1a/Jmjd1b* 発現の量や時期の詳細を解明することで説明できるかもしれない。特質すべき表現型として、*Jmjd1a/Jmjd1b* の両方を完全欠損した場合、出生後の未分化精原細胞の維持ができず、結果すべての生殖細胞が失われた。*Jmjd1a/Jmjd1b* の欠損によって、未分化精原細胞の維持に重要であると考えられる遺伝子群の発現が低下したことから、*Jmjd1a/Jmjd1b* の最も役割は出生後～成体において、精原細胞維持にかかわる遺伝子群の発現を担保することにあると考えられる。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、徳島大学先端酵素学研究所・エピゲノム動態学分野の立花誠教授、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である。

最後になりましたが、本研究課題に助成いただいた上原記念生命科学財団に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Kuroki S, Matoba S, Akiyoshi M, Matsumura Y, Miyachi H, Mise N, Abe K, Ogura A, Wilhelm D, Koopman P, Nozaki M, Kanai Y, Shinkai Y, Tachibana M. Epigenetic regulation of mouse sex determination by the histone demethylase Jmjd1a. *Science*. 2013 Sep 6;341(6150):1106-9. doi: 10.1126/science.1239864. PMID: 24009392
- 2) Tachibana M, Nozaki M, Takeda N, Shinkai Y. Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *EMBO J*. 2007 Jul 25;26(14):3346-59. Epub 2007 Jun 28. PMID: 17599069
- 3) Kuroki S, Akiyoshi M, Tokura M, Miyachi H, Nakai Y, Kimura H, Shinkai Y, Tachibana M. JMJD1C, a JmjC domain-containing protein, is required for long-term maintenance of male germ cells in mice. *Biol Reprod*. 2013 Oct 17;89(4):93. doi: 10.1095/biolreprod.113.108597. PMID: 24006281
- 4) Okada Y, Scott G, Ray MK, Mishina Y, Zhang Y. Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis. *Nature*. 2007 Nov 1;450(7166):119-23. Epub 2007 Oct 17. PMID: 17943087