

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790375

研究課題名 (和文) ヒストンメチル化酵素 DOT1L の精子形成における役割の解明

研究課題名 (英文) Analysis on the roles of DOT1L histone methyltransferase in spermatogenesis

研究代表者

牧野 吉倫 (MAKINO YOSHINORI)

京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユニット・研究員

研究者番号：60431334

研究成果の概要 (和文) : H3 ヒストンのレジン79のメチル化酵素である DOT1L の生化学的、分子生物学的知見は多く見られるが、生体内の様々な現象との関連性についての知見はまだ限定的である。本研究においてはオスの生殖細胞特異的な mDot1l ノックアウトマウスを用いた解析などによって DOT1L が精子形成に必須である事を示した。本研究課題の結果からは精子形成過程におけるメチル化酵素の機能の一端を明らかに出来た事とともに、DOT1L 自体の新しい機能を見つける上での有用な基礎的知見を与えることが出来た。

研究成果の概要 (英文) : The interaction between DOT1L H3K79 methyltransferase and physiological phenomenon in mammals remains to be clarified, though the functions of DOT1L in biochemistry and molecular biology have been well investigated. In this study we demonstrated mDot1l is essential for spermatogenesis by analysis of male germline specific mDot1l knockout mice and other methods. From this study we obtained a basic evidence to lead us to reveal a new function of DOT1L as well as clarified a role of a histone methyltransferase in spermatogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：エピジェネティクス、精子形成、ヒストンメチル化酵素

1. 研究開始当初の背景

遺伝子配列に依存しない遺伝子発現調節機構であるエピジェネティクスは、細胞の基本的な生命維持のみならず、細胞の分化や癌化などにも重要な役割を有することが知られている。中でもエピジェネティクスの一形態であるヒストンメチル化は、メチル化を受けるリジン残基の部位やメチル化の個数に

依存してそのアウトプットが異なり、細胞の多様かつ複雑な遺伝子発現調節に必須である。

生体を構成する細胞の中で、唯一ヒストンを有さないのが成熟精子細胞(精子)である。精子においては、プロタミンと呼ばれる精子特異的塩基性タンパク質がヒストンを置換してDNAを凝集させる。その結果、転写因子

の DNA への結合が阻害され、また転写因子自身の転写翻訳も抑制される。よって精子における遺伝子発現はほぼ完全に抑制されていると考えられてきた。しかし実際精子ゲノムの 15-20 %は依然ヒストン構造を保持しており、また幾つかの遺伝子の mRNA が精子から検出されることから、精子に残存するヒストンは、精子の機能維持および受精に必要な遺伝子の転写に寄与している可能性が高い。しかしながら、RNA ポリメラーゼを含む殆どの転写活性化因子がもはや存在しない精子において、ヒストンがどのような分子機構で遺伝子転写に関与するかは未知である。

DOT1L (disruptor of telomere silencing 1-like) は、2002 年に同定されたヒストン 3 リジン 79 (H3K79) のメチル化酵素である (ref 2)。哺乳細胞において H3K79 のメチル化は転写活性化状態にある遺伝子上に認められ、実際 DOT1L が H3K79 のメチル化を介して癌遺伝子 *Hoxa* 群を活性化することによる白血病発症モデルが提唱されている。しかし RNA ポリメラーゼのリクルートメントを介して転写発現を誘導する他のヒストンメチル化と異なり、H3K79 のメチル化による転写発現誘導の機構は明らかでない。一方 DOT1L の酵母ホモログと H3K79 のメチル化は、テロメアの維持や DNA 修復にも関与することが報告されている。

DOT1L の発現はほぼ全ての臓器・組織に普遍的に認められるが、特に精巣で高く、中でも減数分裂後の精子細胞～成熟精子で最も高い発現が認められる (未発表データ)。さらに、精子に残存するヒストンが H3K79 のメチル化を多く含むと予想されるバリエーションであること、メチル化 H3K79 による転写活性化と RNA ポリメラーゼの関連性は低いことから、DOT1L が精子における転写活性化に関与する可能性がある。興味深いことに、DOT1L 結合タンパク質である転写活性化因子 AF10 も、成熟精子内で強い発現が認められる。さらにテロメアが成熟精子内でヒストン領域に存在すること、また精子 DNA は凝集過程で物理的な損傷を受け易いことから、DOT1L は酵母で提唱されているテロメアの維持や DNA 修復にも関与する可能性がある。このように数々の傍証が、成熟精子における DOT1L の重要性を示唆している。

申請者はこれまで、細胞の癌化機構およびウイルス感染症を題材に、疾患における細胞の機能異常について研究を遂行してきた。ヒストンメチル化を含むエピジェネティクス修飾もこれら疾患と密接に関連し、様々な疾患において修飾を受けているヒストン領域

とその領域がコードする標的遺伝子が続々と同定されている。しかし、正常細胞におけるこれら修飾パターンや酵素分布の解析はまだ始まったばかりであり、事実哺乳細胞における DOT1L の機能も白血病への関与以外はほぼ未知である。また、正常の精子細胞において転写活性化の維持、DNA 損傷・修復、テロメア維持といった癌に類似のイベントが起こるという事実、及びこれら全てにひとつの酵素 DOT1L が関与するという仮説は非常に興味深い。加えて、今回研究協力者である岡田由紀博士からの供与によりノックアウトマウスの使用が可能となったことが、本研究の着想に至った経緯である。

2. 研究の目的

本研究では、主に生殖細胞特異的ノックアウトマウスを用いて、精巣に極めて高い発現を示すヒストン H3K79 メチル化酵素 DOT1L の精子形成における機能、生理学的重要性を個体レベルで解明する。本研究から予想される成果は、生化学領域のみならず、生殖工学、医学領域など多方面に有用な知見を提供すると考えられる。

3. 研究の方法

(1)ノックアウトマウスを用いた解析。

オスの生殖細胞特異的に発現する *Vasa* プロモーターの下流で *Cre* が発現するシステムを使用して、オスの生殖細胞特異的に *mDot11* がノックアウトし、その後組織学的解析等に用いた。

(2)精子幹細胞培養。

野生型あるいはノックアウトマウスから精子幹細胞を、*Thy-1* カラム等を使用して単離後、フィーダー細胞上で培養し、実験に用いた。この培養系は精子幹細胞を *in vitro* 培養で再現していると考えられており、この細胞を用いて DOT1L の精子幹細胞における機能を調べた。

(3)*mDot11* の転写産物の同定。

PCR 法やシーケンスによって精巣特異的な *mDot11* 転写産物の同定を行った。

4. 研究成果

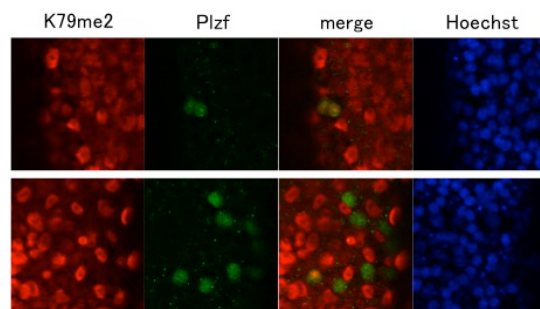
(1)*mDot11* は精子形成に必須である。

生殖細胞特異的ノックアウトマウスでは生育するに従って野生型に比し精巣が小さくなり最終的には全ての生殖細胞が脱落してしまう。また精子形成の最初の段階の細胞である精原細胞がまず脱落し、その後順に精母細胞、精子細胞が見られなくなった。このことから *mDot11* は精子形成の最初のステップである精子幹細胞の生存、増殖に関わっていることが示唆された。

(2)mDot11 は精子形成の二つの段階で発現している。

ノックアウトマウスの lacZ カセットを利用して、精巣組織の凍結切片を lacZ 染色したところ、精子細胞から成熟精子までで強い染色性が見られた。また H3 ヒストンのメチル化リジン 7 9 特異的抗体を用いて精巣の凍結切片や精細管の免疫染色を行うと (Fig 1)、同じく精子細胞に強いメチル化が見られると共に一部の精原細胞に非常に弱いメチル化が認められた。

これらの結果から mDot11 は精子幹細胞を含む精原細胞と精子細胞に発現している事が示唆される。



K79me2: H3K79ジメチル化
Plzf: 未分化精原細胞マーカー
Hoechst: 核染色

Figure 1

(3)mDot11 は精子幹細胞の生存に必須である。

精子幹細胞の in vitro 培養系を用いて、野生型およびノックアウトマウスから精子幹細胞を精製、培養した。野生型は継続的に増殖したが、ノックアウトマウスの精子幹細胞は徐々に死滅した。この結果から mDot11 は精子幹細胞の生存、増殖に必要である事が分かった。

(4)精子細胞に発現する精巣特異的なスプライシングバリエント (mDot11t) を同定した。

精巣からPCR法等を用いてmDot11のmRNAを単離したところ、通常よりやや長い転写産物を発見した。詳細な解析の結果、これの産物は新しいスプライシングバリエントである事が判明した。そもそもmDot11遺伝子にはエクソン1からエクソン28までが存在し、エクソン28はAからDまでを有している (Fig 2)。これまでに報告されているmDot11aからmDot11eまでの5種類のバリエントも上記のエクソンの組み合わせから成っている (Fig 2)。今回同定したバリエント (mDot11t) はエクソン27とエクソン28Bの両方を含んでいるが、これは他のバリエントには見られずmDot11tに特異的な特徴である (Fig 2)。そこでこの特異的な配列をベイトにしてYeast two hybridスクリーニングを行った。スクリ

ーニングの結果、8遺伝子が複数個のコロニーから同定された。現在はこれらの遺伝子とmDot11tとの機能的な関連性や精子細胞における役割等を検討中である。

さらに同定したmDot11tは一倍体細胞 (精子細胞) には見られるが、精子幹細胞には見られなかった。つまり、精子幹細胞に発現するバリエントと精子細胞に発現するバリエントは異なっている事が分かった。またこのことがそれぞれの細胞におけるmDot11の機能的な違いに反映されている可能性も想像される。

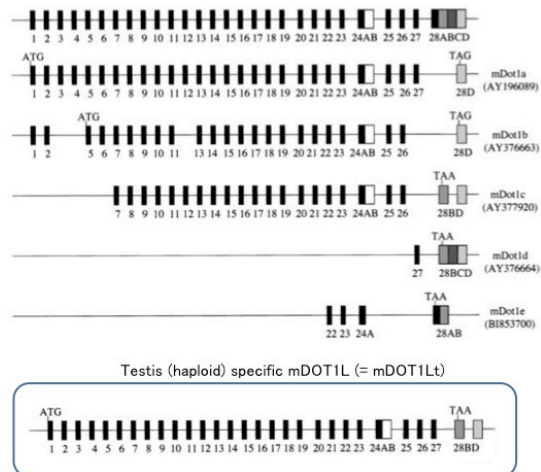


Figure 2

(5)まとめ。

mDot11 は精子形成において必須であり、違った二つのステージ (精子幹細胞から一部の精原細胞および精子細胞) で発現していること、更には精子細胞では特異的転写産物mDot11tが発現していることが分かった。これらの結果から、精子形成過程におけるメチル化酵素の機能の一端を明らかにしたと共に、mDot11 自体の新しい機能を見つける上での有用な基礎的知見を得る事ができた。

mDot11 が精子幹細胞の生存に必要であることから、mDot11 が精子形成に必須である理由は、mDot11 の精子幹細胞における機能にあると考えられる。しかしながら、精子細胞における mDot11 が精子形成において必須であるか、どのような機能を持っているかは今のところ不明である。

今後はこれら mDot11 の精子幹細胞及び精子細胞での機能や相互作用因子の同定などmDot11 がどのように働いているのかメカニズムについての解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[その他]

ホームページ等

<http://www.cp.kyoto-u.ac.jp/Okada/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 吉倫 (MAKINO YOSHINORI)

京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユニット・研究員

研究者番号：60431334

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

岡田 由紀 (OKADA YUKI)

京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユニット・助教

研究者番号：60546430