

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2013

課題番号：23870007

研究課題名(和文) ヒストン脱メチル化酵素 Fbxl10 は如何にして生殖細胞の発生を調整するのか？

研究課題名(英文) Histone demethylase Fbxl10 regulates sustainable spermatogenesis in mice.

研究代表者

小沢 学 (Ozawa, Manabu)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80608787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000 円、(間接経費) 750,000 円

研究成果の概要(和文)：持続的な精子形成にエピゲノム制御が重要な役割を果たしている。本研究ではエピゲノム調整因子である Fbxl10 の精子形成における役割について検証した。結果、Fbxl10 欠損マウスでは加齢に伴い精子形成不全が増加していた。また、Fbxl10 欠損精原細胞では加齢が亢進し、細胞分裂の遅滞が生じることを観察した。以上より Fbxl10 は精原細胞の加齢を抑制することで持続的な精子形成に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Methylation and demethylation of histone residue are important modifications of epigenetics, and essential for proper tissue development including germ cells. Fbxl10 is a gene that catalyzes demethylation of H3K4me3 or H3K36me2. Here we showed that Fbxl10 is important for sustainable sperm production. In Fbxl10 knockout (null) mice, histological analysis of testis sections from the null mice looked normal at a younger age (<3-month old). On the other hand, null mice at older ages (>1 year old) showed abnormal spermatogenesis. Microarray analysis revealed that Fbxl10-null spermatogonia from younger mice showed a transcriptome pattern similar to that in older age wild type (WT). In addition, CDK1 in culturing germline stem cells is significantly stronger compared to WT, and doubling speed of the null cells were longer than WT. These data suggest that Fbxl10 plays important roles for sustainable spermatogenesis throughout the life span by regulating cellular senescence.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：精巣 精子形成 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の生殖細胞の発生過程において、ヒストンおよび DNA のエピジェネティックな修飾が著しく変動することが知られており、それらの修飾を調整する遺伝子を欠損させたマウスの多くが不妊の表現型を示すことから、生殖細胞の正常な発生においてエピジェネティックな修飾が極めて重要な役割を果たしていることが示唆される。我々の研究チームはヒストン H3K4me3 および H3K36me2 を選択的に脱メチル化するエピゲノム修飾因子である Fbxl10 ノックアウトマウスを作出しており (Fukuda et al., 2011)、そのマウスを用いた予備研究において精巣内の精子数が著しく減少するという表現型を得ていることから、同遺伝子が生殖細胞の正常な発生に重要な機能を果たしていることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では「Fbxl10 によるヒストンの脱メチル化を介したエピゲノム修飾が精細胞の発生および分化を制御する」との仮説を立て、Fbxl10 ノックアウトマウスにおける精子形成および精子の配偶子としての機能を詳細に解析することで仮説の検証を詳細に行った。

3. 研究の方法

1) Fbxl10 の欠損によって精子形成が阻害されることは明らかではあるものの、精巣における Fbxl10 の生理的な発現動態の詳細は未だ明らかではない。そこで、野生型マウスを用いて、精子形成が始まっていない新生児の時期から安定的な交配が可能となる生後8週までの精巣を経時的に回収し、Fbxl10 の発現量を Real-time RT-PCR により解析した。

2) Fbxl10 を欠損したマウス精巣における減数分裂の進行および各発生段階の精細胞の分布を詳細に解析するため、精巣切片を作成し免疫組織学的手法により検証した。

3) 精子の配偶子としての次世代作出能力に及ぼす Fbxl10 の役割を検証するために、Fbxl10 欠損オスマウスから回収した精子を用いて体外受精、体外胚発生および胚移植をおこない胚発生について詳細に解析した。

4) Fbxl10 は遺伝子発現を制御するヒストン修飾を調整する遺伝子であるため、欠損することによって数多くの遺伝子の発現が変動することが予想される。そこで、Fbxl10 を欠損した精原細胞における遺伝子発現パターンを網羅的に解析

するためにマイクロアレイ解析を行った。

4. 研究成果

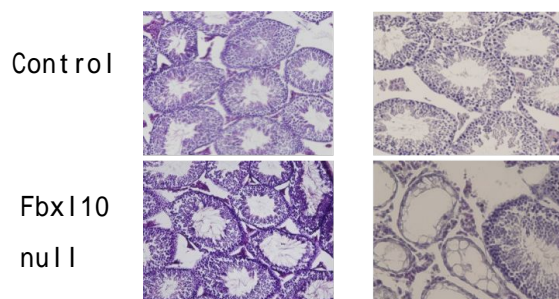
1) 精巣における Fbxl10 遺伝子の発現動態の解析

定量的 PCR の結果より、Fbxl10 の発現動態と精子形成との間に関連性があることが示唆された。すなわち Fbxl10 は出生直後にはほとんど発現しておらず、精子形成の開始と時期を同じくして発現量が増加し、性成熟に達する時期にプラトーに達してその後は定常的に発現することを観察した。このことから、Fbxl10 が精子形成において何らかの役割を果たしていることが示唆された。

2) 精巣における精子形成の免疫組織学的解析

弱齢から1年齢に至る各月齢のマウスから精巣を回収し、免疫組織学的手法により精子形成を評価した。その結果、Fbxl10 欠損マウス精巣では、加齢に伴って (7ヶ月齢頃から) 精細胞をほとんど含まない精細管が散見されるようになり (図1)、12ヶ月齢を超える頃にはほぼすべての精細管において精細胞の著しい減少ならびにアポトーシスの増加を観察した。一方、弱齢の Fbxl10 欠損マウスの精巣においては、野生型と比較して精細胞の著しい減少は確認されなかったものの、精原細胞あるいは減数分裂期の細胞の分布に異常が確認された。このことから Fbxl10 は持続的な精子形成を維持する上で重要な役割を果たしていることが示唆された。

図1 3ヶ月齢 7ヶ月齢



3) Fbxl10 欠損オスマウスから回収した精子を用いた体外受精、および胚発生能の検証

Fbxl10 欠損オスマウスから回収した精子を用いて体外受精を行い、またその胚を母体に移植することで胚発生能を検証した。その結果、Fbxl10 を欠損した精子由来の産仔を得ることが出来た。一方

で、同数の胚を移植したにも関わらず一腹産仔数は野性型精子を体外受精に供試した場合と比較して有意な減少を示した。また、妊娠中期の個体から子宮を回収して胎子を観察したところ、Fbx110欠損精子由来の胚を移植した母体において着床後に死亡している胎仔数が多数確認された(図2)。このことから、Fbx110を欠損した精子は次世代作出能力に何らかの欠陥を有することが示唆された。

図2



3) 精原細胞における遺伝子発現パターンの解析

Fbx110欠損マウスから回収した精原細胞を用いて、マイクロアレイおよびqPCRで遺伝子発現パターンを解析した。その結果、3ヶ月齢のFbx110欠損マウスから回収した精原細胞では同月齢の野性型マウス由来の精原細胞と比較して加齢に参与することが報告されている遺伝子群の発現が亢進しており、さらに3ヶ月齢におけるトランスクリプトームパターンは野性型の1年齢の精原細胞と類似することが明らかになった。このことから、Fbx110は精原細胞の早期加齢を抑制することで持続的な精子形成に寄与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Ozawa, M., Kawakami, E., Sakamoto, R., Shibasaki, T., Goto, A., and Yoshida, N. Development of FGF2-dependent pluripotent stem cells showing naïve state characteristics from murine preimplantation inner cell mass. *Stem Cell Research*, 査読有り 2014; 13: 75-84

[学会発表](計 5件)

(1) 小沢学 他 ヒストン脱メチル化酵素 Kdm2a による精子形成の制御機序 日本繁殖生物学会 2013/9/12-14 府中

(2) Ozawa M et al. Histone

demethylases Fbx110 and its homolog Fbx111 regulate male germ cell development and sustainable spermatogenesis by different methods in mice *Society for the Study of Reproduction* 2013/7/22-26 Montreal, Canada

(3) 小沢学 他 Fbx110は精原細胞の加齢を抑制することで持続的な精子形成を保障する 日本分子生物学会年会 2013/12/3-6 神戸

(4) 小沢学 他 ヒストン脱メチル化酵素 Fbx110による精子形成の制御機序 日本繁殖生物学会 2012/9/5-8 つくば

(5) 小沢学 他 Establishment of novel embryonic stem cell line which grows under GF stimulation but has germline competency in mice 日本分子生物学会年会 2012/12/11-14 福岡

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小沢学 (OZAWA, Manabu)
東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80608787

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：