

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860157

研究課題名(和文) ヒストン脱メチル化酵素 Fbxl10 による精細胞の発生制御機構の解明

研究課題名(英文) The histone demethylase FBXL10 regulates the proliferation of spermatogonia and ensures long-term sustainable spermatogenesis in mice

研究代表者

小沢 学 (Manabu, Ozawa)

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物の生殖細胞が正常に発生する上で、DNAおよびヒストンにおける厳密なエピゲノム調整が極めて重要であることがこれまでに報告されている。本研究では、ヒストン脱メチル化酵素であるFbxl10によるエピゲノム修飾が生殖細胞の発生および分化を制御する」との仮説を立て、ノックアウトマウスを用いてその検証を行った。その結果、Fbxl10を欠損したマウスでは加齢に伴い精子形成異常が亢進するとともに、精原幹細胞の分裂活性の低下が起こっていることが明らかとなった。以上の成果よりFbxl10は精原細胞の分裂活性を調整することで持続的な精子形成を制御するという新規の遺伝子機能モデルが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we show the important roles of FBXL10 as a histone demethylase in sustainable sperm production using mice in which the JmjC domain of Fbxl10 was deleted (Fbxl10 KO). In histological analysis, testes from 7-month-old Fbxl10 KO mice contained a greater ratio of seminiferous tubules exhibiting degeneration of spermatogenesis. Further analysis using an in vitro spermatogonia culture system (germline stem cells (GSCs)) revealed that Fbxl10 KO GSCs expressed a significantly higher level of P21 and P19 mRNA than wild-type (WT) GSCs. Furthermore, the doubling speed of Fbxl10 KO GSCs was significantly slower than that of WT GSCs. In addition, an in vivo study indicated that recovery of spermatogenesis after a transient reduction in the number of testicular germ cells by busulfan treatment was significantly slower in Fbxl10 KO mice than in WT mice. These data suggest that Fbxl10 plays important roles in long-term sustainable spermatogenesis via regulating cell cycle.

研究分野：発生工学

キーワード：精子形成 細胞周期 生殖細胞 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

個体を構成する全ての細胞は基本的に同一のゲノムを有している。その一方で、各組織の細胞はそれぞれに特異的な遺伝子発現とそれに基づいた生理機能を発揮しており、分化段階や組織特異的に遺伝子発現を調整する分子機構が、個体の発生やホメオスタシスを維持する上で不可欠である。近年、ヒストンや DNA の化学的修飾、すなわちエピジェネティックな修飾による遺伝子発現制御機構に注目が集まっている。とりわけて、生殖細胞の発生過程ではエピジェネティックの修飾が著しく変動すること、ならびにエピジェネティクスを制御する遺伝子をノックアウトしたマウスモデルの多くが不妊の表現型を示すことから、この制御機構が生殖細胞の正常な発生に不可欠であることが強く示唆される。

2. 研究の目的

ヒストンのメチル化は、エピジェネティックな制御を司るキーファクターの一つである。申請者が本研究において注目するヒストン脱メチル化酵素 Fbx110 は、ヒストン H3 のリジン 4 (H3K4) およびリジン 36 (H3K36) を脱メチル化する。H3K4 および H3K36 のメチル化は近傍の遺伝子の発現を亢進することから、脱メチル化酵素である Fbx110 は標的遺伝子の発現抑制因子として働くと推察されているものの、生体における詳細な機能的役割についてはこれまでにほとんど明らかにされていない。申請者らは世界に先駆けて Fbx110 ノックアウト (KO) マウスを作成し (Fukuda et al., 2011)、生殖細胞の発生および分化における同遺伝子の機能解析を開始している。これまでの予備的解析の結果、KO マウスの精巣において (1) 減数分裂の異常停止 (~3 ヶ月齢) (2) 精細胞を含まない精細管の出現、および (3) 精巣全体での精細胞数の激減という加齢に伴った精子形成不全の顕著化という興味深い表現型を観察しており、Fbx110 が精子形成に重要な役割を果たしていることは明らかである (Ozawa et al., unpublished data)。そこで、本研究では、「Fbx110 によるヒストンの脱メチル化を介したエピジェネティックな修飾が、精細胞の発生および分化を制御する」との仮説を立て、Fbx110KO マウスを駆使することで詳細に仮説を検証した。

3. 研究の方法

1) Fbx110 は Histone H3 の K4 および K36 を特異的に脱メチル化することが報告されている。そこで、精巣における Fbx110 のヒストン脱メチル化作用を観察するために、精巣切片を用いて H3K4me および H3K36me の修飾パターンを免疫組織化学的に解析した

2) 精原幹細胞をフローサイトメーターを用いて回収して、既往の方法により培養精原幹細胞ライン (Germ line stem cell, GSC, Kanatsu-Shinohara, 2003 Biol Reprod) を樹立し、長期間培養することで自己複製能の永続性を観察するとともに、精原幹細胞特異的なマーカー遺伝子および加齢に関連することが報告されている CDKI (p16, p19, p21) の発現量を比較した。更に、細胞の加齢に関与することが知られているテロメラーゼ活性の比較も合わせて行うことで、加齢を客観的に評価した。

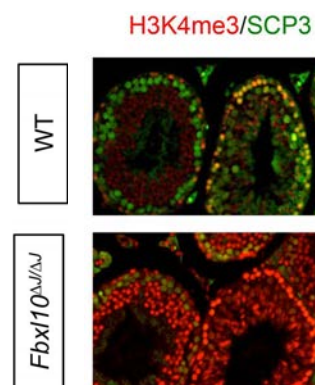
3) 加齢マーカーとして知られる CDKI は細胞周期を抑制的に制御することが知られている。そこで、Fbx110 欠損 GSC を用いて細胞の増殖性を確認するとともに、細胞周期の分布を観察した。さらに、アポトーシスの発生頻度を確認するため開裂カスパーゼ 3 陽性細胞をフローサイトメーターにより定量した。

4) Fbx110 欠損精原幹細胞の in vivo における増殖性を確認することを目的として、精巣切片を精原幹細胞マーカー (PLZF) および細胞増殖マーカー (Ki67) 特異的な抗体を用いて免疫組織化学的に染色をし、増殖細胞の割合を算定した。更に、薬剤により一過性に精原幹細胞数を減少させ、そこからの細胞数の回復速度を観察した。

4. 研究成果

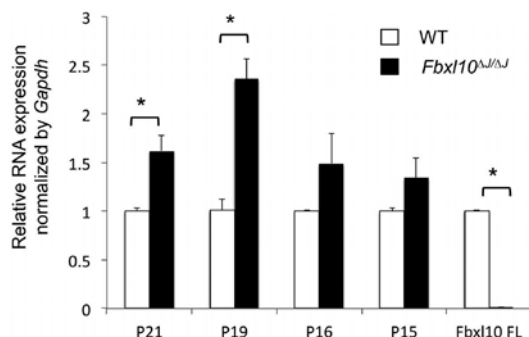
1) 精巣切片を H3K36me1/2/3 特異的な抗体を用いて免疫組織化学的に染色した結果、Fbx110 欠損マウスで Control と比較して大きな際は観察されなかった。一方で、H3K4me3 の染色は Control においては減数分裂前の精原細胞に限定されていた一方で、Fbx110 欠損マウス精巣では、減数分裂期の精母細胞、および減数分裂を終えた半数体精娘細胞でも強いシグナルが観察された

(右図)。この結果から、Fbx110 は減数分裂期以降の精細胞において H3K4 の強い脱メチル化活性を有することが明らかになった。

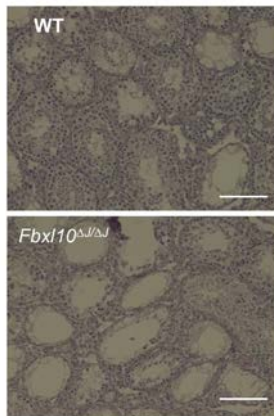


2) Fbx110 を欠損した GSC を長期培養に供した結果、少なくとも 6 ヶ月以上にわたって自己複製を継続できることがわかった。一方、精原細胞未分化マーカーである c-Ret の発現

強度が低下し、分化マーカーである c-Kit の発現が更新していたことから、Fbx110 欠損により細胞の未分化性が低下することが示唆された。さらに、加齢マーカーである p19 および p21 の発現が有意に更新しており、Fbx110 欠損に伴い、精原幹細胞の早期加齢が生じることが強く示唆された (下図)。



3) Fbx110 欠損 GSC の増殖性を確認した結果、Control と比較して、細胞の増殖速度は有意に低下していた。一方でアポトーシス細胞数の出現頻度については優位な差は観察されなかった。加えて、細胞周期の分布を解析した結果、Fbx110 欠損 GSC では G0/G1 期の細胞の割合が Control に比べ、有意に増加していた。このことから、Fbx110 を欠損した精原幹細胞では細胞の増殖性が低下することが示唆された。



4) 上記研究で明らかになった GSC の増殖性の低下が、in vivo でも起こっているのかを確認するために、Fbx110 欠損マウスの精巣を免疫組織学的に解析した。その結果、Fbx110 欠損マウスの精巣では分裂期にある未分化精原細胞の数が有意に低下しており、またブスルファン投与後の精子形成の回復も有意に遅延していた (右図)。このことから、Fbx110 欠損に起因して精原幹細胞の増殖能が低下することが明らかになり、この増殖性の低下が加齢による精子形成不全の原因となることが強く示唆された。

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, Fukuda T, Sakamoto R, Honda H, Yoshida N. The Histone Demethylase FBXL10 Regulates the Proliferation of Spermatogonia and Ensures Long-Term

Sustainable Spermatogenesis in Mice. *Biol Reprod.* 2016;94:1-11 (査読有り)

[学会発表] (計 3 件)

Ozawa M, Kawakami E, Tokunaga A, Yoshida N. Histone demethylases Fbx110 regulates balance between self-renew and differentiation of spermatogonia in mice *Society for the Study of Reproduction* 2015/6/18-22 San Juan, Puerto Rico

Ozawa M, Fukuda T, Sakamoto R, Honda H, Yoshida N. The histone demethylase FBXL10 regulates the proliferation of spermatogonia and ensures long-term sustainable spermatogenesis in mice *Society for the Study of Reproduction* 2016/7/16-20 San Diego, USA

小沢 学 他 ヒストン脱メチル化酵素 Kdm2a は精原細胞の自己複製と分化のバランスを調整する 日本分子生物学会年会 2015/12/1-4 神戸

[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：