

JmjC ドメインをもつタンパク質 JMJD1C はマウスにおける  
長期の生殖細胞の維持に必要である

目次	1
要旨	3
第一章 序論	
1-1 エピゲノムとは	4
1-2 ヒストン修飾	4
1-3 ヒストンリジン残基のメチル化	5
1-4 ヒストンメチル化修飾酵素	6
1-5 ヒストン脱メチル化酵素 JMJD1 ファミリー	8
1-6 精子形成について	10
1-7 生殖細胞の増殖と分化	11
1-8 マウスにおける出生後の生殖細胞分化スケジュール	11
1-9 精子形成と性ホルモン	12
1-10 本研究の目的	13
第二章 実験結果	
2-1 マウス成体における JMJD1C の発現	14
2-2 JMJD1C の精巣における発現の詳細な解析	15
2-3 <i>Jmjd1c</i> <sup>-/-</sup> マウスの雄は加齢に伴って早期に不妊を発症する	19
2-4 <i>Jmjd1c</i> <sup>-/-</sup> マウスの精巣では、加齢に伴い未分化な生殖細胞が欠損する	20
2-5 <i>Jmjd1c</i> <sup>-/-</sup> マウスでは加齢の伴い未分化生殖細胞の アポトーシスが増加する	21
2-6 <i>Jmjd1c</i> を欠損しても血中テストステロンの濃度に変化はない	23

2-7 JMJD1C はヒストンメチル化修飾に対する脱メチル化酵素活性をもたない	24
第三章 考察	
3-1 JMJD1C の生体内における発現パターンとその制御	26
3-2 JMJD1C の生理的な機能	27
3-3 JMJD1C のヒストン脱メチル化活性の有無について	29
3-4 JMJD1C の分子レベルでの機能について	30
3-5 まとめと今後の展開	31
第四章 実験手法	33
図表	37
引用文献	73
謝辞	78

## 要旨

ヒストンのメチル化修飾は、クロマチン状態の変化を介したエピジェネティックな遺伝子発現の制御に重要である。近年、ヒストンのメチル化が可逆的であることが明らかになり、ヒストンの脱メチル化を担う酵素群として JmJc ドメインをもつ Jumonji ファミリーの存在が明らかになった。現在までに約 20 種類の Jumonji ファミリーメンバーが同定されている。しかしその中でも生理機能が明らかになっている分子はごく一部であり、また酵素活性の有無が不確定な分子も多い。今回の研究で、筆者はその機能やヒストン脱メチル化活性の有無が不明の Jumonji ファミリー分子の 1 つである JMJD1C に注目して解析を行った。

JMJD1C の生理的な機能を解明する目的で、*Jmjd1c* 遺伝子欠損マウスを作製した。*Jmjd1c* 欠損マウスは正常に生まれ、外見上の異常は見られなかった。次に *Jmjd1c* 欠損マウスの繁殖能を調べた結果、雄が 3 ヶ月齢以降の時期から徐々に妊孕性を失うことが分かった。*Jmjd1c* 欠損マウスの精巣を調べると、加齢に伴い精巣重量が減少し、それに合わせて生殖細胞の欠失と精子の減少が確認された。異常が進行する途中の精細管では、成熟精子や半数体精子細胞が存在するにも関わらず、それより未分化な段階の生殖細胞が欠落している様子が観察された。精巣における JMJD1C の発現を免疫組織化学的に調べた結果、幹細胞機能を有すると考えられている未分化精原細胞で最も発現が高かった。これらのことから、*Jmjd1c* 欠損マウスの生殖細胞の加齢に依存した欠失は、未分化精原細胞からの新たな細胞の供給が途絶えていることに起因する可能性が強く示唆された。この可能性を検証するため、*Jmjd1c* 欠損マウスの精巣における未分化精原細胞の状態を調べた。その結果、加齢に伴った細胞数の著しい減少とアポトーシスの増加を見いだした。以上のことから、JMJD1C はマウスの精巣において、加齢にともなう雄の生殖細胞のアポトーシスを抑制し、精子形成を長期にわたって維持するのに必要であることを明らかにした。

最期に、JMJD1C のヒストン脱メチル化酵素活性の有無についての検討を行った。JMJD1C を過剰発現させた 293T 細胞と *Jmjd1c* 遺伝子欠損マウスの未分化精原細胞について、既知のヒストンのメチル化修飾状態の変化を検討した。その結果、どちらの実験においてもメチル化状態の変化は観察されなかったことから、JMJD1C はヒストンに対する脱メチル化酵素活性をもたない可能性が強く示唆された。

本研究は、JMJD1C がマウスの精子形成の長期維持に必要なことを明らかにした。さらに、JMJD1C はヒストン脱メチル化酵素活性に依存しない新たな機能を有している可能性を提示した。

## 第一章 序論

### 1-1 エピゲノムとは

ヒトを含む多細胞生物の1個体を構成する細胞は、一部の例外を除いて共通のDNA配列をもち、そこにコードされる遺伝情報も同一である。しかし、個体の様々な組織を構成する細胞は、それぞれが異なった遺伝子の発現パターンをもち、細胞ごとに固有の機能を有している。例えば、神経細胞は細胞体、樹状突起、軸索といった特徴的な構造をもち、情報伝達と情報処理に特化した機能をもつ。一方、胃や小腸など消化器官の粘膜上皮細胞は、細胞質に大量の分泌顆粒をもつ円柱状の細胞で、粘液の分泌による器官壁の保護や栄養の消化・吸収を担っている。各種細胞の特異的な遺伝子発現パターンは、細胞の分化段階に応じて適切に誘導される。分化の完了によりいったん確立した遺伝子の発現パターンは、細胞が増殖する際に複製・維持され、次世代に正確に引き継がれる安定な情報である。しかし同時に、遺伝子の発現パターンは環境変化に応じて適当に変化しうる柔軟性も持ちあわせる。

真核生物において、遺伝子発現のパターンは主にDNAとヒストンから構成されるクロマチンの修飾状態によって規定される。すなわち、DNAのメチル化やヒストンのリン酸化・アセチル化・ユビキチン化・メチル化などの後天的に施される化学修飾の状態に応じてクロマチンの開閉状態が変化し、転写因子のDNAに対するアクセシビリティが変化することで遺伝子の発現が制御される(図1-1)。DNAメチル化や様々なヒストン修飾などのように、DNAの塩基配列に依存しない遺伝情報を「エピゲノム」という<sup>1</sup>。

### 1-2 ヒストン修飾

真核生物において染色体DNAは、ヒストンタンパク質やその他さまざまな核内タンパク質と結合することで、高次に折りたたまれたクロマチン構造を形成している。クロマチンの最小構造単位はヌクレオソームである。ヒストンはヌクレオソームを構成するタンパク質複合体であり、4種類のヒストンH2A, H2B, H3, H4が各2分子会合したヒスト

ン 8 量体に、DNA が約 1.6 回転左巻きに巻き付くことでヌクレオソームが形成される。ヒストンの N 末端はヒストンテールと呼ばれ、決まった立体構造を取らずにヌクレオソームコアから遊離した状態で存在する。ヒストンテールはアセチル化、リン酸化、メチル化、ユビキチン化などの様々な化学修飾を受け、それぞれの修飾はクロマチン構造の変換を介して遺伝子の発現を正または負に制御する<sup>1</sup>。例えば、ヒストンのアセチル化は最も古くから研究が進んだ化学修飾であり、ヒストンのアセチル化は遺伝子の転写活性化に相関する。ヒストンのアセチル化の半減期は数分と短く、そのアセチル化レベルはヒストンアセチル化酵素 (HAT : histone acetyltransferase) とヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC : histone deacetylase) との間の拮抗的な修飾作用により、常に可逆的な調節を受けている<sup>2</sup>。一方、ヒストンのメチル化は 2000 年代以降に最も急速に研究が進んだヒストンの化学修飾である。ヒストンのメチル化はその修飾を受けたアミノ酸残基の位置によって、遺伝子を正にも負にも制御しうるのが特徴である。ヒストンのメチル基の半減期は他の修飾と比べて遅いことから、当初ヒストン脱メチル化酵素は存在せず、ヒストンの入れ替えなどによって代償されると考えられた。しかし、2004 年に最初のヒストン脱メチル化酵素が発見されたのをきっかけに数多くの脱メチル化酵素が見つかり、現在ではヒストンのメチル化レベルは可逆的に制御されると考えられている<sup>3</sup>。

### 1-3 ヒストンリジン残基のメチル化

塩基性アミノ酸であるリジン、アルギニンとヒスチジンがヒストンのメチル化される残基として知られている。この中で最も研究が進展しているリジン残基のメチル化修飾について以下に詳しく述べる。リジン残基のメチル化は側鎖のアミン基に結合するメチル基の数が 1 個 (モノメチル : me1)、2 個 (ジメチル : me2) または 3 個 (トリメチル : me3) の 3 通りの状態がある。これまでにヒストン H3 の 4, 9, 27, 36, 76 番目リジンとヒストン H4 の 20 番目のリジンがメチル化修飾を受けることが報告されている (図 1-2A)。以下に示すように、リジン残基のメチル化はメチル基を付加される残基の

位置によって全く機能が異なる。

H3K4me2 と me3 は転写が活発な遺伝子の転写開始から直近の上流と下流の狭い領域に集中して存在する、典型的な転写活性化のマークである。H3K4me1 も転写活性化のマークであるが、H3K4me2, me3 よりも転写開始点からやや離れた位置によく見られる<sup>4</sup>。

H3K27me3 は転写抑制に関わるマークであり、転写が不活発な遺伝子の開始点近傍に位置する<sup>5</sup>。一方、H3K27me1 は抑制遺伝子よりも活性化遺伝子付近に位置することが知られており、H3K27me3 とは逆に転写の活性化との関連が示唆されている<sup>6</sup>。このように、同じリジン残基のメチル化であっても、修飾されるメチル基の数によって機能が異なる場合があると考えられる。

H3K9me2, me3 はヘテロクロマチンの形成に関わる、転写抑制のマークである。H3K9me2 と me3 は抑制遺伝子付近 ( $\pm 10\text{kb}$ ) に主に位置する。特に H3K9me3 はヘテロクロマチンタンパク質 HP1 のクロマチンへの蓄積を誘導し、ヘテロクロマチンの形成・維持に関与する<sup>7</sup>。しかし、一方で H3K9me1 は活性化遺伝子付近に位置することから、遺伝子の活性化に関わる可能性が示唆されている<sup>8</sup>。

H3K36me3 は活性化遺伝子の転写開始点下流の遺伝子領域内に位置することから、転写伸長に関わることを示唆されている。また、活性化遺伝子の 3' 末端にも位置することが示されている<sup>9</sup>。

H4K20me3 は H3K9me2, me3 と同様に遺伝子の抑制とヘテロクロマチン形成に関わる。一方で H4K20me1 は活性化遺伝子のプロモーターやコーディング領域に位置することが報告されている<sup>10</sup>。

その他のヒストンメチル化修飾も遺伝子上で特異的な局在パターンを示すことから、それぞれの修飾が遺伝子の発現調節に特異な役割を持つことが示唆される<sup>11</sup> (図 1-2B)。

#### 1-4 ヒストンメチル化修飾酵素

ヒストンリジン残基のメチル化レベルは、ヒストンリジンメチル化酵素 (KMT : Lysine methyltransferases) とヒストンリジン脱メチル化酵素 (KDM : Lysine demethylases)

によって可逆的な調節を受ける。ヒストンリジンの修飾酵素は、まずメチル化酵素が先に発見された。2000年にSUV39H1がH3K9の最初のメチル化酵素として報告され<sup>12</sup>、その後G9a<sup>13</sup>、GLP<sup>14</sup>、ESET<sup>15</sup>など次々と新たなメチル化酵素同定された。一方、脱メチル化酵素については、リジン残基のメチル化が化学的に強固な修飾であることから、その存在を疑問視する声が多かった。しかし2004年に最初のヒストン脱メチル化酵素が報告され、現在では1)LSDファミリーまたは2)Jumonjiファミリーに属する分子を合わせて、約20種類のヒストン脱メチル化酵素が確認されている。

1) LSD 脱メチル化酵素ファミリー：2004年に最初のヒストン脱メチル化酵素としてLSD1 (Lysine-specific demethylase1, 別名KDM1A)が発見された<sup>16</sup>。LSD1はH3K4me1, me2とH3K9me1, me2の脱メチル化反応を触媒する。一方、もう一つのLSD脱メチル化酵素ファミリーの分子であるLSD2はH3K4me1, me2のみを脱メチル化するとされる<sup>17</sup>。LSD1とLSD2は共に、補酵素の一種であるFAD(Flavin adenine dinucleotide)依存的なアミノ基の酸化反応を介して、リジン残基の脱メチル化を触媒する (図1-3)。

2) Jumonji 脱メチル化酵素ファミリー：2006年に第2の脱メチル化酵素ファミリーとして、JmjCドメインを活性ドメインとしてもつJumonjiファミリーが報告された。最初にFBXL11 (別名KDM2A)がH3K36me1, me2の脱メチル化酵素として報告され<sup>18</sup>、その後JmjCドメインをもつ同ファミリー分子が次々と報告された。現在ではJumonjiファミリーメンバーとして30種類が同定され、これらは各分子間のホモロジーにより約7種類のサブファミリーに分類される<sup>19</sup> (図1-4)。Jumonjiファミリー分子による脱メチル化は、Fe(II)と $\alpha$ -ケトグルタル酸を補因子とするメチル基の水酸化反応を介して進行する (図1-3)。Jumonjiファミリー分子のうち、実際にヒストン脱メチル化酵素活性を持つことが確認されている分子は約半数であり、残りのファミリー分子については酵素活性の有無が不明である。

#### 1-5 ヒストン脱メチル化酵素 JMJD1 ファミリー

JmjC ドメインが脱メチル化反応の触媒ドメインであることが判明して間もなく、Jumonji ファミリーにおける 2 番目のサブファミリーとして、JMJD1 (別名 KDM3) ファミリーが同定された<sup>20</sup>。JMJD1 ファミリー分子は H3K9me1, me2 に対する脱メチル化酵素活性をもつことから、遺伝子の発現を正に制御する役割をもつと考えられる。JMJD1 ファミリーは JMJD1A (別名 KDM3A, TSGA)、JMJD1B (別名 KDM3B) と JMJD1C (別名 TRIP8) の 3 つのファミリー分子から構成される (図 1-5)。共通するタンパク質構造として、C6-type Zinc Finger モチーフ (H3K9 脱メチル化酵素活性に必要) と LXXL モチーフ (核内受容体との結合が示唆される) を JmjC ドメインの N 末端側にもつ。

JMJD1A は、マウス精巣 cDNA ライブラリーにおいて特異的に発現する遺伝子 TSGA (Testis-specific gene A) として同定された。その後、H3K9 の脱メチル化酵素活性をもつことと、核内アンドロゲン受容体と結合しアンドロゲン応答性遺伝子の発現を制御することが明らかになった<sup>20</sup>。複数の研究グループから *Jmjd1a* 遺伝子の欠損マウスに関する報告がなされており、JMJD1A は胎児期における雄への性分化決定に必要であることや<sup>21</sup>、成体における精子細胞の伸長と成熟に必要であることが明らかになっている<sup>22,23</sup>。また、この遺伝子欠損マウスは加齢に伴って肥満を発症することから、成体の代謝調節にも関わることを示唆されている<sup>24,25</sup>。またヒトの疾患に関わる報告として、大腸癌<sup>26</sup>、前立腺癌<sup>27</sup>、腎細胞癌<sup>28</sup> と肝細胞癌<sup>29</sup> において JMJD1A が高発現することが報告されている。

JMJD1B は、ヒト骨髄性白血病の一種である 5q-症候群において頻繁に欠損が観察される第 5 染色体の q31-33 領域に位置する原因候補遺伝子として報告された<sup>30</sup>。JMJD1B は相同分子である JMJD1A と同様に H3K9me1, me2 に対する脱メチル化酵素活性を持つことが確認されている。

JMJD1C は最初、酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより甲状腺ホルモン受容体結合タンパク質 TRIP8 (thyroid receptor interacting protein 8) として同定された<sup>31</sup>。その後、in silico 解析により TRIP8 が JmjC ドメインを持つことが明らかになり<sup>32</sup>、JMJD1 ファミリーのひとつとして分類された。相同ファミリー分子である JMJD1A と JMJD1B が

ヒストン脱メチル化酵素をもつことが広く認められる一方で、JMJD1C の酵素活性の有無については評価が定まっていない。すなわち、JMJD1C がヒストン脱メチル化酵素をもつとする報告と<sup>33</sup>、逆に酵素活性を持たないとする報告があり<sup>34,35</sup>、JMJD1C の脱メチル化酵素活性の有無については議論の余地が残されている。ヒト疾患との関連については、突発性自閉症患者ゲノムのポジショナルスクリーニングにより、*JMJD1C* 遺伝子変異と自閉症との関連が報告されている<sup>36</sup>。

---

## 1-6 精子形成について

精巣の中には、精子形成の場である精細管とよばれる直径数百  $\mu\text{m}$  の管が幾重にも折り畳まれた状態で詰まっている。精細管内で作られた精子は管の中を流れていき、精巣に隣接する精巣上体の中で成熟し、貯蔵される (図 1-6A)。

精巣は、主に精細管と精細管の間を埋める精巣間質の2つから成る (図 1-6B)。精細管は生殖細胞とセルトリ細胞から構成される。セルトリ細胞は生殖細胞の増殖、分化および成熟をサポートする性腺体細胞である。一方、精巣間質は血管やライディッヒ細胞から構成される。ライディッヒ細胞は男性ホルモンであるテストステロンの分泌細胞で、正常な精子の形成に必要である。

生殖細胞は、精細管内の基底膜側 (外側) から内腔側に向かって進行する (図 1-6C)。精細管の外側から内側に向けて順に精原細胞、精母細胞、精子細胞と次々と分化段階の進んだ生殖細胞が同心円状に整列しており、内腔側の中心部には産出された精子が存在する。生殖細胞の分化は大きく分けて体細胞分裂、減数分裂、形態変化の3つの段階に分けられる。

体細胞分裂は精原細胞において起こる。精原細胞は幹細胞を含む未分化型精原細胞と、減数分裂への進行が決定した分化型精原細胞の2つに大別され、ともに基底膜上に位置しながら分裂・増殖する。

減数分裂は精母細胞において進行する。まず分化型精原細胞が成熟し一次精母細胞となる。次に一次精母細胞は第一減数分裂を経て二次精母細胞となり、直後に二次精母細胞は第二減数分裂を経て精細胞となる。つまり1個の一次精母細胞から4個の精細胞が産出される。

形態変化は精子細胞において起こる。減数分裂により生じた精子細胞は、核の凝集細胞質の消失、尾部の形成など円形から伸長型の精子細胞へと著しく形態を変化させ、最終的には運動性ある精子へと成熟する。

## 1-7 生殖細胞の増殖と分化

基底膜上に位置する未分化精原細胞の中には、生殖細胞の供給源となる1個の精原幹細胞 A-single (As)型精原細胞が含まれる。As型細胞は自己複製による幹細胞の維持、または増殖分化による生殖細胞の供給を行う<sup>37,38</sup>。As型細胞はAs→Apr→Aa14→Aa18→Aa116→(Aa132)と未分化精原細胞期の中に4,5回の体細胞分裂を行う。この分裂は細胞質の分離が完全には起こらず、未分化精原細胞は鎖状に繋がったまま増殖する。未分化精原細胞の増殖は、増殖のタイミングが不規則であるのが特徴である。未分化精原細胞は分化を抑制する転写抑制因子としてPLZFを発現する<sup>39,40</sup> (図 1-6D)。

Aa1型の未分化細胞は、次の分化段階として分化型の精原細胞A1となる。これ以降の体細胞分裂のタイミングは厳密に制御されており1サイクルにつき約30時間で進行する。分化型精原細胞はA1→A2→A3→A4→In→Bと分化し合計5回の体細胞分裂を行う。

B型精原細胞で体細胞分裂は停止し、次に減数分裂のステージへと移行する。B型精原細胞は成長・分化して第一精母細胞となる。その後、第一分裂と第二分裂の2回の減数分裂を経て、1個の第一精母細胞から4個の精子細胞が形成される。

第一分裂は前期・中期・後期・終期の4つのステージからなり、さらに前期は染色体の形状から1)レプトテン期、2)ザイゴテン期、3)パキテン期、4)ディプロテン期の4段階に分けられる。

- 1) レプトテン期：染色体が細い染色質の糸として見える。
- 2) ザイゴテン期：相同染色体が対になって接着する。
- 3) パキテン期：対をなした染色体が互いに螺旋状に巻き付き、太く短くなる。これは相同染色体が結合したもの(二価染色体)である。XとY染色体が対合した二価染色体(XYボディ)にはリン酸化ヒストンバリエントH2A.X( $\gamma$ H2Ax)の集積が1個の大きなドットとして観察される<sup>41</sup>。また分子シャペロンCalmegeinがこの時期に特異的に発現する<sup>42</sup>。
- 4) ディプロテン期：染色体が分離し、相同染色体が離れる。

精子細胞は、前述したようにダイナミックな形態変化によって精子に分化する。

## 1-8 マウスにおける出生後の生殖細胞分化スケジュール

精巣で見られる生殖細胞の分化は生後間もなく進行する(図 1-7)。出生時に最も未分

化な生殖細胞である始原生殖細胞は精細管の中心部に存在する。生後 1-3 日齢に、始原生殖細胞は基底膜に移動、生着したのち細胞分裂を開始する。生後 4-6 日齢に、始原生殖細胞は未分化精原細胞へと分化し、引き続き細胞増殖を続ける。生後 6 日齢頃には、未分化精原細胞から分化型精原細胞への分化が進行する。生後 10 日齢から一次精母細胞が出現し、生後 15 日頃にはパキテン期精母細胞が観察されるようになる。生後 18-20 日齢の間で、減数分裂を完了した精母細胞が出現する。生後 28 日には伸長精子細胞が観察され、生後 35 日には分化を完了した成熟精子が出現する。

### **1-9 精子形成と性ホルモン**

精子の形成は、間脳視床下部 - 脳下垂体 - 精巣からなる性ホルモンの分泌系によって制御される<sup>43</sup>。間脳視床下部は GnRH (性腺刺激ホルモン分泌ホルモン)を放出することで脳下垂体を刺激し、脳下垂体は性腺刺激ホルモンである LH (黄体刺激ホルモン)と FSH (卵胞刺激ホルモン)を放出することで精巣に男性ホルモンの分泌を促す。精巣において、LH はライディッヒ細胞を刺激することで男性ホルモン (テストステロン)の合成・分泌をうながし、FSH はライディッヒ細胞の LH に対する感受性を亢進させる。性ホルモンの分泌系の異常は、正常な精子形成を傷害する<sup>44</sup>。

#### 1-10 本研究の目的

今回の研究で、筆者はまだその機能やヒストン脱メチル化活性の有無が不明の Jumonji ファミリー分子の1つである JMJD1C に注目してその生理的な機能解明を目指した。

## 第二章 実験結果

### 2-1 マウス成体における JMJD1C の発現

生体における JMJD1C の発現を明らかにする目的で、成体マウスの各組織を用いて、JMJD1C に対するウェスタンブロッティングまたは組織免疫染色を行った。

最初に、ES 細胞 (TT2 細胞株)、野生型の胎仔線維芽細胞 (MEF) と 2 ヶ月齢の野生型マウスの各組織から抽出した Whole cell lysate を用いて JMJD1C に対するウェスタンブロッティングを行い、JMJD1C の各組織における発現を検討した (図 2-1, A)。ネガティブコントロールとして、後述する *Jmjd1c* 遺伝子欠損マウスの組織から抽出した Whole cell lysate を用いた。その結果、検出の露光が短時間の場合は ES 細胞でのみ約 260kD の位置にバンドが観察され、露光時間を長くした場合はほぼ全ての組織で約 260kD のバンドが観察された。興味深いことに、精巣だけで 260kD に加えて約 280kD の位置にもバンドが検出された。*Jmjd1c* 遺伝子欠損マウスの組織では、260kD と 280kD の両方のバンドが検出されなかったことから、これらの 2 つのバンドが JMJD1C に相当することを確認した。

次に、2 ヶ月齢の野生型マウスの大脳、心臓、肝臓と小腸の組織切片を用いて、JMJD1C に対する組織免疫染色を行った。その結果、いずれの組織においてもほぼ全ての細胞に JMJD1C の発現が検出された (図 2-1, B)。

以上の結果から、JMJD1C はマウスの成体においてほぼ全ての臓器にユビキタスに発現する事と、精巣だけに分子量の異なる 2 種類の JMJD1C が発現することが明らかになった。

## 2-2 JMJD1C の精巣における発現の詳細な解析

精巣において特徴的な JMJD1C の発現を見いだしたことに加え、JMJD1C のサブファミリー分子である JMJD1A は精巣に強く発現し正常な精子形成に必須であること<sup>22,23</sup>から、精巣における JMJD1C の発現と機能に注目し、詳細な解析を行うことにした。

最初に、マウスの生後の成長に伴う JMJD1C の発現パターンを検討した。生後 4 日から 90 日までの間の野生型マウスの精巣から抽出した Whole cell lysate を用いて、ウェスタンブロッティングにより JMJD1C の発現を検出した (図 2-2, A)。生後 90 日の成体マウスでは前述通り 260kD と 280kD の 2 本のバンドが観察された。一方、生後 4 日から 24 日間の成長期に JMJD1C のバンドの発現パターンに特徴的な変動が見られた。すなわち、260kD の JMJD1C は生後 4 日において最も強く発現し、生後の日数が進むにつれて発現量が減少した。一方で、280kD の JMJD1C は生後 18 日から発現を開始し、マウスの成長にともなって発現量が増加した。生後の成長にともなう 2 種類の JMJD1C の発現量の変化は、プロットのバンド強度を定量することによっても確認した (図 2-2, B)。260kD の JMJD1C の発現パターンは、未分化精原細胞のマーカとして用いた PLZF の発現パターンに類似していた。一方、280kD の JMJD1C の発現パターンは、パキテン期精母細胞のマーカとして用いた Calmegin の発現パターンと強く一致した。この結果から、260kD の JMJD1C が未分化精原細胞に発現する一方、280kD タンパク質がパキテン期精母細胞に発現する可能性が示唆された。

JMJD1C に加えて、JMJD1C のサブファミリー分子である JMJD1A の発現も同時に検出した (図 2-2, A)。JMJD1A は生後 4 日から 14 日間の間はわずかに発現し、生後 18 日以降に発現量が急激に増加した。JMJD1A はパキテン期精母細胞に最も強く発現する<sup>23</sup>。パキテン期精母細胞は生後 15 日頃から出現するので、生後 14 日から 18 日にかけて JMJD1A の発現が増加することは既存の報告と合致する。この結果は、ファミリー分子である JMJD1A と JMJD1C の間で、精巣における発現のパターンが異なることを示した。

マウスの JMJD1C について、オルタナティブ・エクソンに由来する 2 種類のバリエーションが報告されている (図 2-3, A と B)。1 つは Exon1 と Exon2 から転写される Long variant であり、これは 2530 アミノ酸 (分子量 282kD) からなるタンパク質をコードする (NP\_997104)。もう 1 つは Exon1B から転写される Short variant であり、これは 2350 アミノ酸 (分子量 261kD) のタンパク質をコードする (NP\_001229325)。精巣における *Jmjd1c* mRNA の short variant と long variant の発現を明らかにするために、生後 4 日と 60 日の精巣から抽出した total RNA を用いて、short variant と long variant の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法により比較した (図 2-3, C)。その結果、Short variant に対する Long variant の発現量の比率が、生後 60 日の精巣では生後 4 日と比較して 10 倍以上高いことから、Long variant はマウスの生後の成長に伴って発現量が増加することが示唆された。前述のウェスタンブロッティングにより検出した JMJD1C の発現パターンの変化と照らし合わせて考えると、約 260kD の JMJD1C は short variant mRNA に由来する一方、約 280kD の JMJD1C は long variant mRNA に由来することが強く示唆された。

JMJD1C がマウス成体において精巣のライディッシュ細胞に発現するという先の報告がある<sup>33</sup>。精巣において JMJD1C を発現する細胞の種類を明らかにする目的で、*c-Kit* 変異 *W/W<sup>v</sup>* マウス (精巣において生殖細胞のみを欠損し、ライディッシュ細胞を含めた生殖腺体細胞は存在する) を用いて、JMJD1C の発現をウェスタンブロッティングにより検出した (図 2-4)。その結果、*W/W<sup>v</sup>* マウスの精巣では 280kD と 260kD の両方のバンドがほとんど検出されなかったことから、精巣において JMJD1C は主に生殖細胞に発現する事が強く示唆された。

精巣における JMJD1C の発現をさらに詳細に解析するために、組織免疫染色により JMJD1C の発現を検討した。最初に、生後 4 日の *Jmjd1c* +/- マウスの精巣を用いて、JMJD1C と PLZF (未分化精原細胞マーカー) に対する 2 重免疫染色を行った。その結果、精細管の内部に存在する PLZF 陽性の細胞が JMJD1C を強く発現することが明

らかになった (図 2-5, A)。次に、生後 60 日の *Jmjd1c* +/-マウスの精巣切片を用いて、JMJD1C に対する免疫染色を行った (図 2-5, B)。ネガティブコントロールとして *Jmjd1c* -/-マウスの精巣切片も同時に染色を行った。その結果、*Jmjd1c* +/-マウスの精巣において、精細管内部の基底膜に沿って JMJD1C を強く発現する細胞が少数存在した。一方、基底膜から内腔側にも JMJD1C を弱く発現する細胞が多数存在した。精細管同士の間隙に存在する間質細胞 (主にライディッヒ細胞が含まれる) の細胞質にもシグナルが検出されたが、*Jmjd1c* -/-マウスの精巣にも同様のシグナルが観察されたことと、2 次抗体のみを用いて染色した場合でも同様に染色されたことから、これは非特異的な染色に由来するシグナルであると判断した。図 2-4 の実験結果から JMJD1C は主に未分化精原細胞とパキテン期精母細胞に発現する可能性が示唆された。そこで JMJD1C と、PLZF または  $\gamma$  H2AX (パキテン期精母細胞マーカー) との 2 重免疫染色によって、JMJD1C を発現する生殖細胞の種類を確認した。その結果、JMJD1C を強く発現し基底膜に位置する細胞は PLZF 陽性細胞と一致し (図 2-6, A)、一方 JMJD1C を弱く発現する細胞は  $\gamma$  H2AX 陽性細胞と一致した (図 2-6, B)。また、JMJD1C がライディッヒ細胞に発現する可能性を、JMJD1C と HSD3 $\beta$  (ライディッヒ細胞マーカー) との 2 重免疫染色により検討した結果、非常に弱いながらも JMJD1C のシグナルが HSD3 $\beta$  陽性細胞の核内に観察された (図 2-6, C)。

JMJD1C を発現することが判明した未分化精原細胞、パキテン期精母細胞とライディッヒ細胞について、組織免疫染色により検出された JMJD1C シグナルの強度を定量することにより、各細胞における JMJD1C の発現量を比較した。その結果、未分化精原細胞における JMJD1C の発現量を 1 とした場合、パキテン期精母細胞における発現量は約 0.4、ライディッヒ細胞における発現量は約 0.1 であった (図 2-6, D)。

JMJD1A と JMJD1C の精巣における発現パターンを比較するために、JMJD1A と JMJD1C の 2 重免疫染色を行った (図 2-7)。その結果、JMJD1A はパキテン期精母細胞に強く発現するが、未分化精原細胞における発現は検出されなかった。この結果は

JMJD1A の発現に関する従来報告と一致した<sup>23</sup>。一方、JMJD1C はパキテン期精母細胞に弱く発現し、また未分化精原細胞において強く発現した。この結果は、前述の図 2-2 の結果と同じく、JMJD1A と JMJD1A の精巣における発現様式が異なることを強く示唆した。

### 2-3 *Jmjd1c* -/-マウスの雄は加齢に伴って早期に不妊を発症する

JMJD1C の生理的な機能を明らかにするために、*Jmjd1c* 欠損マウスを作製した (図 2-8)。*Jmjd1c* ヘテロ欠損マウス同士の交配により *Jmjd1c* ホモ欠損 (以下、*Jmjd1c* -/- と表記) マウスを作出した結果、*Jmjd1c* -/-マウスはメンデルの法則に従って生まれ、大人まで生育した。また、このマウスに外見上の変化や組織学的な異常は観察されなかったことから (図 2-9)、JMJD1C はマウスの生存に必須ではないことが明らかになった。

JMJD1C のファミリー分子である JMJD1A の欠損は雄の精子形成に異常をきたすことから<sup>22,23</sup>、*Jmjd1c* -/-マウスの生殖機能に関わる異常の有無を検討した。まず、自然交配により *Jmjd1c* -/-マウスの妊孕性の有無を確認した。雄の *Jmjd1c* -/-マウスを雌の野生型マウスと交配したところ、雄の *Jmjd1c* -/-マウスは、3 ヶ月齢までは繁殖能力を有し仔を得たが (8 匹中 7 匹)、3 ヶ月齢以降の全ての *Jmjd1c* -/-マウス雄個体では妊孕性が観察されなかった (8 匹中 0 匹)。この結果から、JMJD1C は雄の妊孕性の維持に必要であることが明らかとなった。一方、雄の野生型マウスと雌の *Jmjd1c* -/-マウスを交配したところ、雌の *Jmjd1c* -/-マウスは正常に妊娠・出産した。

雄の *Jmjd1c* -/-マウスが早期に不妊を発症する原因を明らかにするために、精巣の詳細な解析を進めた。まず、*Jmjd1c* -/-マウスの精巣の外見を観察した結果、1 ヶ月齢の *Jmjd1c* -/-の精巣はコントロールとの間に明らかな差はなかったが、8 ヶ月齢の *Jmjd1c* -/-マウスの精巣はコントロールと比べて顕著に小さかった (図 2-10, A)。一方、8 ヶ月齢の *Jmjd1c* -/-マウスの体の大きさや体重は、コントロール群との間に差はなかった (図 2-10, B)。次に、*Jmjd1c* -/-マウスの精巣重量を月齢ごとに測定した。結果、コントロールの精巣は 4-6 ヶ月齢で最大となり、その後少なくとも 12 ヶ月齢までは重量が維持されるのに対し、*Jmjd1c* -/-マウスの精巣は 4 ヶ月齢以降から加齢にともなって徐々に重量が減少した (図 2-10, C)。

*Jmjd1c* -/-マウスの精巣の萎縮の原因を明らかにするために、*Jmjd1c* -/-マウスの精精巣上体と精巣の組織切片を、HE (ヘマトキシリン&エオシン)染色によって組織学

的に観察した。2ヶ月齢の *Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスの精巣上体と精巣に顕著な異常は観察されなかった。しかし、8ヶ月齢の *Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスでは、精巣上体中の精子の数がコントロールと比べて明らかに減少しており、精巣中では生殖細胞が減少した異常な精細管が頻繁に観察された (図 2-11)。

*Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスの加齢にともなう生殖細胞の減少を、生殖細胞マーカーである DDX4<sup>45</sup> の組織免疫染色により確認した。2ヶ月齢の *Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスでは生殖細胞の欠損を示す DDX4 陰性の精細管がわずかに観察され、12ヶ月齢の *Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスでは DDX4 陰性の精細管の数が顕著に増加した (図 2-12, A)。*Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスの精巣の2ヶ月齢、4ヶ月齢と8-12ヶ月齢における DDX4 陰性の精細管の割合を定量した結果、2ヶ月では~2%、4ヶ月齢では約5%、8-12ヶ月齢では約25%の精細管が DDX4 陰性であった。コントロールのマウス精巣では2ヶ月齢、4ヶ月齢と8-12ヶ月齢の全ての時期で DDX4 陰性の精細管の割合は2%以下であった (図 2-12, B)。これらの結果から、*Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスは加齢にともない徐々に生殖細胞が欠失することが明らかになった。

#### 2-4 *Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスの精巣では、加齢に伴い未分化な生殖細胞が欠損する

8ヶ月齢の *Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスの精巣切片を PAS-ヘマトキシリンにより染色し、生殖細胞の欠失が進む途中の精細管に注目して、組織学的な解析を行った。その結果、分化の最終段階にあたる伸長精子細胞のみ含まれる精細管が高頻繁に見られた (図 2-13, A)。また、伸長精子細胞と円形精子細胞は存在するが、それより未分化な生殖細胞 (未分化精原細胞~パキテン期精母細胞) を欠失した精細管も観察された (図 2-13, B-E)。これらの結果は、*Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスでは、加齢に伴って未分化な生殖細胞の減少が徐々に進行し、新たな生殖細胞の供給が途絶えることを強く示唆した。

JMJD1C は未分化精原細胞に強く発現することから、その欠損により幹細胞を含む未分化な生殖細胞の数が減少すると仮定し、組織免疫染色によって未分化精原細胞の細胞数を検討した。まず *Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスの精巣切片を TRA98 (生殖細胞マーカー) と PLZF (未分化精原細胞マーカー) で2重免疫染色した (図 2-14, A)。次に TRA98 陽性

細胞が十分な数ある精細管を「正常な精細管 (N)」、細胞数の減少が顕著な精細管を「変性した精細管 (D)」と便宜的に分類した後、それぞれの精細管あたりの PLZF 陽性細胞の数を計測した (図 2-14, B)。その結果、1 ヶ月齢においては *Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスとコントロールの PLZF 陽性細胞の数に有意な差は無かった (コントロール 3.2 個/チューブ、*Jmjd1c*<sup>-/-</sup> 3.0 個/チューブ)。しかし、10 ヶ月齢の *Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスの PLZF 陽性細胞数は、「変性した精細管」ではコントロールに対して 20%以下に減少し、加えて「正常な精細管」でも約 60%に減少していた (コントロール 3.2 個/チューブ、*Jmjd1c*<sup>-/-</sup> (N) 1.8 個/チューブ、*Jmjd1c*<sup>-/-</sup> (D) 0.5 個/チューブ)。これらの結果から、*Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスの加齢に伴う生殖細胞の欠失は、未分化精原細胞の減少に起因する可能性が強く示唆された。

## 2-5 *Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスでは加齢の伴い未分化生殖細胞のアポトーシスが增加する

*Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスにおいて未分化精原細胞が減少する原因を明らかにするために、未分化精原細胞におけるアポトーシスと細胞増殖の変化を検討した。

最初に、*Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスの生殖細胞におけるアポトーシスを TUNEL 法により検出した。TUNEL 陽性細胞を精細管内での位置と DAPI 染色による核の形態に基づいて、以下の 3 つのグループに分類した。(図 2-15)。

グループ a) 主に基底膜に位置する精原細胞からなる。その中には幹細胞野性質を持つ未分化精原細胞が含まれる。

グループ b) 主にパキテン期から二次精母細胞の間の分化段階の生殖細胞を含む

グループ c) 主に精子細胞を含む

2 ヶ月齢においては、いずれのグループにおいても *Jmjd1c*<sup>-/-</sup>とコントロールの間に TUNEL 陽性細胞の数に差はなかった。しかし、10 ヶ月齢の *Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスではコントロールと比較して、TUNEL 陽性細胞の数がグループ a)では約 3 倍、グループ b)では約 2 倍に増加していた。一方、グループ c)では *Jmjd1c*<sup>-/-</sup>とコントロールの間に

差はなかった。

次に、*Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスにおける未分化生殖細胞の細胞増殖を、ヒストン H3S10 のリン酸化（細胞周期の M 期のマーカー）を指標に観察した。PLZF とリン酸化 H3S10 (H3S10ph) に対する 2 重組織免疫染色を行い、PLZF 陽性細胞における H3S10ph 陽性細胞の割合を算出した。その結果、1 ヶ月齢と 10 ヶ月齢のいずれにおいても、*Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスとコントロールの間に有意な差がなかった（[図 2-16](#)）。

以上の結果から、*Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスにおける加齢に伴った未分化精原細胞の減少はアポトーシスの増加に起因することを示唆された。さらに、*Jmjd1c* 遺伝子の欠損は精母細胞においてもアポトーシスの増加を引き起こしたことから、JMJD1C は雄の減数分裂期の生殖細胞の細胞死も抑制することが分かった。

## 2-6 *Jmjd1c* を欠損しても血中テストステロンの濃度に変化はない

精子の形成は、間脳視床下部 – 脳下垂体 – 精巣からなる性ホルモンの分泌系によって制御されている。ライディッヒ細胞は精巣におけるテストステロン（男性ホルモン）の産生細胞であり、その機能の異常は正常な精子形成に影響する<sup>46</sup>。

JMJD1C がライディッヒ細胞に観察されたことから、*Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスの加齢に伴う生殖細胞の減少が、ライディッヒ細胞におけるテストステロンの合成・分泌の異常による二次的な影響である可能性も考えられた。そこで、*Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウス血清中のテストステロン濃度とその前駆体であるアンドロステンジオンの濃度を LC-MS/MS 法により測定した。その結果、テストステロンとアンドロステンジオンのどちらについても、*Jmjd1c*<sup>-/-</sup>とコントロールのサンプル間に有意な差はみられなかった (図 2-17)。それに加えて、組織学的な解析によっても *Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスのライディッヒ細胞の形態に異常は観察されなかった。以上の結果から、*Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスにおける生殖細胞の欠失は、ライディッヒ細胞の異常による二次的な影響ではないと考えられた。

## 2-7 JMJD1C はヒストンメチル化修飾に対する脱メチル化酵素活性をもたない

JMJD1C が属する JMJD1 ファミリーはヒストン H3K9me1 と me2 に対する脱メチル化酵素活性をもつグループであることから<sup>20</sup>、JMJD1C も同様の酵素活性をもつことが予想された。そして実際に、JMJD1C がヒストン脱メチル化酵素活性をもつとする報告が最初になされたが<sup>33</sup>、その後逆に JMJD1C はヒストン脱メチル化酵素活性をもたないとする報告が複数のグループからなされており<sup>34,35</sup>、現在のところ JMJD1C の酵素活性の有無については評価が定まっていない。

そこで筆者は、JMJD1C のヒストン脱メチル化酵素活性の有無を明らかにする目的で、1) 培養細胞における JMJD1C の強制発現系と、2) *Jmjd1c* <sup>-/-</sup>マウスによる遺伝子の機能欠損の 2 種類の実験系を用いて、JMJD1C のヒストンに対する脱メチル化酵素活性の評価を行った。

1) について、Flag タグを付加した JMJD1C (Flag-JMJD1C) をトランスフェクションにより 293T 細胞に強制発現させた。H3K9me1 および me2 に対する脱メチル化のポジティブコントロールとして、Flag タグを付加した JMJD1A (Flag-JMJD1A) または JMJD1B (Flag-JMJD1B) の強制発現も同時に行った。まず、Flag-JMJD1C, Flag-JMJD1A と FlagJMJD1B の 293T 細胞における発現量が同程度であることを、Flag タグに対するウェスタンブロッティングにより確認した (図 2-18, A)。次に Flag タグとヒストン H3K9me1, me2 または me3 に対する 2 重細胞免疫染色によって、各 Flag 付加タンパク質を強制発現した 293T 細胞におけるヒストン修飾の変化を観察した。その結果、Flag-JMJD1A または Flag-JMJD1B を強制発現した 293T 細胞ではヒストン H3K9me1 と me2 の脱メチル化が確認された (図 2-18, B と C)。しかし、Flag-JHDM1C を強制発現した 293T 細胞ではヒストン H3K9me1 と me2 の修飾状態に変化は見られなかった (図 2-18, D)。一方、ヒストン H3K9me3 については、Flag-JMJD1C, Flag-JMJD1A と Flag-JMJD1B のいずれを強制発現させた細胞でも修飾状態の変化は無かった (図 2-18, B-D)。

2)について、*Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスにおいてヒストンの修飾状態に変化があるかを組織免疫染色により検討した。JMJD1C が発現することが判明した未分化精原細胞、パキテン期精母細胞とライディッヒ細胞に注目して、ヒストン H3K9me1 me2 または me3 の修飾状態に変化があるかを、各種の細胞マーカーとヒストン修飾に対する 2 重免疫染色によって調べた。その結果、*Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスの未分化精原細胞 (PLZF 陽性細胞)、パキテン期精母細胞 (gH2AX 陽性細胞) とライディッヒ細胞 (HSD2b 陽性細胞) のいずれの細胞においても、H3K9me1, me2 と me3 のヒストン修飾状態に変化はなかった。(図 2-19, 2-20, 2-21) さらに、JMJD1C がヒストンの H3K9 以外のリジン残基の脱メチル化に機能する可能性を考慮し、*Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスでその他のヒストンメチル化修飾に変化があるかも調べた。JMJD1C が最も強く発現する未分化精原細胞に注目して、ヒストン H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K27me1, H3K27me2, H3K27me3, H3K36me1, H3K36me2, H4K20me1, H4K20me2 および H4K20me3 についてヒストン修飾の変化があるかを検討したが、いずれの修飾においても *Jmjd1c*<sup>-/-</sup>とコントロールの間に差はなかった (図 2-22, 2-23, 2-24, 2-25)。

以上の結果をあわせて考えると、JMJD1C はヒストンのメチル化修飾に対する脱メチル化酵素活性を持たないことが強く示唆された。

### 第三章 考察

近年、ヒストンのメチル化が可逆的であることが明らかになり、ヒストンの脱メチル化を担う酵素として JmjC ドメインを触媒ドメインとしてもつ Jumonji ファミリーの存在が明らかになった。現在までに約 20 種類の Jumonji ファミリーメンバーが同定されている。しかし、その中で生理的な機能が明らかになっている分子はごく一部であり、また酵素活性の有無が不確定な分子も多い。今回の研究で、筆者はまだその機能やヒストン脱メチル化活性の有無が不明の Jumonji ファミリー分子の 1 つである JMJD1C に注目して解析を行った。

#### 3-1 JMJD1C の生体内における発現パターンとその制御

マウス成体内における JMJD1C の発現を検討した結果、ほぼ全ての臓器に分子量 260kD の short variant が発現していた。例外的に精巣には分子量 280kD の long variant も発現しており、2 種類のバリエントは生後の成長に伴いダイナミックに発現パターンが変動した。組織免疫染色による詳細な解析の結果、short variant は未分化精原細胞に強く発現する一方で、long variant はパキテン期精母細胞に弱く発現することが明らかとなった。また、ライディッヒ細胞にも short variant が非常に弱く発現していた。他の研究グループから JMJD1C は成体マウスのライディッヒ細胞にのみ強く発現するという論文が報告されている<sup>33</sup>。しかし、この論文では野生型マウスを使った実験結果しか示していない。一方、本研究では 1) *Jmjd1c*  $-/-$ マウスをネガティブコントロールに用いながら慎重に発現パターンの解析を進めたことと、2) 生殖細胞のみを欠損した  $W/W^v$ マウスの精巣において JMJD1C はほとんど発現していなかったという事実から、精巣において JMJD1C は主に生殖細胞に発現している可能性が高い。

生後 4 日の精巣において、JMJD1C の long variant はタンパク質レベルでは発現しないが、mRNA レベルでは short variant よりも高い発現量を示した。この結果から、JMJD1C

の long variant は mRNA の転写だけではなく、翻訳後のタンパク質でも発現量の制御を受けることが予想される。JMJD1C の long variant と short variant のアミノ酸配列を比較すると long variant は N 末端側に約 180 アミノ酸からなる領域を余分に保持している。この領域内に機能的なドメイン配列を見つけることはできなかったが、興味深いことに JMJD1C long variant の N 末端領域は JMJD1 ファミリー分子である JMJD1A の N 末端領域と高い相同性を有することを見いだした(図 3-1)。JMJD1A と JMJD1C の long variant が共にパキテン期精母細胞に発現することを考えると、この N 末端領域内にタンパク質をパキテン期特異的に発現させるのに必要なアミノ酸配列が含まれるのかもしれない。例えば、Jumonji ファミリー分子の 1 つ Jmjd2a/KDM4A は、細胞周期を通して mRNA の発現量は比較的一定であるが、タンパク質の発現量はユビキチン-プロテアソーム経路を介した分解によって制御を受ける<sup>47</sup>。JMJD1C long variant の N 末端アミノ酸配列の中にもポリユビキチン化サイトが存在し、パキテン期精母細胞以外の細胞ではプロテアソームによるタンパク質の分解をうけている可能性も考えられよう。

### 3-2 JMJD1C の生理的な機能

JMJD1C の生理的な機能を明らかにする目的で、*Jmjd1c* *-/-*マウスの作製と解析を行った。*Jmjd1c* *-/-*マウスは正常に出生・発育したが、興味深いことに雄は 3 ヶ月齢以降の早い時期に妊孕性を失った。*Jmjd1c* *-/-*マウスの精巣を詳細に解析した結果、加齢に伴って生殖細胞と成熟精子の数が減少しており、幹細胞を含むと考えられる未分化な生殖細胞におけるアポトーシスが増加していた。一方、ライディッヒ細胞における性ホルモンの分泌異常は観察されなかった。

精子形成に異常をきたす遺伝子欠損マウスは数多く報告されているが<sup>48</sup>、*Jmjd1c* *-/-*マウスのように加齢に伴って生殖細胞が消失する表現型の報告はごく少数である。その中で 2 つの遺伝子の欠損マウスについて *Jmjd1c* *-/-*マウスとよく似た表現型が報告されている。ひとつは *Plzf* (promyelocytic zinc-finger) 欠損マウス<sup>39,40</sup>で、もう一つが *Gdnf* (glial-cell-derived neurotrophic factor) のヘテロ欠損マウス<sup>49</sup>である (ホ

モ欠損マウスは胎生致死)。PLZF は未分化精原細胞の分化を抑制する転写リプレッサーであり<sup>50</sup>、GDNF は未分化生殖細胞の表面に発現する GDNF 受容体への結合を介して生存シグナルを入力する成長因子で、主にセルトリ細胞から分泌される<sup>51</sup>。PLZF は内因性の因子(転写抑制因子)なのに対し GDNF は外因性の因子(成長因子)なので、両者の幹細胞維持における作用メカニズムは異なる。しかしどちらの遺伝子の KO マウスも、加齢に伴って幹細胞を含む未分化な生殖細胞がアポトーシスを起こし、生殖細胞の供給が途絶えることで不妊を発症する。これら 2 つ遺伝子 KO マウスの表現型との類似性や、JMJD1C が未分化精原細胞に最も強く発現する実験結果を合わせて考えると、*Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスにおける早期の不妊発症は、未分化精原細胞のアポトーシスによって新しい生殖細胞の供給が途絶えることに起因する可能性が高いだろう。

JMJD1 ファミリーは JMJD1A, JMJD1B および JMJD1C の 3 つから構成される。*Jmjd1a* 遺伝子の欠損マウスの雄も不妊の表現型を呈することから<sup>21-23</sup>、当初 JMJD1A と JMJD1C の間の機能的な重複の可能性を考慮しながら研究を進めた。しかし、以下の 2 つの実験結果を合わせて考えると、両者の生理的な機能は異なるようである。

1) 精巣における発現の違い : JMJD1A はパキテン期精母細胞のみに発現する。一方 JMJD1C は未分化精原細胞で最も強く発現し、パキテン期精母細胞とライディッヒ細胞でも弱く発現する。

2) 欠損マウスの表現型の違い : JMJD1A を欠損すると円形精子細胞の伸長が起こらないために成熟精子が形成されない。また、加齢に伴う生殖細胞の減少は観察されない<sup>21-23</sup>。一方、JMJD1C の欠損は精子形成自体を阻害することではなく、機能的に問題のない精子を産生することが可能である。しかし未分化な生殖細胞の供給が徐々に減少するため、生殖細胞が欠失した精細管の割合が加齢とともに増大する。この表現型は *Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスに特異的なものである。

JMJD1C はほぼ全ての組織に発現するにも関わらず、異常が観察された組織は精巣の

みであった。精巣において JMJD1C が未分化精原細胞や精母細胞に発現し生理的に機能するのに対して、他の臓器（大脳、心臓、肝臓や小腸）では分化の完了した末梢の細胞に発現していることを考えると(図 2-1, B)、JMJD1C が未分化な細胞で特異的に機能するメカニズムがあるのかもしれない。

### 3-3 JMJD1C のヒストン脱メチル化活性の有無について

Jumonji ファミリー分子のなかで、JMJD1A と JMJD1B はヒストン H3K9 の me1 および me2 に対する脱メチル化活性をもつことから<sup>20,52</sup>、同じ JMJD1 ファミリー分子である JMJD1C もヒストン脱メチル化活性をもつことが予想された。最初に JMJD1C はヒストン脱メチル化活性をもつとする報告がなされたが<sup>33</sup>、その後、逆に JMJD1C は酵素活性をもたないとする複数の報告がなされたため<sup>34,35</sup>、現在まで JMJD1C のヒストン脱メチル化活性の有無は評価が定まっていなかった。そこで、筆者は 293T 細胞を用いた JMJD1C の強制発現による gain of function の系と、*Jmjd1c* -/-マウスを用いた loss of function の系の2つの実験系を用いて JMJD1C のヒストン脱メチル化活性の有無を検証した。293T 細胞を用いた実験では、JMJD1A, JMJD1B または JMJD1C の強制発現を行い、それぞれの酵素についてヒストン H3K9 に対する脱メチル化の酵素活性を検討した。その結果、JMJD1A と JMJD1B はヒストン H3K9me1 と me2 に対する脱メチル化活性をもつが、JMJD1C だけは活性をもたなかった。*Jmjd1c* -/-マウスを用いた実験では、主に JMJD1C を強く発現する PLZF 陽性細胞に注目してヒストンの各種メチル化状態に変化があるか検討したが、いずれの修飾についてもコントロールとの間に差は見られなかった。以上の結果を合わせて考えると、JMJD1C は少なくともヒストンに対する脱メチル化酵素活性をもたないようである。JMJD1A, JMJD1B と JMJD1C の JmjC ドメインのアミノ酸配列を比較すると、JMJD1A と JMJD1B の間では非常に良く保存されているのに対して、JMJD1C だけが大きく異なることが分かる(図 3-2)。脱メチル化反応に必須の Fe(2) 結合サイトと aKG 結合サイトは保存されているので脱メチル化酵素活性を持つ可能性はある。その他のアミノ酸配列の違いから、ヒストンを認識する立体構造をとらないのかもしれない。

### 3-4 JMJD1C の分子レベルでの機能について

本研究では、*Jmjd1c* 遺伝子を欠損した未分化精原細胞が加齢に伴ってアポトーシスを起こすことを明らかにしたが、その分子レベルでのメカニズム解明には至らなかった。JMJD1C のヒストン H3K9 に対する脱メチル化酵素活性が検出されないという実験結果を踏まえると、JMJD1C の分子レベルの機能について以下に示す可能性が考えられる。

- 1) JMJD1C は H3K9 に対する脱メチル化活性をもつが、「グローバルな」ヒストンではなく「特定の遺伝子領域の」ヒストンに作用する。
- 2) JMJD1C は脱メチル化活性をもつが、そのターゲット基質がヒストン以外のタンパク質である。
- 3) JMJD1C は酵素活性をもたないが、機能的なタンパク複合体の構成因子として酵素活性非依存的に働く。

1)について：ヒストン修飾に対する細胞または組織免疫染色法を用いた実験の結果を元に、JMJD1C はヒストン脱メチル化酵素活性をもたないと結論したが、これは正確には”グローバルな”ヒストン脱メチル化活性はないということを意味しており、JMJD1C が限局した遺伝子領域のみに作用する可能性は否定できない。もしかすると、JMJD1C が細胞の生存に必須な遺伝子領域のヒストンを特異的に脱メチル化することで、その遺伝子の発現を正に制御しているのかもしれない。

2)について：JMJD1C の JmjC ドメインは活性中心のアミノ酸が保存されているが、その他のアミノ酸配列はヒストンを基質とすることが明らかな JMJD1A や JMJD1B と大きく異なる。したがって、ヒストン以外のタンパク質が JMJD1C の脱メチル化のターゲット基質である可能性が考えられる。ヒストン脱メチル化酵素が、ヒストン以外のタンパク質も脱メチル化する例は既にいくつか報告されている。例えば、H3K4 または H3K9 に対するヒストン脱メチル化酵素である LSD1 は、p53 や Dnmt1 を脱メチル化する<sup>53</sup>。また、H3K36 に対する脱メチル化酵素 KDM2 ファミリーメンバーの KDM2A は NFκB を脱メチル化する<sup>54</sup>。もしかすると、JMJD1C も未分化精原細胞内の生存に関わるタンパク質を基質

とし、脱メチル化を介した機能制御に関わるのかもしれない。

3) Jumonji ファミリーのなかには、酵素活性に依存しない生理機能をもつ分子も存在する。例えば、JARID2 は脱メチル化酵素活性をもたないが<sup>55</sup>、ポリコーム抑制複合体 PRC2 との相互作用を介したヒストン H3K27 メチル化の促進により、細胞分化の運命決定に関与する<sup>56,57</sup>。JMJD1C は分子量 260-280kD の巨大なタンパク質であることから、多くの種類のタンパク質と結合することが予想される。したがって、JMJD1C が細胞の生存に機能するタンパク質複合体の一部として（例えば、複合体形成の足場タンパク質として）、酵素活性非依存的に働く可能性も考えられよう。

### 3-5 まとめと今後の展開

今回の研究により、JMJD1C は未分化精原細胞の維持に必須であり、その欠損は早期の不妊発症につながるということが明らかになった（**図 3-3**）。しかし、JMJD1C がどのような分子メカニズムで細胞の生存に寄与しているのかは不明であり、その仕組みの解明が今後の課題であろう。具体的の実験としては、①JMJD1C 抗体を用いた ChIP-Sequence 法により、JMJD1C のゲノム上の局在を同定する。②*Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスの未分化精原細胞において発現の変化する遺伝子を、RNA-Sequence 法または Microarray 法により網羅的に探索する。③JMJD1C と結合するタンパク質を質量分析法などにより探索するなどの方法によって解明が進むことが期待される。

野生型のマウスは生後 12-24 ヶ月の間で徐々に精子幹細胞の自己増殖能が低下し、妊孕性を失う<sup>58</sup>。加齢に伴う精子幹細胞の減少や機能低下は、生殖幹細胞における DNA 損傷の蓄積、セルトリ細胞が形成する幹細胞ニッチの機能低下（増殖因子の供給低下や、ニッチ内の ROS の増加など）、あるいはライディッヒ細胞の男性ホルモン分泌能の低下など、内因性と外因性の影響が複雑に組み合わさった結果であると想定される。しかし現在のところ、加齢が精子幹細胞の機能低下に与える影響の実体やメカニズムはよく分かっていない。*Jmjd1c*<sup>-/-</sup>マウスは加齢に伴う早期の不妊発症という興味深い表現型を呈することから、このマウスの解析の進展が、加齢が生殖機能に与える影響の分子メカ

ニズム解明の糸口になることが期待される。

## 第四章 実験手法

### 抗体

マウス抗 JMJD1C モノクローナル抗体は、マウス JMJD1C (UniProt accession no. Q69Zk6) の 245-453 番目アミノ酸に相当するリコンビナントタンパク質を抗原に用いて作製した (スクラム(株))。ラビット抗 JMJD1A ポリクローナル抗体は以前に当研究室で作製した<sup>59</sup>。ウェスタンブロッティングおよび組織免疫染色に使用したその他の抗体は以下の通りである。マウス抗 Flag 抗体 (Sigma)、ラビット抗 Calmegin 抗体<sup>42</sup>、マウス抗 Tublin 抗体 (Oncogene)、ラビット抗 DDX4 抗体 (Abcam)、マウス抗 PLZF 抗体 (Santa Cruz)、ラビット抗 H3S10ph 抗体 (Millipore)、ラビット抗  $\gamma$ H2AX 抗体 (Cell Signaling)、Tra98 抗体 (Bio Academia)。各種のマウス抗ヒストン修飾抗体、抗 H3K9me1 (clone 2F7a)、抗 H3K9me2 (clone 6D11)、抗 H3K9me3 (clone 2F3)、抗 H3K4me1、抗 H3K4me2、抗 H3K4me3、抗 H3K27me1、抗 H3K27me2、抗 H3K27me3、抗 H3K6me1、抗 H3K36me2、抗 H4K20me1、抗 H4K20me2 と抗 H4K20me3 は全て木村宏博士から供与を受けた<sup>60</sup>。

### ウェスタンブロッティング

laemmli らの方法により SDS-PAGE を行った後に、タンク式ブロッティング装置 (Bio-Rad) を用いて PVDF メンブレンに 15V, 1 時間ブロッティングを行った。メンブレンを 5%スキムミルク/TBS-T により室温、1 時間ブロッキングを行った後、1 次抗体をブロッキング溶液に希釈し、1 次抗体反応を 4°C で一晩振盪しながら行った。TBS-T により 10 分間 3 回の洗浄を行った後、HRP 標識 2 次抗体をブロッキング溶液に希釈し、2 次抗体反応を室温で 1 時間行った。TBS-T により 10 分間 3 回の洗浄を行った後、ECL Plus Enhanced Luminol Reagent Plus (GE ヘルスケア) を用いた化学発光を、Las-4000mini (富士フイルム) により検出した。

### 組織学的解析

摘出した各組織をブアン固定液により 4°Cで一晩固定した。70%→90%→100%(×3回)のエタノール系列で組織を脱水し、ヒストクリアー(National Diagnostics)(×3回)とパラフィン(×3回)の順に浸透した後に、パラフィンに包埋した。マイクロトームを用いて 4μm の組織切片を作製し、ヘマトキシリン&エオシンまたは PAS-ヘマトキシリンにより染色した。観察と画像の取得は、オリンパス BX53 正立型顕微鏡とオリンパス DP26 デジタルカメラを用いて行った。

### 免疫組織化学的解析

摘出した精巣を 4%パラホルムアルデヒド/PBS により 4°Cで一晩固定した。30%→50%→70%→90%→100%(×3回)のエタノール系列で組織を脱水し、ヒストクリアー(National Diagnostics)(×3回)とパラフィン(×3回)の順に浸透した後に、パラフィンに包埋した。マイクロトームを用いて 4μm の組織切片を作製した。切片をヒストクリアー(×3回)→100%EtOH(×2回)→90%EtOH→70%EtOH により脱パラフィンした後、10mM クエン酸ナトリウム溶液(pH6.0)中で 105°C, 5 分間の賦活化処理を行った。2%スキムミルク/TBS で室温、30 分間のブロッキングを行った後、各 1 次抗体にて 4°C、一晩反応させた。TBS-Tween20(0.1%)により 3 回洗浄を行った後、Alexa 標識した各 2 次抗体と DAPI(10μg/ml)により室温、30 分間の染色を行った。TBS-T により 3 回洗浄を行った後、VECTASHIELD (Vector)を用いて封入した。切片の観察を画像の取得は、カールツァイス LSM700 共焦点顕微鏡を用いて行った。蛍光強度の定量は ImageJ ソフトウェアを用いた。DAB 染色においては、HRP 標識 2 次抗体による染色と、Peroxidase substrate kit (Vector)による発色を行った。

### 定量的 RT-PCR

RNeasy Kit (Qiagen)を用いて精巣から Total RNA を抽出した後、Superscript III (Invitrogen)を用いて first-strand cDNA を合成した。SYBR Premix Ex Taq (Takara)を用いて定量的 RT-PCR を行い、Step One Plus リアルタイム PCR システム (アプライ

ドバイオシステム)により検出した。定量的 PCR に用いた Primer は以下の通りである。

*Jmjd1c* の long variant と Short variant の両方を検出する Primers

2C-EX26F-2 : TATGGGGTGAGAGCCTGCACTCTGA

2C- EX26R : GTACCTGGTGAAGTGTTCCTGCTGGC

*Jmjd1c* の long variant のみを検出する Primers

2C-EX2-F : CGTGGAATTTGATGACCTTG

2C-EX2-R : TCCTTTTGGCCCAGATTAAG

*Jmjd1c* の Short variant のみを検出する Primers

2C-EX1B-F : GCTTCAGCTGCAGGATTTCT

2C- EX1B-R : CAAGACCACAGAACGAAGCA

*Gapdh* を検出する Primers

Gapdh RT-PCR-F : CATCTTCTTGTGCAGTGCCA

Gapdh RT-PCR-R : CGTTGATGGCAACAATCTCC

#### TUNEL 染色

4%パラホルムアルデヒド/PBS で固定した精巢のパラフィン切片を、in situ cell death detection kit (Roche)を用いて TUNEL 染色を行った。対比染色として DAPI により核を染色した。

#### 血中ホルモン測定

血清中のテストステロンとアンドロステンジオンの濃度を液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて測定した (あすか製薬メディカルにて測定)

#### 発現プラスミド

N 末端に Flag タグを融合した JMJD1A, JMJD1B または JMJD1C の発現ベクターは、

pCAG-FLAG-IRES-Puro ベクターへサブクローニングした。

### *Jmjd1c* 遺伝子欠損マウスの作製

*Jmjd1c* targeting vector は JmjC ドメインをコードする Exon24-27 を置換し欠損するようにデザインした(図 2-8)。C57/BL6 BAC ライブラリーRPCI-23 のクローン 469P19 を鋳型として、PCR により 5' 末端の 5.9kb ホモロジーアームと 3' 末端の 1.5kb ホモロジーアームを増幅した。そして、両フラグメントの間に IRES-ネオマイシン耐性遺伝子配列を含むカセットを挿入した。このベクターをリニアライズし、TT2 ES 細胞 (1×10<sup>7</sup>個に)に 10μg をトランスフェクションした後、G418(0.2mg/ml)によりセレクションした。得られたコロニーをピックアップし、サザンブロッティングにより相同組換えを確認した後 (10/64 個)、この細胞をマウス桑実胚に移植した。得られたキメラマウス (ライン#51 と 53) を C57BL/6 系統の雌と掛け合わせ、*Jmjd1c* 遺伝子欠損ヘテロマウスを得た。このマウスを引き続き C57BL/6 系統に戻し交配を行い、F3 世代のヘテロマウス同士の交配によって、*Jmjd1c* 遺伝子欠損ホモマウスを作製し解析に用いた。マウスのジェノタイピングは以下のプライマーを用いて PCR により行った。

*Jmjd1c* 野生型アレル ( PCR 産物: 670bp)

2C-144121-F : AGTCCCCGCACT CAGGAGGCTGCTG

2C-144790-R : ATATACTATGATACAGGAACAGC

*Jmjd1c* Mutant アレル ( PCR 産物: 500bp)

IN-60F : CGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGGGG

2C-144790-R : ATATACTATGATACAGGAACAGC

全ての実験動物は、京都大学の倫理ガイドラインに基づき、適切に取り扱われた。

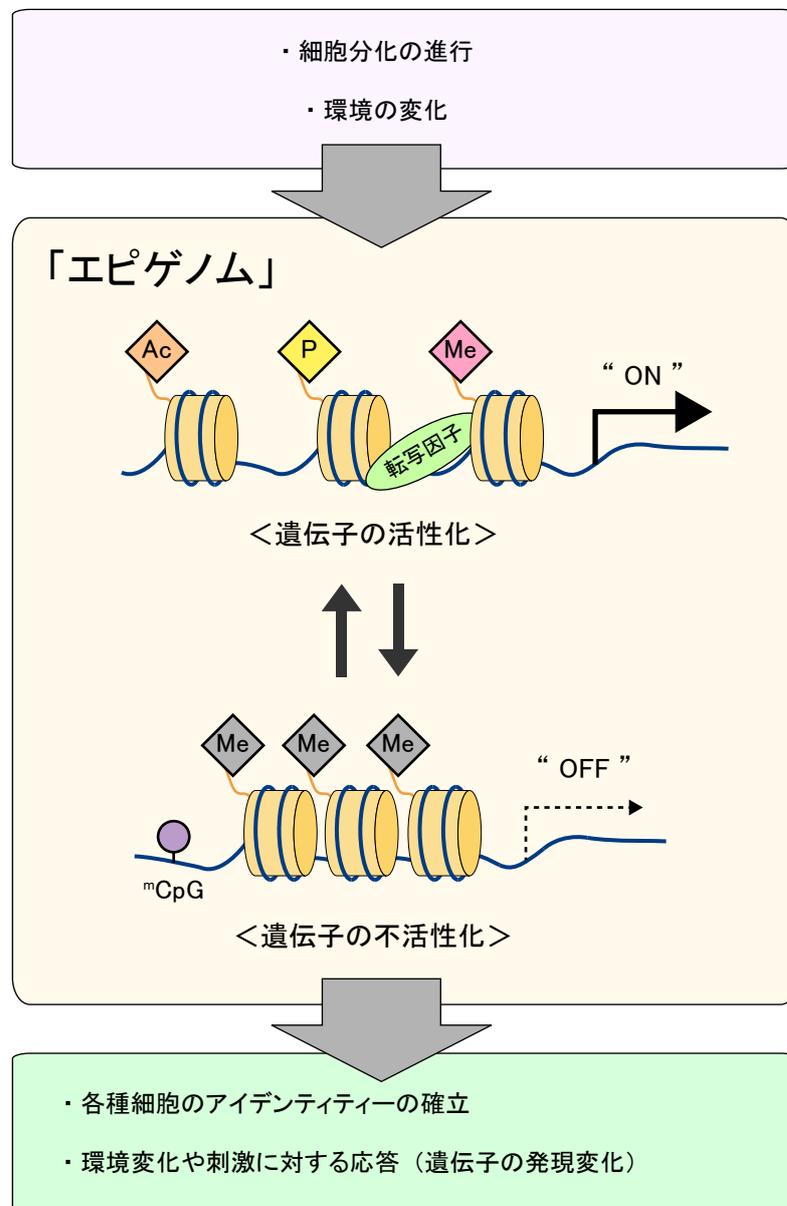
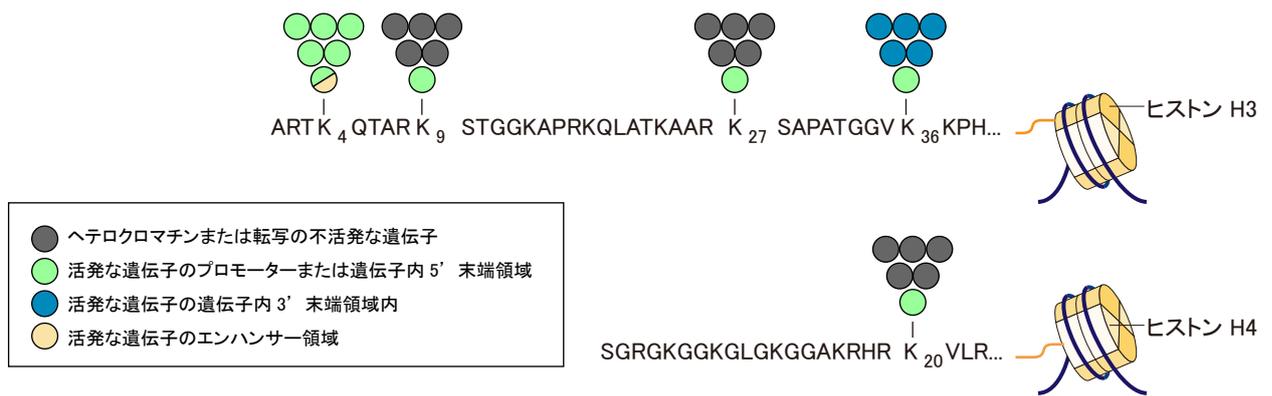


図 1-1 エピゲノムによる遺伝子発現パターンの制御 (概念図)

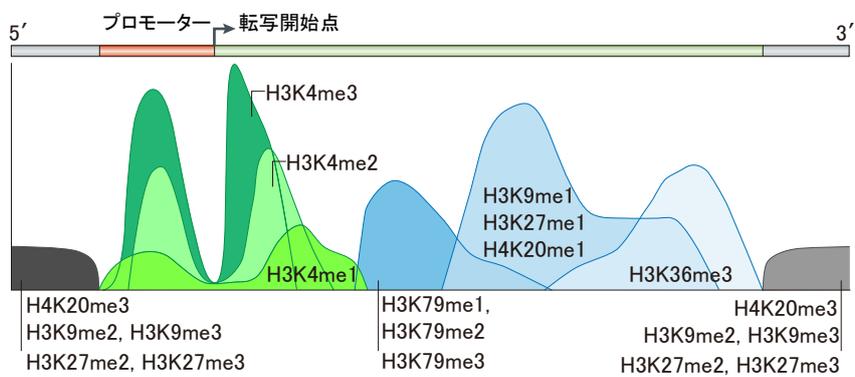
DNA のメチル化やヒストンのリン酸化・アセチル化・ユビキチン化・メチル化などの後天的に施される化学修飾（エピゲノム情報）により遺伝子の発現が制御される。

## A ヒストンリジン残基のメチル化

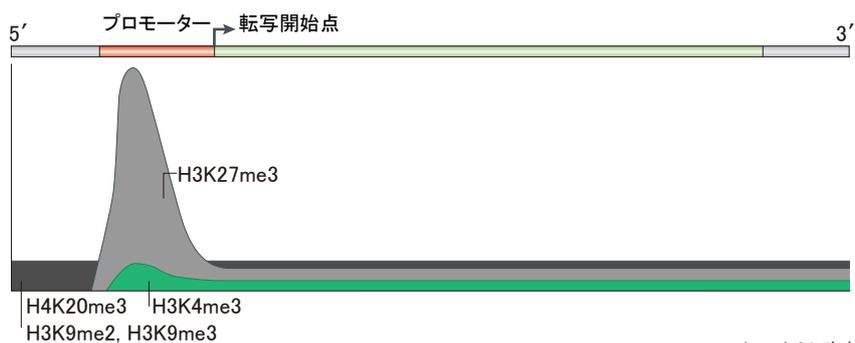


## B 各種メチル化ヒストンの遺伝子上の局在

### <活性化した遺伝子>



### <抑制された遺伝子>



Marije S, et al: Nat Rev Mol Cell Biol (2012) より改変

図 1-2 ヒストンリジン残基のメチル化修飾

(A) ヒストン H3 または H4 のヒストンテールにおけるリジン残基のメチル化修飾を示す。丸の数はメチル基修飾の数を示し、色は各種メチル化修飾が位置する遺伝子の活性化状態を示す。

(B) 各種リジンメチル化修飾の遺伝子上における典型的な局在パターンを示す。

Marije S, et al: Nat Rev Mol Cell Biol (2012)より改変した

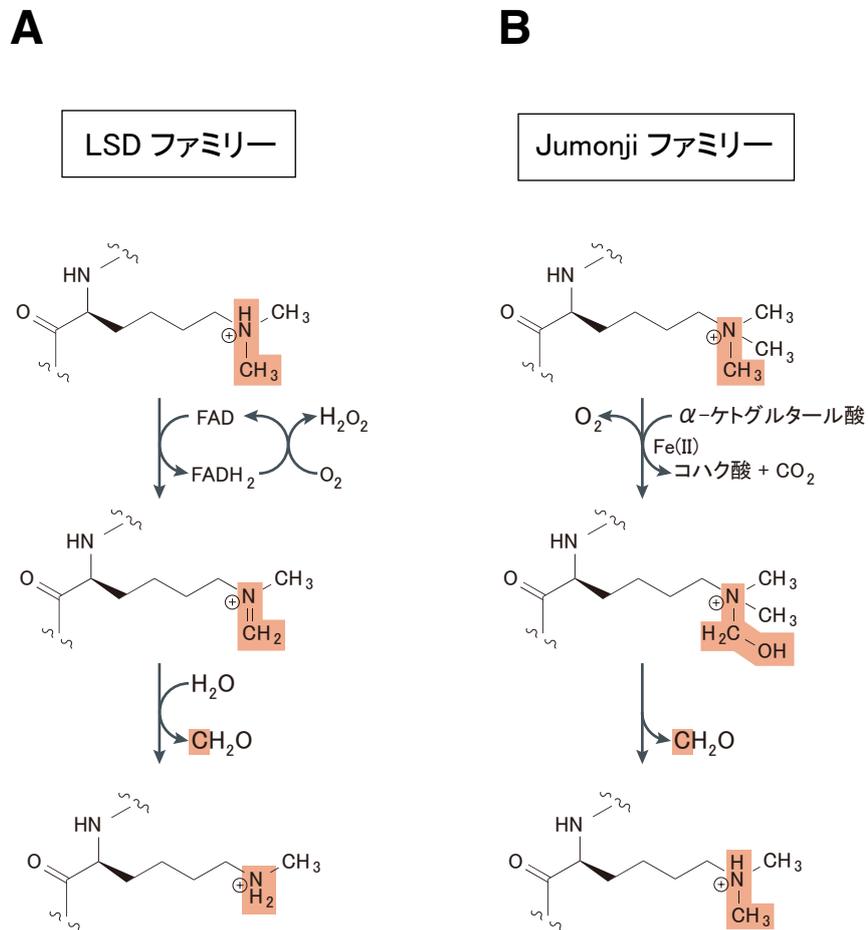


図 1-3 ヒストン脱メチル化酵素による触媒反応メカニズム

(A) LSD ファミリーによる脱メチル化反応。FAD(Flavin adenine dinucleotide)を補因子とするアミノ基の酸化反応を介して進行する。

(B) Jumonji ファミリーによる脱メチル化反応。Fe(II)とα-ケトグルタル酸を補因子とするメチル基の水酸化反応を介して進行する。

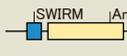
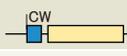
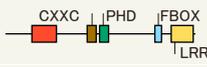
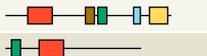
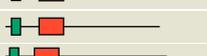
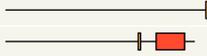
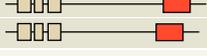
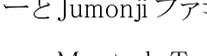
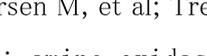
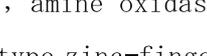
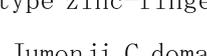
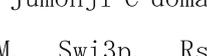
名前	別名	タンパク質構造	基質(ヒストン)
<b>&lt; LSD 脱メチル化酵素ファミリー &gt;</b>			
LSD1	AOF2, BHC110, KDM1A		H3K4me1, H3K4me2, H3K9me1, H3K9me2
LSD2	AOF1, KDM1B		H3K4me1, H3K4me2
<b>&lt; Jumonji 脱メチル化酵素ファミリー &gt;</b>			
JMJD7			
HIF1AN			
HSPBAP1			
JMJD5	KDM8		H3K36me2
JMJD4			
JMJD6	PSR, PTDSR		H3R2, H4R3
JMJD8			
FBXL10	JHDM1B, KDM2B		H3K36me1, H3K36me2, H3K4me3
FBXL11	JHDM1A, KDM2A		H3K36me1, H3K36me2
KIAA1718	JHDM1D		H3K9me1, H3K9me2, H3K27me1, H3K27me2
PHF8	JHDM1F		H3K9me1, H3K9me2, H4K20me1
PHF2	JHDM1E		H3K9me2
HR			
JMJD1B	JHDM2B, KDM3B		
JMJD1A	JHDM2A, KDM3A, TSGA		H3K9me1, H3K9me2
JMJD1C	TRIP8		
JMJD3	KDM6B		H3K27me2, H3K27me3
UTX	KDM6A		H3K27me2, H3K27me3
UTY			
JMJD2A	JHDM3A, KDM4A		H1.4K26me2, H1.4K26me3
JMJD2C	JHDM3C, GASC1, KDM4C		H1.4K26me2, H1.4K26me3
JMJD2B	JHDM3B, KDM4B		H1.4K26me2, H1.4K26me3
JMJD2D	JHDM3D, KDM4D		H1.4K26me2, H1.4K26me3
JARID1B	PLU1, KDM5B		H3K4me2, H3K4me3
JARID1C	SMCX, KDM5C		H3K4me2, H3K4me3
JARID1D	SMCY, KDM5D		H3K4me2, H3K4me3
JARID1A	RBP2, KDM5A		H3K4me2, H3K4me3
JARID2			
MINA			
NO66			H3K4me2, H3K4me3, H3K36me2, H3K36me3

図 1-4 ヒストン脱メチル化酵素ファミリー

現在までに同定されている LSD ファミリーと Jumonji ファミリーの分子を示す。Jumonji ファミリー分子の系統樹を表の左に示した (Pedersen M, et al; Trends Cell Biol, 2010 より改変)。

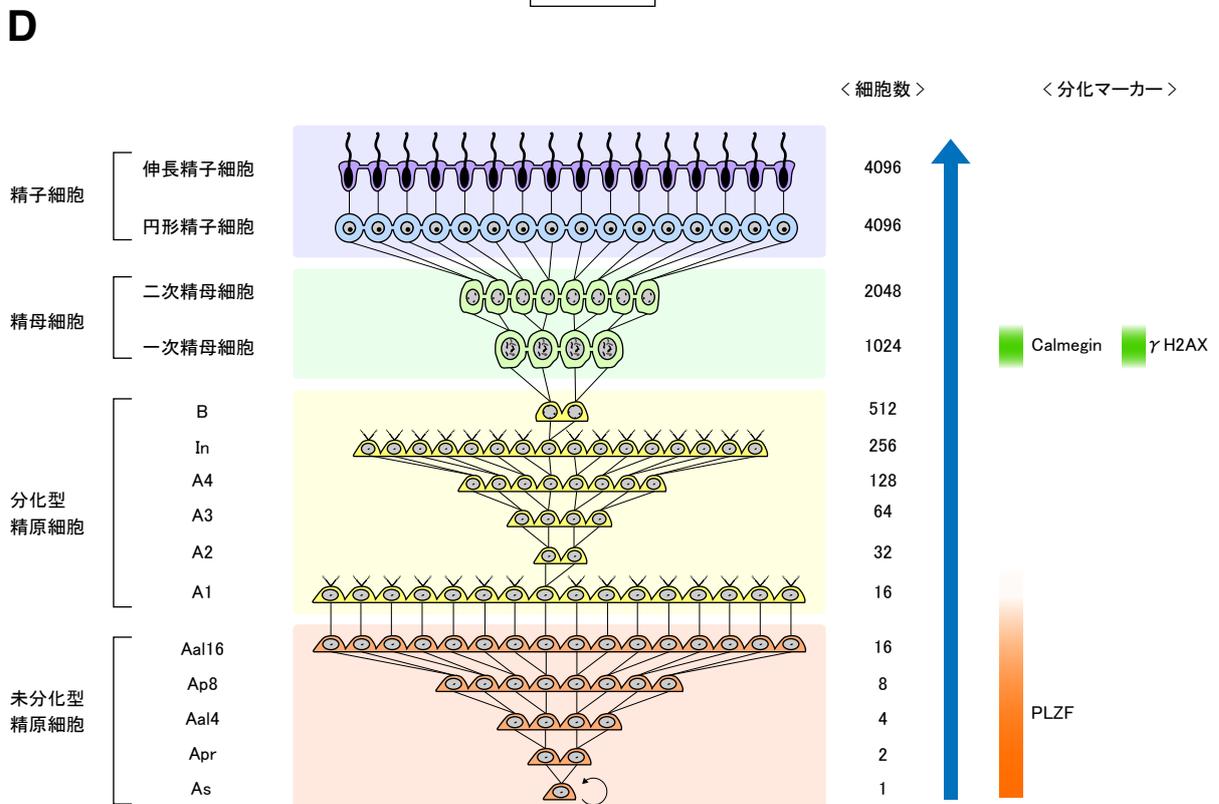
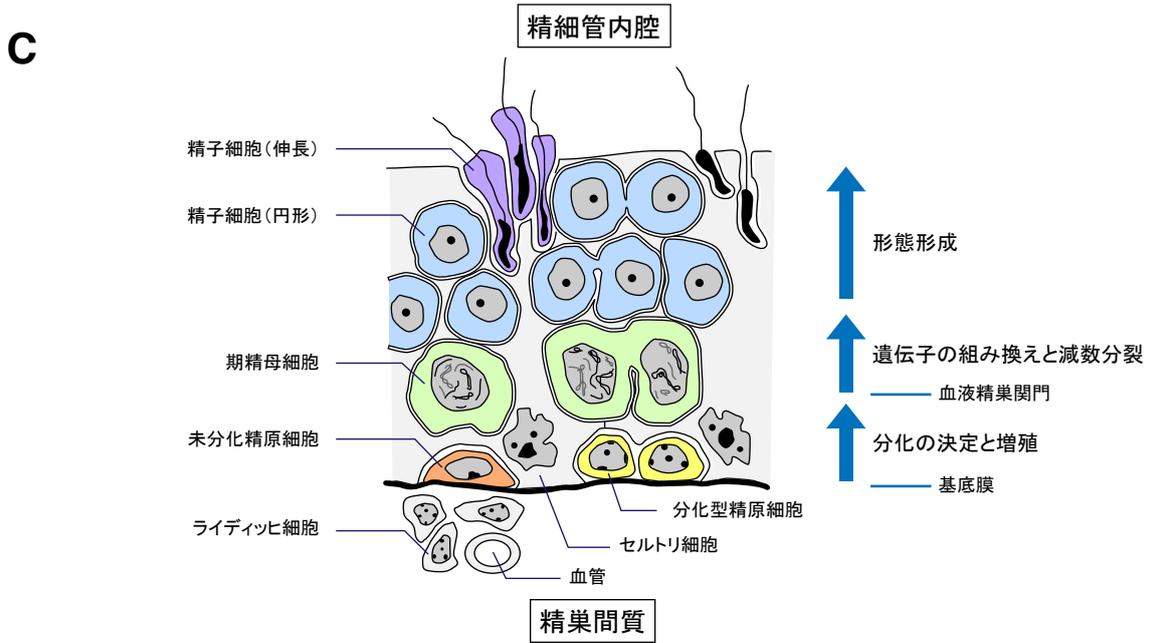
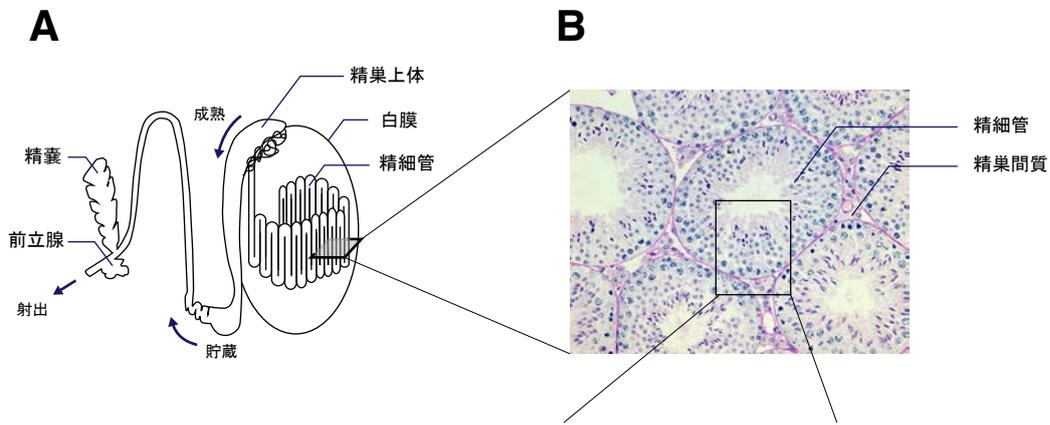
ARID, AT-rich interacting domain; amine oxidase, amine oxidase domain; C5HC2, C5HC2 zinc-finger domain; CW, CW-type zinc-finger domain; CXXC, CXXC zinc-finger domain; FBOX, F-box domain; JMJC, Jumonji C domain; LRR, Leu-rich repeat domain; PHD, plant homeodomain; SWIRM, Swi3p, Rsc8p and Moira domain; TPR, tetratricopeptide domain; TUDOR, Tudor domain;

< JMJD1 ファミリー >

名前	タンパク質構造	ノックアウトマウスの表現型	ヒト疾患との関連
JMJD1A		<ul style="list-style-type: none"> <li>・雄の性分化疾患</li> <li>・雄の不妊</li> <li>・加齢に伴う肥満の発症</li> </ul>	結腸直腸癌 <sup>26</sup> 、 前立腺癌 <sup>27</sup> 、 腎細胞癌 <sup>28</sup> 、 肝細胞癌 <sup>29</sup> において高発現
JMJD1B		N.D.	5q- 症候群の原因候補 <sup>30</sup>
JMJD1C		N.D.	自閉症との関連 <sup>36</sup>

図 1-5 JMJD1 ファミリー

JMJD1 ファミリー分子のタンパク質構造、遺伝子欠損マウスの表現型と、ヒト疾患との関連を示唆する報告を示した。



#### 図 1-6 精巣の構造と精子形成

- (A) 精巣の構造。精細管が幾重にも折り重なった状態で、精巣に詰め込まれている。
- (B) 精巣切片の PAS-ヘマトキシリン染色像。精細管の断面がみられる。
- (C) 精細管の構造。精細管の基底膜に接して精原細胞が、その内側に精母細胞、さらに内腔側に精子細胞がみられる。生殖細胞は全ての分化段階でセルトリ細胞の支持を受ける。
- (D) マウスの精子形成過程。1 つの未分化な精原細胞 (As) から、体細胞分裂と減数分裂を経て多数の精子が産生される。図の右に 1 個の As 細胞から産生される各分化段階の生殖細胞の数を示す。また、本研究で用いた分化マーカーの発現時期を示した。

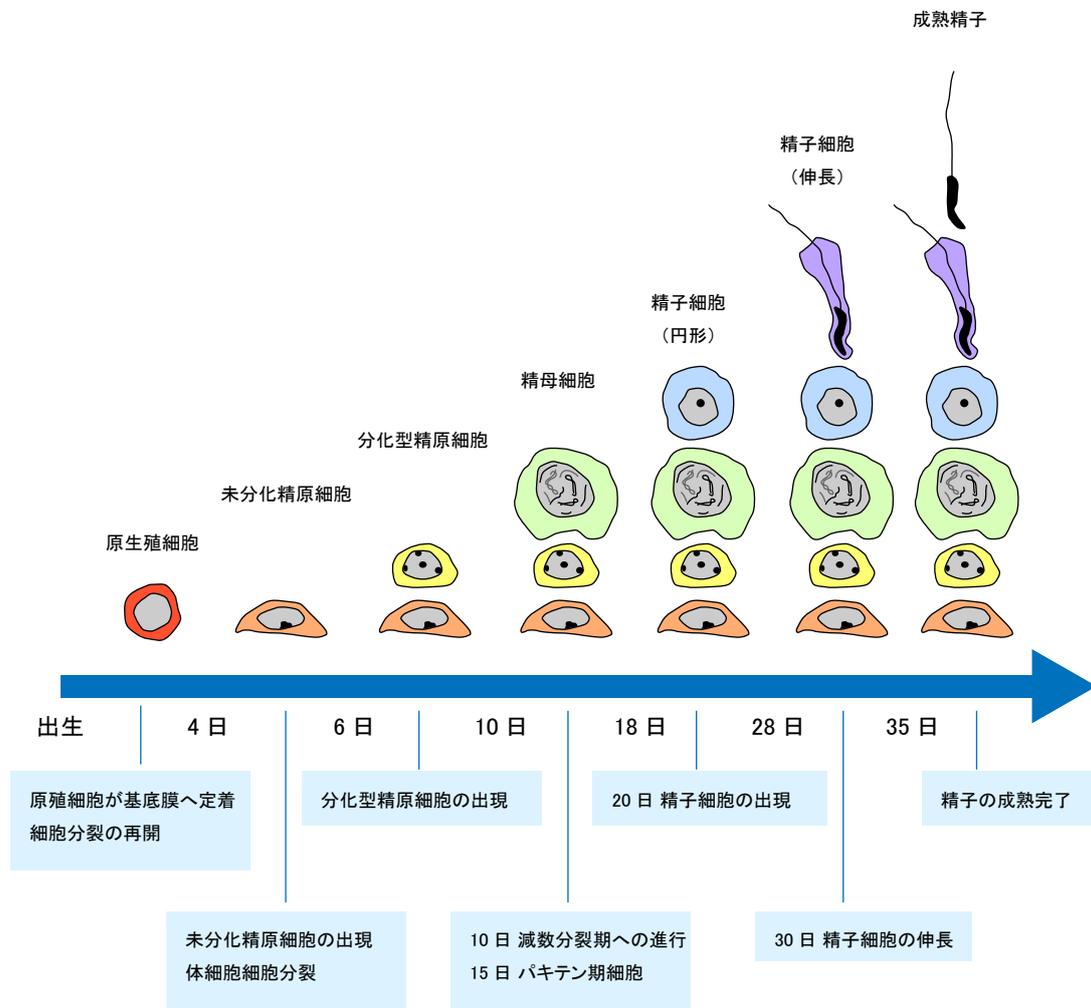


図 1-7 マウスにおける出生後の生殖細胞分化のスケジュール

胎児期に精細管内腔に存在した始原生殖細胞は、出生ののち基底膜に遊走・定着し未分化精原細胞となる。精原細胞は基底膜で増殖した後に、精母細胞へと分化し減数分裂を行う。減数分裂を経て産生された精子細胞は、形態を変化させながら精子へと成熟する。

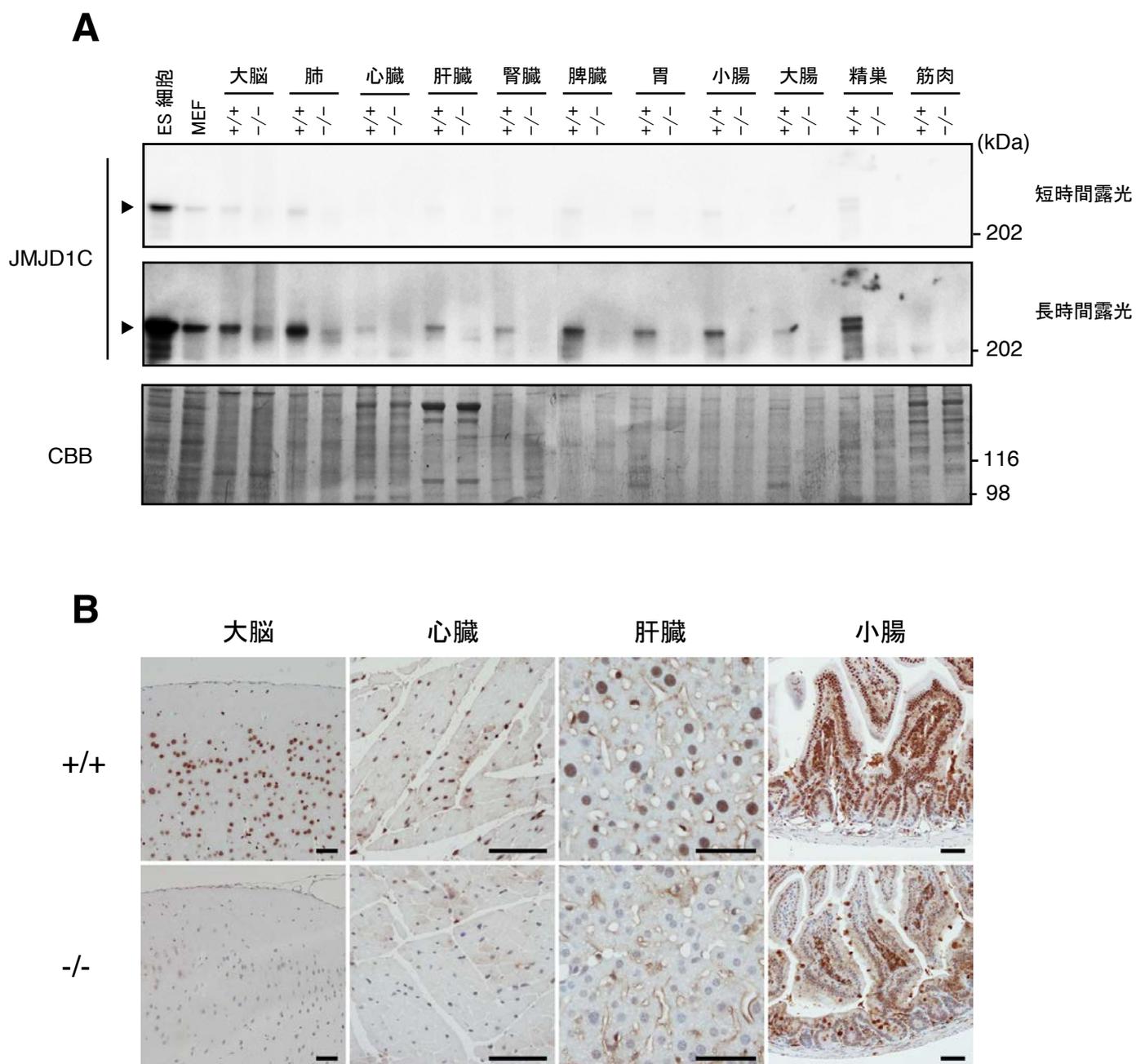


図 2-1 マウス成体における JMJD1C の発現パターン

(A) ES 細胞, MEFs と 2 ヶ月齢の *Jmjd1c* +/- または -/- マウスの各組織における JMJD1C の発現をウェスタンブロッティングにより検出した。短時間露光と長時間露光の 2 枚のプロットを表示した。ローディングコントロールとしてプロット膜の CBB 染色像を示す。

(B) 2 ヶ月齢の *Jmjd1c* +/- または -/- マウスの大脳、心臓、肝臓または小腸における JMJD1C の発現を組織免疫染色により検出した。JMJD1C (茶) を DAB 染色により可視化し、ヘマトキシリン (青) によって核を染色した。スケールバーは 100 $\mu$ m。

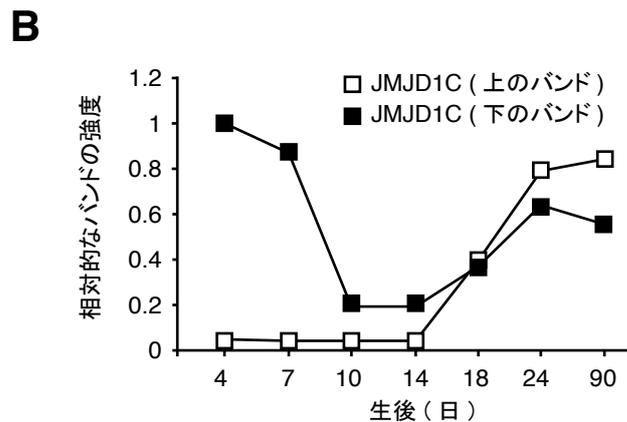
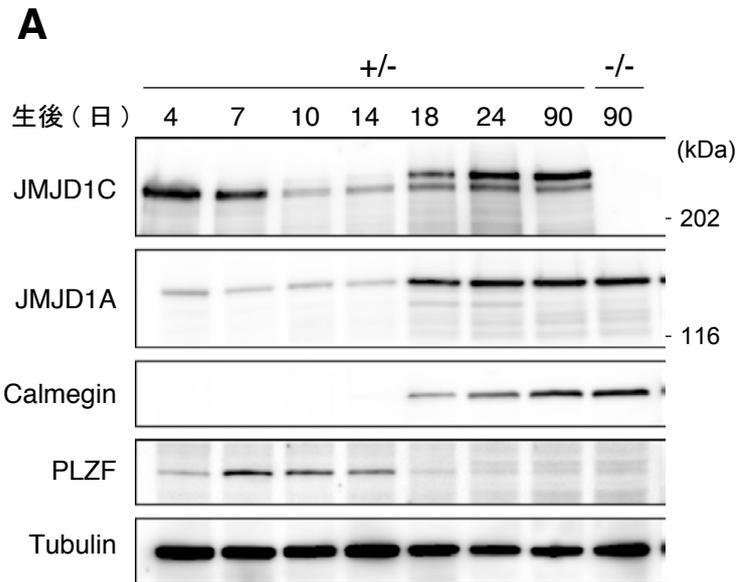


図 2-2 精巣における JMJD1C の発現パターン

(A) 生後 4 日から 90 日までのマウス精巣における JMJD1C と JMJD1A の発現量をウェスタンブロットニングにより調べた。PLZF と Calmegin は、それぞれ未分化精原細胞とパキテン期精母細胞のマーカーである。ローディングコントロールとして Tubulin の発現量を示した。*Jmjd1c* の遺伝子型をプロットの上に表示した。

(B) (A)において検出された JMJD1C の上下 2 本のバンド強度を Image J ソフトウェアを用いて定量化した。Tubulin のバンド強度によりノーマライズした後、生後 4 日における JMJD1C の下のバンドの値を相対的に 1 とした。

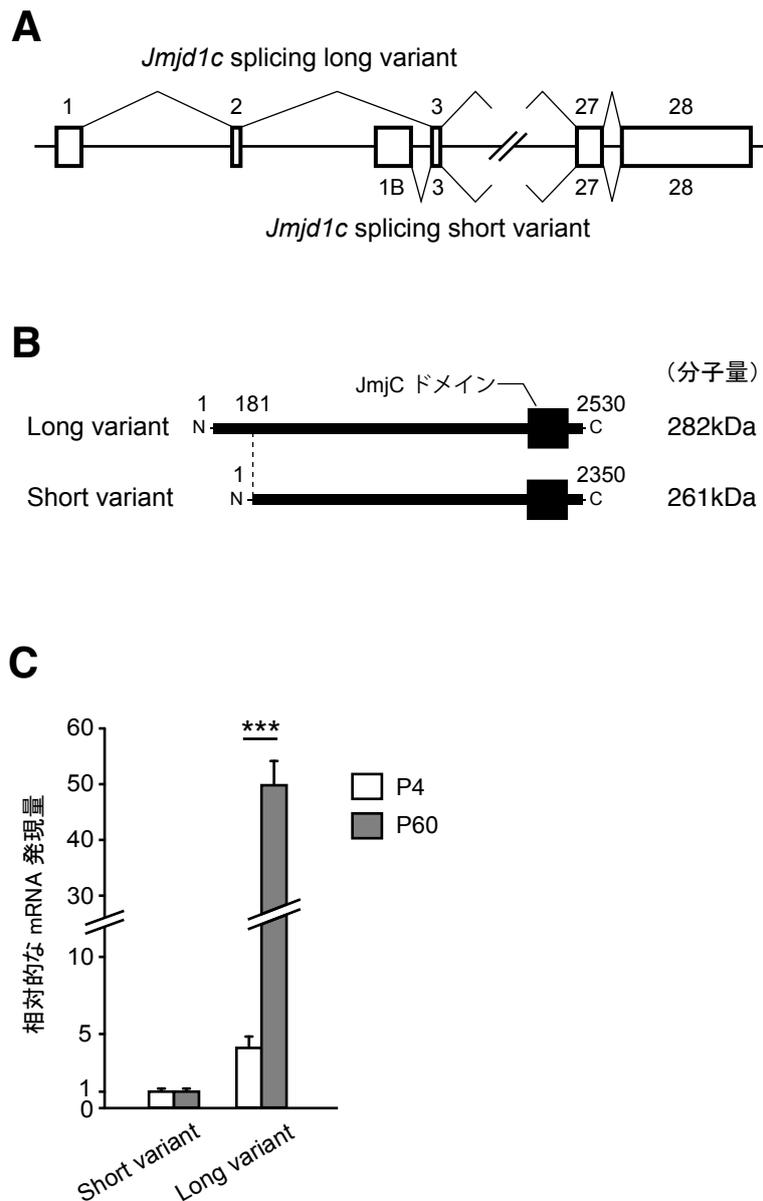


図 2-3 Alternative exon に由来する *Jmjd1c* バリエントのゲノム構造

(A) *Jmjd1c* の long variant (NM\_207221) と short variant (NM\_001242396) のゲノム構造。四角と線がそれぞれエクソンとイントロンを示す。

(B) 各 *Jmjd1c* variant mRNA から翻訳されるタンパク質の構造を示す。上が long variant 由来のタンパク質 (NP\_997104) を示し、下が short variant 由来のタンパク質 (NP\_001229325) を示す。各タンパク質から予想される分子量を図の横に表記した。

(C) 生後 4 日と 60 日の精巣における *Jmjd1c* mRNA バリエントの発現量を、qRT-PCR により定量した。全量の *Jmjd1c* 発現量によりノーマライズした後、生後 4 日の精巣における発現量を相対的に 1 とした。\*\*\* : P 値 < 0.001 (Student t-test)

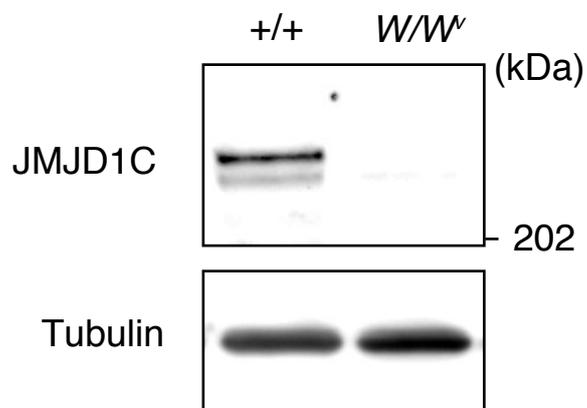


図 2-4 W/W<sub>v</sub> マウスの精巣における JMJD1C の発現

2 ヶ月齢の野生型または W/W<sub>v</sub> マウスの精巣における JMJD1C の発現をウェスタンブロットティングにより検出した。ローディングコントロールとして Tubulin の発現量を示した。

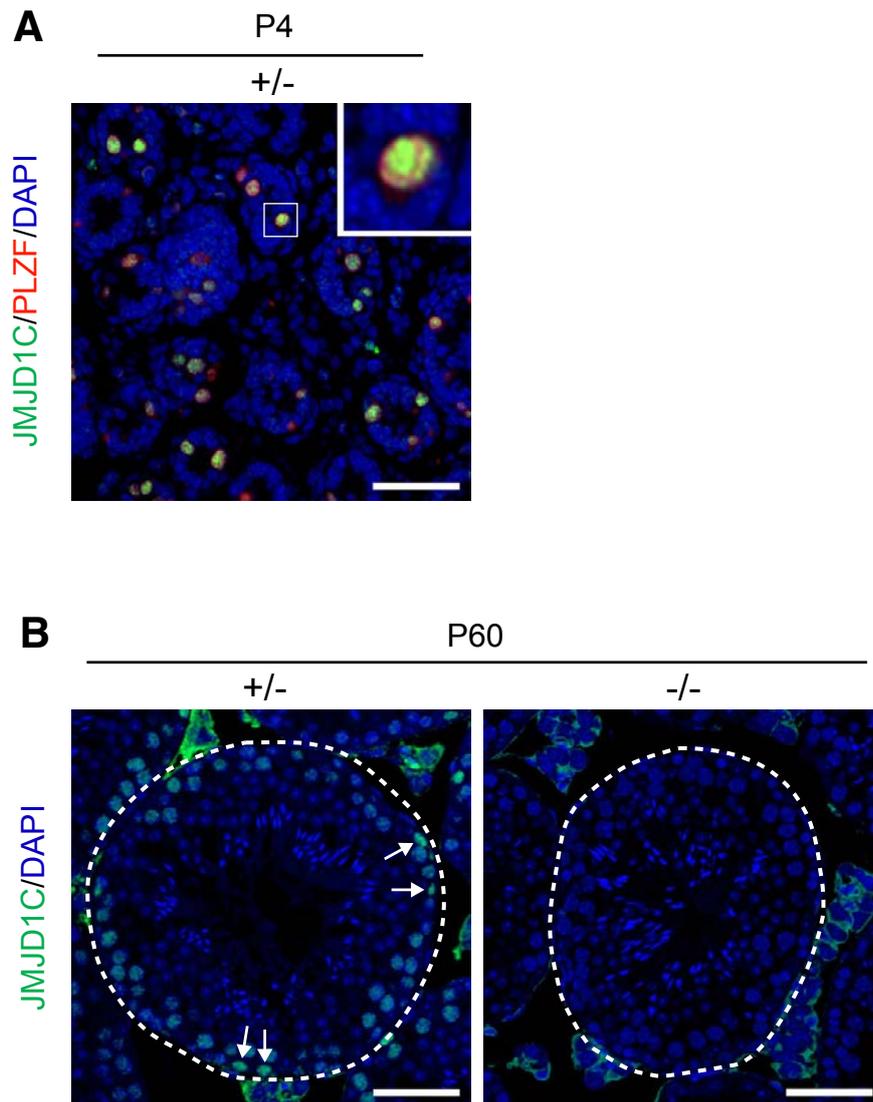


図 2-5 マウス精巣切片における JMJD1C の発現

(A) 生後 4 日のマウス精巣の切片を用いて、JMJD1C (緑)と PLZF (赤)に対する 2 重組織免疫染色を行った。DAPI (青)により核を染色した。ボックス内の拡大像を右上に示す。

スケールバーは 50 $\mu$ m.

(B) 生後 60 日のマウスの精巣切片を用いて、JMJD1C (緑)に対する組織免疫染色を行った。

DAPI (後)により核を染色した。*Jmjd1c* の遺伝子型は図中に表記した。矢印は基底膜に位置する生殖細胞を示す。スケールバーは 20 $\mu$ m.

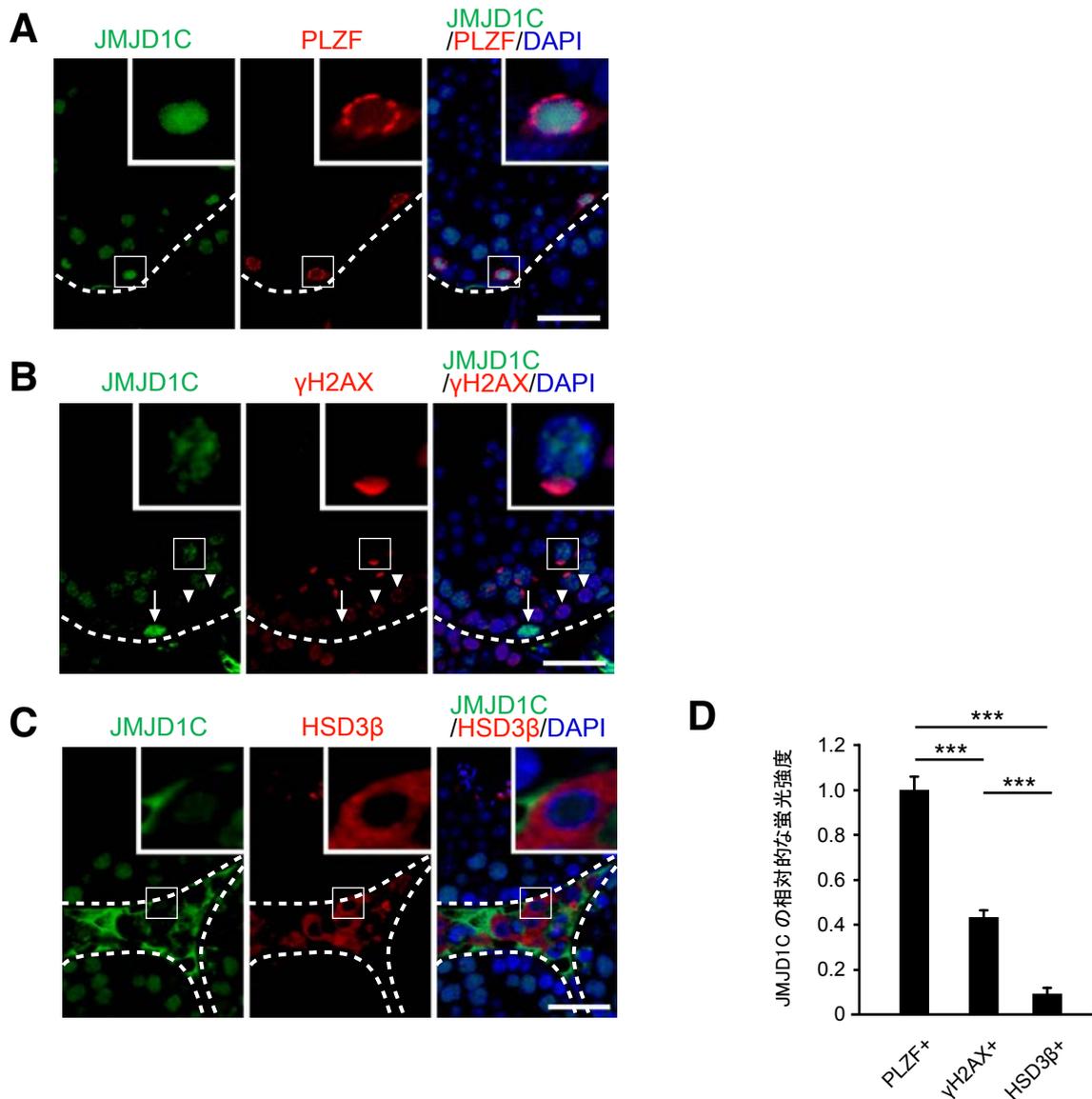


図 2-6 各分化段階の生殖細胞とライディッヒ細胞における JMJD1C の発現

(A-C) 生後 60 日のマウス精巣の切片を用いて、JMJD1C(緑)/PLZF(赤) (A), JMJD1C (緑)/ $\gamma$ H2AX (赤) (B)または JMJD1C (緑)/HSD3 $\beta$  (赤) (C)の組み合わせで 2 重免疫染色を行った。DAPI (青)により核を染色した。右上にボックス内の拡大像を表示した。破線、矢印と矢頭は、それぞれ基底膜、未分化精原細胞とパキテン期精母細胞を示す。スケールバーは 20 $\mu$ m.

(D) (A-C)で観察された JMJD1C の相対的な蛍光シグナル強度を Image J ソフトウェアを用いて定量した。PLZF<sup>+</sup>,  $\gamma$ H2AX<sup>+</sup> または HSD3 $\beta$ <sup>+</sup> 陽性細胞について各 50 個以上の細胞を計測した後、PLZF<sup>+</sup> 陽性細胞におけるシグナル強度の平均値を相対的に 1 とした。\*\*\* : P 値 < 0.001 (Student t-test)

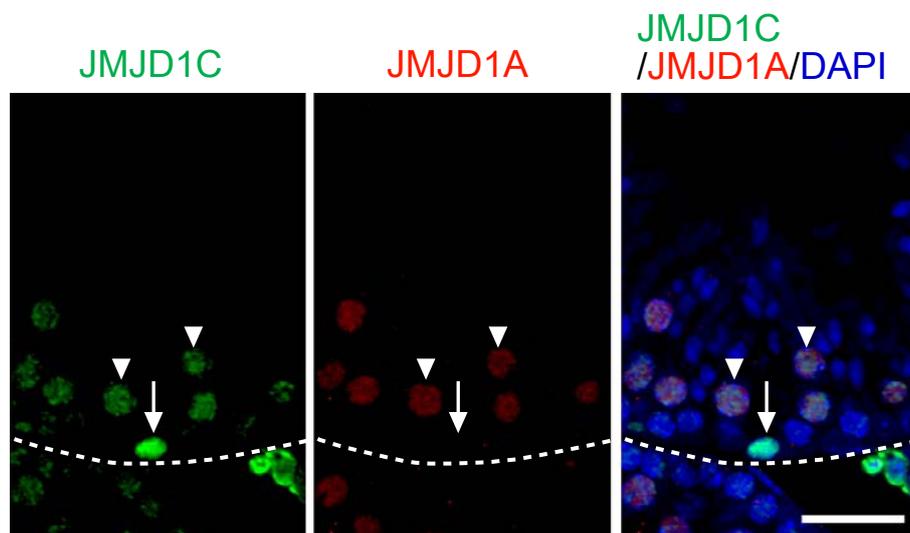


図 2-7 精巣における JMJD1C と JMJD1A の発現パターンの比較

生後 60 日のマウス精巣の切片を用いて、JMJD1C(緑)と JMJD1A(赤)に対する 2 重免疫染色を行った。DAPI (青)により核を染色した。矢印と矢頭は、それぞれ未分化精原細胞とパキテン期精母細胞を示す。スケールバーは 20 $\mu$ m.

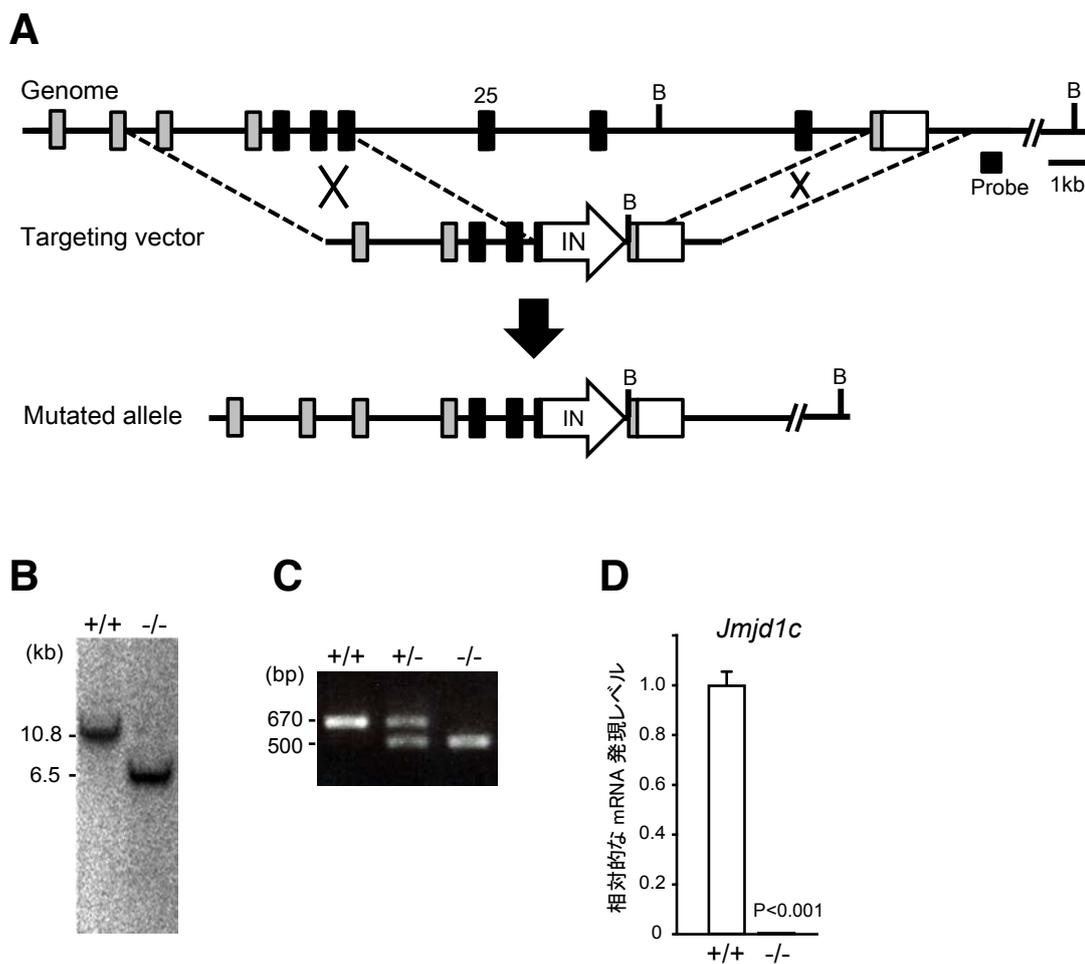


図 2-8 *Jmjd1c*  $-/-$ マウスの作製

- (A) *Jmjd1c* に対する標的遺伝子組換えの模式図。タンパク質をコードする Exon24-27 を IRES-neo カセットにより置き換えた。タンパク質をコードする領域を灰色のボックスで示した。黒色は JmjC ドメインをコードする DNA 配列を示す。B: BamH I
- (B) *Jmjd1c*  $+/+$  と *Jmjd1c*  $-/-$  ES 細胞のサザンブロット解析。BamH I により消化したゲノムを泳動分離とメンブレンブロットした後、(A)の図中に示したプローブにより検出した。
- (C) *Jmjd1c*  $+/+$ , *Jmjd1c*  $+/-$  と *Jmjd1c*  $-/-$  マウスのゲノム PCR によるジェノタイプング
- (D) *Jmjd1c*  $+/+$  または *Jmjd1c*  $-/-$  マウスの精巣における *Jmjd1c* mRNA を qRT-PCR により定量した。Gapdh によりノーマライズした後、*Jmjd1c*  $+/+$  における発現量を 1 とした。

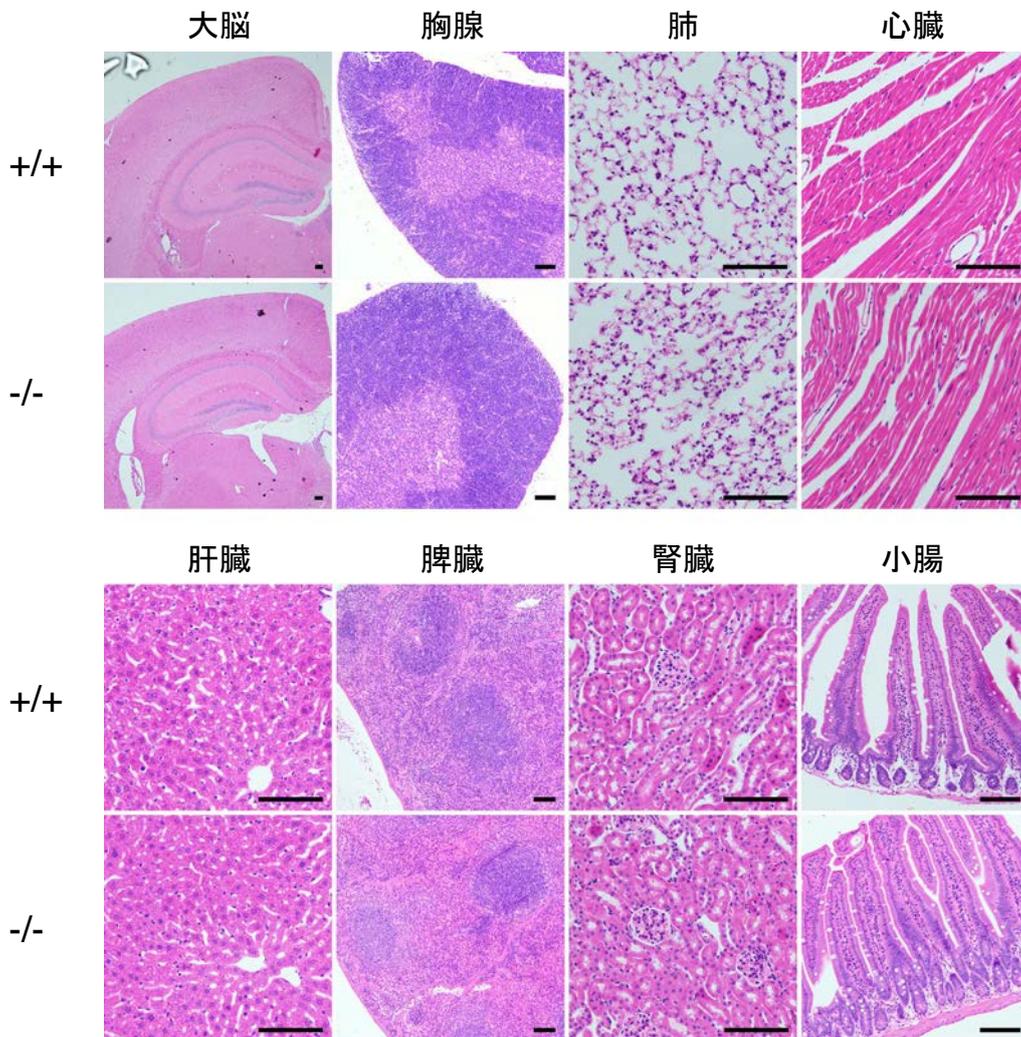


図 2-9 *Jmjd1c*  $-/-$ マウスの各器官の組織学的な解析

2ヶ月齢の *Jmjd1c*  $-/-$ マウスと同腹コントロールの各臓器のパラフィン切片を、ヘマトキシリン&エオシンにより染色した。スケールバーは 100 $\mu$ m.

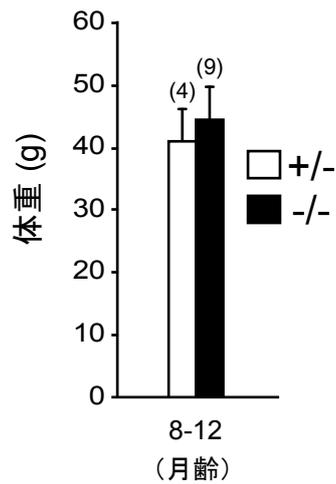
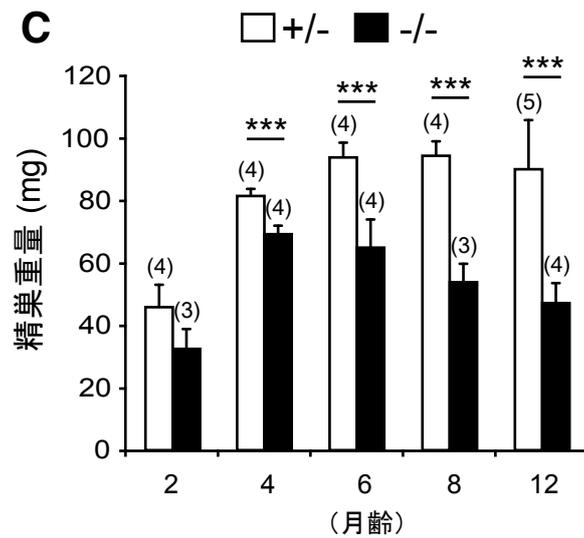
**A****B****C**

図 2-10 *Jmjd1c*  $-/-$ マウスの精巣の観察

- (A) 1ヶ月齢または8ヶ月齢における *Jmjd1c*  $-/-$ と同腹コントロールのマウス精巣の外見  
 (B) 8-12ヶ月齢における *Jmjd1c*  $-/-$ と同腹コントロールのマウスの体重  
 (C) 各月齢における *Jmjd1c*  $-/-$ と同腹コントロールのマウスの精巣重量。各月齢で測定したマウスの匹数をグラフの上に示す。\*\*\* : P 値 < 0.001 (Student t-test)

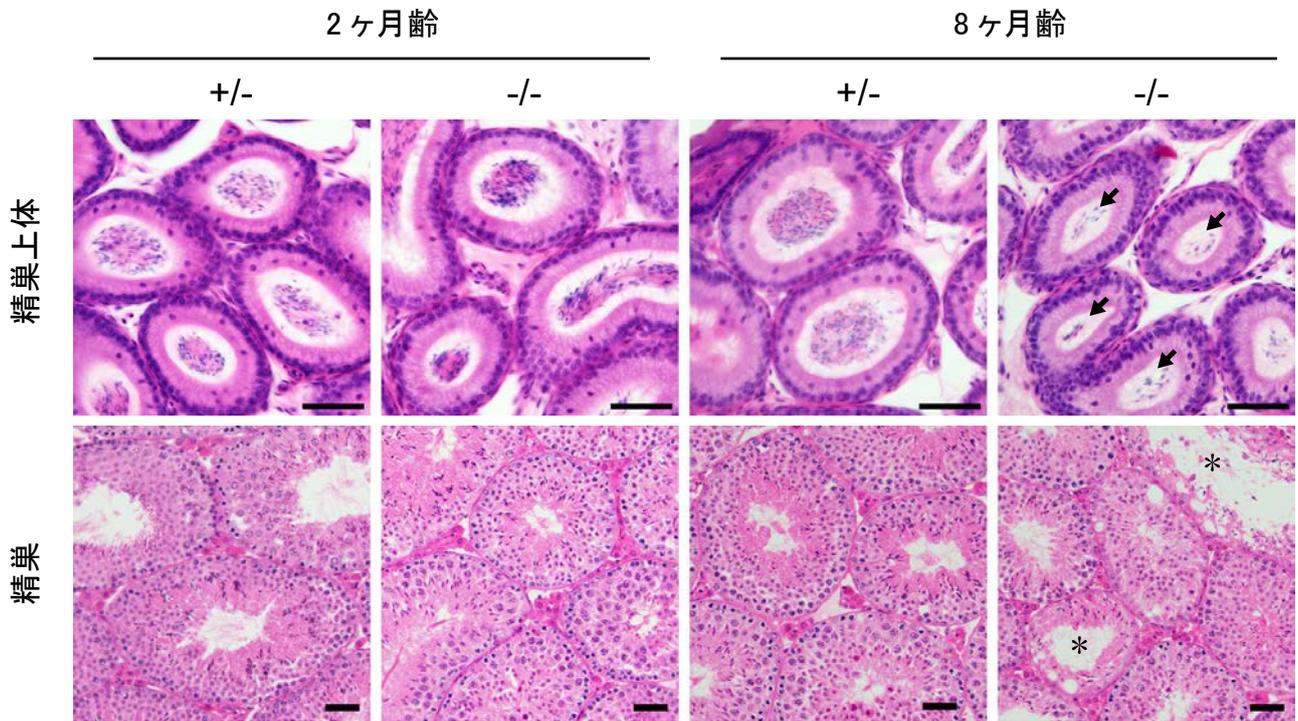


図 2-11 *Jmjd1c*  $-/-$ マウスの精巣上体および精巣の組織学的な観察

*Jmjd1c*  $-/-$ と同腹コントロールのマウスの精巣上体(上段)または精巣(下段)の組織切片をヘマトキシリン&エオシンにより染色した。矢印と\*印は、それぞれ精子の減少した精巣上体管と生殖細胞の欠損した精細管を示す。スケールバーは 50 $\mu$ m.

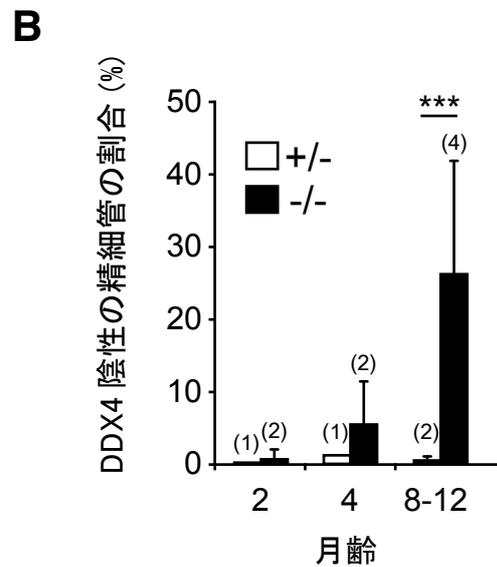
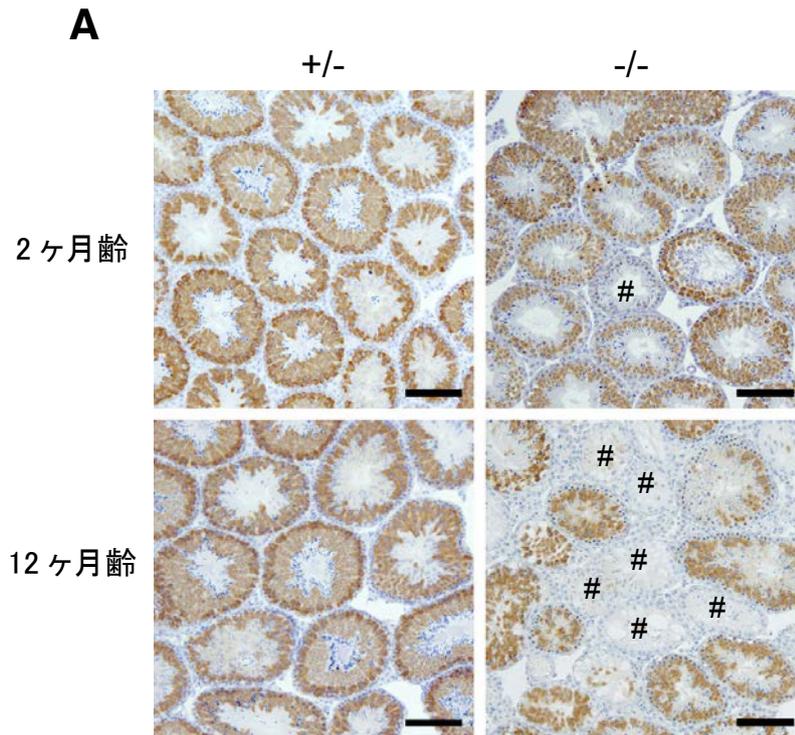


図 2-12 *Jmjd1c*  $-/-$ マウス精巣における生殖細胞マーカーの免疫染色

(A) *Jmjd1c*  $-/-$ と同腹コントロールのマウスの精巣切片を用いて、DDX4 に対する組織免疫染色を行った。#印は DDX4 陽性細胞を欠失した精細管を示す。スケールバーは 100 $\mu$ m.

(B) 各月齢のマウス精巣において DDX4 陽性細胞を欠失した精細管の割合を計測した。各サンプルにつき 200 個以上の精細管を観察し平均値を算出した。グループごとに観察したマウスの匹数をグラフバーの上に示す。\*\*\* : P 値 < 0.001 (Student t-test)

8ヶ月齢

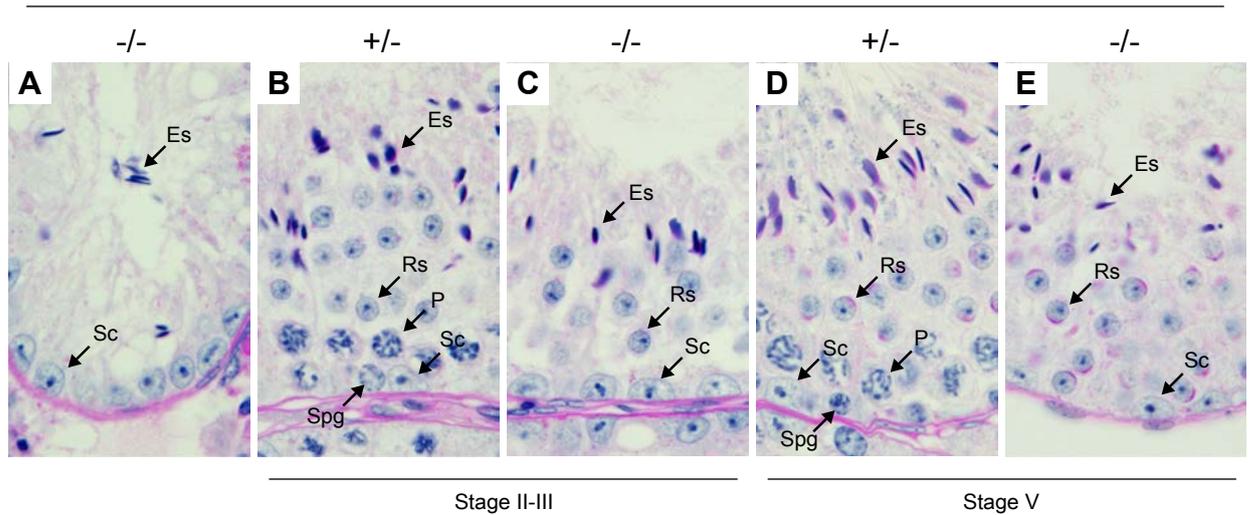


図 2-13 *Jmjd1c*  $-/-$ マウス精巣における未分化な生殖細胞の欠失

マウスの精巣切片をPAS-ヘマトキシリン染色により染色し、精細管のステージを分類した。

(A) 伸長精子細胞とセルトリ細胞だけを含む *Jmjd1c*  $-/-$ マウスの精細管

(B, C) 精細管ステージII-IIIにおける同腹コントロールマウス (B)と *Jmjd1c*  $-/-$ マウス (C)の精細管

(D, E) 精細管ステージVにおける同腹コントロールマウス (D)と *Jmjd1c*  $-/-$ マウス (E)の精細管

Sc : Sertoli cells(セルトリ細胞), Es : Elongating spermatids(伸長精子細胞), Rs : Round spermatids(円形精子細胞), P : Pachytene spermatocytes(パキテン期精母細胞), Spg : Spermatogonia(精原細胞), スケールバーは100 $\mu$ m

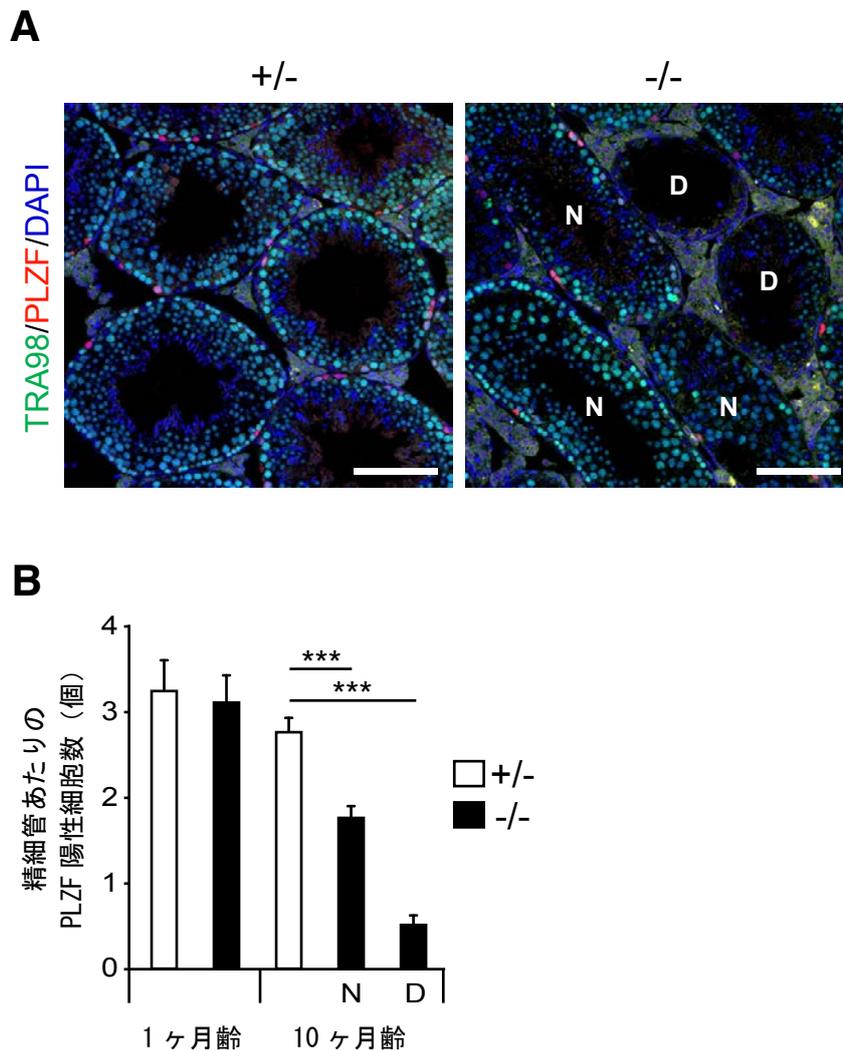


図 2-14 *Jmjd1c*  $-/-$ マウスの精巣における PLZF 陽性細胞数の定量

(A) 10ヶ月齢の *Jmjd1c*  $-/-$ マウスと同腹コントロールマウスの精巣切片を用いて、TRA98 (緑) と PLZF (赤) に対する 2 重免疫染色を行った。DAPI (青) により核を染色した。

スケールバーは 100 $\mu$ m.

N : Normal tube (正常な精細管), D : Degenerated tube (変性した精細管)

(B) 精細管あたりの PLZF 陽性細胞数を計測した。各グループにつき 3 匹のマウスから 5 枚/匹の精巣切片を用いて、平均値を算出した。\*\*\* : P 値 < 0.001 (Student t-test)

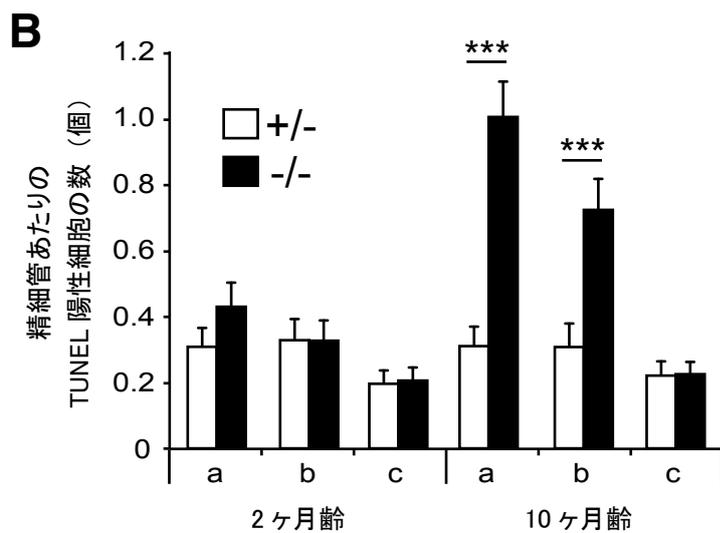
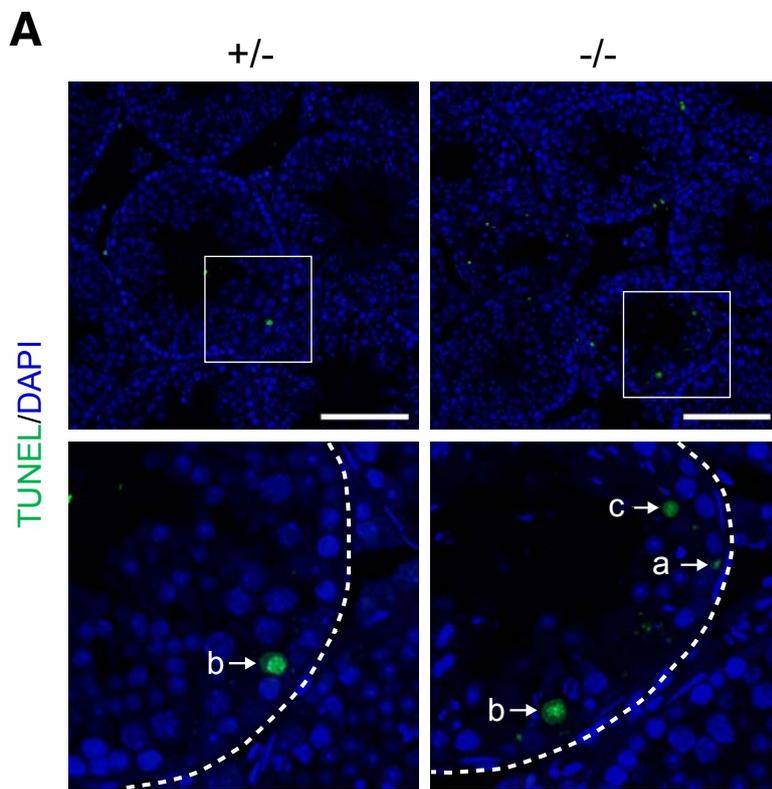


図 2-15 *Jmjd1c*  $-/-$ マウスの精巣における TUNEL 陽性細胞の定量

(A) 2ヶ月齢または10ヶ月齢の *Jmjd1c* KO マウスと同腹コントロールマウスの精巣切片を用いて、TUNEL (緑)染色を行った。DAPI (青)により核を染色した。ボックス内の拡大像を下段に表示した。破線は基底膜を示す。TUNEL 陽性細胞を、精細管内の位置と DAPI 染色像により3つのグループに分類した。グループ a: 基底膜に接着し、パキテン期より未分化な生殖細胞を含む。グループ b: パキテン期から二次精母細胞の間の生殖細胞を含む。グループ c: 精子細胞を含む。スケールバーは 100 $\mu$ m.

(B) 精細管当たりの TUNEL 陽性細胞の数を計測した。各グループにつき3匹のマウスから5枚/匹の精巣切片を用いて、平均値を算出した。\*\*\*: P 値 < 0.001 (Student t-test)

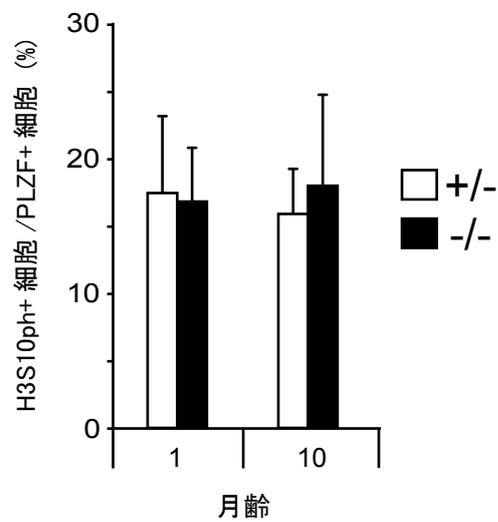


図 2-16 *Jmjd1*  $-/-$ マウスの精巣における未分化精原細胞の増殖

1ヶ月齢または10ヶ月齢の *Jmjd1c*  $-/-$ マウスと同腹コントロールマウスの精巣切片を用いて、PLZFとH3S10phに対する2重免疫染色を行い、PLZF陽性細胞に対するH3S10ph陽性細胞の割合を算出した。各グループにつき3匹のマウスから5枚/匹の精巣切片を用いて、平均値を算出した。

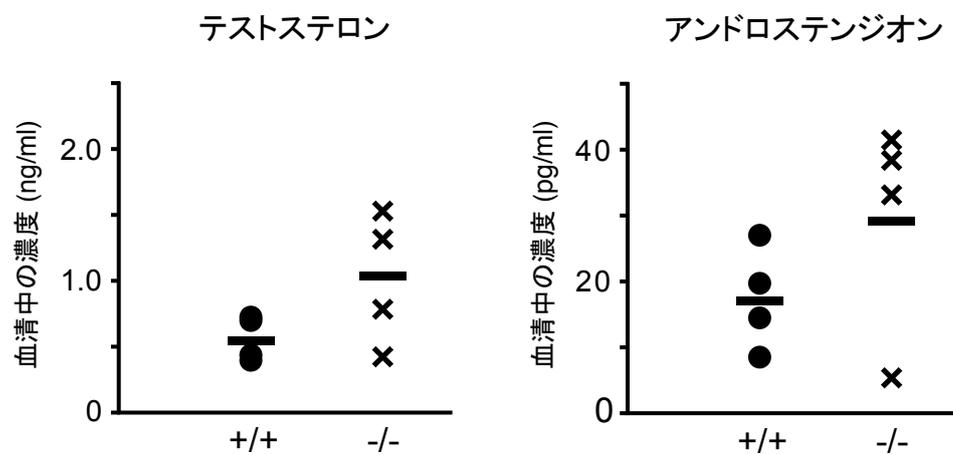


図 2-17 *Jmjd1c*  $-/-$ マウスにおける性ホルモンの血中濃度

2-3 ヶ月齢 *Jmjd1c*  $-/-$ マウスと同腹コントロールにおけるテストステロン(左)とアンドロステンジオン(右)の血清中濃度を LC-MS/MS により測定した。

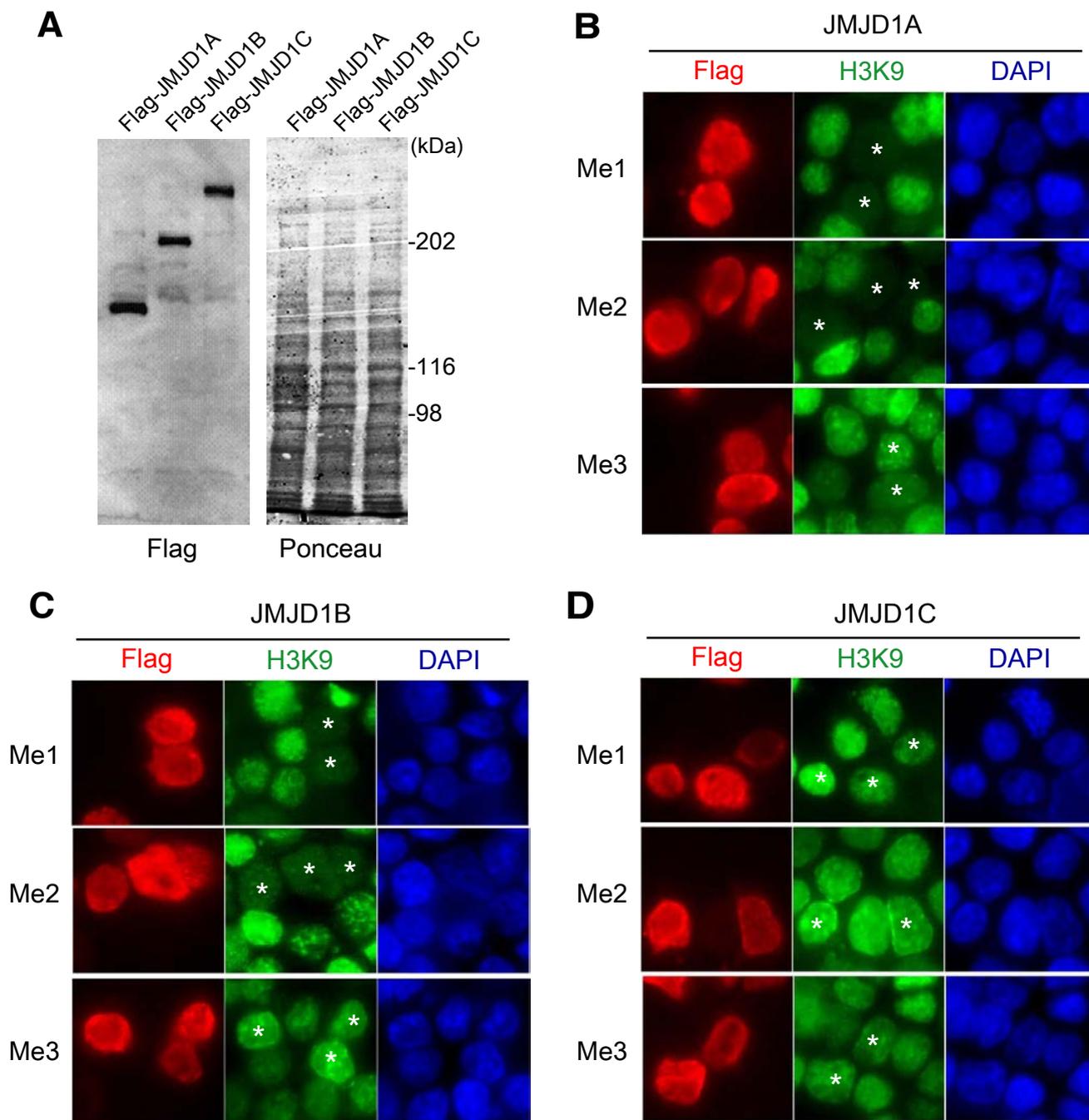


図 2-18 JMJD1C を強制発現した 293T 細胞におけるヒストン修飾状態の観察

(A) 293T 細胞に Flag-JMJD1A, Flag-JMJD1B または Flag-JMJD1C を発現し、ウェスタンブロッティングにより Flag を検出した。

(B-D) Flag-JMJD1A (B), Flag-JMJD1B (C) または Flag-JMJD1C (D) を発現した細胞 (赤) における H3K9m1, me2 または me3 のメチル化状態 (緑) を免疫染色によって観察した。DAPI (青) により核を染色した。

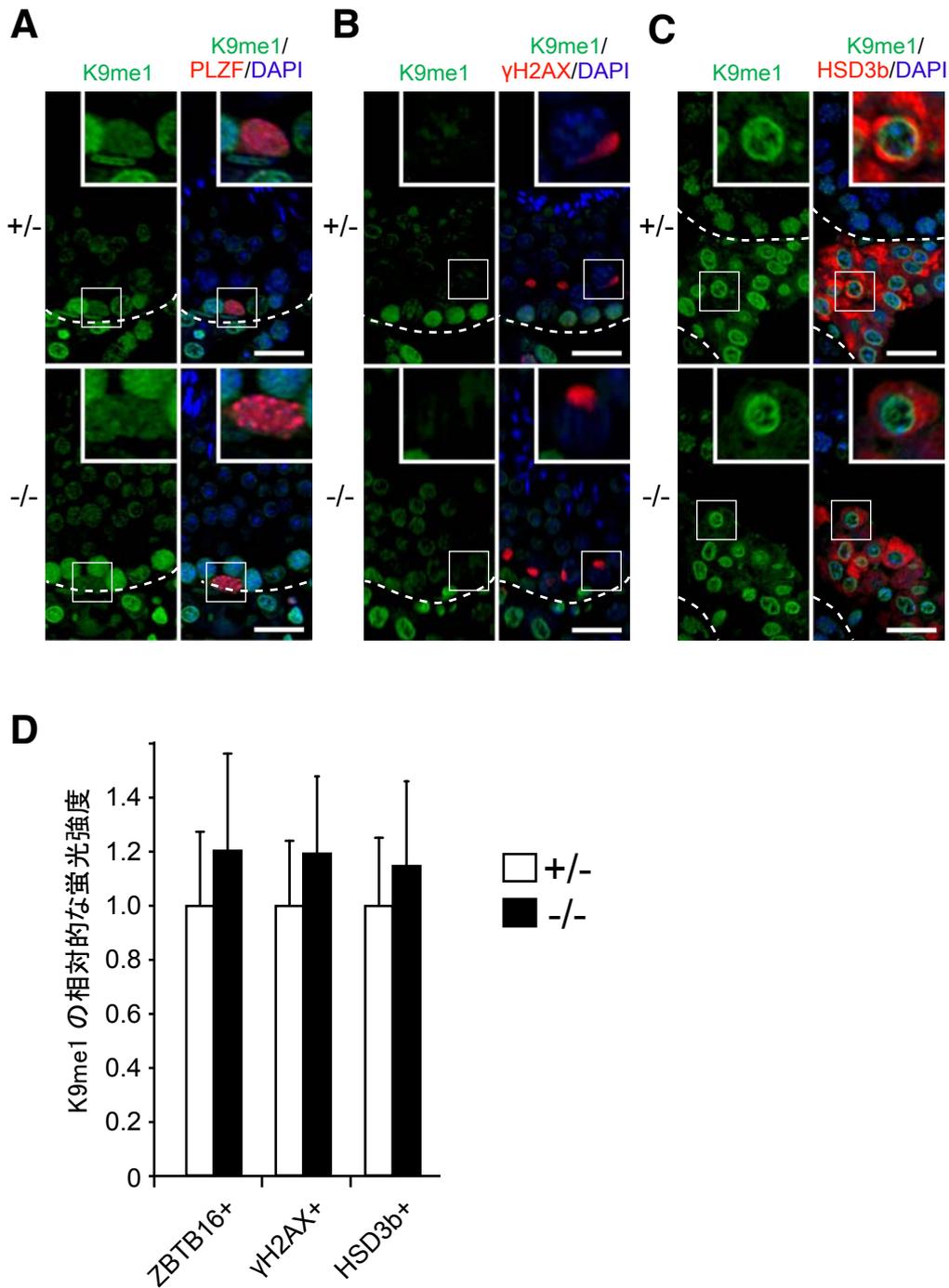


図 2-19 *Jmjd1c*  $-/-$  マウス精巣の細胞における H3K9me1 の修飾状態の観察

(A) 10 ヶ月齢のマウス精巣の切片を用いて、H3K9me1 (緑)/PLZF (赤) (A), H3K9me1 (緑)/ $\gamma$  H2AX (赤) (B) または H3K9me1 (緑)/HSD3 $\beta$  (赤) (C) の組み合わせで 2 重免疫染色を行った。DAPI (青) により核を染色した。右上にボックス内の拡大像を表示した。破線は、それぞれ基底膜を示す。スケールバーは 20 $\mu$ m。

(D) (A-C) で観察された H3K9me1 の相対的な蛍光シグナル強度を Image J ソフトウェアを用いて定量した。PLZF,  $\gamma$  H2AV または HSD3 $\beta$  陽性細胞について各 50 個以上の細胞を計測した後、同腹コントロールの PLZF 陽性細胞におけるシグナル強度の平均値を相対的に 1 とした。

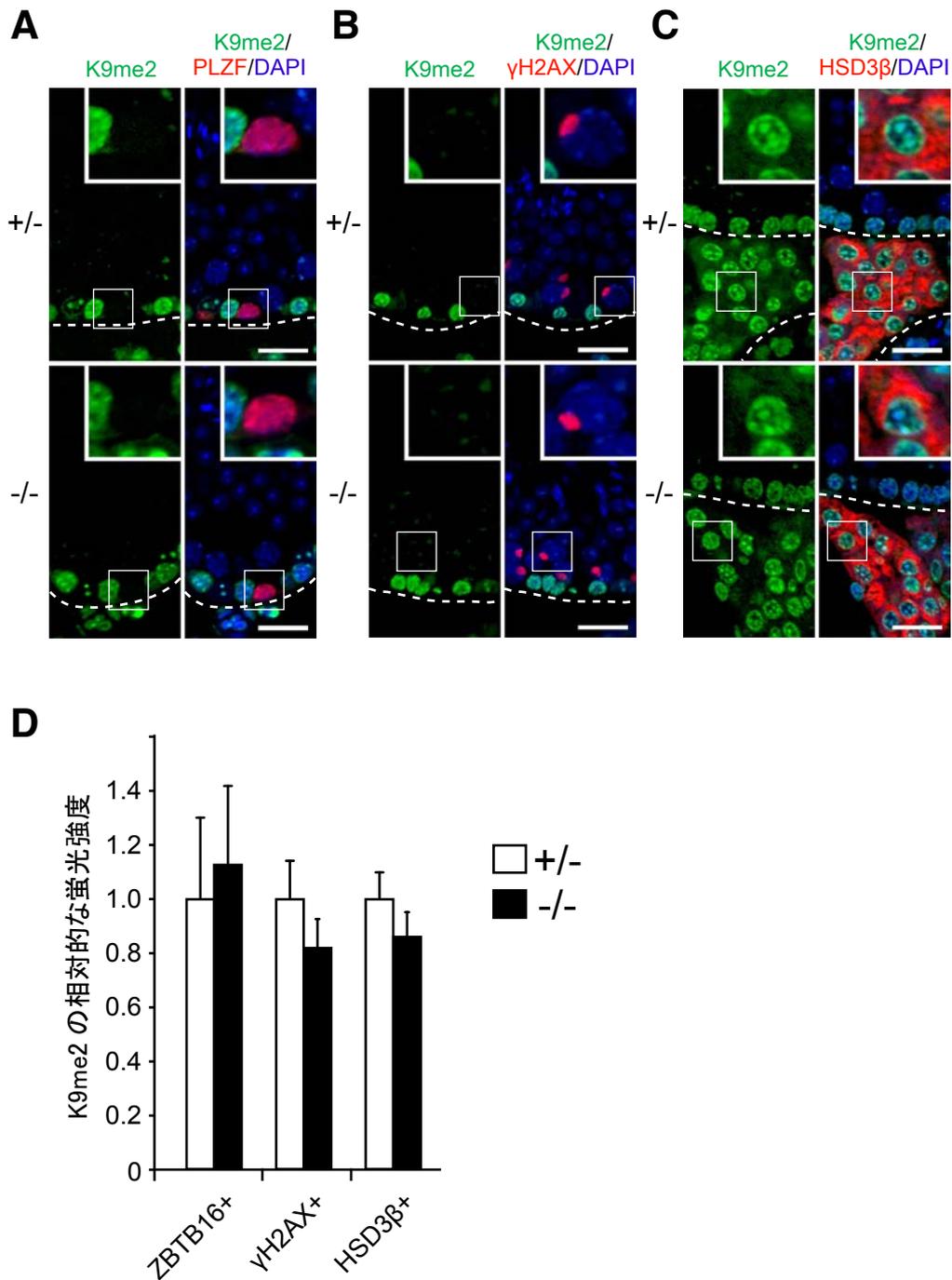


図 2-20 *Jmjd1c*  $-/-$  マウス精巣の細胞における H3K9me2 の修飾状態の観察

(A) 10 ヶ月齢のマウス精巣の切片を用いて、H3K9me2 (緑)/PLZF (赤) (A), H3K9me2 (緑)/ $\gamma$  H2AX (赤) (B) または H3K9me2 (緑)/HSD3 $\beta$  (赤) (C) の組み合わせで 2 重免疫染色を行った。DAPI (青) により核を染色した。右上にボックス内の拡大像を表示した。破線は、それぞれ基底膜を示す。スケールバーは 20 $\mu$ m。

(D) (A-C) で観察された H3K9me2 の相対的な蛍光シグナル強度を Image J ソフトウェアを用いて定量した。PLZF,  $\gamma$  H2AV または HSD3 $\beta$  陽性細胞について各 50 個以上の細胞を計測した後、同腹コントロールの PLZF 陽性細胞におけるシグナル強度の平均値を相対的に 1 とした。

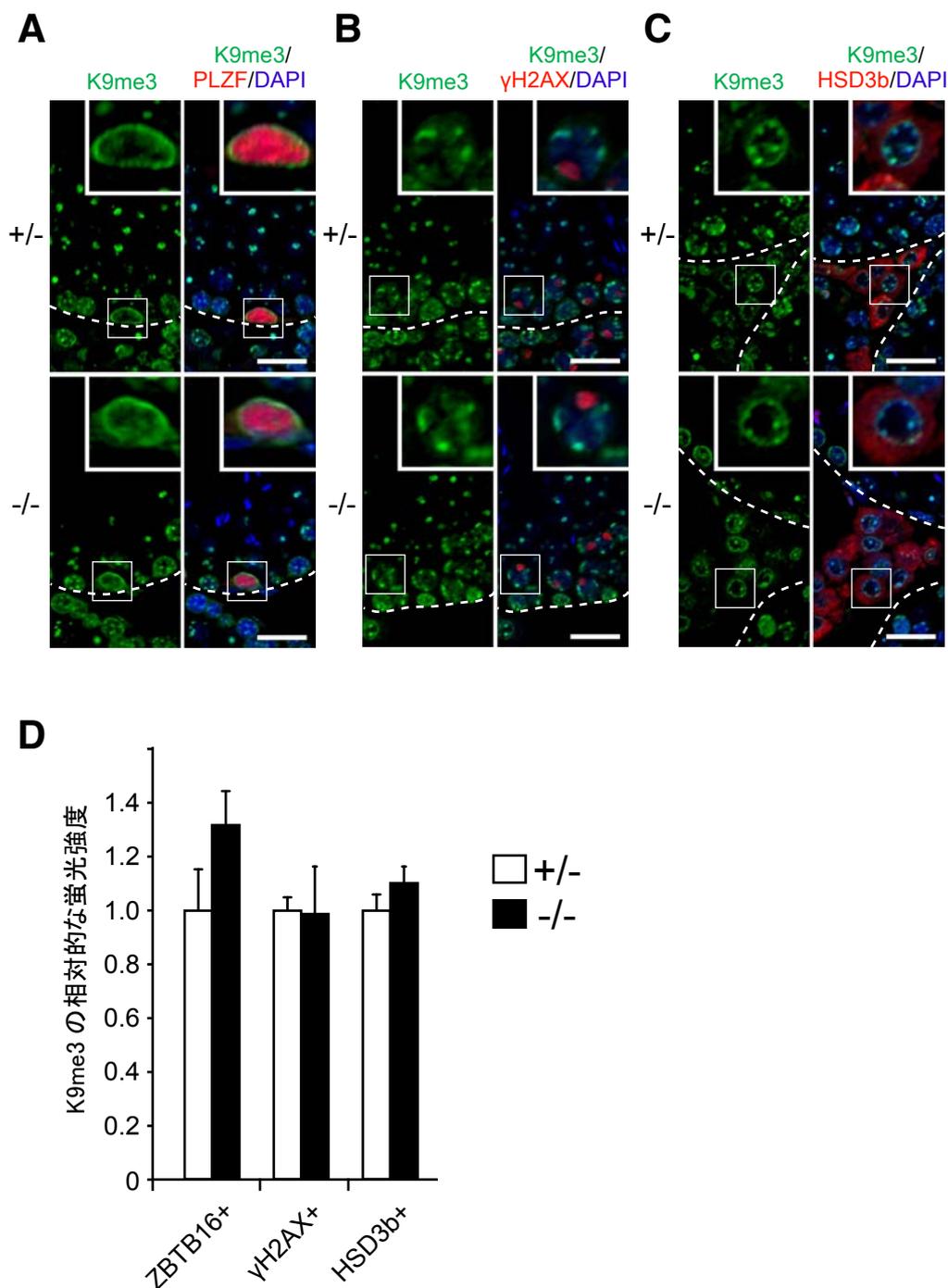


図 2-21 *Jmjd1c*  $-/-$  マウス精巣の細胞における H3K9me3 の修飾状態の観察

(A) 10 ヶ月齢のマウス精巣の切片を用いて、H3K9me3 (緑)/PLZF (赤) (A), H3K9me3 (緑)/ $\gamma$  H2AX (赤) (B) または H3K9me3 (緑)/HSD3 $\beta$  (赤) (C) の組み合わせで 2 重免疫染色を行った。DAPI (青) により核を染色した。右上にボックス内の拡大像を表示した。破線は、それぞれ基底膜を示す。スケールバーは 20 $\mu$ m。

(D) (A-C) で観察された H3K9me3 の相対的な蛍光シグナル強度を Image J ソフトウェアを用いて定量した。PLZF,  $\gamma$  H2AV または HSD3 $\beta$  陽性細胞について各 50 個以上の細胞を計測した後、同腹コントロールの PLZF 陽性細胞におけるシグナル強度の平均値を相対的に 1 とした。

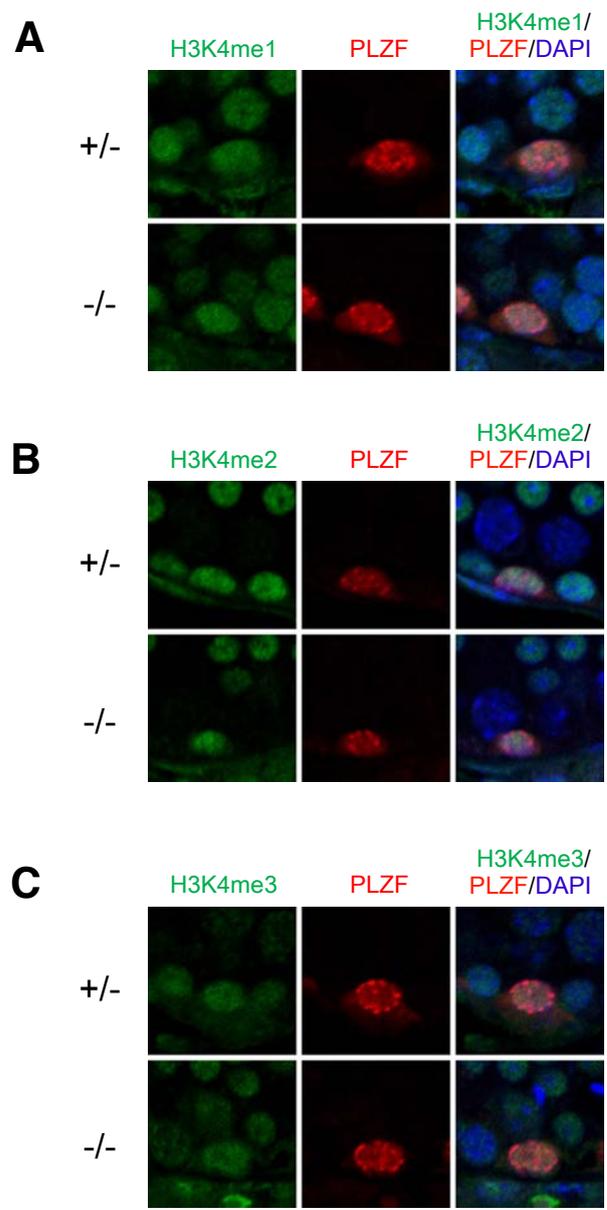


図 2-22 *Jmjd1c*  $-/-$  マウス精巣の PLZF 陽性細胞における H3K4 メチル化修飾状態  
 10 ヶ月齢のマウス精巣の切片を用いて、H3K4me1 (緑)/PLZF (赤) (A), H3K4me2 (緑)/ PLZF (赤) (B) または H3K4me3 (緑)/ PLZF (赤) (C) の組み合わせで 2 重免疫染色を行った。  
 DAPI (青) により核を染色した。

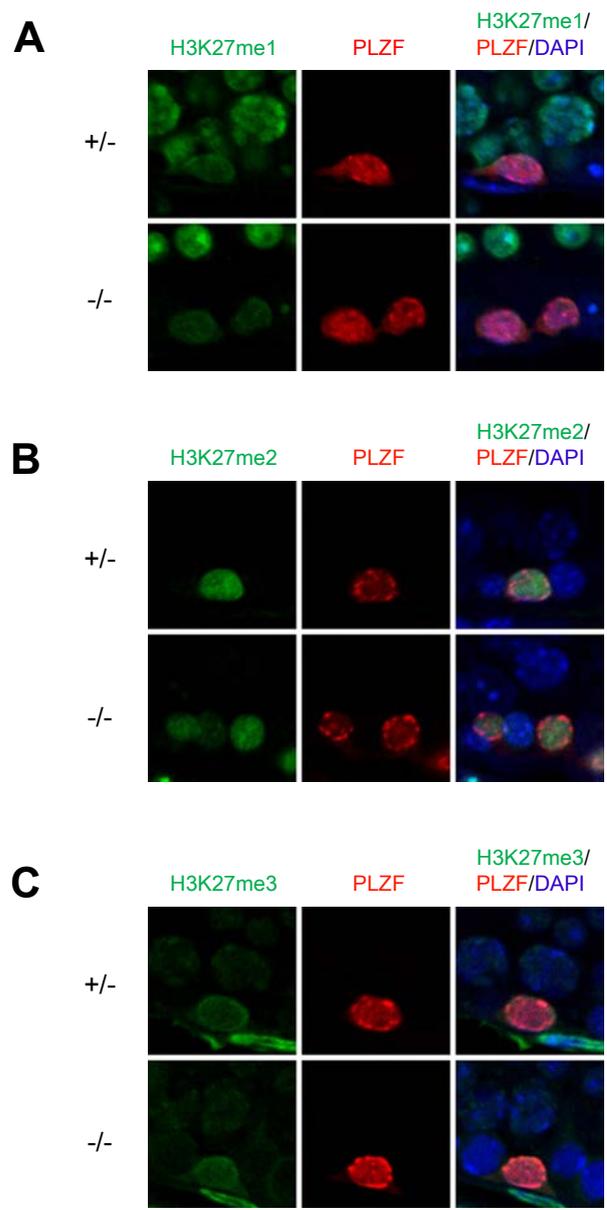


図 2-23 *Jmjd1c*  $-/-$  マウス精巣の PLZF 陽性細胞における H3K27 メチル化修飾状態  
 10 ヶ月齢のマウス精巣の切片を用いて、H3K27me1 (緑)/PLZF (赤) (A), H3K27me2 (緑)/  
 PLZF (赤) (B) または H3K27me3 (緑)/ PLZF (赤) (C) の組み合わせで 2 重免疫染色を行った。  
 DAPI (青) により核を染色した。

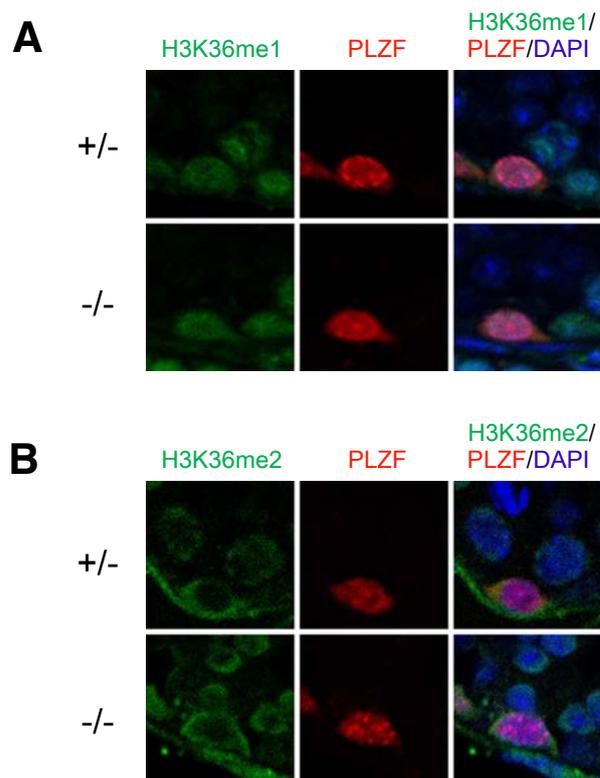


図 2-24 *Jmjd1c*  $-/-$  マウス精巢の PLZF 陽性細胞における H3K36 メチル化修飾状態  
 10 ヶ月齢のマウス精巢の切片を用いて、H3K36me1 (緑)/PLZF (赤) (A)と H3K36me2 (緑)/  
 PLZF (赤) (B)の組み合わせで 2 重免疫染色を行った。DAPI (青)により核を染色した。

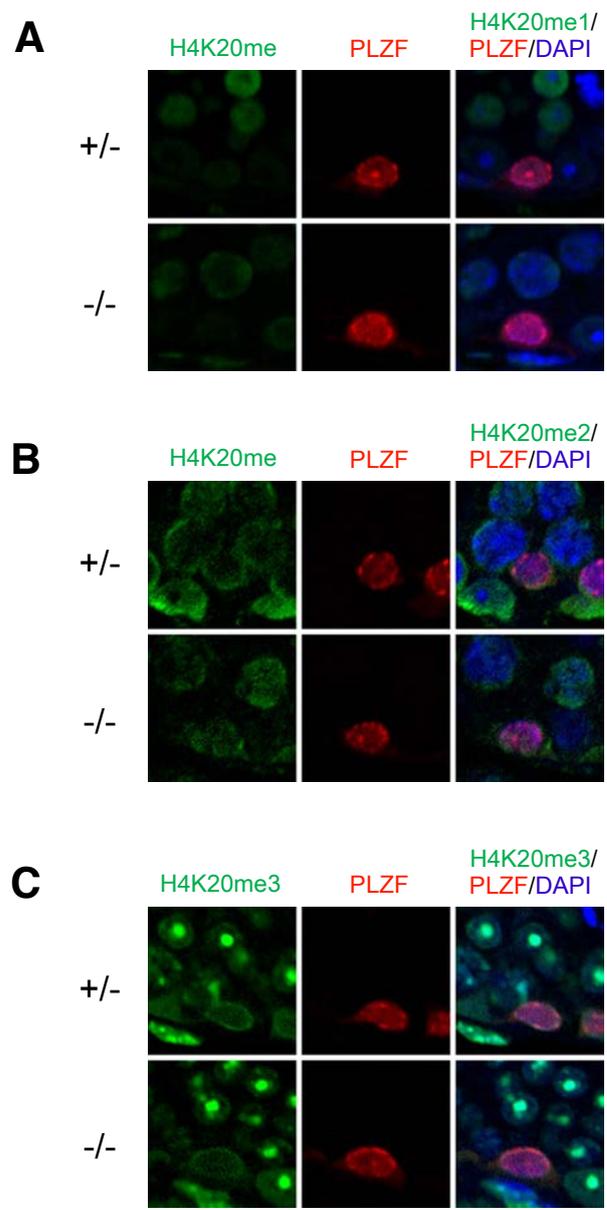
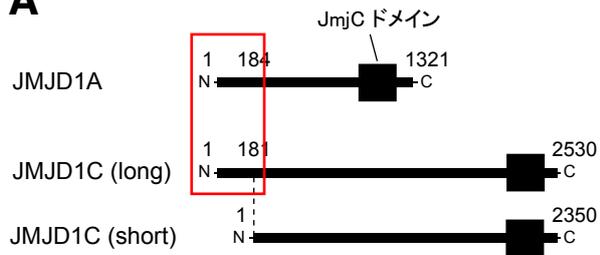


図 2-25 *Jmjd1c*  $-/-$ マウス精巢の PLZF 陽性細胞における H4K20 メチル化修飾状態  
 10 ヶ月齢のマウス精巢の切片を用いて、H4K20me1 (緑)/PLZF (赤) (A), H4K20me2 (緑)/  
 PLZF (赤) (B)または H4K20me3 (緑)/ PLZF (赤) (C)の組み合わせで 2 重免疫染色を行った。  
 DAPI (青)により核を染色した。

< JMJD1A と JMJD1C の N 末端アミノ酸配列の比較 >

**A**



**B**

JMJD1A	1	M	V	L	T	L	G	E	S	W	P	V	L	V	G	K	R	F	L	S	L	S	A	A	E	G	N	-	-	E	S	G	D	N	W	D	L	E	R	V	A	E	W	P	W	L	S	G	T	I	R	A	V	S	H	T	D	V	T	K	K	D	L	K	V	C	V	E	F	D	G	E	S	W	R	73	
JMJD1C (long)	1	M	A	V	-	-	-	E	T	R	P	E	L	V	G	K	R	F	L	C	V	A	A	G	E	D	A	R	P	E	R	G	Q	S	G	C	G	R	G	-	-	-	-	-	-	W	R	A	G	V	I	R	A	V	S	H	R	D	R	G	H	P	D	L	A	V	Y	V	E	F	D	D	L	E	W	D	66
JMJD1A	74	K	R	R	W	I	D	V	Y	S	L	R	K	A	F	L	V	E	H	N	L	V	L	A	E	R	K	S	P	E	V	P	-	-	-	-	E	Q	V	I	Q	W	P	A	I	M	Y	K	S	L	L	D	K	A	G	L	G	A	I	T	S	V	R	F	L	G	D	Q	Q	S	V	F	V	S	K	144	
JMJD1C (long)	67	K	R	E	W	V	R	V	Y	-	E	D	F	S	T	F	L	V	E	Y	H	L	I	W	A	K	R	K	D	P	S	Q	T	Q	G	S	K	S	R	O	I	Q	W	P	A	L	T	F	K	P	L	V	E	N	S	I	P	S	S	I	T	A	V	E	F	L	I	D	K	Q	L	D	F	L	T	E	140
JMJD1A	145	D	-	L	L	K	P	I	Q	D	-	V	N	S	L	R	L	S	L	T	D	N	Q	T	V	S	K	E	F	Q	A	L	I	V	K	H	L	D	E	S	H	L	L	184																																	
JMJD1C (long)	141	D	S	A	F	Q	P	Y	Q	D	I	D	S	L	K	P	V	L	R	D	N	P	Q	L	H	A	E	V	K	V	W	K	E	Q	K	V	Q	E	I	F	M	181																																			

アラインメントされているアミノ酸が,  
 "\*" では、完全に一致している  
 ":" では、強い類似性のあるグループに属している  
 "." では、弱い類似性のあるグループに属している

図 3-1 JMJD1A と JMJD1C (long variant) の N 末端アミノ酸配列の比較

(A) JMJD1A と JMJD1C の模式図。赤で囲んだ枠内のアミノ酸配列を(B)に示す。

(B) JMJD1A と JMJD1C (long variant) の N 末端のアミノ酸配列の比較。

## < JmjC ドメインのアミノ酸配列 >

hs JMJD1A	1058	MPSRFDDLMANIPLPEYTRRDGKLNLASRLPNYFVRPDLGPKMYNAYGLITPEDRKYGTNHL	LDVSDAANVMVY	1132			
mm Jmj1a	1060	MPSRFDDLMANIPLPEYTRRDGKLNLASRLPNYFVRPDLGPKMYNAYGLITPEDRKYGTNHL	LDVSDAANVMVY	1134			
hs JMJD1B	1498	MPTRFEDLMENLPLPEYTKRDGRNLASRLPSYFVRPDLGPKMYNAYGLITAE	EDRRVGTNHL	LDVSDAVNVMVY	1572		
mm Jmj1b	1499	MPTRFEDLMENLPLPEYTKRDGRNLASRLPSYFVRPDLGPKMYNAYGLITAE	EDRRVGTNHL	LDVSDAVNVMVY	1573		
hs JMJD1C	2037	MPARYEDLLKSLPLPEYCNPEGKFNLASHLPGFFVRPDLGPRLCSAYGVVAAKDHDIG	TNHL	LEVSDVVNLLVY	2111		
mm Jmj1c	2084	MPTRYEDFLRCLPLPEYCNPEGKFNLASHLPGFFVRPDLGPRLCSAYGVVAAKDHDIG	TNHL	LEASDVVNLLVY	2158		
hs JMJD1A	1133	VGIPK-GQCE-QEEEVLTIQDGDSELTIKRFIEGKEKPGALWHIYAAKDTEK	IREFLKVVSEEQQENPADHD	1205			
mm Jmj1a	1135	VGIPK-GQCE-QEEEVLRITIQDGDSELTIKRFIEGKEKPGALWHIYAAKDTEK	IREFLKVVSEEQQDNPADHD	1207			
hs JMJD1B	1573	VGIPK-GQCE-QEEEVLTIQDGDSELTIKRFIEGKEKPGALWHIYAAKDTEK	IREFLKVVSEEQQENPADHD	1645			
mm Jmj1b	1574	VGIPK-GQCE-QEEEVLTIQDGDSELTIKRFIEGKEKPGALWHIYAAKDTEK	IREFLKVVSEEQQENPADHD	1646			
hs JMJD1C	2112	VGIAK-GNGILSKAGILKKFEEEDLDDILRKRKDSSEIPGALWHIYAGKDV	KIREFLKVVSEEQGLEVLPEHD	2185			
mm Jmj1c	2159	VGIAK-GNGVLSKAGILKKFEEEDLDDVLRKILKDSSEIPGALWHIYAGKDV	KIREFLKVVSEEQGLEVLPEHD	2232			
hs JMJD1A	1206	PIHDQSWYLDRSLRKRLLH	QEYGVQGWAIVQFLGDVVFIPAGAPHQVHNL	YSCIKVAEDFVSP	PEHVKKCFWLTQEF	1280	
mm Jmj1a	1208	PIHDQSWYLDRSLRKRLLY	QEYGVQGWAIVQFLGDVVFIPAGAPHQVHNL	YSCIKVAEDFVSP	PEHVKKCFWLTQEF	1282	
hs JMJD1B	1646	PIHDQSWYLDQTLRKRLLY	QEYGVQGWAIVQFLGDVVFIPAGAPHQVHNL	YSCIKVAEDFVSP	PEHVKKCFR	1720	
mm Jmj1b	1647	PIHDQSWYLDQTLRKRLLY	QEYGVQGWAIVQFLGDVVFIPAGAPHQVHNL	YSCIKVAEDFVSP	PEHVKKCFR	1721	
hs JMJD1C	2186	PIRDQSWYVNRKLRQRLL	EEYGVRACTLTIQFLGDAIVL	PAGALHQVQNFHSCIQVT	EDFVSP	PEHLVQSFH	2260
mm Jmj1c	2233	PIRDQSWYVNRKLRQRLL	EEYGVRACTLTIQFLGDAIVL	PAGALHQVQNFHSCIQVT	EDFVSP	PEHLVQSFH	2307

赤 : Fe(2) 結合サイト, 青 : aKG 結合サイト, グレイ : JMJD1 ファミリー特有のアミノ酸挿入配列

### 図 3-2 JMJD1A, JMJD1B と JMJD1C の JmjC ドメインアミノ酸配列の比較

ヒト (hs) またはマウス (mm) の JMJD ファミリー分子の JmjC ドメインのアミノ酸配列のアライメント。

赤 : Fe(2) 結合サイト、青 :  $\alpha$ KG 結合サイト、グレイ : JMJD1 ファミリー特有の

JmjC ドメイン内へのアミノ酸挿入配列

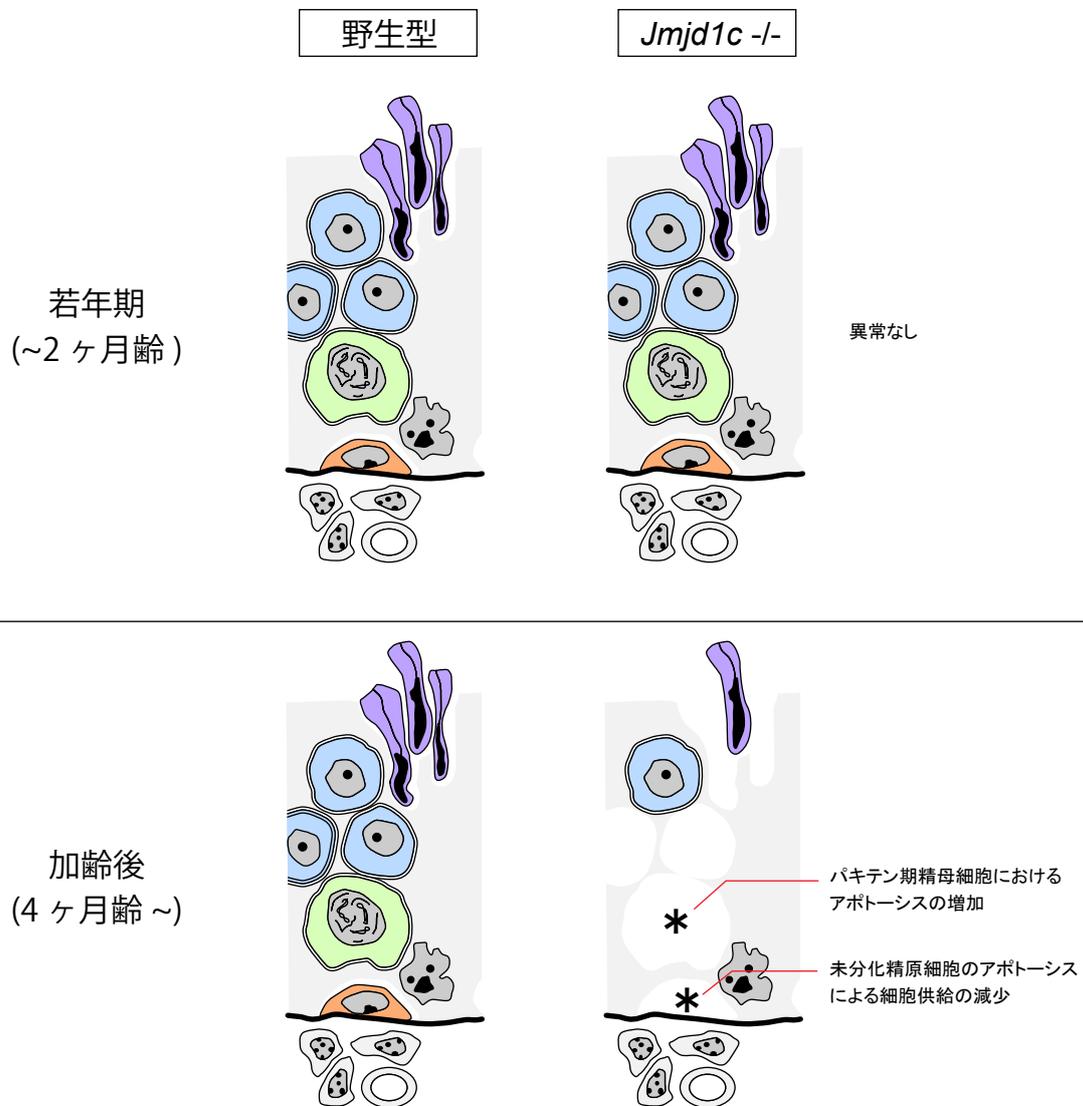


図 3-3 *Jmjd1c* <sup>-/-</sup>マウスの精巣における表現型のモデル図

*Jmjd1c* <sup>-/-</sup>マウスの精巣では、若年期に異常は観察されない。しかし、加齢した *Jmjd1c* <sup>-/-</sup>マウスの精巣では、未分化精原細胞とパキテン期精母細胞のアポトーシスが増加する。その結果、生殖細胞の供給が減少することで成熟精子が徐々に減少し、早期に不妊を発症する。

## 引用文献

1. Allis, C. D., Jenuwein, T. & Reinberg, D. *Epigenetics*. (CSHL Press, 2007).
2. Shahbazian, M. D. & Grunstein, M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* 76, 75–100 (2007).
3. Greer, E. L. & Shi, Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet* 13, 343–357 (2012).
4. Wang, Z. *et al.* Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet* 40, 897–903 (2008).
5. Margueron, R. & Reinberg, D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343–349 (2011).
6. Cao, R. & Zhang, Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell* 15, 57–67 (2004).
7. Maison, C. & Almouzni, G. HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 296–304 (2004).
8. Pinheiro, I. *et al.* Prdm3 and Prdm16 are H3K9me1 methyltransferases required for mammalian heterochromatin integrity. *Cell* 150, 948–960 (2012).
9. Lee, J.-S. & Shilatifard, A. A site to remember: H3K36 methylation a mark for histone deacetylation. *Mutat. Res.* 618, 130–134 (2007).
10. Karachentsev, D., Sarma, K., Reinberg, D. & Steward, R. PR-Set7-dependent methylation of histone H4 Lys 20 functions in repression of gene expression and is essential for mitosis. *Genes Dev* 19, 431–435 (2005).
11. Kooistra, S. M. & Helin, K. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 297–311 (2012).
12. Rea, S. *et al.* Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593–599 (2000).
13. Tachibana, M., Sugimoto, K., Fukushima, T. & Shinkai, Y. Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J Biol Chem* 276, 25309–25317 (2001).

14. Tachibana, M. *et al.* Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes Dev* 19, 815–826 (2005).
15. Schultz, D. C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G. G. & Rauscher, F. J. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev* 16, 919–932 (2002).
16. Shi, Y. *et al.* Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941–953 (2004).
17. Ciccone, D. N. *et al.* KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. *Nature* 461, 415–418 (2009).
18. Tsukada, Y.-I. *et al.* Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439, 811–816 (2006).
19. Black, J. C., Van Rechem, C. & Whetstine, J. R. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Mol Cell* 48, 491–507 (2012).
20. Yamane, K. *et al.* JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* 125, 483–495 (2006).
21. Kuroki, S. *et al.* Epigenetic regulation of mouse sex determination by the histone demethylase Jmjd1a. *Science* 341, 1106–1109 (2013).
22. Okada, Y., Scott, G., Ray, M. K., Mishina, Y. & Zhang, Y. Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis. *Nature* 450, 119–123 (2007).
23. Liu, Z. *et al.* Jmjd1a demethylase-regulated histone modification is essential for cAMP-response element modulator-regulated gene expression and spermatogenesis. *J Biol Chem* 285, 2758–2770 (2010).
24. Tateishi, K., Okada, Y., Kallin, E. M. & Zhang, Y. Role of Jhdm2a in regulating metabolic gene expression and obesity resistance. *Nature* 458, 757–761 (2009).
25. Inagaki, T. *et al.* Obesity and metabolic syndrome in histone demethylase JHDM2a-deficient mice. *Genes Cells* 14, 991–1001 (2009).

26. Uemura, M. *et al.* Jumonji domain containing 1A is a novel prognostic marker for colorectal cancer: in vivo identification from hypoxic tumor cells. *Clin. Cancer Res.* 16, 4636–4646 (2010).
27. Qi, J. *et al.* Siah2-dependent concerted activity of HIF and FoxA2 regulates formation of neuroendocrine phenotype and neuroendocrine prostate tumors. *Cancer Cell* 18, 23–38 (2010).
28. Guo, X. *et al.* The expression of histone demethylase JMJD1A in renal cell carcinoma. *Neoplasia* 58, 153–157 (2011).
29. Yamada, D. *et al.* Role of the hypoxia-related gene, JMJD1A, in hepatocellular carcinoma: clinical impact on recurrence after hepatic resection. *Ann. Surg. Oncol.* 19 Suppl 3, S355–64 (2012).
30. Hu, Z. *et al.* A novel nuclear protein, 5qNCA (LOC51780) is a candidate for the myeloid leukemia tumor suppressor gene on chromosome 5 band q31. *Oncogene* 20, 6946–6954 (2001).
31. Lee, J. W., Choi, H. S., Gyuris, J., Brent, R. & Moore, D. D. Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 9, 243–254 (1995).
32. Katoh, M. & Katoh, M. Identification and characterization of TRIP8 gene in silico. *Int. J. Mol. Med.* 12, 817–821 (2003).
33. Kim, S.-M. *et al.* Regulation of mouse steroidogenesis by WHISTLE and JMJD1C through histone methylation balance. *Nucleic Acids Res* 38, 6389–6403 (2010).
34. Brauchle, M. *et al.* Protein Complex Interactor Analysis and Differential Activity of KDM3 Subfamily Members Towards H3K9 Methylation. *PLoS ONE* 8, e60549 (2013).
35. Watanabe, S. *et al.* JMJD1C demethylates MDC1 to regulate the RNF8 and BRCA1-mediated chromatin response to DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol* 20, 1425–1433 (2013).
36. Castermans, D. *et al.* Identification and characterization of the TRIP8 and REEP3 genes on chromosome 10q21.3 as novel candidate genes for autism. *Eur. J. Hum. Genet.* 15, 422–431 (2007).

37. Russell, L. D. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. (Cache River Pr, 1990).
38. de Rooij, D. G. & Russell, L. D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 21, 776–798 (2000).
39. Buaas, F. W. *et al.* Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet* 36, 647–652 (2004).
40. Costoya, J. A. *et al.* Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet* 36, 653–659 (2004).
41. Fernandez-Capetillo, O. *et al.* H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell* 4, 497–508 (2003).
42. Watanabe, D. *et al.* Molecular cloning of a novel Ca(2+)-binding protein (calmegin) specifically expressed during male meiotic germ cell development. *J Biol Chem* 269, 7744–7749 (1994).
43. Dohle, G. R., Smit, M. & Weber, R. F. A. Androgens and male fertility. *World J Urol* 21, 341–345 (2003).
44. Zhao, L. *et al.* Steroidogenic factor 1 (SF1) is essential for pituitary gonadotrope function. *Development* 128, 147–154 (2001).
45. Tanaka, S. S. *et al.* The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev* 14, 841–853 (2000).
46. Eacker, S. M. *et al.* Hormonal regulation of testicular steroid and cholesterol homeostasis. *Mol Endocrinol* 22, 623–635 (2008).
47. Van Rechem, C. *et al.* The SKP1-Cul1-F-box and leucine-rich repeat protein 4 (SCF-FbxL4) ubiquitin ligase regulates lysine demethylase 4A (KDM4A)/Jumonji domain-containing 2A (JMJD2A) protein. *J Biol Chem* 286, 30462–30470 (2011).
48. Caires, K., Broady, J. & McLean, D. Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells. *J. Endocrinol.* 205, 133–145 (2010).
49. Meng, X. *et al.* Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 287, 1489–1493 (2000).
50. Hobbs, R. M. *et al.* Functional antagonism between Sall4 and Plzf defines germline progenitors. *Cell Stem Cell* 10, 284–298 (2012).

51. Kubota, H., Avarbock, M. R. & Brinster, R. L. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 16489–16494 (2004).
52. Kim, J.-Y. *et al.* KDM3B is the H3K9 demethylase involved in transcriptional activation of *lmo2* in leukemia. *Mol Cell Biol* 32, 2917–2933 (2012).
53. Nicholson, T. B. & Chen, T. LSD1 demethylates histone and non-histone proteins. *Epigenetics* 4, 129–132 (2009).
54. Lu, T. *et al.* Regulation of NF- $\kappa$ B by NSD1/FBXL11-dependent reversible lysine methylation of p65. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 46–51 (2010).
55. Cloos, P., Christensen, J. & Agger, K. Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes & ...* (2008).
56. Shen, X. *et al.* Jumonji modulates polycomb activity and self-renewal versus differentiation of stem cells. *Cell* 139, 1303–1314 (2009).
57. Peng, J. C. *et al.* Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. *Cell* 139, 1290–1302 (2009).
58. Ryu, B.-Y., Orwig, K. E., Oatley, J. M., Avarbock, M. R. & Brinster, R. L. Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells* 24, 1505–1511 (2006).
59. Tachibana, M., Nozaki, M., Takeda, N. & Shinkai, Y. Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *EMBO J* 26, 3346–3359 (2007).
60. Kimura, H., Hayashi-Takanaka, Y., Goto, Y., Takizawa, N. & Nozaki, N. The organization of histone H3 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Cell Struct Funct* 33, 61–73 (2008).

## 謝辞

本研究は、京都大学大学院生命科学研究科准教授（現徳島大学疾患酵素学センター教授）の立花誠博士と理化学研究所主任研究員の眞貝洋一博士のご指導の下行いました。両博士には私の研究活動における様々な局面でご協力くださったことを、ここに深くお礼申し上げます。

本研究の根拠論文の共著者である大阪大学大学院生命機能研究科の木村宏博士には、各種のヒストン修飾抗体を分与していただきました。同じく、共著者の東京大学大学院農学生命科学研究科の中井雄治博士には、マイクロアレイ等の遺伝子発現解析に関する実験の協力を頂きました。また、共著者で眞貝研究室のメンバーである宮地均さん、秋吉美歌さん、登倉美紀世さんには、*Jmjd1c* 遺伝子欠損マウスの作製、マウスの維持・管理や表現型解析の補助等、多くの実験のサポートをしていただきました。ここに深くお礼申し上げます。

また、京都大学ウィルス研究所ゲノム改変マウス研究領域、並びに理化学研究所眞貝細胞記憶研究室の皆さまには多大なご支援をいただきましたことを、ここに深く感謝申し上げます。

最後に、京都大学大学院生命科学研究科教授の米原伸博士には、私が学部生の時から長きにわたり指導をしていただきました。そこで、論理的に物事を考えることの大切さや、教員や学生の身分に関わらず研究者同士は対等であるという研究者としての心構えを学ばせていただきました。また、米原研究室に所属するスタッフや学生の皆さまからも多くのご支援をいただきました。この場を借りて厚くお礼申し上げます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Shunsuke Kuroki, Mika Akiyoshi, Mikiyo Tokura, Hitoshi Miyachi, Yuji Nakai, Hiroshi Kimura, Yoichi Shinkai, and Makoto Tachibana

**JMJD1C, a JmjC Domain-Containing Protein, Is Required for Long-Term Maintenance of Male Germ Cells in Mice**

*Biology of Reproduction*, vol. 89(4) p93-101, 2013