

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06917

研究課題名(和文) 性分化関連遺伝子におけるポリコム標的ゲノム領域の機能解明

研究課題名(英文) Mouse polycomb targets in gonadal development

研究代表者

福井 由宇子 (Katoh-Fukui, Yuko)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・(非)研究員

研究者番号：50342639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：染色体クロマチン構造がダイナミックに変化する発生過程において、Polycomb Group (PcG) 遺伝子は主要なクロマチン構造制御因子である。特にマウスCbx2は生殖腺形成および性分化に必須であることが明らかな唯一のPcGメンバーである。本研究課題では、マウスPcG標的遺伝子領域の*in vivo*特性を明らかにする目的で、研究分担者高田が開発した効率の良いマウスCRISPR/Cas9ゲノム編集システムにより、当該ゲノム領域欠失マウスを作成し、個体レベルでの標的ゲノム領域の機能検証を行う研究基盤を整備した。

研究成果の概要(英文)：In the course of embryonic development, the polycomb group (PcG) proteins are major chromatin components that are involved in the regulation of target genes. Mice lacking the function of the PcG protein Cbx2 show defects in gonadal, adrenal, and splenic development. In particular, XY Cbx2 KO mice develop ovaries but not testes, and the gonads are hypoplastic in both sexes. How Cbx2 regulates target genes in development of these tissues remains largely unknown. In this project, we tried to identify the target region of Cbx2 in embryonic gonad, and further delete the region by CRISPR-Cas9 genome editing in mice, to analyze the molecular mechanisms of Cbx2 in developing gonad.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：Polycomb Mouse Sex determination Gonadal development

## 1. 研究開始当初の背景

染色体クロマチン構造がダイナミックに変化する細胞分化課程において、Polycomb Group (PcG) 遺伝子は主要なクロマチン構造制御因子である。特に Cbx2 は生殖腺形成および性分化に必須であることが明らかな唯一の PcG メンバーである。一方、我々研究グループおよび海外の複数の研究グループの精力的な次世代シーケンサーを用いたヒト性分化疾患原因遺伝子変異解析が行われているが、CBX2 変異は 46,XY complete gonadal dysgenesis 疾患原因遺伝子変異が 1 例報告されているにすぎない (Biason-Lauber et al., Am. J. Hum. Genet., 2009)。さらに追加解析を行ったカリフォルニア研究所からは性分化疾患患者集団に病原性の高い CBX2 変異はなかったという報告がされている (Norling et al., Fertil. Steril., 2013)。

## 2. 研究の目的

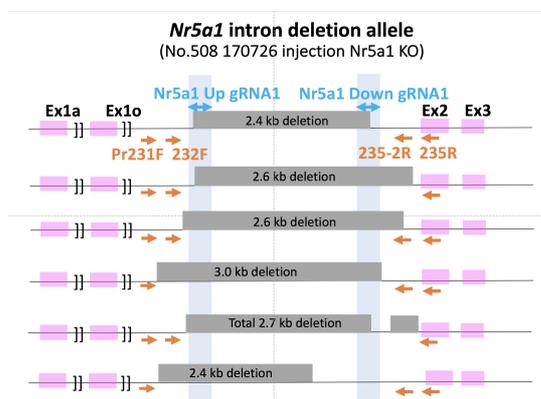
マウス PcG 標的遺伝子領域の *in vivo* における機能を明らかにする。さらに、ヒト疾患との関連性を検証する。

## 3. 研究の方法

本研究課題では、生殖腺形成に関わるマスター遺伝子を制御する Cbx2 に焦点をあて、マウス胚由来細胞における Cbx2 標的ゲノム領域を同定した。さらに CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムにより標的ゲノム領域欠失マウスを作成し、個体レベルでの標的ゲノム領域の機能検証を行うツールを作成した。

## 4. 研究成果

マウス胚生殖隆起由来細胞を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)を行い、Cbx2 標的遺伝



子として Nr5a1 遺伝子ゲノム領域内非翻訳領域 2kb を同定した。研究分担者高田が開発した、効率の良いマウス CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムにより、当該ゲノム領域を欠失するマウスを作成した。合計 152 個の microinjection を行った胚から 6 種類の欠失領域を持つマウスラインを得た(図を参照)。今後、当該領域の *in vivo* における機能を明らかにし、性分化分子機構解明において、新たなゲノム上の解析対象領域を提示する可能性がある。

一方マウスにおいて Cbx2 変異による広汎な表現型が明らかになった。そのため、Cbx2KO マウス表現型解析を進め、出生後骨組織、聴覚組織などにおける表現型を見出し、一部学会発表を行った。これまで性分化疾患患者に CBX2 変異が上述の 1 例のみの報告である。我々の保有する原因不明の性分化疾患においても病原性のある CBX2 変異は認められていない。CBX2 は多くの組織で発現していることから、有害な CBX2 変異を持つ患者は生殖に関わる組織以外にも広範な症状を呈する可能性が考えられる。

## 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 6 件 全件査読あり)

1. Katoh-Fukui Y, Yatsuga S, Shima H, Hattori A, Nakamura A, Okamura K, Yanagi K, Iso M, Kaname T, Matsubara Y, Fukami M. (2018)

An unclassified variant of CHD7 activates a cryptic splice site in a patient with CHARGE syndrome.

Hum Genome Var. 2018 Mar 8;5:18006. (Open access journal)

DOI: 10.1038/hgv.2018.6. eCollection 2018.

2. Hattori A, Katoh-Fukui Y, Nakamura A, Matsubara K, Kamimaki T, Tanaka H, Dateki S, Adachi M, Muroya K, Yoshida S, Ida S, Mitani M, Nagasaki K, Ogata T, Suzuki E, Hata K, Nakabayashi K, Matsubara Y, Narumi S, Tanaka T and Fukami M on behalf of the Japanese SHOX study group (2017)

Next Generation Sequencing-Based Mutation Screening of 86 Patients with Idiopathic Short Stature.

Endocr J. 64:947-954. (Impact factor 1.837,

2016 JCR)

DOI:10.1507/endocrj.EJ17-0150.

3. Hattori A, Zukeran H, Igarashi M, Toguchi S, Toubaru Y, Inoue T, Katoh-Fukui Y, and Fukami M (2017)

A novel C-terminally truncating NR5A1 mutation in dizygotic twins.

Hum Genome Var. 4:17008. (Open access journal)

DOI:10.1038/hgv.2017.8.

4. Miyado M, Inui M, Igarashi M, Katoh-Fukui Y, Takasawa K, Hakoda A, Kanno J, Kashimada K, Miyado K, Tamano M, Ogata T, Takada S, Fukami M. (2016)

The p.R92W variant of NR5A1/Nr5a1 induces testicular development of 46,XX gonads in humans, but not in mice: phenotypic comparison of human patients and mutation-induced mice.

Biol Sex Differ. 7:56. (Impact factor 3.237, 2015 JCR)

DOI:10.1186/s13293-016-0114-6

5. Katoh-Fukui Y, Igarashi M, Nagasaki K, Horikawa R, Nagai T, Tsuchiya T, Suzuki E, Miyado M, Hata K, Nakabayashi K, Hayashi K, Matsubara Y, Baba T, Morohashi K, Igarashi A, Ogata T, Takada S, and Fukami M. (2015)

Lack of Skeletal Dysplasia in Patients with Missense Mutations and Upstream Deletion of SOX9.

Molecular Genetics & Genomic Medicine 3: 550-557. (Open access journal)

DOI:10.1002/mgg3.165

6. Kon M, Suzuki E, Dung VC, Hasegawa Y, Mitsui T, Muroya K, Ueoka K, Igarashi N, Nagasaki K, Oto Y, Hamajima T, Yoshino K, Igarashi M, Kato-Fukui Y, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Matsubara Y, Moriya K, Ogata T, Nonomura K, Fukami M. (2015)

Molecular basis of non-syndromic hypospadias: systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients.

Hum Reprod. 30: 499-506. (Impact factor 4.569, 2014 JCR)

DOI:10.1093/humrep/deu364

[学会発表](国際学会計 5 件)

1. Katoh-Fukui Y, Igarashi M, Nakamura S, Hattori A, Fukami M

Exploring the genetic etiology of Disorders of Sex Development (DSD)-CBX2 variation in DSD patients-

Asian Sex Differentiation Network (The 7th

Gonad Biology Joint Meeting, 2017)

October 16-18, 2017, Nagoya University, Nagoya, Aichi, Japan

2. Hattori A, Katoh-Fukui Y, Igarashi M, Ayabe T, Suzuki E, Nakamura A, Tanaka H, Nagasaki K, Muroya K, Horikawa R, Ida S, Tanaka T, Kamimaki T, Ogata T and Fukami M

Sequence variations in genes of the GH-IGF-1 axis in children with idiopathic short stature

The 9th Biennial Scientific Meeting of the Asia Pacific Pediatric Endocrine Society (APPES)

Nov. 2016, Tokyo, Japan

4. Katoh-Fukui Y, Baba T, Otake H, Sato T, Suyama M, Ohkawa Y, Morohashi K, Tsumura H and Fukami M.

Mouse Polycomb Cbx2 Functions in Skeletal Lineage

The 9th Biennial Scientific Meeting of the Asia Pacific Pediatric Endocrine Society (APPES)

Nov. 2016, Tokyo, Japan

4. Hattori A, Katoh-Fukui Y, Igarashi M, Ayabe T, Suzuki E, Nakamura A, Tanaka H, Nagasaki K, Muroya K and Fukami M.

Mouse Polycomb Cbx2 Functions in Skeletal Lineage

The 9th Biennial Scientific Meeting of the Asia Pacific Pediatric Endocrine Society (APPES)

Nov. 2016, Tokyo, Japan

5. Katoh-Fukui Y, Baba T, Otake H, Sato T, Suyama M, Ohkawa Y, Morohashi K, Tsumura H and Fukami M.

Mouse Polycomb Cbx2 Plays Essential Roles in Postnatal Bone Formation

Mouse Molecular Genetics Meeting

Sep., 2015, Cambridge, England

[学会発表](国内学会計 4 件)

1. Yuko Katoh-Fukui, Shuichi Yatsuga, Hirohito Shima, Atsushi Hattori, Akie Nakamura, Kohji Okamura, Kumiko Yanagi, Manami Iso, Tadashi Kaname, Yoichi Matsubara and Maki Fukami

A de novo CHD7 mutation at the exon/intron junction in a patient with CHARGE syndrome  
第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 年 12 月 6 日

2. 福井由宇子、進導美幸、夏目里恵、崎村建司、津村秀樹、深見真紀

間葉系細胞系列におけるマウスポリコーム  
Cb<sub>x</sub>2 の機能解析  
第 39 回日本分子生物学会年会 ,2016 年 11 月  
30 日

3. 福井由宇子・津村秀樹・深見真紀：  
マウスポリコーム Cb<sub>x</sub>2/M33 ノックアウトマ  
ウスにおける頭蓋冠形成異常  
第 38 回日本分子生物学会年会 ( 第 88 回生化学  
学会大会 ) , 2015 年 12 月 3 日

4. 福井由宇子、五十嵐麻希、長崎啓祐、  
位田忍、堀川玲子、鈴木江莉奈、宮戸真美、  
中村明枝、緒方勤、深見真紀  
Vanishing Testis Syndrome における DSD 関  
連遺伝子の網羅的解析  
第 49 回日本小児内分泌学会学術集会 , 2015  
年 10 月 8 日

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

福井 由宇子 ( 国立成育医療研究センター・  
分子内分泌研究部・特任研究員 )  
研究者番号 : 50342639

### (2)研究分担者

高田修二 ( 国立成育医療研究センター・シス  
テム発生・再生研究部・部長 )  
研究者番号 : 20382856

### (3)連携研究者

該当なし  
研究者番号 :

### (4)研究協力者

該当なし