

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21196

研究課題名(和文) ヒストン修飾エピゲノムを介したほ乳類性決定の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanism of mammalian determination by histone modification

## 研究代表者

黒木 俊介 (KUROKI, Shunsuke)

徳島大学・先端酵素学研究所(次世代)・助教

研究者番号：50735793

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)：体細胞性物の発生・分化は、各種細胞に固有な遺伝子発現プロファイルの制御の上に成り立っている。遺伝子が時空間的に正しく発現するためには、ヒストン修飾やDNAメチル化に代表されるエピジェネティック制御が必須である。私たちは、ヒストン脱メチル化酵素のひとつJmjd1aが、マウス胎児においてY染色体上性決定遺伝子Sryを発現を誘導することを以前報告した。本研究では、この「哺乳類の性がエピゲノムに制御される」という知見の更なる発展を目指して、1)H3K9脱メチル化酵素Jmjd1ファミリーによる共同的なSry発現制御の解明と、2) Sry遺伝子座の新規制御因子の探索、を行った。

研究成果の概要(英文)：Development and differentiation is based on the precise control of gene expression. Epigenetic control by histone modifications and DNA methylation is indispensable for the spatio-temporal proper gene expression. We previously reported that Jmjd1a, one of the histone demethylases, plays a critical role for the expression of sex determination gene Sry in mouse embryos. For further knowledge of "the mammalian sex determination controlled by the epigenome", we have performed the following two projects, 1) Revealing the cooperative epigenetic control of Sry locus by H3K9 demethylase Jmjd1 family, 2) Searching for novel regulators for Sry locus.

研究分野：分子生物学

キーワード：性決定

## 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の発生は、各種の細胞に固有な遺伝子パターンの時間的・空間的な発現制御の上に成りたっている。遺伝子が正しく発現するためには、クロマチン構造変換を介したエピジェネティック制御が重要である。ほ乳類の「性」はY染色体上の性決定遺伝子(転写因子) Sry の発現の有無によって決まるが Sry の発現制御にエピゲノムが果たす役割はほとんど分かっていなかった。研究代表者は以前、抑制性エピゲノム修飾であるヒストン H3の9番目リジンメチル化を外す脱メチル化酵素 Jmjd1a が Sry の活性化に働くことを報告した。(Kuroki S et al., *Science* 2013)。しかし、他のヒストン修飾関連因子の性決定への関与は未だほとんど分かっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、「エピゲノムによるほ乳類の性決定」という新規知見の発展を目指し「Sry のヒストン修飾エピゲノム動態とその制御因子の解明」を目的として、以下の2つの研究計画を立てた。

### 計画 : H3K9 脱メチル化酵素 Jmjd1 ファミリーによる Sry 発現制御の解明

Jmjd1a 欠損により Sry の発現は低下するが、その度合いは部分的であることから、Jmjd1a と相補する因子の存在が予想された。Jmjd1 ファミリーには、Jmjd1a 以外に Jmjd1b と-c の2つが存在する。私はこれまでに、Jmjd1a と Jmjd1b がマウス初期胚の発生に相補的に機能することを見いだしていた。そこで、Sry の H3K9 脱メチル化と発現、それに引き続く性決定についても、同様に Jmjd1b が Jmjd1a と相補すると仮説をたてその検証を行った。

### 計画 : Sry 遺伝子座の新規制御因子の探索

Sry は生殖腺において転写因子 Nr5a1 を高発現する細胞(セルトリ前駆細胞)から発現する。これを利用してセルトリ前駆細胞の遺伝

子発現プロファイルを取得し Sry を制御する新規遺伝子候補を抽出する。候補遺伝子が見つかった場合はその欠損マウスをに作成し、新規の Sry 制御遺伝子の可能性を検証する。

## 3. 研究の方法

計画 : Cre-LoxP システムを用いて、生殖腺体細胞特異的に *Jmjd1a/Jmjd1b* を二重欠損するマウスを作出した。生殖腺体細胞に Cre を発現する Nr5a1-Cre Tg マウスと *Jmjd1a* および *Jmjd1b* の flox マウスを交配した。以降は、生殖腺体細胞特異的なホモ欠損を KO, ヘテロ欠損を Het と表記する。*Jmjd1a* KO/*Jmjd1b* KO マウス(性染色体 XY 型)について、(1) 性転換の頻度を成体マウスの内外生殖器の組織学的解析から判定し、(2) 性定期である胎生 E11.5 日の生殖腺における Sry 発現細胞の割合を組織免疫染色により調べ、また H3K9 メチル化レベルの変化をフローサイトメトリーによって定量した。雄の性決定シグナル経路における *Jmjd1a/Jmjd1b* の作用点を明らかにする目的で、(3) E11.5 日の *Jmjd1a* KO/*Jmjd1b* KO マウス胎児から生殖腺体細胞を精製し RNA-Seq 法により網羅的な遺伝子発現変化を調べた。また、(4) Sry の強制発現 Tg マウスとの交配によって *Jmjd1a* KO/*Jmjd1b* KO マウスにおける性転換がレスキューされるか検証した。上記の各々の実験について *Jmjd1a* および *Jmjd1b* の単独 KO マウスと比較することで、*Jmjd1a/Jmjd1b* 間の相補性を検証した。

### 計画 : Sry 遺伝子座の新規制御因子の探索

Nr5a1-LNGFR Tg マウスを用いて E11.5 日のマウス未分化生殖腺から Nr5a1 高発現細胞(セルトリ前駆細胞)を FACS ソーティングした。比較対象として Nr5a1 低発現細胞も同時に採取した。RNA-Seq 法によりこれらの細胞の遺伝子発現プロファイルを取得し、両者の比較からセルトリ前駆細胞に特徴的発現する遺伝子を Sry 制御の候補因子として抽出した。

#### 4. 研究成果

計画 :

(1) *Jmjd1a* and/or *Jmjd1b* KO マウスにおける性転換頻度は、*Jmjd1a* KO で 13% (7/54 匹), *Jmjd1a* KO/*Jmjd1b* Hett で 91% (39/43 匹), そして *Jmjd1a* KO/*Jmjd1b* KO では 100% (46/46 匹)だった。一方で *Jmjd1a* Het/*Jmjd1b* KO で性転換頻度は 0%だった (0/36 匹) (図 1)。

(2) E11.5 日の生殖線における *Sry* の発現低下の度合いは上記の性転換の頻度と相関した。すなわち *Jmjd1a* KO/*Jmjd1b* KO ではほぼ完全に *Sry* の発現が観察されず、次に *Jmjd1a* KO/*Jmjd1b* Het, *Jmjd1a* 単独 KO の順番で発現の低下が観察された。一方で生殖腺体細胞における H3K9me2 レベルは *Sry* 発現とは逆相関の関係にあり、*Jmjd1a* KO/*Jmjd1b* KO でそのレベルは最も大きく亢進した。(3) RNA-Seq 解析の結果、*Jmjd1a* KO/*Jmjd1b* KO によって *Sry* の発現レベルは顕著に低下していたが、*Nr5a1*, *Gata4*, *Wt1* 等の既知の上流因子群の発現に変化はなかった。(4) *Sry* Tg マウスとの交配によって *Jmjd1a* KO/*Jmjd1b* KO マウスの性転換は 100%の確立でレスキューされた (9/9 匹)。以上の一連の実験結果から、マウスの性決定において、*Jmjd1a*/*Jmjd1b* の間に機能的な相補があること、*Jmjd1a* がドミナントに働き *Jmjd1b* は補助的な役割を担うこと、*Jmjd1a*/*Jmjd1b* の作用点は *Sry* である可能性が高いこと、を明らかにした。今後は ChIP-qPCR または ChIP-Seq 法を用いて *Sry* 遺伝子上の H3K9me2 レベルや *Jmjd1a*/*Jmjd1b* の局在を明らかにする必要があるだろう。

計画 :

セルトリ前駆細胞に特異的に発現する遺伝子として 323 個を抽出した。既知の *Sry* 制御遺伝子 13 個のうち 8 個がこの中に含まれていた。したがって、抽出した 323 個の遺伝子

の中には新規の *Sry* 制御遺伝子も含まれている可能性が高いと考えている。現在、この中から KO マウス作製に進む遺伝子を選別中である。

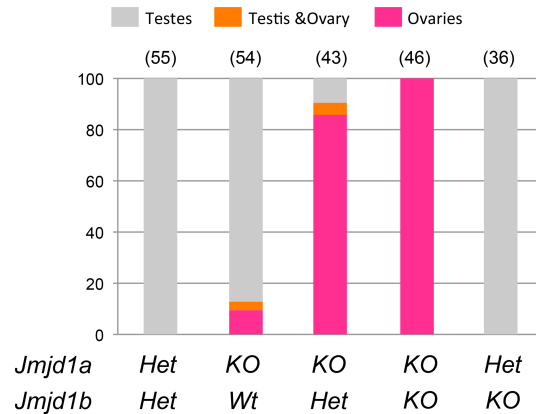


図 1 生殖腺体細胞特異的な *Jmjd1a* and/or *Jmjd1b* 欠損マウス (XY 型) における性転換頻度。各遺伝子型のマウス成体について、内生殖器の雌雄を調べた。カッコ内は個体数を示す。

#### 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)

Shunsuke Kuroki, Naoki Okashita, Baba Shoko, Maeda Ryo, Shingo Miyawaki, Masashi Yano, Yamaguchi Miyoko, Kitano Satsuki, Miyachi Hitoshi, Itoh Akihiro, Yoshida Minoru and Makoto Tachibana :

Rescuing the aberrant sex development of H3K9 demethylase *Jmjd1a*-deficient mice by modulating H3K9 methylation balance, *PLoS Genetics*, Vol.13, No.9, e1007034, 2017, 査読有

DOI: 10.1371/journal.pgen.1007034

[学会発表] (計 6 件)

Shunsuke Kuroki :

Restoring the aberrant sex development of H3K9 demethylase *Jmjd1a*-deficient mice by modulating H3K9 methylation balance,

*Asian Sex Differentiation Network (7th Gonad Biology Joint Meeting, 2017)*, 2017年10月16-17日, 名古屋大学, 愛知県名古屋市

**黒木 俊介, 立花 誠:**

ヒストンH3K9脱メチル化酵素Jmjd1a/bの機能解析,

*新学術領域研究 3領域合同若手勉強会 2017*, 2017年6月7-9日, 白浜温泉むさし, 和歌山県白浜町

**Shunsuke Kuroki and Makoto Tachibana:**

Role of H3K9 methylation and demethylation enzymes in mouse development,

*11th International Symposium of The Institute Network, Frontiers in Biomedical Sciences*, 2017年1月26-27日, 徳島大学, 徳島県徳島市

**黒木 俊介, 立花 誠:**

Regulation of germ cell development by histone demethylation,

*1 回次世代生命科学の研究会*, 2016年8月12-13日, 徳島大学, 徳島県徳島市

**黒木 俊介:**

セルトリ細胞機能におけるヒストンメチル化酵素Esetの役割,

*新学術領域研究 "生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御" "ステムセルエイジングから解明する疾患原理" 合同若手勉強会 2016*, 2016年7月27-29日, 亀の井ホテル, 大分県別府市

**黒木 俊介, 立花 誠:**

H3K9脱メチル化酵素Jmjd1aとJmjd1bによる雄性生殖細胞の発生制御,

*第10回日本エピジェネティクス研究会年会*, 2016年5月19-20日, 千里ライフサイエンスセンター, 大阪府吹田市

[その他]

ホームページ等

<https://ouyoukous01.a1t231.tokushima-u>

[.ac.jp/](#)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒木 俊介 (KUROKI, Shunsuke)

徳島大学・先端酵素学研究所・助教

研究者番号: 50735793