

令和元年6月18日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17924

研究課題名(和文) 哺乳類の性決定における母体の栄養代謝環境の研究

研究課題名(英文) The influence of maternal nutrition on sex determination

研究代表者

宮脇 慎吾 (MIYAWAKI, Shingo)

徳島大学・先端酵素学研究所(次世代)・特任助教

研究者番号：70756759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の性は、Y染色体に存在するSryの有無によって先天的に決まると考えられており、現在まで、後天的な「環境」の影響は考慮されてこなかった。近年、性決定を制御するエピゲノムが明らかになり、遺伝的な性決定に加えて、新たに「環境」が性決定の要因となる可能性が浮上した。本課題では、哺乳類の性決定における「環境」は母体であると考え、母親の栄養が胎仔生殖腺の代謝を制御して性決定に影響を与えるかを検証した。本研究期間に、マウスの性決定時期に活性化する17個の代謝関連遺伝子を見出し、その遺伝子を欠損したマウスの性決定への影響を評価した。結果として、脂肪酸代謝経路が性決定に影響を与える可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物が有性生殖を行うためのシステムである雌雄への性決定様式は多様であり、線虫や魚類、爬虫類などでは、環境に依存した栄養状態により雌雄の決まる種が存在する。これまで、哺乳類の性決定における環境と代謝に関する報告は世界的になく、本研究により初めて、哺乳類の性が環境による影響を受けることが示される。また、本研究は妊娠時の栄養管理に重要な知見を与え、ヒトの性分化疾患や胎仔発育異常の新たな原因及び疾患のメカニズムの解明に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Mammalian sex is determined by the expression of Sry in the fetal gonadal somatic cells (pre-Sertoli cells). We previously found that epigenetic regulation plays an important role on Sry regulation. The discovery of the fundamental role of epigenetic regulation of Sry led to a new research area, namely, on the mechanistic link between environmental cues and sex determination. Embryonic development may be influenced by the maternal nutritional and metabolic state as fetal environment. We speculate that the metabolism of fetal pre-Sertoli cells may influence their sex determination process.

We first compared the gene expression between pre-Sertoli cells and the other gonadal somatic cells at the sex-determining period. Gene ontology analysis showed that metabolism-related process is enriched in pre-Sertoli cells. To investigate the role of metabolic genes on sex determination, we generated knockout mice of these genes using CRISPR-Cas9 system and examined the effect on sex determination.

研究分野：分子生物学

キーワード：性決定 エピゲノム ゲノム編集 代謝 Sry

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の性は、Y染色体上に存在する性決定遺伝子 Sry の有無により遺伝的に決定されるとされてきた (Koopman et al., *Nature* 1991)。申請者の研究室では、哺乳類の性決定には、正しい時期に必要な量の Sry を厳密に発現するためのエピゲノム制御が重要であることを示した (Miyawaki et al., *Curr Top Dev Biol* 2019, Kuroki et al., *PLoS Genet* 2017, Kuroki et al., *Science* 2013)。

哺乳類の性は、Y染色体の有無によって先天的に決まるものと考えられており、現在に至るまで、後天的な「環境」の影響は考慮されてこなかった。一般的に、エピゲノムは「環境」と「遺伝子」をつなぐメカニズムであるとされる。近年、「環境」によるエピゲノム制御が個体の発生や細胞の分化に重要な役割をもつことが明らかになってきている (Carmeliet et al., *Nature*, 2017)。性決定を制御するエピゲノムが明らかになったことにより、遺伝的な性決定に加えて、新たに「環境」が性決定の要因となると申請者は考えた。

### 2. 研究の目的

申請者は、哺乳類の性決定における「環境」は母体であると考え、母親の栄養状態が「胎仔生殖腺の代謝」を制御し、エピゲノムを介して性を決定すると仮説を立てた。本課題では哺乳類の性決定における「環境」としての母体の役割と胎仔生殖腺の代謝の役割をエピゲノム動態の観点から検証する。哺乳類の胎仔の発育に必要な栄養分は、胎盤を通して母体から供給されるため、胎仔の発生は、母体から様々な影響を受けると考えられる。興味深いことに、ヒトやマウスを含む多くの哺乳類で性決定期と胎盤形成期は一致しており、性決定期の胎仔生殖腺では劇的な代謝変化が生じていると考えられる。

さらに、後述する生殖腺体細胞で高発現していることを見いだした *Ldha* や *Cpt1a* は、それぞれ T 細胞の分化やリンパ管内皮細胞の分化を、代謝産物を介したエピジェネティック制御により調節する (Peng et al., *Science* 2016, Carmeliet et al., *Nature* 2017)。申請者は生殖腺の分化過程においても、代謝変化によるエピジェネティック制御を介した分化調節機構が存在するのではないかと考えた。

### 3. 研究の方法

ヒストンの脱メチル化酵素である *Jmjd1a* を欠損したマウスは、Y染色体を持つにもかかわらず、完全な性転換および部分的な性転換である半陰陽が 60% の割合で混在する。つまり、*Jmjd1a* 欠損マウスは雌雄への分化が拮抗しており、環境による影響を選別するツールとして有用である。本研究課題では、*Jmjd1a* 欠損マウスを用いて、哺乳類の性決定に影響を及ぼす妊娠期の母体環境の探索、性決定時期の生殖腺体細胞の代謝プロファイルの検証、*Jmjd1a* に加えて代謝関連遺伝子を欠損させたノックアウトマウスを作製して性転換効率への影響を検証した。

### 4. 研究成果

*Jmjd1a* 欠損マウスを妊娠した母体に、種々の飼料や高脂肪食、カロリー制限食、酢酸 (アセチル化の基質) および、DCA (解糖系の阻害剤) の摂取などの条件を検証した結果として、妊娠中の母親に飼料 B を与えたマウスは 100% の割合で性転換を生じることを見いだした (図 1)。一方で、母体の栄養を受容する胎仔生殖腺の代謝経路を明らかにするために、RNA-seq 法により網羅的な遺伝子発現解析を実施し、クエン酸回路の律速酵素である *Idh1*、脂肪酸代謝の律速酵素である *Cpt1a*、および解糖系の酵素である *Ldha* などの生殖腺体細胞で高発現する 17 個の代謝関連遺伝子を同定した。代謝の活性化により生じるアセチル CoA や  $\alpha$ -ケトグルタル酸などの代謝産物はエピゲノム制御に関わることが知られている。胎仔生殖腺体細胞では代謝が活性化しており、エピゲノム制御に影響を与える可能性が考えられる。エレクトロポレーションによる CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集により 17 個の代謝関連遺伝子のノックアウトマウスを作製した。ノックアウトマウスを作成する手段として、タンパクをコードする領域に、Flag タグと終始コドン挿入し、遺伝子の途中でタンパクの翻訳を止め、Flag タグにより改変されたタンパクを検出する方法を確立した。この方法により、効率的に遺伝子ノックアウトマウスの作製が可能となった。

作製したノックアウトマウスを解析した結果として、多くの遺伝子欠損マウスでは性転換効率に影響を与えなかったが、脂肪酸代謝の律速酵素を欠損したマウスは *Jmjd1a* 欠損マウスの性

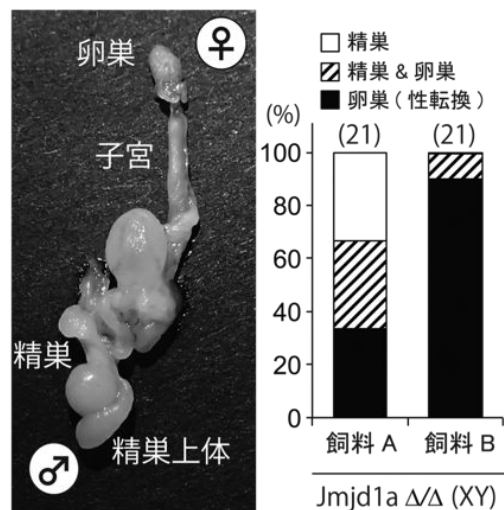


図 1: 左 *Jmjd1a* 欠損マウスの生殖腺 右 飼料による性転換効率の違い。

転換効率を上昇させることを見出した(図2)。また、性決定後の胎仔期の生殖腺体細胞の Sox9 (オスマーカー) と Foxl2 (メスマーカー) を免疫染色により評価したところ、脂肪酸代謝酵素を欠損したマウスでは有意に Foxl2 陽性の細胞が増えていることが明らかになった(図2)。現在、脂肪酸代謝経路と Sry の関係をエピゲノム動態の観点から解析している。

生物が有性生殖を行うためのシステムである雌雄への性決定様式は多様であり、線虫や魚類、爬虫類などでは、環境に依存した栄養状態により雌雄の決まる種が存在する。こ

れまで、哺乳類の性決定における環境と代謝に関する報告は世界的になく、本研究により初めて、哺乳類の性が環境による影響を受けることが示される。また、本研究は妊娠時の栄養管理に重要な知見を与え、ヒトの性分化疾患や胎仔発育異常の新たな原因及び疾患のメカニズムの解明に繋がると期待される。

#### <参考文献>

Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*.351(6322):117-21,1991.

Kuroki S, Matoba S, Akiyoshi M, Matsumura Y, Miyachi H, Mise N, Abe K, Ogura A, Wilhelm D, Koopman P, Nozaki M, Kanai Y, Shinkai Y, Tachibana M. Epigenetic regulation of mouse sex determination by the histone demethylase Jmjd1a. *Science*.341(6150):1106-9, 2013.

Wong BW, Carmeliet P et al. The role of fatty acid  $\beta$ -oxidation in lymphangiogenesis. *Nature*.542(7639):49-54, 2017.

#### 5 . 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計2件)

Miyawaki S, Tachibana M. Role of epigenetic regulation in mammalian sex determination. *Curr Top Dev Biol*. 134: 195-221, 2019. 査読有  
DOI: [10.1016/bs.ctdb.2019.01.008](https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.01.008)

Kuroki S, Okashita N, Baba S, Maeda R, Miyawaki S, Yano M, Yamaguchi M, Kitano S, Miyachi H, Itoh A, Yoshida M, Tachibana M. Rescuing the aberrant sex development of H3K9 demethylase Jmjd1a-deficient mice by modulating H3K9 methylation balance. *PLoS Genet*. 26;13(9):e1007034, 2017. 査読有  
DOI:10.1371/journal.pgen.1007034.

##### [学会発表](計3件)

Miyawaki S, Okashita N, Kuroki S, Tachibana M. THE EFFECT OF MATERNAL DIET AND NUTRITIONAL STATUS ON MAMMALIAN SEX DETERMINATION. International Society for Stem Cell Research Annual Meeting. Los Angeles, 2019.

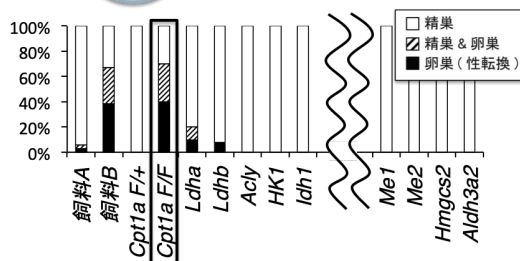
宮脇慎吾. 性決定遺伝子 Sry の近傍に転写される新規性決定因子 Srx/Srz の機能解析. 新学術領域研究「性スペクトラム」第1回若手研究会. 静岡, 2019.

Miyawaki S, Kuroki S, Tachibana M. Effect of maternal diet and nutritional status on mammalian sex determination. The 11th International Symposium of the Institute Network. Fukuoka, 2018.

##### [図書](計0件)

##### [産業財産権]

出願状況(計0件)



脂肪酸代謝の律速酵素Cpt1aが性決定に関与

図2:代謝遺伝子のKOマウスを作製

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://ouyoukousou01.ait231.tokushima-u.ac.jp/index.html>

## 6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。