

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14676

研究課題名(和文)哺乳類性決定を司る新規エピゲノム因子の探索と機構の解明

研究課題名(英文)Searching for novel epigenetic regulators for mammalian sex determination

研究代表者

黒木 俊介(Kuroki, Shunsuke)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

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)：哺乳類の「性」はY染色体の有無という先天的ゲノム情報によって決まると理解されてきた。一方、後天的ゲノム情報であるエピゲノムの性決定への関与はよく分かっていなかった。私たちは近年、ヒストンメチル化制御酵素であるJmjd1aやGLP/G9aがエピゲノムの制御を介して性決定に寄与することを示してきた。しかし、性決定を司るエピゲノム制御系の全容は未だ明らかでない。本研究では、「エピゲノムによる哺乳類の性決定」という独自の知見の更なる発展を目指した。マウス遺伝学・分子生物学手法を駆使して、性決定遺伝子Sryを制御する新規酵素と、新たな性決定関連因子の探索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの性分化疾患(DSD, Disorders of Sex Development)は性の決定・分化が正しく進行しない場合に発症する病気である。DSDの半数以上の症例でその原因は未だ不明である。本研究によって進展したエピゲノムを介した性決定の分子基盤の知見が、DSD発症の新たな原因解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：It has been well known that mammalian sex-determination is made by the sex chromosome system XX (female)/XY (male). On the other hand, the involvement of epigenome in sex determination was not well understood. Recently, we have shown that histone methylation-regulating enzymes Jmjd1a and GLP/G9a contribute to sex determination. However, the whole epigenomic control system that governs sex determination is not yet clear. In this study, we searched for novel epigenetic factors that control the sex-determination. As a result, we have found that histone demethylase Jmjd1b plays a complementary role to Jmjd1a for the expression of sex-determining gene Sry.

研究分野：発生生物学

キーワード：性決定

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子が正しく発現するためには、転写因子による直接的な制御と、クロマチン構造変換を介したエピジェネティック制御の両方が必要である。エピジェネティック制御において、ヒストン N 末端への様々な化学修飾は中心的な役割を果たしている。その中で、ヒストン H3 の 9 番目リジン (H3K9) に対するメチル化は転写の抑制マークである。

性の決定と雌雄の分化は、有性生殖を行う生物が種を存続する上で最も重要なイベントのひとつである。哺乳類は XY 型の性決定様式をもち、Y 染色体をもつ個体が雄になる。1990 年に Y 染色体上の性決定遺伝子 *Sry* が発見されて以来、性決定に関わる転写因子が数多く同定されてきた。その結果、哺乳類の「性」は Y 染色体の有無という先天的ゲノム情報によって決まると理解されてきた。一方、後天的ゲノム情報であるエピゲノムの性決定への関与はよく分かっていない。私は近年、ヒストン H3K9 メチル化制御酵素である *Jmjd1a* や *GLP/G9a* がエピゲノムの制御を介して性決定に寄与することを示した (引用 1, 2)。しかし、性決定を司るエピゲノム制御系の全容は未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1) *Sry* の H3K9 脱メチル化を制御する新規因子の同定 : 我々はこれまでに、*Jmjd1a* が *Sry* の発現を正に制御し雄への分化を誘導すること、*Jmjd1a* 欠損マウス (XY 型) は一定の頻度で雄から雌への性転換を起こすことを示した。しかし、*Jmjd1a* 欠損マウスにおける *Sry* 発現の低下は部分的であったことから、*Jmjd1a* に相補する因子の存在が示唆されていた。我々は最近、遺伝子欠損マウスを用いた一連の解析から、生殖腺において *Jmjd1a/Jmjd1b* を二重欠損したマウス (XY 型) は全ての個体が性転換を起こす証拠を得ていた。そこで本研究では、*Jmjd1b* が *Jmjd1a* と共に *Sry* を標的とする仮定し、*Jmjd1b* が *Sry* のエピジェネティック制御に寄与する新規の H3K9 脱メチル化酵素であることを示すことを目的とした。

(2) *Sry* 遺伝子座の新規制御因子の探索 : 我々はこれまでに、H3K9 脱メチル化酵素 *Jmjd1a* と H3K9 メチル化酵素 *GLP/G9a* が *Sry* を直接的に制御の標的とすること、すなわちこれらの酵素が *Sry* 遺伝子座に特異的に集積することを示した。しかしながら、*Jmjd1a* や *GLP/G9a* が *Sry* 遺伝子座にリクルートされる分子機構は分かっていない。いずれの酵素も DNA 配列を認識する機能ドメインをもたないことから、未知の因子との複合体形成を通して標的遺伝子にリクルートされることが予想される。本計画では、この未知のリクルート因子の同定を目的に、申請者がこれまでに構築したセルトリ前駆細胞の遺伝子発現データから、性決定期である胎生 11.5 日に特異的に発現する遺伝子 X に注目し、これらの遺伝子が性決定プロセスに関与する可能性を検証することとした。

3. 研究の方法

(1)-A *Jmjd1b* の生殖腺における発現パターンの解析 : 胎児性決定期における *Jmjd1b* の発現を明らかにする目的で、胎生 11.5 日マウス生殖腺において *Jmjd1b* に対する組織免疫学染色を行った。免疫染色に適用可能な抗 *Jmjd1b* 抗体が無かったことから、代わりに我々が以前樹立した *Jmjd1b* 遺伝子座末端に Flag タグを挿入したノックインマウスを用いて、抗 Flag 抗体により *Jmjd1b* を検出した。

(1)-B *Sry* 遺伝子座における H3K9 メチル化レベルの解析 : *Jmjd1a/b* の *Sry* H3K9 メチル化機能の相補性を解明する目的で、生殖腺体細胞特異的な *Jmjd1a/b* DKO マウス、*Jmjd1a* と *Jmjd1b* の単独 KO マウスから生殖腺体細胞を精製し、ChIP-qPCR 法により *Sry* 上の H3K9 メチル化レベルを比較した。生殖細胞特異的な欠損マウスの作出には、Nr5a1-Cre Tg マウスと *Jmjd1a/b* の flox マウスを用いた Cre-loxP システムを使用した。生殖腺体細胞の精製には Cre 依存的に *LNGFR* を発現する磁気標識分離用の *LNGFR* ノックインマウスを細胞の精製に用いた。

(2)-A ゲノム編集による欠損マウスの作出と性転換の検討 : 性決定期生殖腺体細胞において最も特異的に強く発現する遺伝子のひとつ遺伝子 X について、CRISPR/Cas9 の受精卵エレクトロポレーション法によるゲノム編集により遺伝子欠損マウス作出した。その F1 世代のヘテロ欠損体同士を掛けあわせ、得られた F2 世代のホモ欠損体の雌について Y 染色体有無をジェノタイプング PCR により判定し、性転換の有無を検証した。

(2)-B GFP ノックインマウスの作出と発現パターンの解析 : 遺伝子 X について、内在性の組織発現パターンを明らかにする目的で、遺伝子 X の末端に P2A ペプチドと GFP-NLS を挿入したノ

ックインマウスを、長鎖一本鎖 DNA と CRISPR/Cas9 の受精卵エレクトロポレーション法により樹立した。作出したノックインマウスの胎児性決定期における遺伝子 Y の発現を免疫組織学染色により検討した。

4. 研究成果

(1)-A: 性決定期の胎生 11.5 日において、Jmjd1b は生殖腺・中腎・生殖細胞などほぼ全ての細胞にシグナルが検出され、Jmjd1b はユビキタな発現様式を示すことが示唆された(図 1)。一方で Jmjd1a は生殖腺体細胞において Sry とよく似た一過的な発現を示すことから(文献 1)、Jmjd1a と Jmjd1b は発現様式が異なることが明らかとなった。

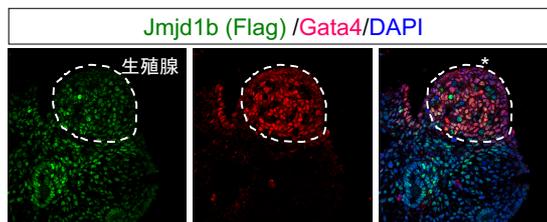


図1. 胎生11.5日生殖腺におけるJmjd1bの発現

(1)-B: Jmjd1a/Jmjd1b を二重欠損した性決定期(胎生 11.5 日目)のマウス生殖腺体細胞を精製し、ChIP-qPCR 法により Sry 遺伝子座の H3K9 レベルを調べた。結果、二重欠損マウスでは、Jmjd1a または Jmjd1b の欠損マウスと比較して H3K9 レベルが顕著に増加したことから、Jmjd1a/Jmjd1b が協調して Sry の遺伝子座の H3K9 を脱メチル化することが示唆された。これまでの研究から、抑制性ヒストン修飾マーク H3K9 の脱メチル化酵素のうち Jmjd1a と Jmjd1b が Sry の発現に機能相補することを明らかにしていた。今回の研究から、Sry の H3K9 脱メチル化および Sry の正の発現制御において、1) Jmjd1b は Jmjd1a 機能相補すること、2) Jmjd1a/Jmjd1b のうち Jmjd1a の方がドミナントかつ特異的に発現する酵素であり、Jmjd1b はバックアップに働くことが示唆される。

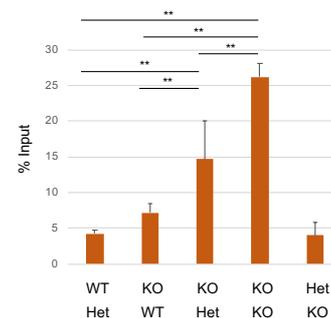


図2 生殖腺体細胞の Sry H3K9メチル化

(2)-A: 遺伝子 X のヘテロ欠損マウス同士の交配の結果、メンデル則に従ってホモ欠損体の仔が得られた。得られた雌の Y 染色体の有無を調べた結果、Y 染色体を持つ性転換個体はいなかったことから(n=11)、遺伝子 Y は雄への性決定に必須ではないことが判明した。

(2)-B: 遺伝子 X の P2A-GFP ノックインマウスを用いて、E11.5 日目の生殖腺における発現パターンを抗 GFP 抗体による免疫組織染色により確認した。結果、GFP のシグナルは生殖腺のみで確認された。GFP 陽性細胞はセルトリ前駆細胞が含まれる Nr5a1 強陽性細胞と一致した(図 3)。前述の結果から遺伝子 X は性決定に必須の遺伝子ではなかったが、セルトリ細胞系列を前駆細胞の段階から標識するマーカー遺伝子として使用可能であることが示唆された。

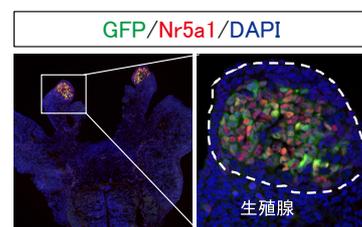


図 3 生殖腺における遺伝子 X の発現

<引用文献>

1. [Kuroki S et. al.](#), “Epigenetic regulation of mouse sex determination by the histone demethylase Jmjd1a” *Science* 341, p1106 (2013)
2. [Kuroki S et. al.](#), “Rescuing the aberrant sex development of H3K9 demethylase Jmjd1a-deficient mice by modulating H3K9 methylation balance” *Plos Genet.* 13, e1007034 (2017)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chen Jiancheng, Kuroki Shunsuke, Someda Masataka, Yonehara Shin	4. 巻 294
2. 論文標題 Interferon- induces the cell surface exposure of phosphatidylserine by activating the protein MLKL in the absence of caspase-8 activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 11994 ~ 12006
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.007161	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okashita Naoki, Kuroki Shunsuke, Maeda Ryo, Tachibana Makoto	4. 巻 9
2. 論文標題 TET2 catalyzes active DNA demethylation of the Sry promoter and enhances its expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-50058-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Someda Masataka, Kuroki Shunsuke, Miyachi Hitoshi, Tachibana Makoto, Yonehara Shin	4. 巻 27
2. 論文標題 Caspase-8, receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1), and RIPK3 regulate retinoic acid-induced cell differentiation and necroptosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Death & Differentiation	6. 最初と最後の頁 1539-1553
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41418-019-0434-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuroki Shunsuke, Tachibana Makoto	4. 巻 468
2. 論文標題 Epigenetic regulation of mammalian sex determination	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 31 ~ 38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mce.2017.12.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuroki Shunsuke, Nakai Yuji, Maeda Ryo, Okashita Naoki, Akiyoshi Mika, Yamaguchi Yutaro, Kitano Satsuki, Miyachi Hitoshi, Nakato Ryuichiro, Ichiyanagi Kenji, Shirahige Katsuhiko, Kimura Hiroshi, Shinkai Yoichi, Tachibana Makoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Combined Loss of JMJD1A and JMJD1B Reveals Critical Roles for H3K9 Demethylation in the Maintenance of Embryonic Stem Cells and Early Embryogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1340 ~ 1354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2018.02.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masaki Kaito, Sakai Mizuki, Kuroki Shunsuke, Jo Jun-ichiro, Hoshina Kazuo, Fujimori Yuki, Oka Kenji, Amano Toshiyasu, Yamanaka Takahiro, Tachibana Makoto, Tabata Yasuhiko, Shiozawa Tanri, Ishizuka Osamu, Hochi Shinichi, Takashima Seiji	4. 巻 10
2. 論文標題 FGF2 Has Distinct Molecular Functions from GDNF in the Mouse Germline Niche	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1782 ~ 1792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2018.03.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 黒木俊介
2. 発表標題 H3K9 Demethylases Jmjd1a and Jmjd1b Control Prospermatogonia to Spermatogonia Transition in Mouse Germline
3. 学会等名 新学術領域「性スペクトラム-連続する表現型としての雌雄」第3回領域会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒木俊介
2. 発表標題 ヒストンH3K9脱メチル化による生殖細胞の分化と制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒木 俊介
2. 発表標題 H3K9脱メチル化酵素による雄性生殖細胞の発生制御
3. 学会等名 新学術領域研究「性スペクトラム-連続する表現型としての雌雄」第1回 若手研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒木 俊介
2. 発表標題 H3K9脱メチル化による雄性生殖細胞の発生制御
3. 学会等名 新学術領域「性スペクトラム-連続する表現型としての雌雄」第2回 領域会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒木 俊介
2. 発表標題 後天的ゲノム修飾による性決定プログラム分子基盤の解明
3. 学会等名 第121回 日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----