

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20H03262
研究課題名（和文）性決定遺伝子SryがH3K9脱メチル化の標的となる機構の解明

研究課題名（英文）The mechanism of H3K9 demethylation at the Sry locus

研究代表者
黒木 俊介（Kuroki, Shunsuke）

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授

研究者番号：50735793
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：性の決定と雌雄の分化は、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。Y染色体上の性決定遺伝子Sryを含め性決定に関わる転写因子が数多く同定されている。一方、エピゲノムの性決定への関与はまだよく分かっていない。本研究ではヒストンH3K9脱メチル化制御酵素Jmjd1aがSry遺伝子座を標的とするメカニズムを解明する目的で、Jmjd1aと結合するタンパク質を探索した。その結果、その候補として機能未知のZnフィンガータンパク質を同定した。

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。本研究によって同定した新規因子と性決定の関わりを明らかにすることで、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）：Sex determination and sex differentiation are the most important events in the survival of a species, and many transcription factors involved in sex determination have been identified, including the sex determination gene Sry on the Y chromosome. On the other hand, how the epigenome is involved in sex determination is still poorly understood. In this study, we searched for proteins that bind to Jmjd1a to elucidate the mechanism by which Jmjd1a, a histone H3K9 demethylase, targets the Sry locus. As a result, we identified a novel Zn finger protein as a candidate.

研究分野：発生生物学

キーワード：性決定

1. 研究開始当初の背景

ほ乳類をはじめとした高等真核生物の個体発生の過程において、遺伝子が正しく発現するためには、転写因子による制御と、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。種々のエピジェネティック制御においてヒストン 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 染色体上の性決定マスター遺伝子 *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、エピジェネティック制御の性決定への関与はよく分かっていない。私はこれまでに、ヒストン H3K9 に対する脱メチル化制御酵素 *Jmjd1a* やメチル化酵素 *GLP/G9a* が H3K9 メチル化の制御を介して性決定に寄与することを示してきた (引用 1, 2)。しかし、性決定を司るエピゲノムの全容は未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

Sry の発現様式は極めて厳密である。マウスを例にとると、生涯を通じて *Sry* の発現が観察される細胞は、染色体 XY 型の胎仔における生殖腺のごく一部の細胞のみである。発現のタイミングも極めて特徴的であり、胎生 11.0 日目から発現し、11.5 日でピークを迎え、以降速やかに消失する。興味深いことに、約 30 種類あるヒストン脱メチル化酵素の中で、胎仔性決定期で発現の場所・タイミングが *Sry* のパターンと一致するのは、*Jmjd1a* 1 種類のみである。このことは、*Jmjd1a* が *Sry* の厳密な発現様式のために特化したエピゲノム酵素であり、性決定におけるこの酵素の重要性を示している。*Jmjd1a* は構造的に DNA やヒストン修飾を認識するドメインをもたないことが予想されることから、*Jmjd1a* は未知のタンパク質との結合を介して *Sry* 遺伝子座にリクルートされる可能性が高い。以上をふまえ、本研究では、*Jmjd1a* の相互作用因子を近年注目される近依存性ビオチン標識法により同定し、*Jmjd1a* が *Sry* 遺伝子座を標的とする分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 近依存性ビオチン化標識法による *Jmjd1* 相互作用タンパク質の同定：

マウス受精卵のゲノム編集により、近依存性ビオチン化酵素 TurboID (TbID) を *Jmjd1a* 遺伝子座の CDS 末端に挿入したノックインマウス (*Jmjd1a-TbID*) を作製し、このマウス系統から *Jmjd1a-TbID* 融合タンパク質を発現する ES 細胞株を樹立した。この細胞を用いて *Jmjd1a* と近接するタンパク質を網羅的にビオチン化し、質量分析により同定した。比較用のコントロールとして TbID に NLS を付加したタンパク質を発現する ES 細胞を用いて同様の実験を行った。

(2) *Jmjd1a* 相互作用タンパク質の解析

上記の実験から得られた *Jmjd1a* 相互作用タンパク質の候補のうち、コントロールと比べて最もビオチン化スコアの高い機能未知の Zn フィンガータンパク質 (仮に ZFP と表記) に着目した。HEK293T によるタンパク質の過剰発現の実験系を使い、共免疫沈降法によって ZFP が実際に JMJD1A と実際に結合するか否か検討した。次に、*Jmjd1a* との相互作用に必要な ZFPN の領域を決定するために、ZFP 欠損変異体を用いて JMJD1A との共免疫沈降を行った。

(3) *Jmjd1a* 相互作用タンパク質の *in vivo* 解析

1. ZFP の生体内局在を明らかにする目的で ZFP 遺伝子座の CDS 末端に V5 タグを挿入した KI マウスを作製し、このマウスを用いて組織免疫染色により *Jmjd1a* と細胞局在を比較した。

2. もし ZFP が *Jmjd1a* を *Sry* 遺伝子座にリクルートする因子ならば、ZFP KO マウスでは *Jmjd1a* KO マウスと同様に XY 型の個体が雌への性転換を起こすことが予想される。この仮説を検証する目的で、ZFP の Zn フィンガードメインをコードするエキソンを欠失した KO マウスをゲノム編集により樹立した。このマウスを用いて、性転換の表現型解析を行った。

4. 研究成果

(1) 独立して2回の実験を行い、それぞれ217個と282個のタンパク質ペプチドを検出し、両方に共通する122個をJmjd1a相互作用タンパク質の候補として得た。次にDAVIDを用いてDNAまたはクロマチンに結合することが予想される因子を絞り込み、結果、Jmjd1aと結合するクロマチン関連因子として28個の候補を得た。このうち最もスコアの高い機能未知のZnフィンガータンパク質ZFPに注目して以後の実験を行った。

(2) 共免疫沈降法によってZFPが実際にJmjd1aと実際に結合することが確認された。ZFPは、AlphaFold2を用いた構造予測から、Znフィンガーモチーフが集約するドメインとHelix-Turn-Helixが集約するN末端ドメインもつことが予想される。これらの領域の変異体ZFPとJmjd1aとの相互作用を調べた結果、ZFPとJmjd1aの結合には、ZFPのN末端側ドメインが重要であることが明らかになった (Fig.1)。

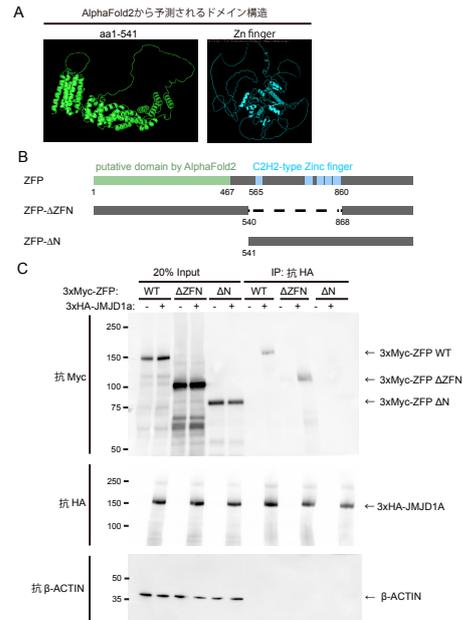


Fig.1 Jmjd1a 相互作用タンパク質の解析

(3) Jmjd1a はマウス精巣のパキテン期生殖細胞に最も強く発現する。データベースの情報からZFPも精巣に高発現することから示唆されたことから、ZFP-V5 KI マウスの精巣を用いてZFPとJmjd1aに対する組織免疫染色を行った。結果、ZFPタンパク質はJmjd1aと同じくパキテン期細胞に限局して発現していた。この結果は、Jmjd1aとZFPは生体においても相互作用する可能性を示唆している (Fig.2)。

2. ZFPのヘテロ欠損マウス同士を交配し、ZFPホモ欠損(KO)マウスを得た。ZFP KOマウスはメンデルの法則に従って生まれてきたが、約70% (8/11匹)の個体が離乳前に死亡した。出生した11匹のKO個体について性染色体と内外生殖器の雌雄を判定した結果、XY型の個体は全て生殖器が雄型だった

(5/5匹)。この結果から、少なくともZFPのZnフィンガードメインは性決定に必須ではないことが示唆された。

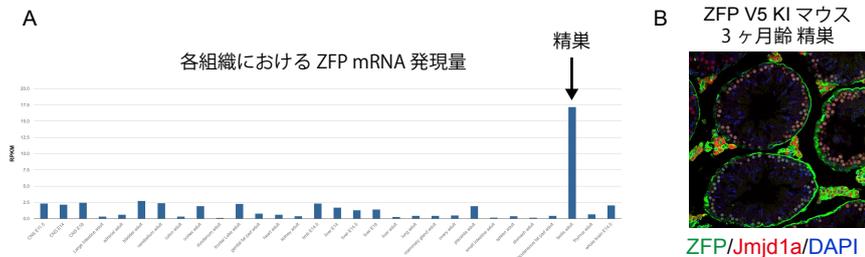


Fig.2 Jmjd1a 相互作用タンパク質の in vivo 解析

<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3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kuroki Shunsuke, Maeda Ryo, Yano Masashi, Kitano Satsuki, Miyachi Hitoshi, Fukuda Mikiko, Shinkai Yoichi, Tachibana Makoto	4. 巻 15
2. 論文標題 H3K9 Demethylases JMJD1A and JMJD1B Control Prospermatogonia to Spermatogonia Transition in Mouse Germline	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 424 ~ 438
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2020.06.013	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 Miyawaki Shingo, Kuroki Shunsuke, Maeda Ryo, Okashita Naoki, Koopman Peter, Tachibana Makoto	4. 巻 370
2. 論文標題 The mouse Sry locus harbors a cryptic exon that is essential for male sex determination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 121 ~ 124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.abb6430	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 該当する

1. 著者名 Hashimoto Daiki, Hirashima Tsuyoshi, Yamamura Hisao, Kataoka Tomoya, Fujimoto Kota, Hyuga Taiju, Yoshiaki Atsushi, Kimura Kazunori, Kuroki Shunsuke, Tachibana Makoto, Suzuki Kentaro, Yamamoto Nobuhiko, Morioka Shin, Sasaki Takehiko, Yamada Gen	4. 巻 104
2. 論文標題 Dynamic erectile responses of a novel penile organ model utilizing TPME†	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 875 ~ 886
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioab011	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3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒木俊介
2. 発表標題 全能性獲得における母性H3K9脱メチル化酵素 Jmjd1a/bの解析
3. 学会等名 新学術領域「全能性プログラム」領域会議（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒木俊介
2. 発表標題 全能性獲得における 母性H3K9脱メチル化酵素の機能解析
3. 学会等名 新学術領域「全能性プログラム」Webinar (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒木俊介
2. 発表標題 生殖細胞におけるH3K9脱メチル化の機能
3. 学会等名 『配偶子インテグリティの構築』『全能性プログラム』合同公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関