

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26890018

研究課題名(和文) H3K9メチル化・脱メチル化酵素による哺乳類の性決定制御

研究課題名(英文) Role of H3K9 methylation and demethylation enzymes in mouse sex determination

研究代表者

黒木 俊介 (KUROKI, Shunsuke)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教

研究者番号：50735793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストンH3K9脱メチル化酵素・メチル化酵素群の Maus 性決定機構への関与を包括的に解明する目的で、それぞれの酵素の遺伝子欠損 Maus を用いて性転換表現型の有無を調べた。その結果、メチル化酵素GLPのヘテロ欠損は、脱メチル化酵素Jmjd1a欠損による性決定遺伝子Sryの発現低下・性転換表現型を回復させた。一方で、脱メチル化酵素Jmjd1bのヘテロ欠損は、Jmjd1a欠損の性転換表現型を亢進させた。これらの結果は、H3K9メチル化制御酵素群によるメチル化レベルの調節が、性決定遺伝子Sryの発現制御と性決定に重要であることを示している。

研究成果の概要(英文)：We previously reported male-to-female sex reversal in H3K9 demethylase Jmjd1a knockout mice. However the involvement of other H3K9me-regulating enzymes in sex determination was unknown. We compare the consequence of combined loss of Jmjd1a and GLP on the sex-reversal phenotype. Loss of even a single GLP allele could rescue the sex-reversal phenotype in Jmjd1a-deficient background, which is accompanied by increase of Sry expression, indicating the functional antagonism between Jmjd1a and GLP. On the other hand, loss of a Jmjd1b single could allele accelerate the sex-reversal in Jmjd1a-deficient mice, indicating the overlapping role of Jmjd1b in mouse sex determination. These results suggest the fine tuning of H3K9 methylation level by methylases and demethylases is vital for mouse sex determination.

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・分化は、各種の細胞における特異的な遺伝子発現パターンの経時的变化によって成り立っている。遺伝子が時間的・空間的に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、クロマチンの構造変換を介したエピジェネティックな制御の両方が必要である。哺乳類の性決定にエピゲノムが果たす役割はこれまでほとんど分かっていなかった。私は2013年にヒストン脱メチル化酵素のひとつ *Jmjd1a* がマウスの性決定を制御することを明らかにした (Kuroki Set al., Science 2013)。しかし、*Jmjd1a* 以外のヒストン修飾酵素群によるエピジェネティック制御系の性決定メカニズムへの関与はまだ明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記の論文で得られた「エピゲノムによって哺乳類の性が決定する」というユニークな知見のさらなる発展をめざした。具体的には、*Jmjd1a* と同じくヒストンH3の9番目リジンのメチル化を制御する酵素群の性決定への関与に焦点を絞り、以下の2点を解明することを目的とした。

テーマ : H3K9 メチル化酵素と脱メチル化酵素の性決定における拮抗的な機能の解明  
ヒストンのメチル化は、メチル化酵素と脱メチル化酵素の拮抗した働きにより可逆的な制御をうける。H3K9のメチル化状態は、脱メチル化酵素 *Jmjd1* ファミリーとメチル化酵素 *G9a*, *GLP* によって調節される。そこで、性決定における H3K9 メチル化酵素と脱メチル化酵素の拮抗した制御機能を明らかにする。

テーマ : H3K9 脱メチル化酵素 *Jmjd1* ファミリーの性決定における機能重複の解明  
我々は *Jmjd1a* が *Sry* 発現制御を介して性決定を制御することを明らかにしてきた。しかし、一部の *Jmjd1a* 欠損マウスは正常にオスに分化したことから、性決定メカニズムに関して、*Jmjd1a* と機能的に重複す

る因子の存在が示唆された。*Jmjd1* ファミリーには *Jmjd1a* と機能相補する候補分子として *Jmjd1b* が存在する。そこで、*Jmjd1b* が性決定に機能するかどうかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

テーマ : *Jmjd1a/G9a* または *Jmjd1a/Glp* の二重欠損マウスを作製し、*Jmjd1a* 単独欠損マウスで観察された性転換がレスキューされるかどうかを検証する。さらに各々の遺伝子欠損マウスについて、胎生 E11.5 日における *Sry* の発現および H3K9 メチル化状態を明らかにする。

テーマ : *Jmjd1b* 欠損マウスについて性転換の有無を確認する。次に、*Jmjd1a* と機能的な重複があるかを検証するために、*Jmjd1a/Jmjd1b* の二重欠損マウスを作製し、*Jmjd1a* 単独欠損マウスよりも性転換の頻度が高くなるかを調べる。最後に、*Jmjd1b* の *Sry* 発現制御に対する役割を明らかにするために、各々の遺伝子欠損マウスについて、胎生 E11.5 日の性腺体細胞における *Sry* の発現および H3K9 メチル化状態を観察する。

## 4. 研究成果

テーマ :

### (1). 個体の性転換表現型解析

*Jmjd1a*  $\Delta/+$ ; *Glp*  $\Delta/+$  と *Jmjd1a*  $\Delta/+$  を交配し得られたマウス仔について、内外生殖器の観察と性染色体のジェノタイプングから性転換の有無を調べた。*Jmjd1a*  $\Delta/\Delta$  (XY) マウスは10匹中7匹が性転換を引き起こした(3匹が精巣を2個もつ雄、6匹が卵巣を2個もつ性転換、2匹が半陰陽)。いっぽう、*Jmjd1a*  $\Delta/\Delta$ ; *GLP*  $\Delta/+$  (XY) は7匹中7匹すべてが精巣を2個もつ雄個体だった。この結果は、H3K9 メチル化酵素 *GLP* ヘテロ欠損によって *Jmjd1a* 欠損の性転換表現型がレスキューされることを示し、*GLP* がマウスの性決定機構に関与することを示唆した。

## (2). 胎児期生殖腺の性転換比率の解析

次に上述の性転換レスキューのメカニズムを解明する目的で、胎生 13.5 日の生殖腺における性転換比率の解析を行った（雄の体細胞マーカー Sox9 と雌の網細胞マーカー Fox12 の比率を、組織免疫染色法を用いて算出）。結果、Jmjd1a  $\Delta/\Delta$  (XY) における性転換比率（生殖腺体細胞における Fox12 陽性細胞の割合）が約 60% だったのに対して、Jmjd1a  $\Delta/\Delta$ ; GLP  $\Delta/+$  (XY) では、約 20% まで低下していた。この結果は、生殖腺体細胞の分化において GLP が Jmjd1a に拮抗し、性転換をレスキューすることを示唆していた。一方、Jmjd1a  $\Delta/\Delta$ ; G9a  $\Delta/+$  (XY) についても同様の解析を行った結果、性転換レスキューは観察されなかった。

## (3). 性決定期生殖腺体細胞における Sry の発現と H3K9 メチル化レベルの解析

マウスの性は、E11.5 日生殖腺体細胞における Y 染色体上の性決定遺伝子 Sry の発現の有無によって決まる。性転換レスキューのメカニズムを明らかにする目的で、Sry の発現を組織面積染色により調べた。その結果、Jmjd1a  $\Delta/\Delta$  (XY) における Sry の発現量は野生型と比較して約 25% まで低下していたのに対して、Jmjd1a  $\Delta/\Delta$ ; GLP  $\Delta/+$  (XY) においては約 70% まで回復していた。次に生殖腺体細胞における H3K9me2 のレベルをフローサイトメトリーによって定量した。Jmjd1a  $\Delta/\Delta$  生殖腺体細胞における H3K9me2 のレベル（蛍光強度の Nr5a1 陽性細胞/Nr5a1 陰性細胞の比率）は、野生型で 0.7 なのに対して、Jmjd1a  $\Delta/\Delta$  (XY) では 0.9 まで増加していた。一方、Jmjd1a  $\Delta/\Delta$ ; GLP  $\Delta/+$  (XY) では 0.8 まで減少していたことから、Jmjd1a 欠損による H3K9 メチル化レベルの亢進が、GLP ヘテロ欠損によって部分的にレスキューされることを示唆した。

以上の解析結果を合わせると、H3K9 脱メチル化酵素 Jmjd1a と H3K9 メチル化酵素 GLP はマウス性決定機構において機能的に拮抗し、その作用点は胎児性決定期 (E11.5) における性決定遺伝子 Sry であることが示唆される（論文投稿準備中）。

テーマ :

## 胎児期生殖腺の性転換比率の解析

Jmjd1b 単独の欠損マウスにおいて、性転換表現型は観察されなかった（未発表）。次に、Jmjd1a と Jmjd1b の性決定における機能重複を検討する目的で、Jmjd1a  $\Delta/+$ ; Jmjd1b  $\Delta/+$  マウスの雌雄を交配し得られた E13.5 日胎児生殖腺について、性転換比率の解析を行った。その結果、Jmjd1a  $\Delta/\Delta$  (XY<sup>B6</sup>) における Fox12+細胞の比率が約 20% なのに対して、Jmjd1a  $\Delta/\Delta$ ; Jmjd1b  $\Delta/+$  (XY<sup>B6</sup>) では約 90% まで増加していた。この結果は、マウス性決定機構において、Jmjd1a と Jmjd1b が機能的に重複すること示唆している。

## 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 1 件)

Shunsuke Kuroki, Akiyoshi Mika, Ideguchi Ko, Kitano Satsuki, Miyachi Hitoshi, Hirose Michiko, Mise Nathan, Abe Kuniya, Ogura Atsuo and Makoto Tachibana :

Development of a general-purpose method for cell purification using Cre/loxP-mediated recombination, *Genesis : the journal of genetics and development*, Vol. 53, No. 6, pp. 387--393, 2015. 査読有

DOI: 10.1002/dvg.22863

〔学会発表〕(計5件)

Shunsuke Kuroki :

Epigenetic regulation of mouse sex determination by the histone H3K9 methylation,

第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25-27日, パシフィコ横浜 神奈川県横浜市

Shunsuke Kuroki and Makoto Tachibana :

Role of H3K9 methylation and demethylation enzymes on mouse sex determination,

*The 10th International Symposium of the Institute Network "Towards the next generation research for cancer and Immunology"*, 2015年7月23-24日, 北海道大学医学部学友会館「ラフテ」 北海道札幌市

黒木 俊介 :

ヒストン H3K9 メチル化によるマウスの性決定の制御,

日本エピジェネティクス研究会 第9回年会, 2015年5月26-26日, 一橋大学一橋講堂 東京都千代田区

Shunsuke Kuroki and Makoto Tachibana :

Role of H3K9 demethylases Jmjd1a and Jmjd1b in male germ cell development, *BMB2015*, 2015年12月1-4日, 神戸ポートアイランド 兵庫県神戸市

Makoto Tachibana and Shunsuke Kuroki :

Regulation of germ cell development by histone demethylation.

*International Symposium on Epigenome Dynamics and Regulation in Germ Cells*, 2016年2月17-19日, 京都大学百周年時計台記念館 京都府京都市

〔その他〕

ホームページ等

<https://ouyoukous01.ai231.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・疾患酵素学研究センター・助教

研究者番号: 50735793