

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22132002

研究課題名（和文）性特異的エンハンサーを介した性差構築

研究課題名（英文）Establishment of sex differences through sex-specific enhancer

研究代表者

諸橋 憲一郎（MOROHASHI, Ken-ichirou）

九州大学・医学（系）研究科（研究院）・主幹教授

研究者番号：30183114

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 182,500,000円

研究成果の概要（和文）：生殖腺（精巣と卵巣）は遺伝的制御によって性を獲得し、性ホルモンの産生を開始することで、雌雄の内分泌制御系を確立する。その後、遺伝的制御と内分泌制御は協調的に機能しながら生殖腺やその他の組織の性差を構築する。本研究では、この性差構築過程における遺伝子発現の性差がヒストン修飾を介した性特異的なクロマチン構造によると推測し、性差構築の分子基盤を明らかにすることを目的とした。特に、生殖腺の構築に不可欠な転写因子Ad4BPとクロマチン構造に着目し、胎児精巣において重要な働きをするセルトリ細胞（支持細胞）とライディッヒ細胞（ステロイドホルモン産生細胞）の性差構築メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The gonads, testis and ovary, acquire the sexes under genetic regulation, and then establish endocrine regulation by starting sex steroid production. Thereafter, genetic and endocrine regulation, through their synergistic interaction, result in exhibition of sex differences in the gonads and other many organs. In the present study, based on the hypothesis that the sex-dependent gene expression in the establishment of the sex differences would be regulated by sex-specific chromatin structure via variety of histone modification, we aimed to uncover the molecular bases for establishment of the sex differences. In particular, we focused on the function of Ad4BP essential for gonadal development and the chromatin structure. As the consequence, we succeeded to elucidate the molecular mechanisms for sex-dependent differentiation of Sertoli (nursing cells) and Leydig cells (steroid hormone producing cells), both of which are crucial for testicular functions.

研究分野：性差生物学

キーワード：ゲノム 発生 遺伝子発現 クロマチン構造 精巣 ライディッヒ細胞 セルトリ細胞

1. 研究開始当初の背景

多くの脊椎動物は遺伝的に性を決定し、雄には精巣が、そして雌には卵巣が分化する(性差構築の第一のステップ)。次いで、精巣と卵巣からは性ホルモンが分泌され、その作用によって個体全域に性差が誘導される(性差構築の第二のステップ)。したがって、生殖腺は個体の性差構築にとって最も根源的な臓器と位置づけられ、その性決定機構は性研究の中心的課題であった。この間、国内外で転写因子や細胞増殖因子を対象とした研究が精力的に行われ、生殖腺の性決定機構の理解が飛躍的に進展した。そしてその成果をもとに、性決定の後に構築される性差と性差を取り巻く現象(性差の維持や揺らぎなどの興味深い現象)が議論されるに至り、同時に性差の構築機構の解明が性的本質的理解には欠かせないと認識するに至った。

われわれは生殖腺の性差構築の鍵となる *Ad4BP* 遺伝子に着目し、5種類の組織特異的エンハンサーを同定した。また、精巣で男性ホルモンを産生するライディッヒ細胞のエンハンサー活性に性差があることや、胎仔型ライディッヒ細胞が成獣型細胞へ分化する際に、使用するエンハンサーを胎仔型から成獣型に変換する可能性を見出していた。以上の結果を踏まえ、申請者はエンハンサー領域のクロマチン構造の性差が遺伝子発現に性差をもたらすと考えた。また同時に *Ad4BP* 遺伝子に限らず、クロマチン構造と性特異的遺伝子発現はリンクすると推測した。

2. 研究の目的

性差は遺伝的制御による第一ステップと、遺伝的制御に内分泌制御が重層する第二ステップによって構築される。この制御系の基盤となる分子メカニズムの解明を目指し、これまでに複数のエンハンサーを同定した *Ad4BP* 遺伝子と、雌雄生殖腺のステロイド産生細胞ならびに支持細胞に着目した。

(1) クロマチン構造の性差：クロマチン構造の性差を介した性特異的なエンハンサー活性が、性特異的遺伝子発現には不可欠であるとの観点から、クロマチン構造を ChIP-シーケンス法にて解析することで、クロマチン構造の性差を明らかにする。

(2) 胎仔ライディッヒ細胞の分化メカニズム：胎仔ライディッヒ細胞特異的エンハンサーを用い、胎仔ライディッヒ細胞をラベルすることで、この細胞を調製することが

可能となる。この細胞は胎仔のオス化を担うことから、本細胞の成立メカニズムを明らかにすることは、性差構築の基本メカニズムを明らかにすることにつながる。

3. 研究の方法

(1) ChIP (クロマチン免疫沈降法)

調製した細胞を 0.5% Triton X-100 を含むバッファーで細胞ならびに核を溶解し、その後クロマチンをソニケーションと micrococcal nuclease によって断片化した(ヒストン修飾抗体の場合)。上記の条件に加え、調製した細胞を PFA で固定する方法も採用している(Ad4BP 抗体を用いる場合)。これらのクロマチン断片から Ad4BP 抗体や各種ヒストン修飾抗体によって約 250 塩基の DNA を有するクロマチンを回収した。このステップは用いる抗体によってバッファー組成などの条件が異なる。

(2) 遺伝子改変マウス

Ad4BP 遺伝子の胎仔ライディッヒ細胞エンハンサーを EGFP 遺伝子に連結し、胎仔ライディッヒ細胞特異的に EGFP 遺伝子を発現するプラスミドを作成した。このプラスミドを用いトランスジェニックマウス複数ライン作出した。セルトリ細胞特異的に EGFP 遺伝子を発現するマウス(*Sox9*-EGFP knock-in)を岐阜大学の秋山先生より、*Sry* 遺伝子のトランスジェニックマウスを東京大学の金井先生より供与いただいた。

(3) 大規模シーケンスと解析

ChIP によって得られた DNA 断片、ならびに mRNA から得られた cDNA を次世代シーケンサー(九州大学の支援組織(大川先生)で稼働しているイルミナ社製の機器)によって解析した。得られたシーケンスは九州大学の須山先生の指導のもとに解析を行った。遺伝子セットの機能を推測するにあたり、gene ontology 解析ならびに KEGG pathway 解析を行った。

4. 研究成果

(1) M33 はクロマチン構造の認識と修飾を行うポリコム複合体の因子である。本因子の遺伝子 KO マウスの XY 個体の精巣は卵巣となり性転換をきたすことから、本因子はオス化因子の活性を有することがわかっていた。本研究ではこの遺伝子 KO マウスを *Sry* 遺伝子トランスジェニックマウスと交配することで、*Sry* 遺伝子が M33 遺伝子 KO の表現系をレスキューすることを示した。このことは M33 遺伝子産物(多分ポリコム複合体)が *Sry* 遺伝子のクロマチン構造の返還を通じ、

発現を制御することを示唆するものであった。また M33 KO の生殖腺 (卵巣) は矮小化しているため、この矮小化が性転換を引き起こすと推測されていたが、レスキューされた精巣は小型化しており、矮小化と性転換は独立の事象であることが示唆された (発表論文 12)。

(2) Ad4BP 遺伝子の胎仔ライディッヒ細胞エンハンサーを同定し、胎仔ライディッヒ細胞を EGFP によってラベルしたトランスジェニックマウスラインを確立した (発表論文 13)。このマウス胎仔精巣より純粋な胎仔ライディッヒ細胞を調製し、その性質を調べた。これまで、胎仔ライディッヒ細胞はテストステロンを合成すると考えられてきたが、胎仔ライディッヒ細胞はアンドロステンジオンまでしか合成することができず、胎仔精巣においてはセルトリ細胞がアンドロステンジオンからテストステロンへの最後の反応を行っていることを明らかにした (発表論文 11)。また、胎仔ライディッヒ細胞の分化には男性ホルモン受容体が不要であることを示した (発表論文 2)。

(3) Ad4BP/ SF-1 の標的領域とクロマチン構造を成獣ライディッヒ細胞ならびに副腎皮質細胞で検討した。成獣ライディッヒ細胞においてステロイドホルモン合成の前駆物質であるコレステロール合成経路を構成する遺伝子のほとんどを Ad4BP/SF-1 が制御することが示された。また、同様にステロイドホルモンを産生する副腎皮質において Ad4BP/SF-1 が解糖系遺伝子群を制御することを明らかにしたが (発表論文 7)、成獣ライディッヒ細胞においても Ad4BP/SF-1 が解糖系遺伝子座に結合していた。

(4) 胎仔ライディッヒ細胞を EGFP によってラベルしたトランスジェニックマウスラインから、EGFP 強陽性の胎仔ライディッヒ細胞と EGFP 弱陽性細胞を分離することができた。EGFP 弱陽性細胞の遺伝子発現を検討したところ、この細胞が胎仔ライディッヒ前駆細胞である可能性が指摘された。このことは、in vitro の精巣再構築系を用い、この細胞が胎仔ライディッヒ細胞へ分化することを示したことで証明された (発表論文 1)。

(5) XY セルトリ細胞と XX セルトリ細胞のクロマチン構造と機能の差を検討した。その結果、両者では乳酸合成とコレステロール合

成に不可欠な遺伝子の発現に差があることが示された。これらの物質は生殖細胞の分化に必要で、セルトリ細胞が供給する。XX セルトリ細胞が生殖細胞の養育のための活性の一部を欠いている可能性が指摘された。またこれらの遺伝子発現の差異はヒストン修飾の差によることが示唆された (論文再審査準備中)。

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 14 件)

Miki Inoue, Yuichi Shima, Kanako Miyabayashi, Tetsuya Sato, Takashi Baba, Yasuyuki Ohkawa, Haruhiko Akiyama, Mikita Suyama, Ken-ichirou Morohashi.
Isolation and characterization of mouse fetal Leydig progenitor cells.
Endocrinology **157**, 1222-1233, 2016, 査読有
DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2015-1773>

Yuichi Shima, Sawako Matsuzaki, Kanako Miyabayashi, Hiroyuki Otake, Takashi Baba, Shigeaki Kato, Ilpo Huhtaniemi, Ken-ichirou Morohashi.
Fetal Leydig Cells are Androgen Independent and Persist as an Androgen-independent Subpopulation in the Postnatal Testis.
Mol. Endocrinol. **29**, 1581-1593, 2015, 査読有
DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/me.2015-1200>

Megumi Tsuchiya, Shin Isogai, Hiroaki Taniguchi, Hidehito Tochio, Masahiro Shirakawa, Ken-ichirou Morohashi, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi & Hidesato Ogawa.
Selective autophagic receptor p62 regulates the abundance of transcriptional coregulator ARIP4 during nutrient starvation.
Scientific Report **5**, 14498, 2015, 査読有
DOI: [10.1038/srep14498](http://dx.doi.org/10.1038/srep14498)

Yuko Katoh-Fukui, Maki Igarashi, Keisuke Nagasaki, Reiko Horikawa, Toshiro Nagai, Takayoshi Tsuchiya, Erina Suzuki, Mami Miyado, Keniciro Hata, Kazuhiko Nakabayashi, Keiko Hayashi, Yoichi Matsubara, Takashi Baba, Ken-ichirou Morohashi, Arisa Igarashi, Tsutomu Ogata, Shuji Takada and Maki Fukami.
Testicular dysgenesis/regression without Campomelic dysplasia in patients carrying missense mutations and upstream deletion of SOX9.
Molecular Genetics & Genomic Medicine **3**, 550-557, 2015, 査読有 DOI: [10.1002/mgg3.165](http://dx.doi.org/10.1002/mgg3.165)

Kanako Miyabayashi, Kaori Tokunaga, Hiroyuki Otake, Takashi Baba, Yuichi Shima,

Ken-ichirou Morohashi.
Heterogeneity of ovarian theca and interstitial gland cells in mice.
PLoS One **10**, e0128352, 2015, 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0128352

Atsushi Yokoyama, Katsuhide Igarashi, Tetsuya Sato, Kiyoshi Takagi, Yurina Shishido, Takashi Baba, Ryo Ito, Jun Kannno, Yasuyuki Ohkawa, Ken-ichirou Morohashi and Akira Sugawara.
J.Biol.Chem. **289**, 18152-18162, 2014, 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M114.566448

Takashi Baba, Hiroyuki Otake, Tetsuya Sato, Kanako Miyabayashi, Yurina Shishido, Chia-yih Wang, Yuichi Shima, Hiroshi Kimura, Mikako Yagi, Yasuhiro Ishihara, Shinjiro Hino, Hidesato Ogawa, Mitsuyoshi Nakao, Takeshi Yamazaki, Dongchon Kang, Yasuyuki Ohkawa, Mikita Suyama, Bon-Chu Chung, Ken-ichirou Morohashi.
Nature Commun. **5**, 3634, 2014, 査読有
DOI: 10.1038/ncomms4634

Yuka Fujimoto, Satomi S. Tanaka, Yasuka L. Yamaguchi, Hiroki Kobayashi, Shunsuke Kuroki, Makoto Tachibana, Mai Shinomura, Yoshiakira Kanai, Ken-ichirou Morohashi, Kiyoshi Kawakami, and Ryuichi Nishinakamura.
Homeoproteins Six1 and Six4 regulate male sex determination and mouse gonadal development.
Dev. Cell **26**, 416-430, 2013, 査読有
DOI: 10.1016/j.devcel.2013.06.018

Kyoko Harikae, Kento Miura, Mai Shinomura Shogo Matoba, Ryuji Hiramatsu, Naoki Tsunekawa, Masami Kanai-Azuma, Masamichi Kurohmaru, Ken-ichirou Morohashi, and Yoshiakira Kanai.
Heterogeneity in sexual bipotentiality and plasticity of granulosa cells in developing mouse ovaries.
J. Cell Sci. **126**, 2834-2844, 2013, 査読有
DOI: 10.1242/jcs.122663

Kanako Miyabayashi, Yuko Katoh-Fukui, Hidesato Ogawa, Takashi Baba, Yuichi Shima, Noriyuki Sugiyama, Kunio Kitamura, Ken-ichirou Morohashi.
Aristaless related homeobox gene, *Arx*, is implicated in mouse fetal Leydig cell differentiation possibly through expressing in the progenitor cells.
PLoS One **8**, e68050, 2013, 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0068050

Yuichi Shima, Kanako Miyabayashi, Shogo Haraguchi, Tatsuhiko Arakawa, Hiroyuki Otake, Takashi Baba, Sawako Matsuzaki, Yurina

Shishido, Haruhiko Akiyama, Taro Tachibana, Kazuyoshi Tsutsui, Ken-ichirou Morohashi.
Contribution of Leydig and Sertoli cells to testosterone production in mouse fetal testes.
Mol. Endocrinol. **27**, 63-73, 2013, 査読有
DOI: 10.1210/me.2012-1256

Yuko Katoh-Fukui, Kanako Miyabayashi, Tomoko Komatsu, Akiko Owaki, Takashi Baba, Yuichi Shima, Tomohide Kidokoro, Yoshiakira Kanai, Andreas Schedl, Dagmar Wilhelm, Peter Koopman, Yasushi Okuno, Ken-ichirou Morohashi.
Cbx2, a polycomb group gene, is required for Sry gene expression in mice.
Endocrinology **153**, 913-924, 2012, 査読有
DOI: 10.1210/en.2011-1055

Yuichi Shima, Kanako Miyabayashi, Takashi Baba, Hiroyuki Otake, Sanae Oka, Mohamad Zubair, Ken-ichirou Morohashi.
Identification of enhancer specific for fetal Leydig cells in *Ad4BP/SF-1* gene.
Endocrinology **153**, 417-425, 2012, 査読有
DOI: 10.1210/en.2011-1407

Masatomo Kusaka, Yuko Katoh-Fukui, Hidesato Ogawa, Kanako Miyabayashi, Takashi Baba, Noriyuki Sugiyama, Yukihiko Sugimoto, Yasushi Okuno, Ryuji Kodama, Akiko Iizuka-Kogo, Takao Senda, Shinichi Aizawa, Ken-ichirou Morohashi.
Abnormal epithelial cell polarity and migration of *Emx2* KO embryonic gonads induced by ectopic EGFR expression.
Endocrinology **151**, 5893-5904, 2010, 査読有
DOI: 10.1210/en.2010-0915

〔学会発表〕(計14件)

井上 実紀, 胎仔精巣におけるライディッヒ前駆細胞の単離とその分化誘導系の確立, 第38回日本分子生物学会年会, 2015年12月3日, 神戸ポートアイランド(神戸市)

諸橋 憲一郎, 教育講演; Ad4BPによる代謝制御とステロイド合成, 第49回日本小児内分泌学会学術集会, 2015年10月10日, タワーホール船堀(東京都)

諸橋 憲一郎, 特別講演; Ad4BP レギュロンによる細胞内代謝連関, 2015年6月26日, 日本アンドロロジー学会第34回学術集会, 福岡大学病院メディカルホール(福岡市)

Takashi Baba, Nuclear receptor and metabolism(Herbert Tabor Young Investigator Award 受賞), 19th International conference on Cytochrome P450, 2015年6月13日, 国立オリンピック記念青少年総合センター(東京都)

Yuichi Shima, Functional importance of fetal Leydig cells in postnatal testis development, 7th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex differentiation, April 14, 2015, Hawaii (USA)

宍戸 祐里菜, セルトリ細胞における性染色体構成に依存した遺伝子発現制御機構の解明, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 27 日, パシフィコ横浜 (横浜市)

Takashi Baba, Dual Roles of Ad4BP/SF-1 in Steroidogenesis and Glycolysis, 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 18 日, 国立京都国際会館 (京都市)

Ken-ichirou Morohashi, The function of Ad4BP/SF-1 in adrenocortical metabolism, 16th Conference on the adrenal cortex, Adrenal 2014, June 19, 2014, Chicago (USA)

Ken-ichirou Morohashi, Invited; Dual Roles of Ad4BP/SF-1 in Steroidogenesis and Glycolysis, 20th International Symposium on Microsomal and Drug Oxidations, May 21, 2014, Stuttgart (Germany)

嶋 雄一, 胎仔型ライディッヒ細胞の細胞運命と生理機能の解明 (若手研究奨励賞受賞), 第 87 回日本内分泌学会学術総会, 2014 年 4 月 25 日, 福岡国際会議場 (福岡市)

Ken-ichirou Morohashi, Regulation of energy metabolism by nuclear receptors, 第 87 回日本内分泌学会学術総会, 2014 年 4 月 24 日, 福岡国際会議場 (福岡市)

Ken-ichirou Morohashi, A Novel Landscape of Target Genes for Ad4BP/SF-1, Endocrine Society's 95th Annual Meeting, June 16, 2013, San Francisco (USA)

Ken-ichirou Morohashi, Keynote Lecture/Invited; Molecular and Cellular Mechanisms of Testis Differentiation, Gordon Research Conference "Reproductive Tract Biology" Aug 15, 2010, Andover (USA)

Ken-ichirou Morohashi, The Keith Parker Memorial Lecture/Invited; Ad4BP/SF-1 as the key factor for steroidogenic cell development, 14th Adrenal Cortex Conference/The Keith K Parker Memorial Symposium, June 18, 2010, San Diego (USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

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

取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等
平成 22 年度～平成 26 年度
文部科学省科学研究費補助金
新学術領域研究「性差構築の分子基盤」

6. 研究組織

(1) 研究代表者
諸橋 憲一郎 (MOROHASHI, Ken-ichirou)
九州大学・大学院医学研究院・主幹教授
研究者番号 : 30183114

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
嶋 雄一 (SHIMA, Yuichi)
九州大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号 : 80425420

馬場 崇 (BABA, Takashi)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号 : 40435524

横山 敦 (YOKOYAMA, Atsushi)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号 : 20572332

松本 高広 (MATSUMOTO, Takahiro)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号 : 70447374