

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06926

研究課題名(和文)クロマチン因子による標的ゲノム領域構築-生殖腺分化マスター遺伝子の制御-

研究課題名(英文)Establishment of the chromatin state in gonadal development

研究代表者

福井 由宇子 (Yuko, Katoh-fukui)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・(非)研究員

研究者番号：50342639

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)：分化細胞核ではダイナミックなクロマチン構造変換が起きる。本研究課題では、PcGメンバーならびにパートナーであるクロマチン構成因子Jarid2 (Jumonji) に焦点をあてた。分担研究者等により作成されたJarid2 flox alleleの検証のため、メスgerm-lineで組換え酵素を駆動し、得られたJarid2機能欠失胚を解析した。これまで報告のあったgene-trapマウスと同様の浮腫、心臓の中隔欠損、肝臓の低形成のみならず、新たに泌尿生殖領域の形成の異常をみとめた。さらに、ヒト性分化疾患におけるこれら因子の変異解析をおこなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発生中の多様な時期に、多様な組織で機能を果たすクロマチン構成因子のより詳細な解析のために、Jarid2 flox alleleマウスを用いた組織特異的機能解析が可能であることが明らかになった。DSDのみならず様々な小児疾患原因因子あるいはリスク因子としてクロマチン構成因子変異が検討されるべきであることを示した。

研究成果の概要(英文)：Dynamic chromatin structural transformation occurs in the differentiated cell nucleus. In this study, we focused on the Polycomb Group (PcG) member, Cbx2 and the chromatin component Jarid2 (Jumonji), which is known to associate with PcG in ES cells. In order to verify the Jarid2 flox allele, we deleted floxed exon three regions by using germ-line active Cre. The obtained Jarid2 deficient embryo confirmed edema, septal defect of the heart, and hypoplasia of the liver, similar to the phenotypes observed in previously reported gene-trap mice. In addition, we found an unreported dysplasia of the urogenital regions and retinal coloboma. Furthermore, mutation analysis of these factors in disorders of sex development (DSD) was performed.

研究分野：発生遺伝

キーワード：クロマチン 生殖腺 分化 マウス

1. 研究開始当初の背景

発生分化過程における細胞核内クロマチン構造のダイナミックな変換が、ES 細胞 (ES) in vitro 分化系の研究を中心に明らかにされてきた。この過程で、ポリコム群 (PcG) はクロマチン構造変換における主要なエピジェネティック制御因子である。

【ヒトおよびマウス性分化・生殖腺分化と PcG】

発生過程の生殖腺は分子生化学的解析に適しており組織分化研究のモデルとされてきた。マウス胎生 11 日前後 24 時間に組織構造がダイナミックに変化し、同時に性が決定される。さらに、生殖腺形成のために必須な分子基盤として、生殖腺体細胞に発現する複数の性分化・生殖腺分化関連マスター遺伝子が見出されており、これらのヒト相同遺伝子変異は性分化疾患 disorders of sex development (DSD) の病因として報告されている。Cbx2 は哺乳類性分化・生殖腺分化に必須であることが明らかにされている唯一の PcG 構成因子であり、ヒトにおいても 46, XY complete gonadal dysgenesis タイプの DSD 患者に CBX2 機能変異が報告されている (Biaison-Lauber et al., 2009)。以上のように Cbx2 は哺乳類における生殖システム構築の根幹に関わる重要な因子である。

【PcG と Jarid2 は機能的複合体を形成し共通したゲノム上の標的に集積する】

ES において、PcG タンパクは PRC1 (Polycom Repressive Complex 1) 複合体あるいは PRC2 複合体を構成する。また、Jarid2 は PRC2 と共役複合体を形成し、PRC2 の標的遺伝子領域への集積は Jarid2 に依存している (Peng et al., 2009, Pasini et al., 2010)。一方、PRC1 構成因子 Chromobox 2 (Cbx2) は、細胞分裂中の DNA から遊離せず細胞分裂後のクロマチン再構成の足がかりとなるとの報告がある (Zhen CY et al., 2014)。

【温度感受性性分化に関わる Jarid2】

温度依存的性決定システムを持つ複数種の爬虫類において、温度依存的に性転換した個体では Jarid2 mRNA が intron retention により破壊され機能を失うことが報告された (Deveson et al., 2017)。爬虫類の性決定分子機構は現時点で未解明ではあるが、Jarid2 が性決定のスイッチの役割を果たす可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生殖システム組織形成の根幹となる重要な新規クロマチン因子を明らかにするものである。これまで研究代表者は世界に先駆けて Cbx2 が生殖腺分化に必須な因子であることを明らかにしてきた (Katoh-Fukui et al., 1998)。一方、分担研究者は世界に先駆けて Jarid2 を発見、"jumonji" と命名し (Takeuchi et al., 1995)、機能欠失マウスの機能解析を行ってきた。哺乳類 PcG の ChIP-sequence 解析は主に ES (He J et al., 2013; Morey Let al., 2012; Ku M et al., 2008) を対象として行なわれている。ES in vitro 分化系を用いたクロマチン解析からは、胎生 3-6 日の初期分化を想定して重要な知見が明らかにされてきた。しかし、これらの実験結果は組織構築が開始する発生中期の空間および時系列を反映するものではない。本研究課題は胎生 10.5-13.5 日発生中期の胎児生殖腺形成における両因子の機能を、マウス個体レベルで解析する。

3. 研究の方法

① Jarid2 flox マウス導入

Jarid2-flox/+は研究分担者が、本研究課題開始前に共同研究にて作成を進めてきていた。本研究課題では研究分担者共同研究者（東京大学、理化学研究所）との共同研究ベースのMTAを取り交わし、研究分担者が保有する Jarid2-flox/+マウスは、鳥取大学動物実験施設の協力のもと凍結精子を作成、系統保存を行った。凍結精子は液体窒素下で国立成育医療研究センターへ輸送した。国立成育医療研究センターにて一部を融解移植後7匹の Jarid2-flox/+マウスを得た。

② Jarid2-flox allele の生殖系列 deletion による、exon 3 欠失による機能喪失の確認

RefSeq NM_001205044 exon 3 del 型 Jarid2 flox マウスは、東京大学、理化学研究所、分担研究者共同研究により本研究課題開始以前に作成されていたが、機能欠失の確認は未着手であった。そのため、国立成育医療研究センター・実験動物飼育施設に導入後、新規 exon 3 del 型 Jarid2 flox allele に Cre 酵素によるdeletionを起こした場合、その遺伝子破壊効果が null 型同様であるかを確認した。

③ マウス性分化・生殖腺分化過程における Cbx2・Jarid2 の遺伝学的相互作用の解析

Jarid2+/-KO x Cbx2+/-KO (129/B6 mixed genetic back) 交配は国立成育医療研究センターにて行なった。

④ 性分化ならびに症候性小児疾患患者のゲノム解析

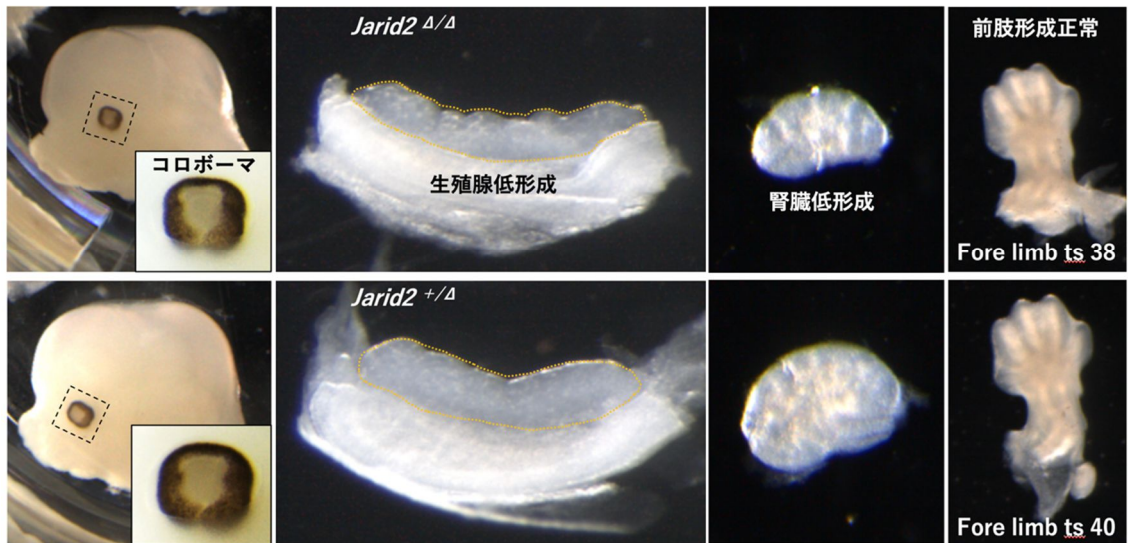
5名のDSD患者のDNA検体（国立成育医療研究センター深見研究室所有・研究代表者所属）を用いてエクソーム解析を行なった。JARID2、CBX2の変異を検索したが、病原性の高い変異は認められなかった。さらにCHD7病的変異を持たない、CHARGE症候群類似疾患4名を用いたエクソーム解析も行なった。病的変異は認められていない。

4 研究成果

これまで報告のない新規 exon 3 del 型 Jarid2 flox allele に対して、Cre 酵素による deletion を起こした場合、その遺伝子破壊効果が null 型同様であるかを確認するため、Prrx1-Cre（米国 Jackson 研究所より研究代表者が購入）ラインと交配実験を行なった。Prrx1-Cre は発生期の肢芽の間充細胞に特異的に Cre を発現することが広く知られているが、代表者は独自に未受精卵においても Cre 活性があることを見出している。Prrx1-Cre、Jarid2/flox/+メスとJarid2/flox/+オスの交配実験により、exon 3 del/del ホモ胚を得ることに成功した。胎生13日Exon 3 del/del ホモ胚には、体全体の浮腫、心臓中隔欠損（拍動時血流の右心室から左心室への移動）、肝臓の異常（肝葉の構造異常）など、これまで論文報告のあったgene trap による null 型変異胚の表現型（Takeuchi et al., Gene Dev, 1995; Lee et al., Circ Res, 2000, Motoyama et al., Mech Dev, 1997）と一致した。以上の結果より、Exon 2 del 型 Jarid2 flox マウスではCreにより組み換えを起こせば、null型と同様の機能欠失が起きることが明らかになった。

さらに、Jarid2 null 型変異マウスではこれまで報告のなかった、泌尿生殖領域の形成異常ならびに網膜コロポーマを認めた。これらの表現型は、Cbx2 null KO の表現型とオーバーラップするものであった。そのため、両遺伝子の遺伝的相互作用を明らかにする目的で、Cbx2 null/+と Jarid2 Exon 2 del/+の交配をおこなった。得られた Cbx2 null/+;Jarid2 del/+胚では上記いずれの異常も見出されなかったため、Cbx2 null/null;Jarid2 del/+あるいは Cbx2 null/null;Jarid2 del/del 胚の解析を行なっている。

Jarid2^{del/del} (Δ/Δ) 泌尿生殖領域とコロポーマ (胎生13.5日)



一方、5名のDSD患者のDNA検体(国立成育医療研究センター深見研究室所有・研究代表所属)を用いてエクソーム解析を行なった。JARID2、CBX2の変異を次世代シーケンサー解析により検索した。病原性の高い変異は、認められなかった。さらにCHD7病的変異を持たない、CHARGE症候群類似疾患4名を用いたエクソーム解析も行った。病的変異は認められていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Tamaoka Satoshi, Suzuki Erina, Hattori Atsushi, Ogata Tsutomu, Fukami Maki, Katoh-Fukui Yuko	4. 巻 8
2. 論文標題 NDNF variants are rare in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Genome Variation8	6. 最初と最後の頁 5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-021-00137-x	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 Igarashi Maki, Masunaga Yohei, Hasegawa Yuichi, Kinjo Kenichi, Miyado Mami, Saito Hiroto, Kato-Fukui Yuko, Horikawa Reiko, Okubo Yomiko, Ogata Tsutomu, Fukami Maki	4. 巻 10
2. 論文標題 Nonsense-associated altered splicing of MAP3K1 in two siblings with 46,XY disorders of sex development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17375
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74405-1	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 Akiba Kazuhisa, Narumi Satoshi, Nishimura Riko, Kato Fukui Yuko, Takada Shuji, HasegawaYukihiro, Fukami Maki	4. 巻 87
2. 論文標題 SOX9 is colocalized with paraspeckle protein NONO in cultured murine sertoli cells and features structural characteristics of intrinsically disordered proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 1124 ~ 1125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mrd.23425	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 Kinoshita T, Mikami M, Ayabe T, Matsubara K, Ono H, Ohki K, Fukami M, Katoh-Fukui Y	4. 巻 159
2. 論文標題 Frequency of Common Copy-Number Variations at 15q11.2q13 in Sperm of Healthy Men	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytogenet Genome Res.	6. 最初と最後の頁 66-73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000503267	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 Hattori A, Okamura K, Terada Y, Tanaka R, Katoh-Fukui Y, Matsubara Y, Matsubara K, Kagami M, Horikawa R, Fukami M	4. 巻 12
2. 論文標題 Transient multifocal genomic crisis creating chromothriptic and non-chromothriptic rearrangements in prezygotic testicular germ cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Med Genomics.	6. 最初と最後の頁 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12920-019-0526-3	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 Umino Satoko, Kitamura Miyuki, Katoh Fukui Yuko, Fukami Maki, Usui Takeshi, Yatsuga Shuichi, Koga Yasutoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 A case of combined 21 hydroxylase deficiency and CHARGE syndrome featuring micropenis and cryptorchidism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Genetics & Genomic Medicine	6. 最初と最後の頁 e730 ~ e730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mgg3.730	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 Hamanaka K, Takata A, Uchiyama Y, Miyatake S, Miyake N, Mitsuhashi S, Iwama K, Fujita A, Imagawa E, Alkanaq AN, Koshimizu E, Azuma Y, Nakashima M, Mizuguchi T, Saitsu H, Wada Y, Minami S, Katoh-Fukui Y, Masunaga Y, Fukami M, Hasegawa T, Ogata T, Matsumoto N	4. 巻 28
2. 論文標題 MYRF haploinsufficiency causes 46,XY and 46,XX disorders of sex development: bioinformatics consideration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 2319~2329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddz066	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 Sutani Akito, Shima Hirohito, Hijikata Atsushi, Hosokawa Susumu, Katoh-Fukui Yuko, Takasawa Kei, Suzuki Erina, Doi Shozaburo, Shirai Tsuyoshi, Morio Tomohiro, Fukami Maki, Kashimada Kenichi	4. 巻 63
2. 論文標題 WDR11 is another causative gene for coloboma, cardiac anomaly and growth retardation in 10q26 deletion syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 103626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejmg.2019.01.016	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 Katoh-Fukui Yuko, Baba Takashi, Sato Tetsuya, Otake Hiroyuki, Nagakui-Noguchi Yuko, Shindo Miyuki, Suyama Mikita, Ohkawa Yasuyuki, Tsumura Hideki, Morohashi Ken-ichirou, Fukami Maki	4. 巻 120
2. 論文標題 Mouse polycomb group gene Cbx2 promotes osteoblastic but suppresses adipogenic differentiation in postnatal long bones	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 219 ~ 231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2018.10.021	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 Katoh-Fukui Yuko, Yatsuga Shuichi, Shima Hirohito, Hattori Atsushi, Nakamura Akie, Okamura Kohji, Yanagi Kumiko, Iso Manami, Kaname Tadashi, Matsubara Yoichi, Fukami Maki	4. 巻 5
2. 論文標題 An unclassified variant of CHD7 activates a cryptic splice site in a patient with CHARGE syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 18006 ~ 18006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/hgv.2018.6	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 -

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 福井由宇子, 務台英樹, 深見真紀
2. 発表標題 Cb x 2cterm/ctermマウスが出生後に示す多様な表現型
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 福岡
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi Hattori, Kohji Okamura, Yumiko Terada, Rika Tanaka, Yuko Katoh-Fukui, Yoichi Matsubara, Keiko Matsubara, Masayo Kagami, Reiko Horikawa, and Maki Fukami
2. 発表標題 Multifocal and multifaceted genomic crisis leading to highly complex chromosomal rearrangements in a boy with congenital disorders
3. 学会等名 The Pediatric Academic Societies Meeting, Baltimore, MD (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木下貴裕、三上剛史、綾部匡之、松原圭子、小野ひろみ、福井由宇子、深見真紀
2. 発表標題 健常日本人精子染色体におけるPWS領域微小欠失頻度と季節性
3. 学会等名 日本分子生物学会、横浜、
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
研究分担者	竹内 隆 (Takeuchi Takashi) (70197268)	鳥取大学・医学部・教授 (15101)	

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
---------	---------