

令和元年6月6日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08072

研究課題名(和文) 哺乳類性腺の性差構築と性特異的エピゲノム制御・維持機構の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular basis of sex difference and sex-specific epigenome regulation and maintenance mechanism in mammalian gonads

研究代表者

星 信彦 (HOSHI, NOBUHIKO)

神戸大学・先端融合研究環・教授

研究者番号：10209223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：性差の確立は、SRYをマスター遺伝子とした「遺伝的制御」によって未分化性腺の雄(精巣)あるいは雌(卵巣)への運命が決まることにより始まる。その雌雄表現型・機能を維持するために様々な性分化関連因子の時空間特異的な性的二型性発現が必要不可欠である。我々が作出した性逆転系統であるC57BL/6N-XYposマウスの性差構築と破綻機構を詳細に解析した結果、1) C57BL/6のY染色体(SRY遺伝子C末端)の遺伝的背景に性逆転の原因がある可能性、2) 常染色体上のノンコーディングDNA領域が関与する可能性、3) 新たなエピジェネティック因子が関与する可能性、が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「性」は可逆性を有する分子基盤の上に成立している連続的な表現型であり、「遺伝的制御」にエピゲノム制御が加わることにより、生殖腺の「性」は変わりうる。すなわち、「性」は可逆性を有する分子基盤の上に成立している連続形質であることを支持する成果であり、性差を再定義する新しい概念に通じる。本研究成果は、生物の進化の過程を遡り、性腺の分化から哺乳類の誕生・進化の謎の一端を探求する意義あるものと考えられる。さらに、ヒトを含めた哺乳類の性分化およびその破綻機構の解明に新たな基礎的知見を加え、畜産学、獣医学および医学の発展に大きく寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The establishment of sex differences begins with the determination of the fate of undifferentiated gonads to males (testis) or females (ovary) by "genetic control" with SRY as the master gene. Spatiotemporal sexual dimorphic expression of various sexual differentiation related factors is essential to maintain its male and female phenotype and function. As a result of detailed analysis of sex difference construction and failure mechanism of C57BL/6N-XYpos mouse, which show sex reversal phenotype created by us, 1) the genetic background of Y chromosome (SRY C-terminal) of C57BL/6 mouse may be the cause of sex reversal, 2) possibility that autosomal non-coding DNA region is involved, 3) possibility of involving new epigenetic factors, were suggested.

研究分野：動物分子形態学

キーワード：性分化 生殖腺 エピゲノム制御 SRY poschiavinus 性差構築基盤 真性半陰陽 哺乳類

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

有性生殖を行う脊椎動物は性腺として精巣または卵巣を有する。そのどちらかが形成されるかは「種の保存」に関わる個体発生における極めて重要な発生イベントである。興味深いことに、この性腺形成メカニズムは脊椎動物の進化の過程で保存されていない。例えば、遺伝的に性が決定する哺乳類や一部の魚類で同定されている性決定遺伝子、*SRY* [Sinclair *et al.* 1990], *DMY* [Matsuda *et al.* 2002], *SDY* [Yano *et al.* 2012], *AMHR2* [Kamiya *et al.* 2012] および *GSDF* [Myosho *et al.* 2012] は、それぞれ構造や由来がまったく異なり、その種に固有の遺伝子である。他方、カメやワニなどの爬虫類では、胚発生中の孵卵温度によって性比が大きく変化する [Angelopoulou *et al.* 2012]。さらに、精巣を構成する細胞の起源は哺乳類と鳥類とで異なる [Karl and Capel, 1998; Sekido and Lovell-Badge, 2007]。哺乳類の性は、Y 染色体上の遺伝子 *SRY* により決定される。マウスの未分化性腺において *SRY* は、ウェーブ状かつ一過性の非常に特徴的な発現様式を示す。すなわち、マウスでは交尾後 11.0 日 (dpc) (尾体節数 12: 12 ts) に未分化性腺の中央部に限局して *SRY* が発現し、両端に向かって発現が広がっていく。11.5 dpc (17-18 ts) までに性腺の殆どの領域で発現し、その後、中央部・前部から急速に減少して 12.0 dpc (24 ts) までに消失する。すなわち、性腺の中央部と後端では、*Sry* 発現に 6 時間以上の時間差の生じることが明らかになっている (Harikae *et al.* 2013)。一方、XY 女性 (性逆転) 患者では、*SRY* の変異に原因のあるものは 10-15% にすぎず、多くは原因不明 [申請時 研究業績 1, 58, 59 他] で、*SRY* のみをみても、その転写や下流遺伝子の発現制御が同定されておらず、性分化破綻機構には未だ不明な点が多い。最近、申請者らは XY 女性の *SRY* のヒストンアセチル化異常が原因で性逆転になった症例を報告した [研究業績 33, 34]。加えて、遺伝子改変性転換 *SryTg-Y^{POS}* マウスと精巣化の抑制で知られる *M33 KO* 系 B6/NIH 系マウスとの交配から右性腺が卵巣に、左性腺が精巣に分化する真性半陰陽マウスを作製することに成功した。さらに、同一遺伝子型でありながら多様な表現型の半陰陽個体を作製しうることを示した [研究業績 2]。

一方、哺乳類の性分化機構は、メス型が標準型で *SRY* により雄性化するとされてきたが、近年、成獣マウスにおいて *FOXL2* を除去すると卵巣が雄性化すること [Uhlenhaut *et al.* 2010] や、その逆に精巣の雌性化 [Matson *et al.* 2011]、ならびにホリスタチン [Kashimada *et al.* 2011]、*FGF9* の関与 [Jameson *et al.* 2012] など、哺乳類の性差構築には、雌化維持機構の積極的な関与が示唆されており、性分化機構はより複雑な様相を呈している。さらに、最近、non-coding DNA 領域による制御 [Wainwright *et al.* 2013; Arboleda *et al.* 2014] や、ヒストンのメチル化制御 [Kuroki *et al.* 2013] も報告されている。

本研究では、哺乳動物の性差構築を特別なものととらえ、その実態にはエピジェネティクスが大きく関与していると想定されることから、様々な表現型を呈する半陰陽マウスを用いて生殖腺の発生・分化と細胞特異的エピジェネティック機構について時間・空間的に解析し、ゲノムの修飾・構造変換とその発生・分化の多様性にかかわる分子基盤を解明する事を企図した。

2. 研究の目的

脊椎動物の中で唯一、哺乳類ではメスだけで子孫を作る「単為発生」の自然例は報告されていない。この『哺乳類の発生には「オス」と「メス」が必要不可欠』であることの理由は永らく謎であったが、胎盤を有する胎生哺乳動物は、父母由来の遺伝子を区別するゲノムインプリンティングシステムを持つことによると理解されるようになった。一方で、生殖は「種の保存」に関わる極めて重要な営みであるが、興味深いことに性腺形成メカニズムは、生物の進化の過程で保存されていない。本研究では、我々が作出に成功した真性半陰陽マウス等を用いて生殖腺の発生と性特異的エピゲノム制御・維持機構の分子基盤について時空間的に解析し、ゲノムの修飾・構造変換と生殖腺の発生・分化の多様性に関わる特殊性・普遍性を検証する。本課題は、生物の進化の過程を遡り、性腺の分化から哺乳類の誕生・進化の謎の一端を探求する意義ある研究と考える。

3. 研究の方法

同一遺伝子型で多様な半陰陽表現型を呈する動物モデルを用いて、並行的に研究を進める。まず、動物モデル系で、性決定の臨界期付近での性腺領域を用い、胎子期の各段階における mRNA およびタンパク質レベルでの変動を解析し、そのエピジェネティック修飾ならびに同時期の網羅的解析を行う。細胞・組織モデル実験での解析を行い、*in vitro*・*ex vivo* 評価、器官培養系における評価ならびに発生プログラムと組織特異的 DNA メチル化プロファイルの形成検証を行う。次いで、これらの知見に關与する因子群の機能を実験的に検証すると共に、条件依存的に性分化疾患を惹起可能な病態モデル動物実験系の確立を目指す。

4. 研究成果

脊椎動物の多くは、それぞれの個体が雄もしくは雌のどちらかに分化して有性生殖を行うことが知られている。哺乳類では Y 染色体に位置する *SRY* が未分化性腺の支持細胞において発現を開始すると、精巣化実行因子 *SOX9* の発現が誘導されることで精巣の形態形成が進行する。分化後の精巣においては *DMRT1* が雌化関連遺伝子を抑制することで、性腺の性差維持を行って

る。DMRT1はDMドメインと呼ばれるDNA結合領域を有する転写制御因子であり、そのオーソログは脊椎動物のみならず、線虫やキイロシヨウジョウバエ等の無脊椎動物に至るまで広く存在し、その多くが性決定・性分化に関与している。ヒストン修飾状態の解析から、精巣においてのみエンハンサーシグナルがみられる領域が2つ存在し、Region I・IIと定義した。これらの領域について脊椎動物間における詳細な配列比較を行うと、Region I・IIともに進化的に保存されている領域を含んでおり、とくにRegion IIは真獣類特異的に塩基配列が保存されていた。同領域は精巣、卵巣および心臓において低メチル化状態にあった。さらに、同領域内で転写因子結合モチーフを探索すると、SRY, SOX gene family, GATA4などの精巣分化に必須の転写因子のモチーフが抽出された。加えて、レチノイン酸レセプターの結合モチーフの存在、および既報のChIP-seqデータを用いた網羅的な解析の結果においてNanog/Pou5f1の結合が認められた。本研究において新たに見出したRegion IはDMRT1の真獣類特異的エンハンサーであり、セルトリ細胞・生殖細胞において機能していると推測された。本研究は、*in vivo*におけるDMRT1のシス調節領域について言及した最初の報告であり、性分化関連遺伝子の発現制御に対するNon-coding DNA領域の関与について新たな知見を見出した。

哺乳類の雄では、胎子期に精巣のセルトリ細胞で産生されたAMHの作用によってミュラー管が退行し、卵管・子宮・膈上部への分化が抑制される。しかしながら、当研究室で作製したB6N背景コンソミックマウスの真性半陰陽個体(O/Tマウス)では、精巣側ではミュラー管由来の器官が退行する一方、卵巣側には卵管・子宮が形成される。

13.5 dpc または 14.5 dpc の野生型雄および O/T マウス胎子の性腺中腎複合体を用い、免疫組織化学 (IHC) およびウエスタンブロット (WB) により AMH の発現・分布を解析した。また、13.5 dpc の野生型マウス胎子の性腺に AMH を注入し、48 時間培養後、HE 染色によりミュラー管の退行程度を確認した。IHC では、O/T マウスにおいて、AMH 陽性反応およびミュラー管退行が精巣側でのみ確認され、精巣から分泌された AMH は同側のミュラー管にのみ作用することが明らかになった。また、野生型雄マウスの精巣において、精巣索内の AMH 陽性反応とともに、間質で弱い瀰漫性の AMH 陽性反応がみられ、頭側領域においてはその弱い陽性反応が中腎との境界部にも認められた。この結果の妥当性を WB で確認したところ、雄の中腎頭側部における AMH 量は中腎尾側部の 2 倍以上であった。さらに、培養実験では、同一の培養液内で複数の性腺を培養したものの、AMH を注入した性腺でのみミュラー管の退行が促進された。以上のことから、AMH はホルモンとして分類されているにもかかわらず、狭義の内分秘様式とは異なり、セルトリ細胞から分泌された後、精巣間質に漏出し、精巣の頭側部から中腎領域に組織内を浸潤する形でミュラー管を退行させると考えられる。これは頭側から尾側方向に起こるミュラー管の退行様式とも合致しており、本研究は AMH の分泌作用様式を明らかにした初めての報告である。

性決定遺伝子 (機構) は生物の進化の過程で保存されておらず、胎盤を有する哺乳類動物は独自のゲノムインプリンティングを基盤としたエピゲノム制御・維持機構が想定される。我々が作出した C57BL/6N (B6N) 背景に *Mus musculus poschiavinus* 由来の Y 染色体 (Y^{POS}) を導入したマウス B6N-XY^{POS} は、両側に精巣を有する個体や真性半陰陽個体を含む、雌雄が連続した表現型を示す性スペクトラムを呈することを明らかにしてきた。近年、マウスの亜系統間には様々な表現型の差異が認められ、実験に大きな影響を与えることが明らかにされていることから、B6J-XY^{POS}, B6N-XY^{POS} 間の生殖腺表現型の差異は、遺伝的背景に依存することが想定された。そこで、B6N-XY^{POS} を B6J 背景に戻し交配し、精巣を有する個体が出現するか否かならびに各表現型の出現率の検討を行った。その結果、B6J 背景への戻し交配に伴い、B6J-XY^{POS} では両側に精巣を有する個体の出現頻度が低下する一方で、両側に卵巣を有する個体の出現頻度が上昇した。また、戻し交配 3 世代目以降、両側に精巣を有する個体は出現しなくなり、組織学的にも卵巣内に精巣様の構造物は認められなかった。しかし、B6J-XY^{POS} における性決定遺伝子 SRY の発現開始は野生型と同時期であった。また、今回用いた B6N-XY^{POS} および B6J-XY^{POS} マウスの SOX9 調節領域はすべて B6 型で、雄性化誘導能の高い Swiss 型ではなかった。B6J-XY^{POS} と B6N-XY^{POS} とのエピゲノムの差が、生殖腺の表現型に影響を及ぼすことが示された。B6J 背景において B6J-XY^{POS} の精巣化が破綻しやすい原因は不明であるが、亜系統間の比較がその機序解明に有効と考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Yokoyama T, Miura Y, Yamamoto A, Hasegawa C, Kawanishi K, Takada N, Omotehara T, Hirano T, Mantani Y, Miki T, Hoshi N. Genetic differences between C57BL/6 substrains affect the process of testis differentiation in Y^{POS} mice. *J Vet Med Sci*, doi: 10.1292/jvms.18-0621. [Epub 2019 Mar 4] (2019) (査読有)

Yokoyama T, Omotehara T, Kubota N, Yanai S, Hasegawa C, Takada T, Hirano T, Mantani Y, Hoshi N. Identification of reference genes for quantitative PCR analyses in developing mouse gonads. *J Vet Med Sci*, 80: 1534-1539, 2018. doi: 10.1292/jvms.18-0417. (査読有)

Yamamoto A, Omotehara T, Miura Y, Takada T, Yoneda N, Hirano T, Mantani Y, Kitagawa H,

Yokoyama T, Hoshi N. The mechanisms underlying the effects of AMH on Müllerian duct regression in male mice. *J Vet Med Sci*, 80: 557-567, 2018. doi: 10.1292/jvms.18-0023. (査読有)

Yanai S, Hirano T, Omotehara T, Takada T, Yoneda N, Kubota N, Yamamoto A, Mantani Y, Yokoyama T, Kitagawa H, Hoshi N. Prenatal and early postnatal NOAEL-dose clothianidin exposure leads to a reduction of germ cells in juvenile male mice. *J Vet Med Sci*, 79: 1196-1203, 2017. doi: 10.1292/jvms.17-0154. (査読有)

Kubota N, Yokoyama T, Hoshi N, Suyama M. Identification of a candidate enhancer for DMRT3 involved in spastic cerebral palsy pathogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 496: 133-139, 2018. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.011. (査読有)

Omotehara T, Minami K, Mantani Y, Umemura Y, Nishida M, Hirano T, Yoshioka H, Kitagawa H, Yokoyama T, Hoshi N. Contribution of the coelomic epithelial cells specific to the left testis in the chicken embryo. *Dev Dyn*, 246: 148-156, 2017. doi: 10.1002/dvdy.24469. (査読有)

〔学会発表〕(計16件)

<特別講演・国際講演等>

Hoshi N. Adverse effects on cognitive-emotional behavior and immune system function in experimental animals administered a NOAEL-dose of neonicotinoids. CHEMICAL HAZARD Symposium, Hokkaido 2019. (Sapporo) March 20, 2019.

表原拓也, 南 貴一, 万谷洋平, 梅村ゆりあ, 西田美穂, 平野哲史, 吉岡秀文, 北川 浩, 横山俊史, 星 信彦. ニワトリ胚の性腺発生における左右差. 第121回日本解剖学会学術集会シンポジウム, ビックパレットふくしま(郡山市), 2017年3月28-30日.

星 信彦 (2017): 分子遺伝学が明かす男と女. 第58回日本母性衛生学会教育講演, 神戸国際会議場, 2017年10月6日.

星 信彦 (2017): 性決定・分化の多様性とその謎. 第74回生体構造医学セミナー, 東京医科大学, 2017年10月12日.

Omotehara T, Minami K, Mantani Y, Umemura Y, Nishida N, Hirano H, Yoshioka H, Kitagawa H, Yokoyama T, Itoh M, Hoshi N.: The origin of the testicular cells in the chicken embryo. Annual Meeting of the American Society for Reproductive Immunology, (Chicago, USA) 2017年9月17-20日

<一般講演等>

三浦由佳, 山本 杏, 川西航平, 長谷川千夏, 高田菜々子, 万谷洋平, 横山俊史, 星 信彦. 生殖腺の表現型に及ぼすマウス亜系統差の影響に関する遺伝学的研究. 第161回日本獣医学会学術集会, つくば国際会議場(つくば市), 2018年9月11-13日.

久保静花, 宮田結佳, 大成果乃子, 大野周嗣, 杉田暁佑, 前田瑞稀, 高田匡, 平野哲史, 万谷洋平, 横山 俊史, 星 信彦. 浸透性農薬の行動影響の性差. 第161回日本獣医学会学術集会, つくば国際会議場(つくば市), 2018年9月11-13日.

長谷川千夏, 梅村ゆりあ, 三浦由佳, 川西航平, 高田菜々子, 大野周嗣, 万谷洋平, 横山 俊史, 星 信彦. 性決定前のマウス未分化 XY 性腺の精巢化を誘導する器官培養法の確立とその組織学的評価. 第94回日本解剖学会近畿支部学術集会, 神戸大学新緑会館(神戸市), 2018年11月17日.

長谷川千夏, 梅村ゆりあ, 三浦由佳, 川西航平, 高田菜々子, 大野周嗣, 万谷洋平, 横山 俊史, 星 信彦. 性決定遺伝子発現前のマウス未分化 XY 性腺の精巢化を誘導する器官培養法. 関西実験動物研究会第140回研究会. 京大楽友会館(京都市), 2018年12月7日.

久保静花, 宮田結佳, 大成果乃子, 大野周嗣, 高田匡, 平野哲史, 横山 俊史, 星 信彦. 無毒性量のネオニコチノイド系農薬曝露による行動影響の性差. 環境ホルモン学会第21回研究発表会, 東洋大学白山キャンパス(東京都文京区), 2018年12月15-16日.

山本杏, 表原拓也, 三浦由佳, 川西航平, 長谷川千夏, 万谷洋平, 北川 浩, 横山俊史, 星 信彦. マウスのミュラー管退行における AMH 作用様式. 第93回日本解剖学会近畿支部学術集会,

滋賀医科大学(大津市), 2017年11月25日.

三浦由佳, 山本 杏, 川西航平, 長谷川千夏, 横山俊史, 星 信彦. マウスの垂系統差が生殖腺に及ぼす影響の遺伝学的研究. 第136回関西実験動物研究会, 京都大学楽友会館(京都市), 2017年12月1日.

梅村ゆりあ, 横山俊史, 田淵圭章, 表原拓也, 南貴一, 橋本理恵, 久保田直人, 山本杏, 広川千英, 平野哲史, 柳井翔吾, 高田匡, 米田直起, 万谷洋平, 北川浩, 星信彦. マウス未分化性腺における *Sry* 発現制御に関わる新規遺伝子の時空間特異的探索. 第159回日本獣医学会学術集会, 日本大学 生物資源科学部(神奈川県藤沢市), 2016年9月6-8日.

山本 杏, 表原拓也, 久保田直人, 南 貴一, 広川千英, 平野哲史, 磯江美智子, 柳井翔吾, 高田 匡, 米田直起, 三浦由佳, 岩本 遥, 万谷洋平, 北川 浩, 横山俊史, 星 信彦. マウス真性半陰陽個体における AMH の作用様式に関する組織学的解析. 第159回日本獣医学会学術集会, 日本大学 生物資源科学部(神奈川県藤沢市), 2016年9月6-8日.

山本 杏, 表原拓也, 久保田直人, 南 貴一, 平野哲史, 万谷洋平, 北川 浩, 横山俊史, 星信彦. マウス真性半陰陽個体のミューラー管退化と AMH の作用様式. 第92回日本解剖学会近畿支部学術集会, 近畿大学東大阪キャンパス(大阪府東大阪市), 2016年11月27日.

南 貴一, 表原拓也, 田淵圭章, 平野哲史, 横山俊史, 万谷洋平, 北川 浩, 星 信彦. ニワトリ雌右性腺退縮メカニズムの解明. 第92回日本解剖学会近畿支部学術集会, 近畿大学東大阪キャンパス(大阪府東大阪市), 2016年11月27日.

久保田直人, 表原拓也, 山本 杏, 三浦由佳, 平野哲史, 南 貴一, 柳井翔吾, 高田 匡, 米田直起, 岩本 遥, 万谷洋平, 横山俊史, 北川 浩, 星 信彦. マウス胎子性腺における性分化関連遺伝子転写調節領域の DNA メチル化状態. 第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2016年11月30日 12月2日.

〔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:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
<http://morfunc.main.jp>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 田淵 圭章

ローマ字氏名: TABUCHI, YOSHIAKI

所属研究機関名：富山大学

部局名：研究推進機構 研究推進総合支援センター

職名：教授

研究者番号(8桁): 20322109

研究分担者氏名：横山 俊史

ローマ字氏名：YOKOYAMA, TOSHIFUMI

所属研究機関名：神戸大学

部局名：農学研究科

職名：助教

研究者番号(8桁): 10380156

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。