

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18492

研究課題名(和文)ほ乳類の性決定に関わる新規エピゲノム制御因子の同定

研究課題名(英文)Studies on novel epigenetic regulator of the sex-determine in mammal

研究代表者

岡下 修己 (OKASHITA, Naoki)

徳島大学・先端酵素学研究所(次世代)・助教

研究者番号：10757933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Y染色体上には性決定遺伝子であるSryが存在し、このSryが雌雄に分化していない胎児期の生殖腺で一過的に発現することで個体を雄へと誘導する。我々は、H3K9脱メチル化酵素であるJmjd1aがSryのエピジェネティックな発現制御に深く関わっていることを明らかにした。しかし、Jmjd1a以外のエピゲノム制御因子の関りは不明であった。申請者の解析の結果、メチル化シトシン酸化酵素であるTetファミリーやH3K9メチル化酵素であるSuv39h、H3K9メチル化結合因子であるHP1ファミリーがSryの発現制御に関わる可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In mammals, the sex-determining gene Sry on the Y chromosome initiates testis differentiation in embryonic gonads. Sry expression in gonads is fine-tuned in both space and time. We previously demonstrated that Histone H3 lysine 9 (H3K9) demethylation Jmjd1a plays an indispensable role in mouse sex development. However, little is known about epigenetic regulators other than Jmjd1a responsible for regulation of Sry expression. As a result of our analysis, methylcytosine dioxygenases (Tets), H3K9 methylases (Suv39h) and H3K9 methyl binders (HP1 family) played an important role in regulation of Sry expression.

研究分野：分子生物学

キーワード：性決定 エピジェネティクス Sry

1. 研究開始当初の背景

エピゲノム修飾 (DNAのメチル化及びヒストンの化学修飾) は様々な生命現象の分子基盤を担っており、エピゲノム修飾の制御は哺乳類が発生・分化するうえで、遺伝子を時間的・空間的に正しく発現させるための重要な役割を果たしている。

哺乳類の性は、性染色体 (X、Y) の組み合わせにより決定し、XY を受け継ぐと雄、XX を受け継ぐと雌になる。Y 染色体上には性決定遺伝子である *Sry* が存在し、この *Sry* が雌雄に分化していない胎児期の生殖腺で一過的に発現することで個体を雄へと誘導する。*Sry* の発現制御については、その制御に関わる重要な転写因子はいくつか明らかとなっているが、エピジェネティックな制御機構の関与についてはほとんど分かっていなかった。本研究室では、*Jmjd1a* と呼ばれるヒストン脱メチル化酵素が *Sry* のエピジェネティックな発現制御に深く関わっていることを明らかにした。すなわち、*Jmjd1a* は *Sry* 遺伝子座の抑制的なエピジェネティックマークであるヒストン H3 のリジン 9 (H3K9) のメチル化修飾を外すことで、その転写活性化を正に調節していることを明らかにした。この論文において、哺乳類の性は単純に性染色体の組み合わせによって決まるのではなく、厳密なエピゲノム制御によって決定することを世界で初めて示した。しかし、*Jmjd1a* 以外の *Sry* の発現制御に関わるエピゲノム制御因子は未だ明らかとなっていない。

2. 研究の目的

上記の研究において、XY *Jmjd1a* 欠損マウスでは不完全な性転換が起こっており、雌雄両方の生殖腺を有する個体が観察される(図1)。



図1: *Jmjd1a* 欠損マウスの生殖腺の写真

すなわち、*Sry* の発現が雄化の誘導に必要な閾値付近まで低下しており、雌雄への分化が拮抗した状態にあることを示している。本研究では、この *Jmjd1a* 欠損マウスのユニークな表現型を利用して、*Sry* の発現制御における新規エピゲノム制御因子を明らかにすることで、エピゲノム制御を介した性決定メカニズム解明のさらなる進展を目指す。今回、大きく以下の2つのテーマに分けて研究を行う。

(1) *Sry* 遺伝子座における H3K9 メチル化の責任酵素及び H3K9 メチル化結合分子の同定

(2) *Sry* 遺伝子座における DNA 脱メチル化の

責任酵素の同定

エピゲノム修飾の制御には、修飾酵素 (Writer)、それに特異的に結合する分子 (Reader)、修飾を外す酵素 (Eraser) の3者が重要な役割を持つ。上記の研究により、*Jmjd1a* は *Sry* 遺伝子座の H3K9 メチル化を外す Eraser として機能し、*Sry* の転写活性化に寄与することが分かった。しかし、*Sry* 遺伝子座の H3K9 メチル化に寄与する Writer 及びそれに特異的に結合する Reader は不明である。また、生殖腺において *Sry* の発現が誘導される際、DNA メチル化が *Sry* 遺伝子座から消去されることが報告されている。しかし、その DNA メチル化消去を担う Eraser についても未だ不明である。そこで、*Jmjd1a* 欠損マウスを用い、近年開発が進んでいるゲノム編集技術を駆使することで、H3K9 メチル化 Writer・Reader 及び DNA メチル化 Eraser の候補因子の評価を行なう。

具体的には、それらの候補分子を CRISPR/Cas9 システムを用いて人為的に破壊し、*Jmjd1a* 欠損マウスにおける性転換の表現型を観察することで、*Sry* の発現制御に関わる新規エピゲノム制御因子を同定する。*Sry* 遺伝子座における H3K9 メチル化 Writer・Reader 及び DNA メチル化 Eraser の候補の絞り込みに成功した場合、それらの因子による *Sry* 発現制御機構の分子基盤を分子生物学的な手法を用いて明らかにしていく。

3. 研究の方法

上記の両テーマとも、以下の3つのステップに分けて行う。このステップを段階的に進めることで、*Sry* の発現制御に関わる新規エピゲノム制御因子を同定し、エピゲノム制御を介した性決定メカニズムを明らかにしていく。

(1) H3K9 メチル化及び DNA 脱メチル化制御因子をヘテロ欠損した *Jmjd1a* 欠損マウスの作製

(2) 作製した遺伝子欠損マウスにおける性転換の表現型解析

(3) 遺伝子欠損マウスにおける *Sry* の発現及び *Sry* 遺伝子座のエピゲノム構造解析

(1) H3K9 メチル化及び DNA 脱メチル化制御因子をヘテロ欠損した *Jmjd1a* 欠損マウスの作製

Sry 遺伝子座における H3K9 メチル化 Writer 候補は、これまでに H3K9 メチル化酵素活性があると示された分子、*Suv39h*、*Setdb1* を候補とする。H3K9 メチル化 Reader は、これまでに H3K9 メチル化特異的に結合することが分かっている分子、*HPI* ファミリーを候補とす

る。
Sry 遺伝子座における DNA メチル化 Eraser 候補は TET ファミリーを候補とする。これら各々の分子をヘテロ欠損したマウスは CRISPR/Cas9 システムを用いて樹立する。Cas9 mRNA 及び標的因子に対する gRNA を作製し、これらをエレクトロポレーション法により受精卵に導入することで、従来の手法よりも簡易かつ短期間に多くの欠損体の樹立を行う。その後、樹立した欠損マウスは *Jmjd1a* 欠損の遺伝子背景に戻し交配を行なうことで、各々の因子をヘテロで欠損した *Jmjd1a* 欠損マウスを樹立する。

(2) 作製した遺伝子欠損マウスにおける性転換の表現型解析

H3K9 メチル化制御因子をヘテロ欠損することで、*Jmjd1a* 単独欠損マウスで観察された性転換の表現型がレスキューされるのか、胎仔期及び成体での観察を行なう。性転換の比率は免疫科学的解析により定量する。性転換マウスの性腺は雌雄の性腺体細胞が混在したキメラ状になる。そこで、生殖腺の組織切片を抗 Sox9 抗体（雄生殖腺体細胞マーカー）及び抗 Foxl2 抗体（雌生殖腺体細胞マーカー）を用いて免疫組織染色を行い、Sox9 陽性細胞及び Foxl2 陽性細胞の数をカウントし比率を算出する。以上の解析により、ヘテロ欠損することで性転換の表現型がレスキューされた因子を *Sry* 遺伝子座における H3K9 メチル化の責任酵素とする。

DNA 脱メチル化制御因子に関しては、ヘテロ欠損することで、*Jmjd1a* 単独欠損マウスよりも性転換の頻度が高くなるか解析する。胎仔期及び成体での観察を行なう。性転換の比率は同様に抗 Sox9 抗体及び抗 Foxl2 抗体を用い、免疫組織染色により定量する。ヘテロ欠損することで性転換の頻度が高くなった因子を *Sry* 遺伝子座における DNA 脱メチル化の責任酵素とする。

(3) 遺伝子欠損マウスにおける *Sry* の発現及び *Sry* 遺伝子座のエピゲノム構造解析

Sry 遺伝子座の H3K9 の Writer・Reader 及び DNA メチル化 Eraser の候補の絞り込みに成功した場合、その分子基盤を分子生物学的な手法を用いて明らかにしていく。具体的には、胎生 11.5 日の胎仔で *Sry* mRNA 発現の変化を定量的リアルタイム PCR 法 (qRT-PCR) で測定する。加えて、各生殖腺における *Sry* タンパク質の発現を、当研究室で独自に作成した抗 *Sry* 抗体を用いて免疫組織染色により検討する。同時に、*Sry* 遺伝子座のエピゲノム構造を明らかにしていく。

4. 研究成果

Jmjd1a を欠損したマウスの生殖腺（胎生 13.5 日）では Sox9 陽性細胞及び Foxl2 陽性細胞が混在した状態になっている（図 2）。この

Jmjd1a 欠損マウスにおいて、更に *Tet2* をヘテロ欠損させることで、Sox9 陽性細胞の割合が減少（Foxl2 陽性細胞の割合が上昇）したことから、*Tet2* が *Sry* 遺伝子座の DNA メチル化 Eraser として機能する可能性が示唆された（図 2）。さらに、*Tet2* による *Sry* 発現制御機構の分子基盤を明らかにするため解析

Sox9/Foxl2/DAPI

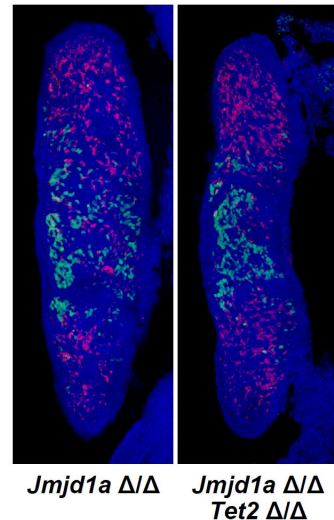


図 2: *Tet2* ヘテロ欠損による性決定の促進

を行った結果、*Tet2* を欠損することで *Sry* 遺伝子座の DNA メチル化の減少が起こりやすくなっていた。以上の結果から、*Tet2* が *Sry* 遺伝子座における DNA 脱メチル化の責任酵素として機能することが明らかとなった。

続いて、*Tet2* と同様に、*Jmjd1a* 欠損の遺伝子背景において上記の候補因子をヘテロ欠損した結果、*Tet2* 以外の Tet ファミリーや H3K9 メチル化酵素 Suv39h 及び H3K9 メチル化結合因子 Hp1 ファミリーが新たに *Sry* の発現制御に関わることも明らかとなった。

一方、同じ H3K9 メチル化酵素ではあるが Setdb1 に関しては性決定への影響は見られなかった。

本研究は、ほ乳類の性決定の仕組みをエピゲノムの観点から解明しようという世界に先駆けた独自のテーマであり、新規エピゲノム制御因子による性決定メカニズムの解明は学術的に価値のある成果である。さらに、本研究課題の成果は、学術的価値だけでなく医学的な意義も大きい。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。本研究結果は、DSD 発症の新たな原因及び疾患のメカニズム解明に繋がることが期待される。

参考文献

Kuroki S, Matoba S, Akiyoshi M, Matsumura Y, Miyachi H, Mise N, Abe K, Ogura A, Wilhelm D, Koopman P, Nozaki M, Kanai Y, Shinkai Y, Tachibana M. Epigenetic regulation of mouse sex determination by the histone demethylase *Jmjd1a*. *Science*, 341(6150), 1106-9, 2013

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)

Kuroki S., Okashita N., Baba S., Maeda R., Miyawaki S., Yano M., Yamaguchi M., Kitano S., Miyachi H., Itoh A., Yoshida M., Tachibana M. Rescuing the aberrant sex development of H3K9 demethylase *Jmjd1a*-deficient mice by modulating H3K9 methylation balance. *PLoS Genet*, 13(9), e1007034, 2017 (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

Naoki Okashita. Elucidation of novel epigenetic regulatory mechanism of the sex-determining gene “*Sry*”. Key forum: The 3rd International Symposium on Stem Cell Traits and Developmental Systems. Kumamoto. 2018

〔その他〕

ホームページ等

<https://ouyoukouso01.ait231.tokushima-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡下 修己 (OKASHITA, Naoki)
徳島大学・先端酵素学研究所・助教
研究者番号：10757933

(2)研究協力者

立花 誠 (TACHIBANA, Makoto)
徳島大学・先端酵素学研究所・教授
研究者番号：80303915