

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22369

研究課題名（和文）性染色体上ヒストン脱メチル化酵素活性転換マウスの作製と性分化への影響

研究課題名（英文）Generation of sex chromosome linked histone demethylase activity-converted mice and their effect on sex differentiation

研究代表者

岩森 巨樹（Iwamori, Naoki）

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：70647362

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：UTX及びUTYは性染色体にコードされたH3K27脱メチル化酵素であるが、両者の酵素活性には大きな差があるため、両者の活性差異が性決定に関与するかどうか、雌雄の活性を逆転させることで、性転換が起こるかどうか明らかにすることを目的とした。UTX及びUTYのアミノ酸配列及び結晶構造を参照し、UTXの活性をUTY型（UTX^Y）に、UTYの活性をUTX型（UTY^X）に変換しうるアミノ酸変異体を複数作製し、培養細胞を用いて、最適なアミノ酸変異を同定した。同定したアミノ酸変異を持つマウスをゲノム編集により作製したが、UTX^Yを持つ雌、UTY^Xを持つ雄ともに性転換は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

性は性染色体の遺伝的性で決定され、生殖線のみならず脳など様々な組織で性差が現れる。近年、LGBTなどの性の多様性が広く認識されるようになり、性差の制御にも多様性、連続性があるという考えが広まりつつある。本研究で対象とするUTXとUTYは活性が異なることから性差を構築する候補として考えられる。本研究結果によりUTX/UTYが雌雄の性決定に関わりがない可能性が高くなったことから、実際にUTX/UTY変異マウスが組織レベル、細胞レベルでの性差構築を解析する有用なツールとなることが示された。

研究成果の概要（英文）：UTX and UTY are H3K27 demethylases encoded on sex chromosomes. Since there is a large difference in their demethylase activity between UTX and UTY, the aim of this study is that whether the difference in demethylase activity is involved in sex determination or not is determined by conversion of H3K27 demethylase activity of male to the female level and vice versa. By referring to the amino acid sequences and crystal structures of UTX and UTY, multiple amino acid mutants which could convert UTX activity to UTY level (UTX^Y) and UTY activity to UTX level (UTY^X) were prepared. best amino acid mutants were identified by evaluation using cultured cells. Then, although mice with the identified amino acid mutations were prepared by genome editing, no sex conversion was observed in both females with UTX^Y and males with UTY^X.

研究分野：幹細胞生物学、生殖生物学

キーワード：性決定 性染色体 ヒストン脱メチル化酵素 ゲノム編集 UTX UTY 性差

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物における雌雄の性は性染色体の遺伝的性により決定され、Y 染色体上の遺伝子 *Sry* (Sex determining region on Y chromosome) が雄性性決定遺伝子として同定されている。しかし、*Sry* は哺乳類特有の性決定遺伝子であり、単孔類や一部の齧歯類、他の種類の動物では *Sry* が存在せず、別の制御機構の存在が示唆される。また、哺乳類でも *Sry* 欠損 / 転座や染色体異常などの性分化疾患を持つ個体では不妊など様々な異常が生じ、正常な性分化には性染色体上遺伝子群による別の制御機構の存在が裏付けられる。

いくつかの遺伝子組換えマウスの実験から *Sry* とは異なる経路の存在を示唆する結果が報告されている。メチル化 H3K27 を認識し、遺伝子発現抑制に関わる M33 (CBX2) の欠損マウスでは雄 雌の性転換が起こる。2016 年には H3K27 脱メチル化酵素 JMJD3 (KDM6B) が爬虫類における温度依存的性決定を制御することが報告され、H3K27 メチル化制御が種間のみならず、性決定様式をも超えて性分化制御に関与していることが示唆されている。

性染色体上には H3K27 脱メチル化酵素 UTX (KDM6A ; X 染色体) 及び UTY (Y 染色体) がコードされている。UTX 及び UTY は高い相同性を持ち、UTX は高い H3K27 脱メチル化活性を持ち、UTY の脱メチル化活性は極めて弱い。しかし、UTX を欠損した雌マウスは発生異常で胎生致死となるのに対し、UTX 欠損雄マウスは誕生することから、UTY に何らかの機能があることが示唆されている。また、UTX は X 染色体不活化から逃れる遺伝子の一つであるため、雄では UTX と UTY、雌では 2 アレル分の UTX が発現しており、雌雄で H3K27 脱メチル化活性に差があることが示唆される。

2. 研究の目的

以上の研究背景から、我々は「UTX と UTY の機能的差異が性分化制御に関与する」との仮説を立てた。そこで、本研究では、UTX 及び UTY の異なる H3K27 脱メチル化活性が性分化制御に関与するかどうか明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では UTX 及び UTY にアミノ酸置換を導入し、UTX の脱メチル化活性を UTY 型にまで減弱させた雌マウス (XX^{UTX}) 及び UTY の脱メチル化活性を UTX 型にまで増強させた雄マウス (XY^{UTY}) を作製した。

以上のように同定した UTX 及び UTY の変異体情報を元にマウスにアミノ酸置換を導入した。具体的には CRISPR/Cas9 によるゲノム編集法を採用し、アミノ酸置換導入予定部位近傍にガイド RNA を、さらに置換を導入するための一本鎖 DNA を設計し、各々合成した。合成したガイド RNA とアミノ酸置換導入一本鎖 DNA を Cas9 タンパク質とともに、前核期受精卵にエレクトロポレーションにより導入し、偽妊娠マウスに移植後、得られた産仔の遺伝子型を PCR-RFLP 法により確認した。

上記のようにして得られた UTX 活性減弱雌マウス (XX^{UTX}) あるいは UTY 活性増強雄マウス (XY^{UTY}) で性転換が見られるかどうか確認した。

4. 研究成果

まず、マウス UTX 及び UTY それぞれの活性の変換を試みた。ヒト UTY では 1214 番目のプロリンをイソロイシンに置換することで UTX と同程度の脱メチル化活性にまで増強できることが報告されている。脱メチル化活性を示すドメイン内のアミノ酸配列を比較すると、マウス UTY ではヒト UTY1214 番に対応するアミノ酸は 1079 番目で、プロリンではなくバリンである (図 1)。バリンはイソロイシンと同様の疎水性アミノ酸であるため、ヒト UTY と同様のアミノ酸置換では活性増強できる可能性は低い。他のアミノ酸置換候補として 1050 番目のスレオニン、アラニン及び 1141 番目の



図1. H3K27脱メチル化酵素C末端近傍の配列比較
白抜きは相同アミノ酸を示し、青三角がヒストンH3との疎水結合部位を示す。四角で囲っているのが変異導入予定位置

のプロリン ヒスチジンが考えられる (図 1)。そこで、マウス UTY^{V1079I}、UTY^{T1050A}、UTY^{P1141H}、UTY^{T1050A+P1141H} の各変異体を作製し、培養細胞での過剰発現系を用いて、UTX と同程度の活性置換が得られるかどうか検討し、UTY^{T1050A} 変異体で脱メチル化活性が確認できた。

一方で、UTX に関してはヒト、マウス共に 1267 番目のイソロイシンをプロリンに置換することでヒト UTY と同じアミノ酸構成に変換でき (UTX^{I1267P})、実際にマウス UTX の活性を UTY と同程度にまで減弱できることを確認した。

CRISPR/Cas9 法を用いて、上記 UTY^{T1050A} 及び UTX^{I1267P} の変異導入を行ない、UTY^{T1050A} を持つ雄マウス (XY^{UTY}) 及び UTX^{I1267P} を持つ雌マウス (XX^{UTX}) を作製した。しかしながら、XY^{UTY}、XX^{UTX} とともに性転換の表現型は得られなかった。JMJD1A ノックアウトマウスにおいて、C57BL 背景では性転換がほとんど起こらなかったのに対し、C57BL × CBA 背景で高率に性転換が起こったという事例を参考に、CBA 雄 × BDF1 雌の受精卵に対しゲノム編集を行い、XY^{UTY} を作製したが、性転換を起こす個体は確認できなかった。今後、実際に XY^{UTY} あるいは XX^{UTX} で H3K27 脱メチル化活性が変化しているかどうか検証するほか、性決定が行われる胎齢 11.5~13.5 日の生殖腺を解析し、性分化に異常がないかどうか解析を行う。一方で、本研究計画には含まれない遺伝子型の変異マウスで興味深い表現型を見出し、今後の展開が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Byun Sangwon, Seok Sunmi, Kim Young-Chae, Zhang Yang, Yau Peter, Iwamori Naoki, Xu H. Eric, Ma Jian, Kemper Byron, Kemper Jongsook Kim	4. 巻 11
2. 論文標題 Fasting-induced FGF21 signaling activates hepatic autophagy and lipid degradation via JMJD3 histone demethylase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-14384-z	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 該当する
1. 著者名 Iwamori Tokuko, Iwamori Naoki, Matsumoto Masaki, Imai Hiroyuki, Ono Etsuro	4. 巻 in press
2. 論文標題 Novel localizations and interactions of intercellular bridge proteins revealed by proteomic profiling†	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioaa017	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 Mallaney Cates, Ostrander Elizabeth L., Celik Hamza, Kramer Ashley C., Martens Andrew, Kothari Alok, Koh Won Kyun, Haussler Emily, Iwamori Naoki, Gontarz Paul, Zhang Bo, Challen Grant A.	4. 巻 33
2. 論文標題 Kdm6b regulates context-dependent hematopoietic stem cell self-renewal and leukemogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 2506 ~ 2521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-019-0462-4	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 該当する
1. 著者名 Kaneko Takane, Toh Saori, Mochida Izumi, Iwamori Naoki, Inai Tetsuichiro, Iida Hiroshi	4. 巻 87
2. 論文標題 Identification of TMC02 as an acrosome associated protein during rat spermiogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 808 ~ 818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mrd.23396	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 岩森巨樹	4. 巻 8月号
2. 論文標題 性分化を制御するエピジェネティック分子機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 36-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Naoki Iwamori, Sakurako Shima, Tokuko Iwamori, Hiroshi Iida
2. 発表標題 The role of H3K27 demethylases in the aging of spermatogonial stem cells
3. 学会等名 ISSCR 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakurako Shima, Tokuko Iwamori, Hiroshi Iida, Naoki Iwamori
2. 発表標題 Regulation of Spermatogonial stem cells by H3K27 demethylases
3. 学会等名 2019 SSR annual meeting (52nd) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩森督子、加藤譲、岩森巨樹、今井啓之、相賀裕美子、小野悦郎
2. 発表標題 ノックアウトマウスを用いたInterCellular bridge関連遺伝子KIAA1210の機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Yamamura, Hiroshi Iida, Naoki Iwamori
2. 発表標題 Visualization of intercellular bridges and undifferentiated spermatogonia in in vitro differentiation of male germ cells
3. 学会等名 第18回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2020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	岩森 督子 (Iwamori Tokuko) (10711509)	九州大学・医学研究院・助教 (17102)	

	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
研究協力者	藤田 真由 (Fujita Mayu)	九州大学・農学部・学生 (17102)	

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