

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24051

研究課題名(和文)性差形成過程における外生殖器のアンドロゲン依存性の普遍的遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of how androgen receptor regulates downstream target genes in external genitalia during sexual differentiation.

研究代表者

梶岡 大暉(Kajioka, Daiki)

和歌山県立医科大学・先端医学研究所・助教

研究者番号：40842737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、性差形成過程のマウス胎仔外生殖器をモデルとして、アンドロゲン依存的な遺伝子発現制御機構を明らかにすることを目的としている。本研究結果から、性差形成過程の外生殖器において、雌雄共通にSp1がアンドロゲン受容体(AR)標的遺伝子の発現制御領域においてH3K27のアセチル化を制御していることを明らかとした。さらに、AR標的遺伝子であるMafBのエンハンサーノックアウト(eKO)マウスを用いた解析から、MafB発現低下とともに管腔形成異常を認めたことから、外生殖器の性差形成においてARが標的遺伝子の発現を制御する上で、Sp1によるH3K27のアセチル化の重要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス胎仔外生殖器において、アンドロゲンが標的遺伝子の発現を制御するにあたり、Sp1によるヒストン修飾を介した転写制御領域の活性化の重要性が示唆された。さらに、次世代シーケンサーを駆使したゲノムワイドな解析により、本制御機構は雌雄共通に保存されていることを明らかにした。このことは、既存報告されてきた遺伝的背景のメス個体が雄性分化するためのアンドロゲン応答性を獲得している分子基盤である可能性を示唆するものである。このようなホルモン応答性の獲得に対する初期分子制御基盤を明らかにしたことは、尿道下裂などの泌尿生殖系の先天性疾患から前立腺癌などの癌病態までの幅広い理解に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Androgen is an essential endocrine factor for establishing sex differences of external genitalia (ExG). This study aims to uncover the mechanisms of how androgen receptor (AR) regulates its target genes expression by using murine embryonic ExG (eExG). Motif enrichment analyses from AR ChIP-seq identified that Sp1 was a collaborative transcriptional factor of AR. Genome-wide distribution analyses of H3K27ac, H3K4me1, and SP1 from ChIP-seq revealed a similar pattern at AR-mediated regulatory elements in both sexes, suggesting that transcriptional competency for AR target genes was conserved in both male and female. Moreover, Sp1 regulates the acetylation of H3K27 at the enhancers of AR target genes in both sexes. Genetic manipulation of MafB and Sp1 regulatory MafB enhancer elements caused incomplete male-type eExG differentiation. These findings provide novel insight into the androgen-dependent regulatory mechanisms underlying sex differentiation for eExG.

研究分野：生殖発生学

キーワード：アンドロゲン 性差 外生殖器 遺伝子発現制御 ヒストン修飾 エンハンサー Sp1 MafB

1. 研究開始当初の背景

性ホルモンは、外生殖器を含む様々な生殖発生および分化と密接に関与する。哺乳類の外生殖器は、母胎内にて性ホルモンの一種であるアンドロゲン依存的に亀頭や陰茎などの雄特有の器官へ分化し、性差の構築に至る。これまでに、遺伝子改変動物、抗アンドロゲン剤またはアンドロゲン受容体作動薬などを用いた我々の知見から、外生殖器の形態的性差に対するアンドロゲンの重要性は議論されていたが、遺伝子発現制御機構を含めて如何なる分子基盤のもとに性差の構築に至るのか未解明である。外生殖器の発生は、雌雄共通の原基である生殖結節 (Genital Tubercle; GT) の形成に始まる。その後、雄マウスの GT では、精巣から分泌されるアンドロゲンにより尿道が陰茎内に取り込まれ管状の構造を形成する。このような形態学的性差は、胎生 16.5 日目 (E16.5) に初めて観察される。我々は、外生殖器の間葉細胞におけるアンドロゲンシグナルが性分化に不可欠であること、及び、MafB はアンドロゲン依存的に GT の間葉細胞にて発現誘導される雄型尿道形成に必須の因子であることを見出している (Suzuki et al., *PNAS* 2014)。アンドロゲンシグナルの破綻は尿道下裂などの先天性疾患の原因となる。

アンドロゲン受容体 (AR) は、アンドロゲン (リガンド) が結合することで転写因子として機能し、細胞増殖因子や細胞周期に関連する因子等の発現を制御する。これまでに、前立腺癌や乳癌など病態をモデルとした研究から AR を含む性ホルモン受容体の転写共役因子 (collaborative transcription factor) が同定されている。一般に、collaborative transcription factor はヒストン修飾などのエピゲノム制御を介して性ホルモン受容体の転写活性を調節することが提唱されている。一方で、外生殖器を含む生殖器の発生・分化過程における性ホルモン受容体の collaborative transcription factor の同定とその機能に迫った報告は皆無である。

研究代表者は、AR ChIP-seq からモチーフ解析を行い、AR の結合サイト周辺に Zing-finger 型転写因子 Sp1 結合サイトの存在を同定した。さらに、Reporter assay の解析から bZip 型転写因子 MafB (雄型尿道形成因子) のアンドロゲン依存的な発現は Sp1 阻害剤 (ミスラマイシン A) の共処置により抑制され、一方で、SP1 の過剰発現により AR の転写活性が増強した。また、E16.5 の雄 GT において、AR と SP1 のタンパク質間相互作用の存在についても同定した。これまでに、我々は AR による *MafB* の転写制御はその 3' 非翻訳領域 (3' UTR) を介するものであり、有力なエンハンサー領域である可能性を明らかとしてきた (Matsushita et al., *Endocrinology* 2016)。しかしながら、性差形成過程の生殖器においてどのような機構を基盤に AR が下流遺伝子の転写制御を可能とするのか未解明のままである。興味深いことに、我々のヒストン修飾の ChIP-seq 解析から活性型エンハンサーマークである H3K27Ac 及び H3K4me1 は雌雄共通に MafB の 3' UTR に濃縮していた。また、同領域において Sp1 が結合していた。これらの結果は、性差形成過程の外生殖器において、Sp1 が AR の転写活性に寄与する collaborative transcription factor の可能性を示唆するものである。

そこで、本研究では、性差形成過程の外生殖器をモデルとしてエピゲノム修飾を介した AR 依存性の普遍的遺伝子発現制御機構を明らかとする。

2. 研究の目的

本研究では、生殖発生分野において未解明である生殖器の発生・分化過程における性ホルモン依存性の遺伝子発現機構について外生殖器をモデルに collaborative transcription factor の同定とその機能に焦点を置き、性ホルモン受容体による普遍的な遺伝子発現制御機構の解明を目的とする。

我々は、世界初となるアンドロゲン依存的な雄型尿道形成の評価を可能とする組織培養系の確立に至った (Acebedo et al., *Commun Biol* 2019)。このような組織培養実験系を応用した解析から、研究代表者はミスラマイシン A によりアンドロゲン誘導性 MafB の発現低下に伴い雄型尿道形成が阻害される結果を得ていた。

そこで、本研究では、このような組織培養実験系やゲノム編集技術を用いる解析から Sp1 が AR の転写活性にどのように寄与するかを解明する。

3. 研究の方法

1. 組織培養実験系を用いて、ミスラマイシン A 処置によるアンドロゲン標的遺伝子の発現制御領域における活性化ヒストンマーク (H3K27ac 及び H3K4me1) の enrichment 状態に与える影響を ChIP-qPCR 解析により評価する。

2. E16.5 の GT を用いて活性化ヒストンマーク (H3K27ac 及び H3K4me1) 及び SP1 の ChIP-seq を行う。これらの ChIP-seq 解析から、AR による転写制御領域におけるヒストン修飾の状態と SP1 の結合状態について雌雄の違いを評価する。

3. E16.5 の *Ar* KO 雄マウスの GT を用いて、H3K27ac 及び H3K4me1 の ChIP-qPCR を行う。

4. 雄型尿道形成因子 MafB 発現を調節する Sp1 を介した候補制御エンハンサー領域の欠損マウスを CRISPR-Cas9 システムを用いて作製し、エンハンサー領域を介した遺伝子発現制御機構に対

する意義について表現型解析を以て解明する。

4. 研究成果

本研究の遂行により、1)性差形成過程の外生殖器において、Sp1 が H3K27 のアセチル化を介して AR の転写活性を制御すること、2)AR 結合領域における網羅的な H3K27ac、H3K4me1、SP1 の ChIP-seq のシグナルをヒートマップ解析した結果、雌雄の外生殖器で変化を認めなかったことから、AR 標的遺伝子の発現制御機構が雌雄共通に保存されていたこと、3)Sp1 による H3K27ac 制御領域を欠損させた *MafB* エンハンサーノックアウト (eKO) を用いた表現型解析から、アンドロゲン依存的な尿道形成が阻害されていたことより、AR シグナルによる遺伝子発現制御には Sp1 による H3K27 のアセチル化が重要であることが明らかとなった。

以上の結果は、国際科学雑誌に成果報告も行なった (Kajioka et al., *PNAS* 2021)。

1)性差形成過程の外生殖器において、Sp1 は H3K27 のアセチル化を介して AR の転写活性を制御する。

Sp1 が AR の転写活性を制御するメカニズムを明らかとするべく、E14.5 のマウス GT にミスラマイシン A を処置し、24 時間後にサンプルを回収し、ChIP を行なった。得られた DNA 断片を定量解析したところ、*MafB* の発現を制御するエンハンサー領域における H3K27ac の enrichment がミスラマイシン A を処置することで阻害されていた。一方で、H3K4me1 の enrichment に対する阻害効果は認められなかった。また、*MafB* のみならず、AR の標的遺伝子である *Fkbp5* のエンハンサー領域における H3K27ac の enrichment を評価したところ、*MafB* 同様にミスラマイシン A により阻害されていた。驚くべきことに、ミスラマイシン A による H3K27 アセチル化に対する阻害効果は雌雄共通に確認されたことから、AR の標的遺伝子発現制御に対するアンドロゲン応答性は Sp1 による H3K27 のアセチル化を介して雌雄共通に保存されたメカニズムであることが示唆された。

2)アンドロゲンによる AR 標的遺伝子の転写活性化機構は雌雄で保存されている。

組織培養実験系を駆使した解析からアンドロゲンによる *MafB* や *Fkbp5* の発現誘導には、雌雄共通にしてエンハンサー領域における Sp1 を介した H3K27 アセチル化が重要であることを明らかとしてきた。次に、*MafB* や *Fkbp5* のみならず、AR 結合領域における H3K27ac、H3K4me1、SP1 の enrichment 状態を網羅的に評価するため、これらの ChIP-seq から得られたそれぞれのシグナルについてヒートマップ解析を行なった。その結果、AR 結合領域において、H3K4me1 に比較して H3K27ac の方が SP1 との状態に高い正の相関性があることが明らかとなった。さらに、ヒートマップによるゲノムワイドな解析から、H3K27ac、H3K4me1、SP1 の状態に性による差が認められなかった。これらのことから、AR 結合領域における活性化ヒストン修飾には AR による非依存的なメカニズムが存在することが示唆された。そこで、*Ar* KO 雄マウスの GT を用いた H3K27ac 及び H3K4me1 の ChIP-qPCR 解析を行なった結果、*MafB* 及び *Fkbp5* のエンハンサー領域において活性化ヒストンマークが enrich していた。これらの解析結果から、アンドロゲンによる AR 標的遺伝子発現誘導に対する転写活性化機構は雌雄で保存されていたことが明らかとなった。

3)Sp1 の制御する *MafB* エンハンサー領域は雄型尿道形成に重要である。

組織培養実験系を応用した解析などから Sp1 がヒストン修飾を介して AR の転写活性を制御することを明らかとしてきたが、実際にアンドロゲン依存的な性分化制御に与える影響は不明である。*MafB* は、AR の直接的な下流遺伝子であり、且つ、KO すると雄マウス胎仔は尿道下裂に酷似する表現型を呈する (Suzuki et al., *PNAS* 2014)。そこで、*MafB* の発現制御をモデルとすることで、アンドロゲン依存的な外生殖器の性分化に与える Sp1 の H3K27ac 制御領域の重要性を明らかにする。この目的を達成するために、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を駆使し、H3K27ac 陽性の *MafB* エンハンサー領域 (3'UTR) を欠損させたマウス (*MafB* eKO) を作製した。*MafB* eKO の雄マウス胎仔において、外生殖器の異常を認めることはなかった。一方で、*MafB*^{+/GFP} (*MafB*^{+/+}) マウスとの掛け合わせにより作製した *MafB* eKO/⁻雄マウスの GT は、*MafB* KO で認められるほどの表現型異常はなかったが、不完全な雄型の尿道形成を呈していた。*MafB* の発現、及び、その発現制御に伴う外生殖器の性差形成をモデルとした解析結果から、AR の標的遺伝子に対する転写活性化には Sp1 による H3K27 のアセチル化が重要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Taiju Hyuga, Mellissa Alcantara, Daiki Kajioka, Ryuma Haraguchi, Kentaro Suzuki, Shinichi Miyagawa, Yoshiyuki Kojima, Yutaro Hayashi and Gen Yamada	4. 巻 21 (1)
2. 論文標題 Hedgehog Signaling for Urogenital Organogenesis and Prostate Cancer: An Implication for the Epithelial-Mesenchyme Interaction (EMI).	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 58-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21010058	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 Daiki Kajioka, Kentaro Suzuki, Shoko Matsushita, Shinjiro Hino, Tetsuya Sato, Shuji Takada, Kyoichi Isono, Toru Takeo, Mizuki Kajimoto, Naomi Nakagata, Mitsuyoshi Nakao, Mikita Suyama, Tony DeFalco, Shinichi Miyagawa, Gen Yamada	4. 巻 118 (23)
2. 論文標題 Sexual fate of murine external genitalia development: Conserved transcriptional competency for male-biased genes in both sexes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA	6. 最初と最後の頁 e2024067118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2024067118	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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Daiki Kajioka, Kentaro Suzuki, Shoko Matsushita, Shinjiro Hino, Tetsuya Sato, Shuji Takada, Shinichi Miyagawa, Toru Takeo, Naomi Nakagata, Mikita Suyama, Kyoichi Isono, Mitsuyoshi Nakao and Gen Yamada
2. 発表標題 Androgen receptor (AR) transcriptional activities are regulated by Sp1 during sexual differentiation of external genitalia.
3. 学会等名 53rd Annual Meeting of JSDB
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
---------------------------	-----------------------	----

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