

令和 6 年 4 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19221

研究課題名（和文）鉄によるエピゲノム制御 -母体の鉄量変動は胎仔のエピゲノムを変えるのか？-

研究課題名（英文）Epigenetic regulation by iron metabolism - Does maternal iron fluctuation alter the epigenome of the fetus? -

研究代表者

立花 誠 (Tachibana, Makoto)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：80303915

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）：DNAやヒストンの脱メチル化を触媒する酵素反応（酸化反応）には、二価鉄（Fe²⁺）が必須である。私たちは過去に、胎仔（児）期におきる性決定は、Fe²⁺要求性のヒストン脱メチル化酵素が深く関与することを見出した。さらに最近、培養細胞のレベルで、培地の鉄量がヒストンの脱メチル化を律速することを見出した。このような知見に基づき、妊娠期の母体の鉄の代謝変動が胎仔エピゲノムに及ぼす影響をマウスモデルで検証する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、鉄過剰症の一般的な治療薬として用いられている鉄キレート剤が生体内のエピゲノムを変えてしまう可能性を検証する。最近では、DNA/ヒストンのメチル化は配偶子のゲノムを介して複数の世代にわたって安定に継承される、との実験結果も数多く報告されてきている。本研究は、鉄代謝関連疾患に対する既存の治療方法の抜本的な見直しを迫るとともに、その新たな（=安全な）治療方法の開発へとつながる可能性を秘めている。

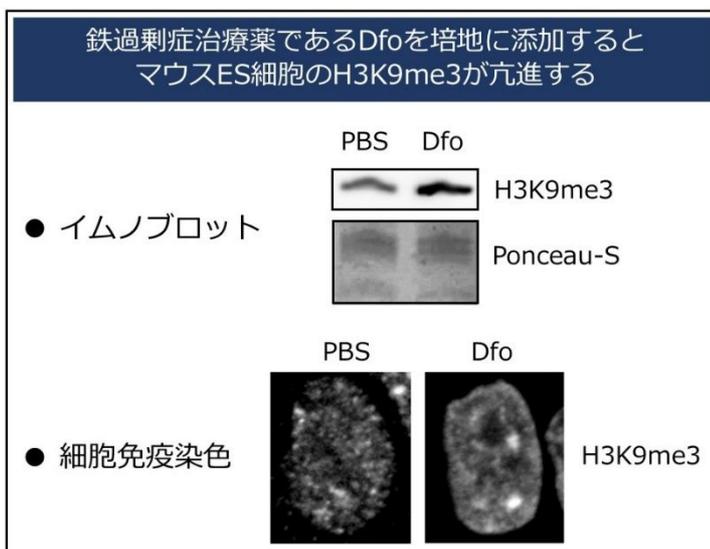
研究成果の概要（英文）：Enzymatic reactions (oxidation reactions) that catalyze the demethylation of DNA and histones require divalent iron (Fe²⁺). Previously, we have found that Fe²⁺-requiring histone demethylase is involved in sex determination during embryogenesis. More recently, it was found that in cultured cells, the iron content of the medium is a rate-limiting factor for histone demethylation. Based on these findings, we will examine the effects of maternal iron metabolism on the fetal epigenome in a mouse model.

研究分野：分子生物学

キーワード：性決定 鉄

1. 研究開始当初の背景

以前私たちは、性決定期のマウスの生殖腺では、ヒストン脱メチル化酵素 *Jmjd1a* が *Sry* の H3K9 を脱メチル化し、その発現を正に制御していることを報告した (Science 2013)。加えて最近、性決定の時期のマウス胎児の生殖腺では、*Tfrc* などの鉄の細胞内取り込みに関わる遺伝子や、*Steap3* などの Fe^{2+} の産生を促進する遺伝子群が高発現していることを見出した (未発表データ)。この二つの事実を考え合わせ、「DNA/ヒ



ストンの脱メチル化反応は、細胞内の鉄量で律速されている」という、まったく新しい概念を想起するに至った。この仮説についてまずは培養細胞による検証をおこなった。上述した鉄過剰症の治療薬である Dfo を培地に添加して一過性に鉄を除去すると、マウスの胚性幹 (ES) 細胞の H3K9 のトリメチル化が大幅に亢進することが明らかになった (上図)。また、鉄を過剰に加えると H3K9 のトリメチル化は減少した。鉄量とメチル化レベルの関係は、ヒストンのメチル化のみならず DNA のメチル化でも逆相関していた。以上の実験結果は、生体内においても鉄の過不足が細胞のエピゲノムを変える可能性を容易に連想させるものであった。

2. 研究の目的

DNA/ヒストンの化学修飾によるエピジェネティック制御は、発生や分化の様々な局面で重要な役割を果たす。なかでも DNA/ヒストンのメチル化・脱メチル化は、ゲノムインプリンティングの確立と消去に必須の役割を担っている。加えて私たちは、マウス胎仔の性決定にヒストンの脱メチル化 (黒木と立花ら Science 2013) や DNA の脱メチル化 (岡下と立花ら Sci Rep 2019) によるエピジェネティック制御が重要であることを明らかにしてきた。

DNA /ヒストンの脱メチル化を触媒する酵素反応 (酸化反応) には、二価鉄 (Fe^{2+}) が必須である。私たちはごく最近、培養細胞では、DNA とヒストンのメチル化が培地中の鉄量に依存して変動することを見出した。この現象は、DNA の脱メチル化に関わる Tet ファミリー分子、およびヒストン脱メチル化酵素である *JmjC* ドメインファミリー分子の活性が、培地に含まれる鉄量によって律速されることを意味する。さらにこの実験結果は、生体内においても、鉄の不足や過剰な状態は細胞のエピゲノムを変えうることも容易に連想させた。胎仔 (児) 期におきる性決定やゲノムインプリントの消去には、上記のエピゲノム酵素群が深く関与する。このような知見に基づき、妊娠期の母体の鉄の代謝変動が胎仔エピゲノムに及ぼす影響を、マウスモデルで検証する。

3. 研究の方法

過去に私たちは、胎仔期の生殖腺から、性決定関わる細胞 (NR5A1 陽性 (+) 細胞) と主に中腎細胞からなる性決定寄与しない細胞 (NR5A1 (-) 細胞) を分離する方法を開発した (図 1)。この方法を用いて性決定期の生殖腺から NR5A1 (+) 細胞と NR5A1 (-) 細胞を分取し、鉄代謝遺伝子の発現を RT-qPCR 法にて定量し、比較した。

並行し、胎仔期生殖腺を鉄欠乏状態にして、その性分化過程を経時的に観察できるような実験系を構築することを目指した。この目的のためには、母体内で生殖腺を成育させるのではなく、試験管内で成育後させるのが望ましい。よって性決定前のマウス胎仔から、性的に未分化な生殖腺の複合体（大動脈、間質細胞、中腎を含む）を抽出し、*in vitro* で器官培養を行ってその性分化を観察することができる実験系の開発を目指した。

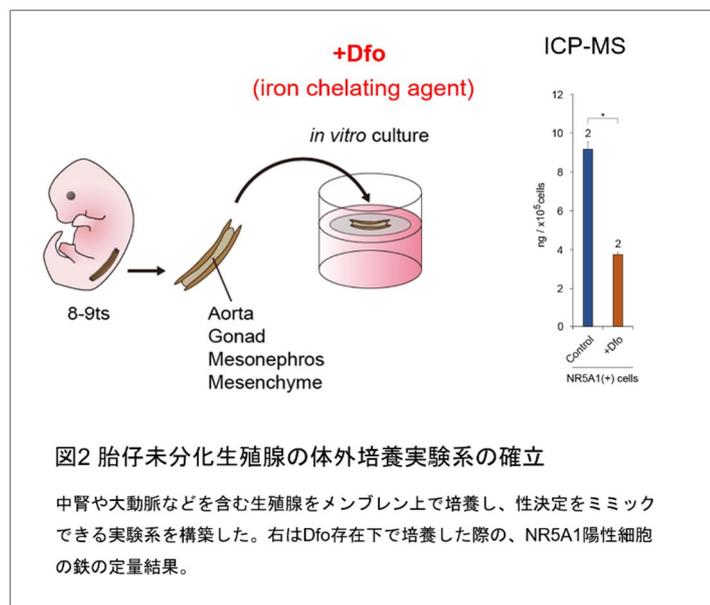
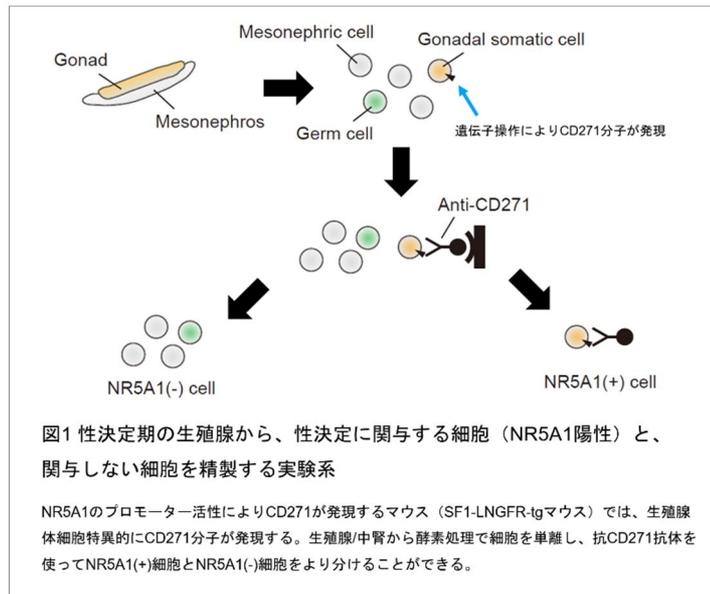
受精後 10.5 日 (E10.5) の胎仔から

生殖腺複合体を単離し、これを一定のポアサイズのメンブレン上に静置し、血清が入った細胞培養用の培地に浮かべて CO2 インキュベーター中にて培養した（図 2、左）。これを一定の時間培養し、各時点で *Sry* の mRNA を定量した。同時に、生殖腺体細胞の個数もカウントした。さらに、鉄キレート剤である Deferoxamine (Dfo) を培地に添加し、鉄を欠損した状態での生殖腺の分化を観察した。

4. 研究成果

鉄代謝関連遺伝子の発現を、性決定期の NR5A(+)*細胞*と NR5A(-)*細胞*で比較した結果を図 3 に示した。*Sry* mRNA は、ほぼ NR5A(+)*細胞*でのみ検出された。また、*Jmjd1a* mRNA は NR5A(+)*細胞*に多く含まれていた。鉄代謝に関連する遺伝子/タンパク質に着目すると、鉄の細胞内取り込みを促進する *Tfrc*/TFR1 (トランスフェリン受容体)、*Scara5*/SCARA5 (フェリチン受容体) は、NR5A(+)*細胞*で高く、NR5A(-)*細胞*で低かった。また、細胞内で Fe²⁺ の産生を促進する、*Slc11a2*/DMT1、*Steap3*/STEAP3、*Ncoa4*/NCOA4、*Hmox1*/HO1 についても、NR5A(+)*細胞*で高く、NR5A(-)*細胞*で低かった。また、鉄の細胞外排出を促進する、*Slc40a1*/FPN (フェロポーチン)、*Heph*/HEPH は、逆に NR5A(+)*細胞*で低く、NR5A(-)*細胞*で高かった。この結果は、性決定の役割を担っている NR5A(+)*細胞*では、鉄の取り込み経路と Fe²⁺ 産生経路が活性化していることを示した。

未分化生殖腺の試験管内培養の実験では、約 20 時間の培養時間で *Sry* の発現がピークとなることを明らかにした。20 時間培養した時点での *Sry* の mRNA 発現量は、母体内で発生した性決定期（受精後 11.5 日）の胎仔の *Sry* の mRNA 発現量と同等であった。20 時間培養した時点での生殖腺体細胞の個数も、母体内で発生した胎仔の生殖腺体細胞の個数と遜色なかった。また、鉄キレート剤である Dfo の存在下でも生殖腺を培養した。Dfo 存在下で生殖腺を培養しても、生



未分化生殖腺の試験管内培養の実験では、約 20 時間の培養時間で *Sry* の発現がピークとなることを明らかにした。20 時間培養した時点での *Sry* の mRNA 発現量は、母体内で発生した性決定期（受精後 11.5 日）の胎仔の *Sry* の mRNA 発現量と同等であった。20 時間培養した時点での生殖腺体細胞の個数も、母体内で発生した胎仔の生殖腺体細胞の個数と遜色なかった。また、鉄キレート剤である Dfo の存在下でも生殖腺を培養した。Dfo 存在下で生殖腺を培養しても、生

殖腺体細胞の個数は Dfo が非存在下のそれと変わらなかった。一方で、Dfo を培地に添加することによって、生殖腺体細胞中の鉄量は対照試料のその約40%にまで減少した(図2、右)

この鉄量が対照の40%にまで減少した生殖腺を材料にしてエピゲノム解析を行った(図4)。図4の左に示すように、Dfo 未処理生殖腺では、生殖腺体細胞で H3K9me2 が低く、中腎細胞で H3K9me2 が高い。これは、*Jmjd1a* が高く発現し

ている NR5A1(+)細胞では、H3K9me2 の脱メチル化が活発に行われていることに起因する(図2参照)。一方で、Dfo 存在下で培養した生殖腺では、NR5A1(+)細胞の H3K9me2 が隣接した NR5A1(-)細胞のそれと同等なレベルにまで上昇していた。TET 酵素は、5-methyl cytosine (5mC) を酸化することにより、5-hydroxymethyl cytosine (5hmC) 産生する。5hmC はさらに酸化を受け、最終的には修復経路によって cytosine に変換される。このことから、5hmC は DNA 脱メチル化経路の中間産物である。図4の右に示すように、NR5A1(+)細胞では 5hmC が高いことから、この細胞で DNA の脱メチル化が活発に行われていることが分かる。一方で、Dfo 存在下で培養した生殖腺では、NR5A1(+)細胞の 5hmC の低下が観察された。以上の実験結果は、Dfo 添加による培地中の鉄の減少は、胎仔生殖腺体細胞のエピゲノムを攪乱することが明らかになった。

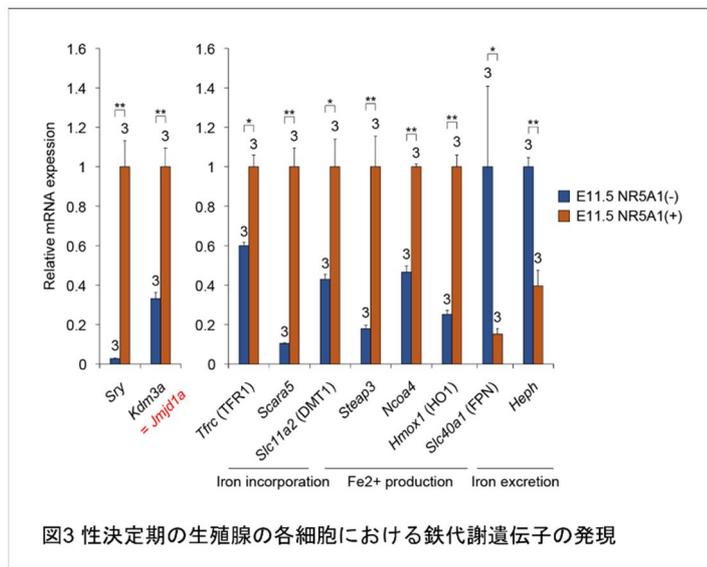


図3 性決定期の生殖腺の各細胞における鉄代謝遺伝子の発現

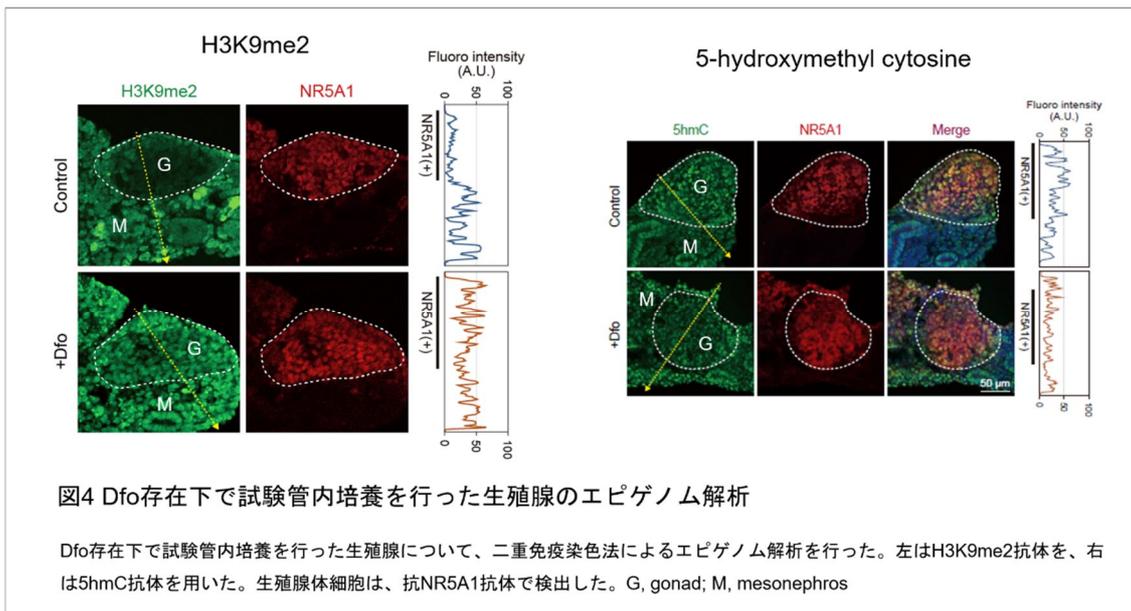


図4 Dfo存在下で試験管内培養を行った生殖腺のエピゲノム解析

Dfo存在下で試験管内培養を行った生殖腺について、二重免疫染色法によるエピゲノム解析を行った。左はH3K9me2抗体を、右は5hmC抗体を用いた。生殖腺体細胞は、抗NR5A1抗体で検出した。G, gonad; M, mesonephros

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Maeda Ryo, Tachibana Makoto	4. 巻 23
2. 論文標題 HP1 maintains protein stability of H3K9 methyltransferases and demethylases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e53581
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202153581	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 立花誠	4. 巻 58
2. 論文標題 マウス性決定遺伝子Sryの「隠れたエキソン」の発見	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 34, 38
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 -
1. 著者名 Daiki Hashimoto, Tsuyoshi Hirashima, Hisao Yamamura, Tomoya Kataoka, Kota Fujimoto, Taiju Hyuga, Atsushi Yoshiki, Kazunori Kimura, Shunsuke Kuroki, Makoto Tachibana, Kentaro Suzuki, Nobuhiko Yamamoto, Shin Morioka, Takehiko Sasaki, Gen Yamada	4. 巻 104
2. 論文標題 Dynamic erectile responses of a novel penile organ model utilizing two photon excitation microscopy (TPEM) †	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 875, 886
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioab011	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 Yuki Takada, Chisato Kodera, Kazumasa takemoto, Akihiko Sakashita, Kenichi Horisawa, Ryo Maeda, Ryuki Shimada, Shingo Usuki, Sayoko Fujimura, Naoki Tani, Kumi Matsuura, Tomohiko Akiyama, Atsushi Suzuki, Hitoshi Niwa, Makoto Tachibana, Takeshi Ohba, Hidetaka Katabuchi, Satoshi Namekawa, kimi Araki, Kei-Ichiro Ishiguro	4. 巻 12
2. 論文標題 Meiosis-specific ZFP541 repressor complex promotes developmental progression of meiotic prophase towards completion during mouse spermatogenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 e3184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-23378-4.	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 Takeshi Yoshino, Takahiro Suzuki, Go Nagamatsu, Haruka Yabukami, Mika Ikegaya, Mami Kishima, Haruka Kita, Takuya Imamura, Kinichi Nakashima, Ryuichi Nishinakamura, Makoto Tachibana, Miki Inoue, Yuichi Shima, Ken-Ichirou Morohashi, Katsuhiko Hayashi	4. 巻 373
2. 論文標題 Generation of ovarian follicles from mouse pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 282, 289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.abe0237.	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 Ryo Maeda, Makoto Tachibana	4. 巻 23
2. 論文標題 HP1 maintains protein stability of H3K9 methyltransferases and demethylases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EMBO Reports	6. 最初と最後の頁 e53581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202153581	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 宮脇慎吾、立花誠	4. 巻 278
2. 論文標題 性決定遺伝子の全貌-マウスSryにおける“隠れエキソン”の発見-	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1132, 1133
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 -

1. 著者名 立花誠	4. 巻 58
2. 論文標題 マウス性決定遺伝子Sryの「隠れたエキソン」の発見	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 34, 38
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 -

1. 著者名 Okashita Naoki, Maeda Ryo, Tachibana Makoto	4. 巻 120
2. 論文標題 CDYL reinforces male gonadal sex determination through epigenetically repressing Wnt4 transcription in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2221499120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2221499120	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Makoto Tachibana
2. 発表標題 The Mouse Sry Locus Harbors a Cryptic Exon that is Essential for Male Sex Determination
3. 学会等名 The 12th Biennial Scientific Meeting of the Asia Pacific Paediatric Endocrine Society 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田亮、立花誠
2. 発表標題 H3K9me2/3 represses the expression of 2-cell-stage-specific genes in mESCs
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryo Maeda, Makoto Tachibana
2. 発表標題 HP1 maintains protein stability of H3K9 methyltransferases in mammalian cells
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Makoto Tachibana
2. 発表標題 Role of iron metabolism in mouse sex determination
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会シンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 立花誠
2. 発表標題 マウスES細胞におけるトランスポソンの抑制機構
3. 学会等名 転移因子研究会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立花誠
2. 発表標題 Epigenetic regulation of two-cell-specific genes in mouse ES cells
3. 学会等名 日本分子生物学会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryo Maeda, Makoto Tachibana
2. 発表標題 HP1-dependent heterochromatin formation in mammalian cells
3. 学会等名 染色体ワークショップ
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Minoru Tanaka and Makoto Tachibana	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 233
3. 書名 Spectrum of Sex: The Molecular Bases that Induce Various Sexual Phenotypes	

1. 著者名 Shingo Miyawaki and Makoto Tachibana	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 17
3. 書名 The Evolutionary Aspects of the Mammalian Sex-Determining Gene SRY	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪大学大学院生命機能研究科 立花研究室 https://tachibana-lab.net/ 性スペクトラム http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/sexspectrum/outline.html 新学術領域「性スペクトラム」HP http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/sexspectrum/index.html 大阪大学大学院生命機能研究科 立花研究室 HP https://tachibana-lab.net/</p>

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1件

<p>国際研究集会 第45回日本分子生物学会シンポジウム「Role of epigenetic regulation in mammalian health and disease」</p>	<p>開催年 2022年～2022年</p>
--	-------------------------------------

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			
オーストリア	クイーンズランド大学			
米国	カリフォルニア大学デービス校			