

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26250037

研究課題名(和文)ほ乳類のエピゲノム性差とその構築因子の機能の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of epigenetic regulation of mammalian sex differentiation

研究代表者

立花 誠 (TACHIBANA, Makoto)

徳島大学・先端酵素学研究所(次世代)・教授

研究者番号：80303915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストンの化学修飾によるエピジェネティックな制御は、高等真核生物の様々な生命現象に密接に関わっている。我々は、ヒストンのメチル化修飾の除去がほ乳類の性分化に重要な役割を担っていることを報告した。この知見に基づき、マウスの性分化に関わるエピジェネティック制御についてさらに研究を進めたところ、ほ乳類の性決定遺伝子は、ヒストンの脱メチル化とヒストンのメチル化の拮抗した作用によってその発現が緻密に制御されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic regulation by covalent modification of histone tails play crucial roles on a wide range of biological processes in mammal. Previously we found that histone demethylation is required for mammalian sex differentiation. Based on this finding, we further studied the roles of epigenetic regulation for sex differentiation. We found that the expression level of mammalian sex-determining gene is finely tuned by the antagonistic activities between histone demethylation and methylation.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヒストン メチル化 性決定

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物における個体発生の過程は、様々な細胞種における遺伝子発現プロファイルの経時的な変化として捉えることができる。発生段階特異的な遺伝子群が時間的・空間的に正しく発現するためには、クロマチンの構造変換によるエピジェネティック制御系が重要な役割を果たしている。中でもヒストンのテール部分の共有結合修飾は、エピジェネティック制御の中心的な役割を担っている。

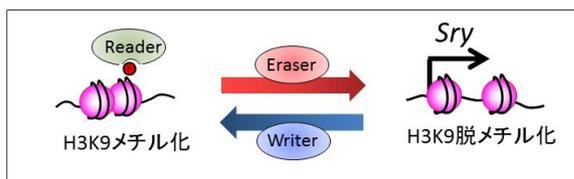
ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基 (H3K9) のメチル化修飾は、遺伝子発現の抑制に相関するエピジェネティックマークである。我々は、H3K9 の脱メチル化酵素である Jmjd1a がマウスの性決定に重要な役割を担っていることを見いだした。Jmjd1a は XY マウスの胎児期性腺において性決定遺伝子である Sry (Sex-determining region Y) の H3K9 メチル化を外すこと、この脱メチル化は Sry の転写活性化に必須であること、そして Jmjd1a 欠損に起因する Sry の転写レベルの低下は、個体の雌化を引き起こすこと、を明らかにした。

2. 研究の目的

ヒストン修飾によるエピジェネティック制御には、修飾を付加する酵素 (Writer)、修飾を除去する酵素 (Eraser)、修飾を読み取る分子 (Reader) の 3 者が密接に関わっている。発生段階特異的な遺伝子は、この 3 者の協調的な作用によって発現の時期が厳密に制御されていると考えられる。また、細胞種特異的な発現プロファイルの形成にもこの 3 者の機能が関わっていると想定されている。しかしこれまでに、特定の遺伝子の発現制御について、エピジェネティック制御の Writer・Eraser・Reader の役割を明らかにする研究は例がなかった。

前述したように、私はほ乳類の性決定遺伝子である Sry の発現制御に H3K9 メチル化 Eraser である Jmjd1a が重要であることを見出した。この知見を踏まえ、Sry 発現制御に関わる H3K9 メチル化 Writer と Reader を明らかにすることで、ほ乳類の性決定の制御するエピゲノム構築因子とその機能を明らかにする (下図参照)。

研究計画の概要:
性決定遺伝子 Sry の発現に関わる H3K9 メチル化
Writer/Reader/Eraser を同定する



3. 研究の方法

(1) Sry 発現制御に関わる H3K9 メチル化 Writer の候補の探索

Jmjd1a を欠損させた XY マウス胎仔 (受精後 11.5 日) の生殖腺をメチル化 H3K9 特異的な抗体によって免疫染色を行なった。トリメチル化 H3K9 およびジメチル化 H3K9 の染色強度を観察し、野生型と Jmjd1a 欠損で差があるかどうかを解析した。この解析によって Sry 発現制御に関わる H3K9 メチル化 Writer の候補を選出した。すなわち、Jmjd1a 欠損によってトリメチル化 H3K9 が亢進していれば、Sry の発現に関わる H3K9 メチル化 Writer として、Eset, Suv39h1 が候補となる。一方、Jmjd1a 欠損によってジメチル化 H3K9 が亢進していれば、Sry の発現に関わる H3K9 メチル化 Writer として、G9a/GLP 複合体が候補となる。

(2) H3K9 メチル化 Writer 候補の変異マウスの作出

上記 3-1 の解析によって選出された H3K9 メチル化 Writer の候補分子について、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集によって変異体を作成する。野生型マウス (C57BL6) の受精卵に、上記候補分子のガイド RNA と Cas9 発現プラスミドを導入する。2 細胞期胚まで発生させて仮親へと移植し、これに由来する産仔を F0 世代としてゲノム編集の有無を確認する。F0 の変異体を野生型マウスと交配し、F1 マウスを得る。F1 世代にゲノム編集されたアリルが伝わっていることを確認する。確認の後、Jmjd1a ヘテロ欠損マウスと交配し、当該 H3K9 メチル化 Writer の遺伝子変異を Jmjd1a 欠損の遺伝子背景へと導入する。

(3) H3K9 メチル化 Writer 候補がマウス性分化に果たす役割の解明

3-2 で得られた H3K9 メチル化 Writer の変異を有する Jmjd1a 欠損マウスの性分化における表現型の解析を行なう。具体的には以下の項目について、H3K9 メチル化 Writer の変異を有する Jmjd1a 欠損マウスと Jmjd1a 欠損マウスで比較する。

胎生 11.5 日の生殖腺から生殖線体細胞を単離し、H3K9 のメチル化の抗体染色を行なう。フローサイトメーター解析により H3K9 メチル化のレベルを比較する。

同様に生殖腺体細胞を単離し、クロマチン免疫沈降実験によって Sry 遺伝子座の H3K9 メチル化のレベルを比較する。

胎生 11.5 日の生殖腺における Sry の発現について、免疫組織染色法と定量的 RT-PCR によって比較する。

胎生 14 日目の胚を摘出し、生殖腺をオス型体細胞マーカーの Sox9 とメス型体細胞マーカーの Foxl2 で共染色を行なう。Sox9 陽性細胞と Foxl2 陽性細胞の比率について統計解析を行なう。

当該マウスを成体（約 3 ヶ月齢）まで成育させ、外部生殖器と内部生殖器の形状による性分化判定を行なう。

4. 研究成果

(1) Sry 発現制御に関わる H3K9 メチル化 Writer の候補の探索

トリメチル化 H3K9 を認識する抗体と、ジメチル化 H3K9 を認識する抗体で、Jmjd1a を欠損させたマウス胎仔の未分化生殖腺の免疫染色を行なった。その結果、Jmjd1a の欠損でトリメチル化 H3K9 のレベルは変化が見られなかったのに対し、ジメチル化 H3K9 のレベルは顕著に亢進していた。この結果は、生殖腺体細胞において、Jmjd1a による脱メチル化に拮抗している H3K9 メチル化酵素はジメチル化 H3K9 を産生する酵素であることを示唆した。よって我々は、G9a/GLP 複合体が Sry の H3K9 メチル化 Writer の候補として、先に実験を進めた。

(2) H3K9 メチル化 Writer 候補の変異マウスの作出

G9a/GLP 複合体の変異マウスであるが、C 末の触媒部位である SET ドメインへ変異を導入したマウスを私が過去に樹立済みであったため、この変異を持つマウスを実験に使用した。G9a/GLP 複合体で、その安定性を担っているのは GLP である。このため、まずは GLP の変異アリル (GLP アリル) を Jmjd1a 欠損の遺伝子背景へと導入した。

(3) H3K9 メチル化 Writer 候補がマウス性分化に果たす役割の解明

胎生 11.5 日の生殖腺から生殖腺体細胞を単離し、H3K9 のメチル化フローサイトメーター解析により比較した。その結果、Jmjd1a / 生殖腺体細胞に比べて、GLP+/ ;Jmjd1a / 染色腺体細胞のジメチル化 H3K9 のレベルが有意に低いことが明らかになった。このことは、Jmjd1a による H3K9 の脱メチル化と G9a/GLP 複合体による H3K9 のメチル化は、少なくとも染色体のマクロなレベルで拮抗していることを意味した。

生殖腺体細胞を単離し、クロマチン免疫沈降実験によって Sry 遺伝子座の H3K9 メチル化のレベルを比較した。その結果、Jmjd1a / 生殖腺体細胞に比べて、GLP+/ ;Jmjd1a / 染色腺体細胞では Sry のジメチル化 H3K9 のレベルが有意に低化していることが明らかになった。このことは、Jmjd1a による H3K9 の脱メチル化と G9a/GLP 複合体による H3K9 のメチル化は、Sry の遺伝子で拮抗していることを意味した。

胎生 11.5 日の生殖腺における Sry の発現について、免疫組織染色法によって比較した。その結果、Jmjd1a / 生殖腺体細胞に比べ、GLP+/ ;Jmjd1a / 染色腺体細胞で Sry 陽性細胞の数が顕著に増加していることが明らかになった。このことは、Jmjd1a と G9a/GLP

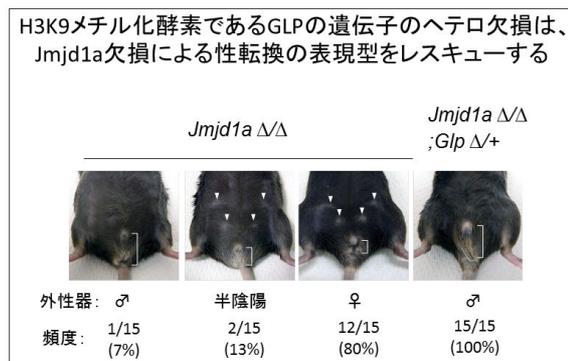
複合体による H3K9 のメチル化への拮抗作用は、Sry の転写に相関していることを意味した。

胎生 14 日目の胚を摘出し、生殖腺をオス型体細胞マーカーの Sox9 とメス型体細胞マーカーの Foxl2 で共染色を行なった。その結果、Jmjd1a / 生殖腺体細胞に比べて、GLP+/ ;Jmjd1a / 染色腺体細胞では Sox9 陽性の体細胞の数が顕著に増加していることが明らかになった。このことは、GLP 変異の導入は、胎仔期生殖腺のオス化に正に働いたことを意味した。

当該マウスを約 3 ヶ月齢にまで成育させ、外部生殖器と内部生殖器の形状による性分化判定を行なった。その結果、Jmjd1a / 欠損マウスではおよそ 9 割でオス化の障害が観察されたのに対し、GLP+/ ;Jmjd1a / マウスは全てオスに分化した。よって、GLP 変異の導入は、Jmjd1a / 欠損マウスの性転換の表現型を極めて効率良くレスキューすることが明らかになった（下図参照）。

研究成果のまとめ

本研究の推進により、ほ乳類性決定遺伝子のエピジェネティック制御について、新たな知見がもたらされた。すなわち、Sry の精密な発現調節機構には、H3K9 メチル化の Eraser として Jmjd1a が関与し、さらにこの活性に拮抗している G9a/GLP H3K9 メチル化酵素複合体によって、Sry の発現が負に制御されていることが分かった（下図参照）。今回の研究では、H3K9 メチル化 Reader の同定には至っておらず、これについては今後に残された課題である。



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10件)

1. A HIF-KDM3A-MMP12 regulatory circuit ensures trophoblast plasticity and placental adaptations to hypoxia
Chakraborty D, Cui W, Rosario GX, Scott RL, Dhakal P, Renaud SJ, Tachibana M,

Rumi MAK, Mason CW, Krieg A, *Soares MJ

PNAS 113, E7212-7221, 2016 (査読有)

2. PRDM14 drives OCT3/4 recruitment via active demethylation in the transition from primed to naïve pluripotency

Okashita N, Suwa Y, Nishimura O, Sakashita N, Kadota, Nagamatsu G, Kawaguchi M, Kashida H, Nakajima A, Tachibana M, *Seki Y

Stem Cell Rep 7, p1072-1086, 2016 (査読有)

3. Pericentric H3K9me3 formation by HP1 interaction-defective histone methyltransferase Suv39h1

Muramatsu D, Kimura H, Kuboshita K, Tachibana M, *Shinkai Y

Cell Struct. Funct. 41, p145-152, 2016 (査読有)

4. Epigenetics of Sex Determination in Mammals

Tachibana M.

Reproductive Medicine and Biology 15, 59-67, 2016 (査読有)

5. Development of a general-purpose method for cell purification using Cre/loxP-mediated recombination

Kuroki S, Akiyoshi M, Ideguchi K, Kitano S, Miyachi H, Hirose M, Mise N, Abe K, Ogura A, and Tachibana M*

Genesis 53, p387-393, 2015 (査読有)

6. H3K9MTase G9a is essential for the differentiation and growth of tenocytes in vitro.

Wada S, Ideno H, Shimada A, Kamiunten T, Nakamura Y, Nakashima K, Kimura H, Shinkai Y, Tachibana M and Nifuji A*

Histochem. Cell Biol. 144, p13-20, 2015 (査読有)

7. Epigenetic regulation of mammalian sex determination

Tachibana M.

Journal of Medical Investigation 62, 19-23, 2015 (査読有)

8. The Hypoxia-Inducible Epigenetic Regulators Jmjd1a and G9a Provide a Mechanistic Link between Angiogenesis and Tumor Growth.

Ueda J, Ho JC2, Lee KL, Kitajima S, Yang H, Sun W, Fukuhara N, Zaiden N, Chan SL, Tachibana M, Shinkai Y, Kato H and Poellinger L*

Mol. Cell. Biol. 34, p3702-3720, 2014 (査読有)

有)

9. Transgenic Expression of Map3k4 Rescues T-associated Sex Reversal (Tas) in Mice

Warr N, Siggers P, Carréa GA, Bogani D, Brixey R, Akiyoshi M, Tachibana M, Lydia Teboul L, Wells S, Sanderson J and Greenfield A*

Hum. Mol. Genetics, 23, p3035-3044, 2014 (査読有)

10. 酵素がマウスの性決定を左右する

立花誠

化学と生物 vol.52-No.4, p216-217, 2014 (査読有)

[学会発表](計30件)

1. Role of H3K9 methylation and demethylation enzymes in mouse development,

Shunsuke Kuroki and Makoto Tachibana (2017.1.26)

11th International Symposium of The Institute Network, Frontiers in Biomedical Sciences、徳島大学藤井節郎記念研究センター(徳島県・徳島市)

2. H3K9 メチル化の動的変動によるほ乳類の発生・分化制御

立花誠 (2016.11.30)

第39回日本分子生物学会年会シンポジウム「発生・老化・疾患をつかさどるクロマチンイベント」、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 招待講演

3. マウス性決定のエピジェネティックな制御機構

立花誠 (2016.9.7)

日本遺伝学会第88回大会シンポジウム「エピジェネティクスの広がり」、日本大学国際関係学部三島駅北口校舎(静岡県・三島市) 招待講演

4. Regulation of germ cell development by histone demethylation,

黒木 俊介, 立花 誠 (2016.8.12)

第1回次世代生命科学の研究会、徳島大学藤井節郎記念研究センター(徳島県・徳島市)

5. H3K9 脱メチル化酵素 Jmjd1a と Jmjd1b による雄性生殖細胞の発生制御,

黒木 俊介, 立花 誠 (2016.5.19)

第10回日本エピジェネティクス研究会年会、千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)

6. ヒストンのメチル化と脱メチル化による

生命機能制御
立花誠 (2016.3.25)
第4回 X 染色体研究会、鳥取大学医学部臨床講義棟 (鳥取県・米子市)

7. マウス性決定のエピジェネティックな制御機構
立花誠 (2016.3.15)
広島大学大学院理学研究科 特別セミナー「性の生物学」広島大学理学研究科大会議室 (広島県・東広島市) 招待講演

8. ヒストンのメチル化修飾による高次生命現象の制御
立花誠 (2016.3.7)
第9回 共同利用・共同研究「酵素学研究拠点」シンポジウム、北里大学薬学部コンベンションホール (東京都港区) 招待講演

9. マウス性決定のエピジェネティックな制御機構
立花誠 (2016.1.25)
千葉大学理学部 第10回クロマチン代謝制御セミナー、千葉大学理学部大講義室 (千葉県・千葉市) 招待講演

10. H3K9 脱メチル化酵素 Jmjd1a と Jmjd1b による雄性生殖細胞の発生制御
黒木俊介、立花誠 (2015.12.1)
第38回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

11. マウス性決定のエピジェネティックな制御機構
立花誠 (2015.10.22)
第3回湯島性分化勉強会、東京ガーデンパレス (東京都文京区) 招待講演

12. マウスの発生過程におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の役割
立花誠 (2015.7.29)
富山県立大学生物工学科研究セミナー、富山県立大学生物工学研究科大講義室 (富山県・射水市) 招待講演

13. ヒストンメチル化によるほ乳類の発生制御
立花誠 (2015.7.15)
東京工業大学大学院生命理工学研究科 研究セミナー、東京工業大学大学院生命理工学研究科大講義室 (神奈川県・横浜市) 招待講演

14. ヒストンメチル化・脱メチル化によるほ乳類の発生・分化の制御
立花誠 (2015.6.26)
北海道大学生命科学院 生命融合科学コース研究セミナー、北海道大学生命科学院大講義室 (北海道・札幌市) 招待講演

15. マウス性決定のエピジェネティックな制御機構
立花誠 (2015.5.25)
日本エピジェネティクス研究会第9回年会、東京一ツ橋学術総合センター (東京都千代田区) 招待講演

16. H3K9 脱メチル化酵素 Jmjd1a とそのアイソザイム Jmjd1b はマウスの胚発生に必須である
立花誠 (2015.03.26)
第3回 X 染色体研究会、近畿大学農学部講義室 (奈良県・奈良市)

17. H3K9 脱メチル化酵素 Jmjd1a とそのアイソザイム Jmjd1b の機能
立花誠 (2015.3.20)
国際高等研究所 研究プロジェクト「クロマチン・デコーディング」第2回研究会、国際高等研究所大会議室 (京都府・木津川市) 招待講演

18. Role of H3K9 methylation and demethylation enzymes on mouse sex determination
黒木俊介、馬場翔子、立花誠 (2014.12.10)
新学術領域研究「性差構築の分子基盤」若手研究者集会、熱海 伊豆山温泉・ハートピア熱海 (静岡県・熱海市)

19. エピゲノム調節によるほ乳類の性決定機構
立花誠 (2014.12.4)
第59回日本生殖医学会学術講演会・総会 教育講演、京王プラザホテル (東京都新宿区) 招待講演

20. ヒストン修飾エピゲノムと哺乳類の性決定制御
黒木俊介、馬場翔子、立花誠 (2014.11.27)
第37回日本分子生物学会年会 ワークショップ、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

21. Expressions and functions of Histone H3K9 methyltransferases during tooth development
Taichi Kamiunten, Hisashi Ideno, Akemi Shimada, Satoshi Wada, Yoshiki Nakamura, Makoto Tachibana, Kazuhisa Nakashima, Akira Nifuji (2014.11.27)
第37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)

22. セルトリ細胞特異的 Eset コンディショナルノックアウトマウスの表現型解析
井手口 耕, 黒木 俊介, 眞貝 洋一, 立花誠 (2014.11.26)
第37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)

23. The Hypoxia-Inducible Epigenetic Regulators Jmjd1a and G9a Provide a Mechanistic Link between Angiogenesis and Tumor Growth

上田 潤, Jolene H. Ho, Kian Leong Lee, 北島 正二郎, Henry Yang, Wendi Sun, 福原 寛子, Norazean Zaiden, Shing Leng Chan, 立花 誠, 眞貝 洋一, 加藤 宏幸, Lorenz Poellinger (2014.11.26)

第37回日本分子生物学会年会 ワークショップ、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

24. マウス性決定のエピジェネティック制御機構

立花 誠(2014.10.4)、

東京大学先端科学技術研究センター学術講演会、東京大学先端科学技術研究センター(東京都目黒区) 招待講演

25. マウス性決定のエピジェネティック制御機構

立花 誠(2014.10.8)

新学術領域研究「性差構築の分子基盤」研究成果報告会、館山寺サゴロイヤルホテル(静岡県・浜松市) 招待講演

26. マウス性決定のエピジェネティックな制御機構

立花 誠(2014.8.28)、

第26回高遠展分子生物学シンポジウム「一つのゲノムが多細胞生物を産む仕組み」、高遠桜ホテル(長野県・伊那市) 招待講演

27. マウス性決定のエピジェネティックな制御機構

立花 誠(2014.7.31)、

第32回日本受精着床学会総会・学術講演会、シンポジウム I「発生生物学トピックス」、ハイアットリージェンシー東京(東京都新宿区) 招待講演

28. Epigenetic regulation of mouse sex determination by histone demethylation

Makoto Tachibana (2014.6.20), (Oral in English)

The 9th International Symposium of the Institute Network 「Molecular Target for Diseases and Structural Life Science」, Osaka University (Suita, Osaka)

29. Epigenetic regulation of mouse sex determination by histone demethylation

Makoto Tachibana (2014.5.29), (Oral in English)

47th Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologist, WINC AICHI (Nagoya, Aichi), Invited speaker

30. Epigenetic regulation of mouse sex determination by histone demethylation

Makoto Tachibana (2014.5.14), (Oral in English)

International Institute for Advanced Studies Research Conference 2014, International Institute for Advanced Studies (Kizugawa, Kyoto), Invited speaker

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

竹本 経緯子 (TAKEMOTO, Keiko)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：90243104

宮地 均 (MIYACHI, Hitoshi)

京都大学・ウイルス研究所・技術専門職員

研究者番号：90599200