

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成23年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	哺乳類の性特異的なエピゲノム構造とその維持機構の解明
研究機関・ 部局・職名	京都大学・ウイルス研究所・准教授
氏名	立花誠

### 1. 当該年度の研究目的

哺乳類の性決定遺伝子 Sry がどのようにして胎児の特定時期に発現するのかを明らかにする。特に Sry 発現をどのようにエピジェネティック因子群が調節しているのかについて解析を行う。なかでも当該年度はヒストンのメチル化修飾と Sry 遺伝子の発現の相関を明らかにする。具体的には 22 年度に樹立した胎児の生殖腺体細胞を精製する系を用い、Sry 遺伝子座のエピゲノムの解析を行う。さらに、精製した生殖腺体細胞を用いて、様々なヒストンメチル化酵素、脱メチル化酵素の発現プロファイル解析を行い、哺乳類の性決定に関わる分子(群)を明らかにする。

### 2. 研究の実施状況

平成 22 年度に発生工学的な手法によって性腺の体細胞特異的に LNGFR を発現するような遺伝子組み換えマウス(トランスジェニックマウス)を樹立した。このマウスの胎児から生殖腺を単離し、得られた細胞を抗 LNGFR 抗体で精製することにより、胎児の生殖腺体細胞を容易に単離することが可能となった。

次にこのマウスを用い、胎生期 11.5 日目の雄の未分化性腺体細胞を精製し、遺伝子発現解析を行った。様々なヒストンメチル化酵素、脱メチル化酵素の遺伝子発現をマウス胎児繊維芽細胞(MEF)と比較した結果、中でもヒストン脱メチル化酵素 *jmjd1a* の発現が性腺体細胞で高いことが明らかになった(図 1)。タンパク質のレベルでも発現が高いかどうかを検討した結果、やはり *Jmjd1a* の発現は性腺体細胞で非常に高いことが分かった。興味深いことに、ヒストン H3 の 9 番目のリジン(H3K9)のメチル化はそれと逆相関していた。このことは生殖腺体細胞においては、ヒストン脱メチル化酵素 *Jmjd1a* が高発現することで染色体の広範な部分の脱メチル化が触媒されていることが示唆された(図 2)。

クロマチン免疫沈降法によって、雄の未分化性腺体細胞の Sry 遺伝子座のヒストンのメチル化状況を調べた。その結果、Sry 遺伝子座は未分化性腺体細胞において H3K9 のメチル化が低い一方で、転写の活性化の標識である H3K4 のメチル化が亢進していた。それとは対照的に、MEF では H3K9 のメチル化が亢進し、逆に H3K4 のメチル化が低い状態であった。このことは、H3K9 の脱メチル化と H3K4 のメチル化酵素が Sry 遺伝子の遺伝子発現制御に関わっている可能性を強く示唆した。

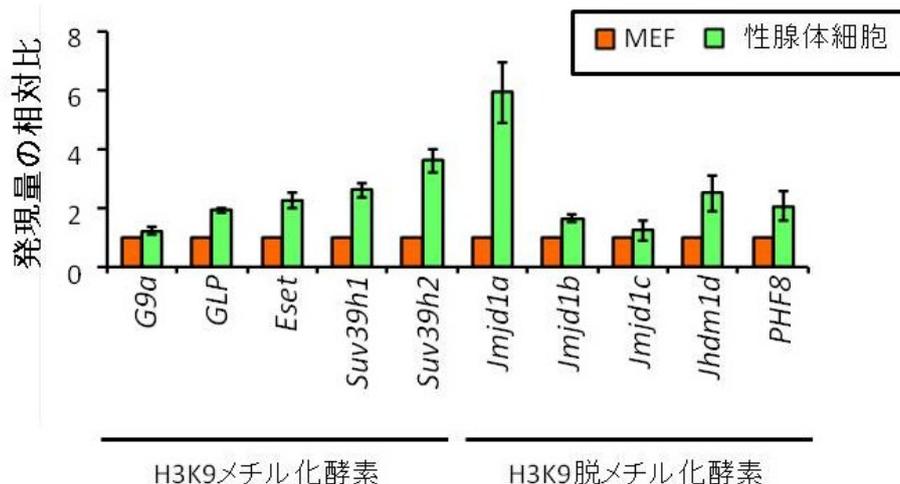


図 1 MEF と E11.5 性腺体細胞におけるヒストンメチル化酵素と脱メチル化酵素の発現量の比較

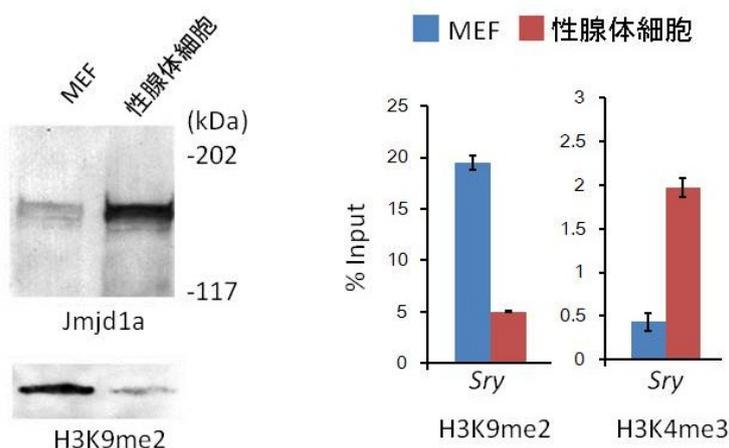


図 2(左) MEF と性腺 E11.5 性腺体細胞で Jmjd1a のタンパク質発現量を比較した結果後方で高発現が認められ、さらに H3K9 のメチル化はそれと逆相関していた。

図 3(右) Sry 遺伝子座のヒストンのメチル化状況をクロマチン免疫沈降法によって解析した。性腺体細胞では K9me2 が低く、逆に K4me3 が高い。

3. 研究発表等

雑誌論文 計 4 件	<p>(掲載済み一査読有り) 計 4 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>H3K9 methyltransferase G9a and the related molecule GLP Shinkai Y. and <b>Tachibana M.</b> <i>Genes Dev.</i> 25; 781-8, 2011</li> <li>HP1<math>\gamma</math> links histone methylation marks to meiotic synapsis in mice Takada Y, Naruse C, Costa Y, Shirakawa T, <b>Tachibana M.</b>, Sharif J, Kezuka-Shiotani F, Kakiuchi D, Masumoto H, Shinkai Y, Ohbo K, Peters A. H.F.M. Peters, Turner J.M.A. Asano M, and Koseki H.* <i>Development</i> 138; 4207-17, 2011</li> </ol>
---------------	---

様式19 別紙1

	<p>3. Tracking epigenetic histone modifications in single cells using Fab-based live endogenous modification labeling. Hayashi-Takanaka Y, Yamagata K, Wakayama T, Stasevich TJ, Kainuma T, Tsurimoto T, <b>Tachibana M</b>, Shinkai Y, Kurumizaka H, Nozaki N, Kimura H.* <b>Nucleic Acid Research</b> 39; 6475-88, 2011</p> <p>4. Lysine methyltransferase G9a is required for <i>de novo</i> DNA methylation and the establishment but not maintenance of proviral silencing Leung D, Dong K<sup>1</sup>, Irina A, Maksakova IA, Goyal P, Appanah R, Lee S, <b>Tachibana M</b>, Shinkai Y, Lehnertz B, Mager DL, Rossi FMV<sup>4</sup> and Lorincz MC* <b>PNAS</b> 108; 5718-23, 2011</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計0件</p> <p>(未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表 計 2 件</p>	<p>専門家向け 計 2 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Transcriptional regulation by hoistone methylation and demethylation 立花 誠(2011.12)、横浜、第 34 回日本分子生物学会年会</li> <li>2. Transcriptional regulation by histone methylation and demethylation. Matoko Tachibana, The 18<sup>th</sup> east asian joint symposium on biological research, Shanghai, China (December, 2011)</li> </ol> <p>一般向け 計 0 件</p>
<p>図 書 計 0 件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状 況 計 0 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 0 件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>京都大学ウイルス研究所 組織・研究室紹介 附属感染症モデル研究センター ゲノム改変マウス研究領域 <a href="http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/virus/genomukaihen.html">http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/virus/genomukaihen.html</a></p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>京都精華女子中学校（京都市左京区）の理科特別授業を 3 時間行った。 (2012 年 1 月 27 日) 17 名 内容：マウス発生工学の技術紹介と ES 細胞から分化させた心筋細胞の拍動の様子を講義し、私たちの研究材料と技術の紹介を行った。</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計 0 件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	123,000,000	46,900,000	0	76,100,000	0
間接経費	36,900,000	14,070,000	0	22,830,000	0
合計	159,900,000	60,970,000	0	98,930,000	0

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未取利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	46,886,392	0	0	46,886,392	41,047,194	5,839,198	0
間接経費	14,055,000	0	0	14,055,000	3,852,367	10,202,633	0
合計	60,941,392	0	0	60,941,392	44,899,561	16,041,831	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	34,542,320	FAS-IVフルシステム、分光光度計などの備品関係、マウス、プライマー、実験試薬等
旅費	79,700	エビジェネティック研究会などでの研究成果発表のための旅費
謝金・人件費等	6,314,474	実験補佐員および、実験データの管理をする者の人件費
その他	110,700	マウスおよびサンプルの輸送代金
直接経費計	41,047,194	
間接経費計	3,852,367	
合計	44,899,561	

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
Gene Pulser Xcell コンプリートシステム	バイオ・ラッドラボラトリーズ社製 Gene Pulser Xcell コンプリートシステム 1652660J1	1	1,370,250	1,370,250	2011/4/27	京都大学
クロマトチャンバー	日本フリーザー株式会社製 クロマトチャンバー MC-20EF 3	1	772,800	772,800	2011/8/25	京都大学
純水製造装置	米国ミリポア社製 Elix Advantage 3 一式	1	859,950	859,950	2011/9/15	京都大学
FAS-IVフルシステム	日本ジェネテイクス株式会社製 FAS-IVフルシステム	1	1,134,000	1,134,000	2011/9/22	京都大学
極微量分光光度計	米国サーモフィッシャーサイエンティフィック社製 極微量分光光度計 Nano Drop 2000c	1	1,727,250	1,727,250	2011/10/20	京都大学
インキュベーターシェーカー	NBS社製 エクセラ インキュベーターシェーカーE24R M1 352-0005 (3/4インチストローク、冷凍機付)	1	840,000	840,000	2011/10/31	京都大学
サーマルサイクラー	米国ライフテクノロジー社製 Veriti 96-Well サーマルサイクラー、0.2ml VERITI200	1	926,100	926,100	2012/2/27	京都大学

共焦点レーザスキャン顕微鏡システム	独国カールツァイスマイクロイメージング社製 共焦点レーザスキャン顕微鏡LSM700 一式	1	21,486,150	21,486,150	2012/3/8	京都大学
-------------------	--	---	------------	------------	----------	------