

課題番号	LS066
------	-------

**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24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

23年度までの解析によって、未分化マウス生殖線における Sry の転写の活性化には、ヒストンの脱メチル化酵素である Jmjd1a が関与している可能性が示されている。当該年度は、Jmjd1a の欠損マウスを用いて哺乳類の性分化とヒストン修飾との関係をさらに追及する。Jmjd1 ファミリー分子のうち、Jmjd1a 以外の分子機能についても解析を行い、性分化のみならず、ほ乳類の細胞分化にヒストンの脱メチル化修飾がどう機能しているのかを明らかにしていく。

2. 研究の実施状況

Jmjd1a ノックアウト (KO) マウスを解析した結果、一定の頻度で XY 性転換が起きることを明らかにした。詳細にその頻度を調べたところ、XY KO 検体のうち精巣を 2 つ持つものが 12%、精巣と卵巣それぞれを持つものが 21%、卵巣を 2 つ持つものが 59%であった。よって、全ての XY KO 個体が雌化するわけではなく、表現型に広がりがあることが分かった。外見上は雌である XY KO 個体のすべてが卵巣を 2 つ有していた。これらの性転換個体の妊よう性を調べたところ、27 個体中 11 で妊娠が確認された。このことは、少なくとも一部の XY KO 個体では、外性器、生殖線の形状のみならず、生殖機能という観点においても完全に性転換していることを意味した。

XY Jmjd1a KO マウスの胎児期性腺（受精後 14 日）を解析したところ、セルトリ細胞（精巣に存在）に特異的なマーカーである Sox9 陽性細胞と、顆粒層細胞（卵巣に存在）に特異的なマーカーである Foxl2 陽性細胞が混在していた。これはいわゆる卵精巣状態であり、胎児期の性腺が雌型、雄型の細胞の混在であることを示していた。この表現型の原因を明らかにするため、性決定の最も重要な時期（受精後 12 日）の性腺において、Jmjd1a がどの細胞で発現しているか、KO 個体では雄の性決定に関わる因子の発現がどうなっているのか、または雌化に関わる因子の発現量に変化はあるのか、等について詳細に検討中である。

Jmjd1 は Jmjd1a-c の 3 つのファミリー分子からなる。Jmjd1a についてはいくつかの報告があるものの、Jmjd1b、Jmjd1c の機能については全く不明である。よって、Jmjd1b、c の機能についても解析を行った。生化学的な解析によって、Jmjd1a と b には H3K9 脱メチル化活性を有することが確認できた。興味深いことに、Jmjd1c には脱メチル化活性が検出できなかった。さらに Jmjd1c の KO マウスを作成し、表現型を解析

した。Jmjd1c KO マウスはメンデルの法則通りに生まれることから、個体発生には影響を及ぼさないことが分かった。より詳細に表現型を解析した結果、Jmjd1c KO マウスの雄は加齢と共に不妊となることが明らかとなった。その一方で雌マウスの妊よう性には問題がなかった。図1にJmjd1c KO マウスの精巣重量の変化を示した。野生型の精巣重量は6ヶ月にピークになり、生後1年までは変化が見られなかった。それに対し、Jmjd1c KO マウスの精巣重量は4ヶ月齢以降、徐々に軽くなっていくことが分かった。よってJmjd1c KO マウスでは徐々に精巣の機能が損なわれ、それが不妊の原因となっている可能性が示唆された。現在、このマウスの不妊の原因を詳細に解析中である。

Jmjd1a と共に Jmjd1b は H3K9 脱メチル化活性を有する。このことは Jmjd1a と Jmjd1b で機能が重複している可能性を示唆した。遺伝学的な両者の機能重複を検証すべく、Jmjd1a と Jmjd1b の双方を欠損したマウスの表現型を調べたところ、少なくとも出生に至った個体は見られなかった。このことから Jmjd1ab 双方の欠損マウスは胎生致死であると考えられた。胚性幹(ES)細胞では Jmjd1a と Jmjd1b の双方が発現していることが分かっている(図2)。そのため ES 細胞を用いて Jmjd1a と Jmjd1b の機能も調べており、次年度までにはその表現型をまとめたい。

図1

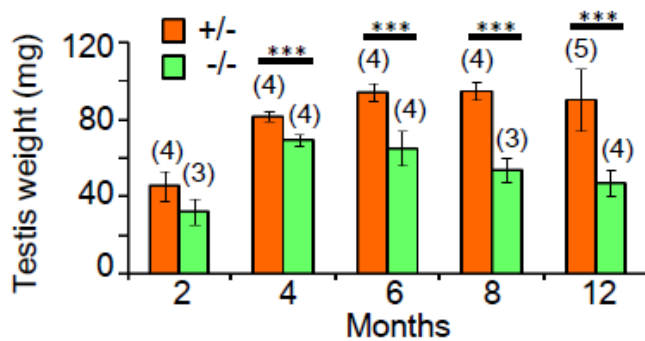


図2

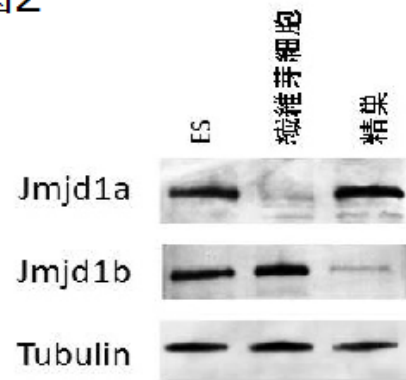


図1 Jmjd1c ノックアウトマウスの精巣の重量変化を表した。4ヶ月以降精巣が萎縮する。

図2 Jmjd1a、b の発現解析。ES 細胞では両者が発現している。

3. 研究発表等

雑誌論文 計 5 件	<p>(掲載済み一査読有り) 計 5 件</p> <p>1. Implication of DNA demethylation and bivalent histone modification for selective gene regulation in mouse primordial germ cells. Mochizuki K, Tachibana M, Saitou M, Toritake Y, and Matsui Y*. PLoS One published on September 28 2012</p> <p>2. PGC7/Stella links histone H3K9me2 to protect against conversion of 5MeC to 5HmC in early embryos Nakamura T*, Liu Y-J, Nakashima J, Umehara H, Inoue K, Matoba S, Tachibana M, Ogura A, Shinkai Y and Nakano T Nature 486; 415-419, 2012</p> <p>3. Protein kinase A determines timing of early differentiation through epigenetic regulation with G9a</p>
---------------	--

様式19 別紙1

	<p>Yamamizu K, Fujihara M, Tachibana M, Katayama S, Takahashi A, Hara E, Imai H, Shinkai Y and Yamashita J*. Cell Stem Cells 10; 759-770, 2012</p> <p>4. Inhibition of histone H3K9 methyltransferases by gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines Takahashi M, Takemoto Y, Shimazu T, Kawasaki H, Tachibana M, Shinkai Y, Takagi M, Shin-ya K, Igarashi Y, Ito A, and Yoshida M.* J. Antibiotics 65; 263-265, 2012</p> <p>5. DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/C(Cdh1) in senescent cells. Takahashi A, Imai Y, Yamakoshi K, Kuninaka S, Ohtani N, Yoshimoto S, Hori S, Tachibana M, Anderton E, Takeuchi T, Shinkai Y, Peters G, Saya H, Hara E.* Mol. Cell 45;123 -131, 2012</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計0件 (未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表 計1件</p>	<p>専門家向け 計1件 ヒストンのメチル化によるほ乳類の性分化制御 立花 誠(2012.10)、海南市 新学術領域研究「性差構築の分子基盤」若手研究会</p> <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 (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 http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/virus/genomukaihen.html</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>群馬県立高崎高校特別研修授業 (2012. 9. 5) 内容：ウイルス研究所の概要説明、マウス発生工学実演、蛍光タンパク発現マウスの観察、PCR 技術の紹介、ES 細胞の顕微鏡観察など(2年生 29人)</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24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	38,200,000	37,900,000	0
間接経費	36,900,000	14,070,000	11,460,000	11,370,000	0
合計	159,900,000	60,970,000	49,660,000	49,270,000	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 (未収利息を 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	5,839,198	38,200,000	0	44,039,198	39,216,718	4,822,480	0
間接経費	10,202,633	11,460,000	0	21,662,633	327,132	21,335,501	0
合計	16,041,831	49,660,000	0	65,701,831	39,543,850	26,157,981	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	23,969,370	高速冷却遠心機、試薬 抗体などの実験試薬、マウス等
旅費	363,873	学術集会、研究会などで研究成果発表のための旅費
謝金・人件費等	12,682,240	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	2,201,235	マウスおよびサンプルの輸送代金等
直接経費計	39,216,718	
間接経費計	327,132	
合計	39,543,850	

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
微量高速冷却遠 心機	トミー工業株式会社製 微量高速冷却遠心機 MX-307	1	917,490	917,490	2012/4/13	京都大学
リトラトーム	大和光機工業株式会 社リトラトーム REM710-SUF240W	1	1,049,895	1,049,895	2012/7/5	京都大学
高速冷却遠心機	トミー工業株式会社製 微量高速冷却遠心機 Suprema23	1	2,645,370	2,645,370	2012/8/23	京都大学
高速冷却遠心機	トミー工業株式会社製Suprema 専用アングルローターNA-400	1	1,204,875	1,204,875	2012/8/23	京都大学
オートクレーブ	トミー工業株式会社製 オートクレーブLSX- 700	1	696,150	696,150	2012/9/10	京都大学

顕微鏡	オリンパス株式会社製 システム生物顕微鏡 BX53	1	1,438,290	1,438,290	2012/9/20	京都大学
インキュベーター	米国サーモフィッ シャーサイエンティ フィック社製フォーミュ ニバーサルCO2イン キュベーター3110	1	1,124,550	1,124,550	2012/10/10	京都大学
顕微鏡デジタルカ メラ	オリンパス株式会社製 顕微鏡デジタルカメラ DP26	1	1,070,685	1,070,685	2012/11/16	京都大学
顕微鏡	独国ライカマイクロシ ステムズ社製実体顕 微鏡M205C(M205C- RI)	1	1,496,250	1,496,250	2013/1/15	京都大学
デジタルカメラシス テム	独国ライカマイクロシ ステムズ社製DFCデジ タルカメラシステム (DFC450C-DT)	1	1,527,750	1,527,750	2013/1/15	京都大学
マクロ蛍光システ ム	株式会社デジタルマイ クロシステムズ社製マ クロ蛍光システムQFS EL6000	1	1,379,700	1,379,700	2013/1/15	京都大学