

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25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	国立大学法人徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授
氏名	立花 誠

1. 当該年度の研究目的

24年度までの研究で、ヒストン脱メチル化酵素である Jmjd1a の欠損マウスは XY であるにもかかわらず雄→雌の性転換を起こすこと、さらに XY Jmjd1a 欠損マウスの未分化生殖線では、性決定遺伝子である Sry の発現が低下していることを明らかにした。これらの知見をもとに、当該年度は Jmjd1a がいつ、どこで、どのようにして Sry の活性化に関わっているのかについて、分子レベルで明らかにしていく。中でも、Jmjd1a が性決定に寄与する作用点は Sry のみなのか、について焦点を絞って、分子生物学的な手法と遺伝学的な手法を駆使して解析を行なう。

2. 研究の実施状況

Jmjd1a がどのように Sry の発現制御の関わっているのかを明らかにする目的で、以下の3つの実験を遂行した。

1. Jmjd1a ノックアウトマウスで、Sry の発現を正に調節する因子群に影響が見られるか？

マウス胎児性腺から体細胞のみを選択的に単離精製する系を用いて、XY Jmjd1a ノックアウト胎児の性腺体細胞から RNA を抽出した。得られた RNA を用いてマイクロアレイ解析を行ない、網羅的に遺伝子発現を調べた。Gata4、Ad4BP、M33、WT1 などの転写因子、Map3k4 キナーゼ、あるいは Igf1r 膜レセプター分子等が、Sry の発現を正に制御することがこれまでに明らかになっている。これらの既知因子の発現を調べたところ、Jmjd1a の欠損によって全く影響を受けていなかった。Jmjd1a による Sry 発現制御は、これまでに報告されていない新規の経路であることが強く示唆された。

2. Jmjd1a は Sry の下流の雄化カスケード分子群の発現制御に関わるか？

Sry はその直下流の標的因子である Sox9 を活性化する。さらに Sox9 はその下流にある雄化に必須な分子群の発現を正に制御していることが分かっている。Jmjd1a は Sry のみならず、Sox9 をはじめとする Sry の下流分子の発現調節にも関わっている可能性が考えられた。この可能性の検証のため、以下の実験を行なった。

Sry を Hsp プロモーターの制御下で発現するマウス (Hsp-Sry) と Jmjd1a 欠損マウスを交配し、XY Jmjd1a ノックアウト、Hsp-Sry TG 陽性のマウスを樹立し、性転換が抑制されるかどうかを調べた。Hsp-Sry トランスジーンを導入は、Jmjd1a の欠損による雄→雌の性転換の表現型を完全にレスキューすることが分かった。Jmjd1a は Sry の下流分子群の発現調節には寄与しないことが強く示唆された。

3. Jmjd1a は Sry 遺伝子座のヒストン脱メチルを触媒しているか？

上記1、2の実験結果は、Jmjd1a が直接 Sry 遺伝子座に作用し、その発現を正に制御している可能性を強く指示するものであった。この確認するため、以下の実験を行なった。

XY Jmjd1a ノックアウトマウスの胎児期性腺からクロマチンを抽出・裁断し、各種修飾ヒストンに対するモノクローナル抗体でクロマチン免疫沈降実験を行なった(図1)。その結果 Jmjd1a は Sry 遺伝子座に直接作用し、ヒストン H3 の 9 番目のリジン(H3K4)の脱メチル化を触媒していることを明らかにした。ヒストン修飾によるエピジェネティックな遺伝子発現制御システムが、Sry 制御に直接関与していることを世界で初めて明らかにした。

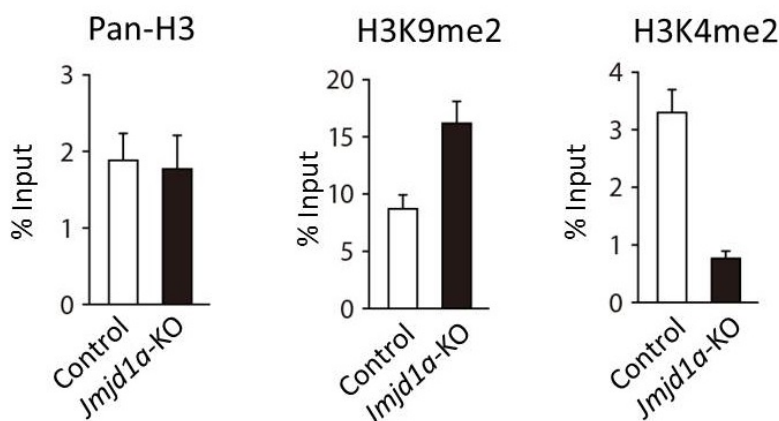


図1. Jmjd1aはSry遺伝子座に直接作用し、H3K9の脱メチル化を触媒する

3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計 8 件
計 8 件	<p>1. Epigenetic regulation of mouse sex determination by the histone demethylase Jmjd1a Kuroki S, Matoba S, Akiyoshi M, Matsumura Y, Miyachi H, Mise N, Abe K, Ogura A, Wilhelm D, Koopman P, Nozaki M, Kanai Y, Shinkai Y, and Tachibana M. <i>Science</i> 341: p1106–1109, 2013</p> <p>2. JMJD1C, a JmjC Domain-Containing Protein, Is Required for Long-Term Maintenance of Male Germ Cells in Mice Kuroki S, Akiyoshi M, Tokura M, Miyachi H, Nakai Y, Kimura H, Shinkai Y, and Tachibana M. <i>Biol Reprod.</i> 89: p93–101, 2013</p> <p>3. Pericentric heterochromatin generated by HP1 interaction-defective histone methyltransferase Suv39h1 Muramatsu D, Singh PB, Kimura H, Tachibana M. and Shinkai Y. <i>J. Biol. Chem.</i> 288: p25285–25296, 2013</p> <p>4. Histone H3 Lysine 9 methyltransferases, G9a and GLP are essential for cardiac morphogenesis Inagawa M, Nakajima K, Makino T, Ogawa S, Kojima M, Ito S, Ikenishi A, Hayashi T, Schwartz RJ, Nakamura K, Obayashi T, Tachibana M. Shinkai Y, Maeda K, Miyagawa-Tomita S, and Takeuchi T. <i>Mech. Dev.</i> 130: p519–31, 2013</p> <p>5. Homeoproteins Six1 and Six4 regulate male sex determination and mouse gonadal development Fujimoto Y, Tanaka S, Yamaguchi Y, Kobayashi H, Kuroki S, Tachibana M. Shinomura M, Kanai Y, Morohashi K,</p>

様式19 別紙1

	<p>Kawakami K, and Nishinakamura R. <i>Dev. Cell</i> 26: p416–30, 2013</p> <p>6. Hippocampal dysfunction in the Euchromatin histone methyltransferase 1 heterozygous knockout mouse model for Kleeftstra syndrome Balemans MCM, Kasri NN, Kopanitsa MV, Afinowi NO, Ramakers G, Peters T, Beynon AJ, Janssen SM, van Summeren RCJ, Eeftens JM, Eikelenboom N, Benevento M, Tachibana M, Shinkai Y, Kleeftstra T, van Bokhoven H, and Van der Zee CEEM. <i>Hum. Mol. Genetics</i> 22: p852–866, 2013</p> <p>7. A replication–dependent passive mechanism modulates DNA demethylation in mouse primordial germ cells Ohno R, Nakayama M, Naruse C, Okashita N, Takano O, Tachibana M, Asano M, Saitou M, and Seki Y. <i>Development</i> 140: p2892–903, 2013</p> <p>8. Posttranscriptional Regulation of Histone Lysine Methyltransferase GLP in Embryonic Male Mouse Germ Cells. Deguchi K, Nagamatsu G, Miyachi H, Kato Y, Morita S, Kimura H, Kitano S, Hatada I, Saga Y, Tachibana M, Shinkai Y. <i>Biol Reprod.</i> 88: e36, 2013</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> <p>1. ヒストン脱メチル化による ほ乳類の性決定制御 立花 誠(2014.3)、木津川市 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 1 回研究会</p> <p>2. エピジェネティック因子によるほ乳類の性決定の制御 立花 誠(2013.5)、つくば 第 60 回日本実験動物学会総会</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</p> <p>(出願中) 計 0 件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>徳島大学疾患酵素学研究センター 応用酵素・疾患代謝研究部門 http://www.tokushima-u.ac.jp/ier/divisions/application.html</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>福島県立福島高等学校 特別研修授業(2013.10.23) 内容: ウイルス研究所の概要説明、マウス発生工学、ウイルス学、実験施設の紹介(2 年生 4 人)</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計 6 件</p>	<p>2013 年 9 月 6 日 読売新聞朝刊「性別決定新たな遺伝子」</p> <p>2013 年 9 月 6 日 京都新聞朝刊「性決定の『鍵』酵素発見」</p>

様式19 別紙1

	<p>2013年9月6日 産経新聞朝刊「特定酵素 性別影響か」</p> <p>2013年9月6日 日経新聞朝刊「性別を決めるたんぱく質発見」</p> <p>2013年9月6日 中日新聞朝刊「性別決定の鍵 特定」</p> <p>2013年9月6日 朝日新聞DIGITAL「マウスの性を左右する酵素発見 京大などのグループ」 http://www.asahi.com/tech_science/update/0906/OSK201309050139.html</p>
<p>その他</p>	<p>2013年9月6日 NHK 全国放送 17時ニュース「ほ乳類の性決定の仕組みを解明」</p> <p>2013年9月6日 NHK 京都放送 ニュース610 京いちにち「京大研究成果 オスをメスにする」</p> <p>2014年2月3日 小学館ジャパンレッジ JK Who's Who「注目の人物 サイエンス&テクノロジー」</p>

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成25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	85,100,000	37,900,000	0	
間接経費	36,900,000	25,530,000	11,370,000	0	
合計	159,900,000	110,630,000	49,270,000	0	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	4,822,480	37,900,000	0	42,722,480	42,722,480	0	
間接経費	21,335,501	11,370,000	0	32,705,501	32,705,501	0	
合計	26,157,981	49,270,000	0	75,427,981	75,427,981	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	31,523,258	備品、試薬、実験用消耗品等
旅費	124,920	情報収集等
謝金・人件費等	8,128,389	教務補佐員人件費等
その他	2,945,913	凍結胚からの個体作出業務
直接経費計	42,722,480	
間接経費計	32,705,501	
合計	75,427,981	

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
超低温フリーザー	ハナソニックヘルスケア MDF-500VX	1	2,261,280	2,261,280	2013/5/13	徳島大学
病理検査室用クオ スタット	独国ライカハイシステ ムス・ヌスロフGmbH CM1860	1	4,000,710	4,000,710	2013/5/22	徳島大学
Milli-Q(純粋製造 装置)	独国メルク社製 ReferenceA	1	919,579	919,579	2013/10/1	徳島大学
実体顕微鏡	独国ライカマイクロス テムス製 M205C(M205C- RI)	1	1,558,095	1,558,095	2013/10/17	徳島大学
超低温フリーザー	ハナソニックヘルスケア MDF-1156ATN	1	2,923,200	2,923,200	2013/11/28	徳島大学
バイオハザード用キャ ネット	ハナソニックヘルスケア MHE-S1300A2	2	1,327,200	2,654,400	2013/11/28	徳島大学
ImageQuant	英国GEヘルスケア LAS4000mini	1	4,063,500	4,063,500	2013/11/25	徳島大学
液体窒素容器	CHART クワイオシステム4000	1	554,400	554,400	2014/3/11	徳島大学
バイオアナライザー	アジレントテクノロジー Agilent2100	1	2,999,850	2,999,850	2014/3/14	徳島大学
多本架冷却遠心機	トミ精工 AX- 511	1	589,448	589,448	2014/3/25	徳島大学