

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) 実績報告書

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. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	123,000,000	123,000,000	0	123,000,000	123,000,000	0	
間接経費	36,900,000	36,900,000	0	36,900,000	36,900,000	0	
合計	159,900,000	159,900,000	0	159,900,000	159,900,000	0	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	13,608	34,542,320	23,969,370	31,523,258	90,048,556
旅費	0	79,700	363,873	124,920	568,493
謝金・人件費等	0	6,314,474	12,682,240	8,128,389	27,125,103
その他	0	110,700	2,201,235	2,945,913	5,257,848
直接経費計	13,608	41,047,194	39,216,718	42,722,480	123,000,000
間接経費計	15,000	3,852,367	327,132	32,705,501	36,900,000
合計	28,608	44,899,561	39,543,850	75,427,981	159,900,000

4. 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	徳島大学 (京都大学より移管)
クロマトチャンパー	日本フリーザー株式会社製 クロマトチャンパー MC-20EF3	1	772,800	772,800	2011/8/25	徳島大学 (京都大学より移管)
純水製造装置	米国ミロア製 Elix Advan tage 3一式	1	859,950	859,950	2011/9/15	徳島大学 (京都大学より移管)
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	徳島大学 (京都大学より移管)
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	徳島大学 (京都大学より移管)

様式20

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 M1352- 0005(3/4インチス トローク、冷凍機 付)	1	840,000	840,000	2011/10/31	徳島大学 (京都大学よ り移管)
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	徳島大学 (京都大学よ り移管)
共焦点レーザースキャン 顕微鏡システム	独国カーツァイスマ イクロイメージ 社製 共焦点 レーザースキャン顕 微鏡LSM700一 式	1	21,486,150	21,486,150	2012/3/8	徳島大学 (京都大学よ り移管)
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	徳島大学 (京都大学よ り移管)
リトグラフ	大和光機工業 株式会社リト グラフ REM710- SUF240W	1	1,049,895	1,049,895	2012/7/5	徳島大学 (京都大学よ り移管)
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	徳島大学 (京都大学よ り移管)
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	徳島大学 (京都大学よ り移管)
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	徳島大学 (京都大学よ り移管)
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	徳島大学 (京都大学よ り移管)
インキュベーターシェーカー	米国サーモフィ シャーサイエンティ フィック社製 フォ ーマユニバーサル CO2インキュベ ーター3110	1	1,124,550	1,124,550	2012/10/10	徳島大学 (京都大学よ り移管)
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	徳島大学 (京都大学よ り移管)
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	徳島大学 (京都大学よ り移管)

様式20

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	徳島大学 (京都大学より移管)
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QFSEL6000	1	1,379,700	1,379,700	2013/1/15	徳島大学 (京都大学より移管)
超低温フリーザー	パ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 (京都大学より移管)
病理検査室用クオースタット	独国ライカハイシステムズ・ヌスロフ GmbH M1860	1	4,000,710	4,000,710	2013/5/22	徳島大学 (京都大学より移管)
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 (京都大学より移管)
実体顕微鏡	独国ライカマイクロシステムズ製M205C(M205C-RI)	1	1,558,095	1,558,095	2013/10/17	徳島大学 (京都大学より移管)
超低温フリーザー	パ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 (京都大学より移管)
ハイオハザード用キャビネット	パ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 (京都大学より移管)
ImageQuant	英国GEヘルスケア LAS4000mini	1	4,063,500	4,063,500	2013/11/25	徳島大学 (京都大学より移管)
液体窒素容器	CHARTクライオシステム4000	1	554,400	554,400	2014/3/11	徳島大学
パラフィン包埋ブロック作製装置(ディスベンジング・コンソール)	サクラファインテック TEC-P-DC-JO	1	1,000,000	1,000,000	2014/3/11	徳島大学
ハイオアナライザー	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	トミー精工 AX-511	1	589,448	589,448	2014/3/25	徳島大学

5. 研究成果の概要

様式20

H3K9の脱メチル化酵素の一つであるJmjd1aの機能を調べる目的で、そのノックアウト(KO)マウスを作成した。XY, Jmjd1a-KOマウスでは雄から雌への性転換が高頻度で起きていることが分かった。マウスでは受精後11.5日の胎児の性腺でSryの発現がピークを迎えるが、Jmjd1a-KOマウス胎児ではSryの発現が顕著に低下していた。いくつかの詳細な解析により、我々はJmjd1aがSryの転写を直接制御していることを示した。Jmjd1aは、Sry遺伝子座の抑制的なエピジェネティック修飾を外すことでその転写活性化を援助していると考えられる。「酵素反応がほ乳類の性決定に重要である」という知見は世界的にも初であり、本研究成果は「性は受精のときに決定する」という一般的な概念の再考につながった。

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)
研究成果報告書**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名 (下段英語表記)	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
	Studies on mammalian sex-specific epigenome
研究機関・部局・ 職名 (下段英語表記)	国立大学法人徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授
	Professor, Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima
氏名 (下段英語表記)	立花 誠
	Makoto Tachibana

研究成果の概要

(和文):我々はマウスの性決定にヒストン脱メチル化酵素が重要な働きを担っていることを世界に先駆けて報告しました。ヒストン脱メチル化酵素である Jmjd1a の遺伝子破壊マウスでは、性染色体が XY であるにもかかわらず高頻度に雄→雌の性転換が観察されます。Jmjd1a 欠損マウスでは、性決定遺伝子である Sry 遺伝子座のヒストンの脱メチル化が触媒されず、Sry が活性化されません。この研究成果は、人間の性分化疾患の原因解明にもつながると考えています。

(英文): We revealed that an histone demethylase plays crucial roles on mouse sex determination. XY Mice lacking the histone demethylase, Jmjd1a were frequently sex-reversed from male to female. We found that Sry was not activated in Jmjd1a-deficient embryonic gonads, since H3K9 methylation marks in Sry loci were not removed. Our results may contribute to solving the unknown cause for disorders sex development in human.

1. 執行金額 159,900,000 円
(うち、直接経費 123,000,000 円、 間接経費 36,900,000 円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年 3月31日

3. 研究目的

有性生殖を行う生物にとって雌雄への性分化は非常に重要な意味を持つ。とりわけ哺乳類の性分化機構の実態を明らかにすることは、我々人類の成り立ちを探ることのみならず、将来的には医学や農学など様々な分野への貢献が期待される。我々人類を含めたほ乳類は、たった一個の受精卵からおよそ 200 種もの細胞種が生み出される。その場面では、「遺伝子配列を変えない後天的なゲノム修飾機構」である、エピジェネティック制御が深く関与している。一方で、これまでにほ乳類の性分化とエピジェネティック制御との関わりを追求した研究は皆無に近い。申請者がこれまでに行ってきたヒストンメチル化酵素による遺伝子発現制御の研究実績をもとに、新たに「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」を目標とした研究を提案する。

4. 研究計画・方法

(1) 性腺体細胞の精製システムの確立

雌雄の性差が確立する時期、およびそれが維持される時期の胎児期生殖腺体細胞からクロマチンを分離する実験系を構築する。さらにそのクロマチンを用いてメチル化 DNA や修飾ヒストンの分布の解析を行い、雌雄間でのエピゲノムの質的および量的な差を明らかにする。次にその性差が個体の成長とともに安定に維持されているのかをマウス個体を使って経時的に解析する。

(2) 胎児期性腺の Sry 遺伝子座のエピジェネティックな制御

Sry 遺伝子は胎児期の雄の生殖腺体細胞でごく限られた時期に一過性に発現する。この特殊な発現様式を制御するエピジェネティック因子の同定、並びに Sry 遺伝子座のエピゲノム構造の解明を行う。

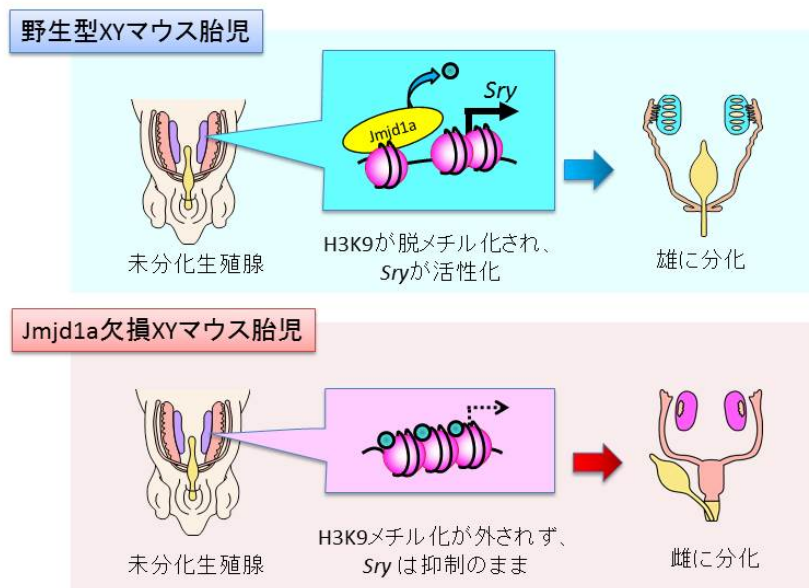
5. 研究成果・波及効果

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機構が、ほ乳類の性決定に重要な役割を有することを明らかにした。ヒストン脱メチル化酵素である Jmjd1a の欠損マウスは、性染色体が XY であるにも関わらず、高い頻度で雌化する。この発見をきっかけとし、Jmjd1a がマウスの性決定のどの局面で作用しているのか、またその分子メカニズムの解明を行った。マイクロアレイ解析やトランスジェニックマウスによるレスキュー実験で、Jmjd1a は性決定遺伝子 Sry の転写制御に関わっていることを明らかにした。さらに分子レベルでの解析を進めた結果、以下の 3 点を明らかにした(まとめの図も参照されたい)。

(1) Jmjd1a は性決定遺伝子である Sry 遺伝子座のヒストン脱メチル化(ヒストン H3 の 9 番目のリジン)を行うこと。

(2) H3K9 脱メチル化は Sry の転写を正に制御すること。

(3) Sry の H3K9 脱メチル化が起きなかったことでそのマウスの性転換が引き起こされること。



野生型XY胎児の性腺では、*Sry*遺伝子座のヒストンH3の9番目のリジン（H3K9）のメチル化が外され*Sry*が活性化する。Jmjd1aが欠損したXY胎児性腺では、H3K9の脱メチル化が不十分なため*Sry*の発現が活性化せず、雌化してしまう。

DSD (Disorders of Sex Development) は人間の疾患のうちでも決した希なものでは無い。しかもその症例の多くで原因がまだ分かっていない。私の研究成果はエピジェネティック制御の破綻がDSDの原因となっている可能性を強く示唆する。今後はエピジェネティクス制御とDSDとの関を追求していきたい。

6. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 8 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 8 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 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 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 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 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 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, Kawakami K, and Nishinakamura R. <i>Dev. Cell</i> 26: p416–30, 2013 6. Hippocampal dysfunction in the Euchromatin histone methyltransferase 1 heterozygous knockout mouse model for Kleefstra 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, Kleefstra T, van Bokhoven H, and Van der Zee CEEM. <i>Hum. Mol. Genetics</i> 22; p852–866, 2013 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 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>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
-----------------------	---

様式21

<p>会議発表 計 2 件</p>	<p>専門家向け 計 2 件 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 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 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>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>新聞・一般雑 誌等掲載 計 7 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」 2013 年 9 月 6 日 京都新聞朝刊「性決定の『鍵』酵素発見」 2013 年 9 月 6 日 産経新聞朝刊「特定酵素 性別影響か」 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」 2013 年 9 月 6 日 中日新聞朝刊「性別決定の鍵 特定」 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>013 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」 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」 2014 年 2 月 3 日 小学館ジャパンナレッジ JK Who's Who 「注目の人物 サイエンス&テクノロジー」</p>

7. その他特記事項