

課題番号 2

マウス性決定のエピゲノム制御を担う代謝産物の解析

[1] 組織

代表者：立花 誠

(大阪大学生命機能研究科)

対応者：林 陽平

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：宮脇 慎吾

(岐阜大学応用生物科学部)

黒木 俊介

(大阪大学生命機能研究科)

研究費：物件費 13 万円

[2] 研究経過

【研究の背景と目的】

ほ乳類の性的に未分化な生殖腺が将来精巣になるか卵巣になるか、その運命決定に性決定遺伝子 *Sry* (Sex-determining region of Y) が深く関与する。*Sry* は特定の時期の胎仔生殖腺でのみ発現し、その生殖腺を精巣へと運命付ける。*Sry* が発現しなかった場合、その生殖腺は卵巣へと運命付けられる。

申請者は 2013 年に、ほ乳類性決定におけるエピゲノム制御の重要性を世界に先駆けて見出した。ヒストン H3 の 9 番目のリシンのジメチル化 (H3K9me2) は、転写が抑制されたヘテロクロマチンの形成に必須のエピゲノムである。申請者らは、H3K9 脱メチル化酵素の JMJD1A を欠損させたマウスでは *Sry* の転写が抑制され、その結果当該マウスはオスからメスに性転換することを見出した (Science, 2013)。続いて申請者らは、H3K9 メチル化酵素である G9a/GLP 複合体が *Sry* を抑制すること (PLoS Genet, 2017)、DNA 酸化酵素である TET2 が *Sry* の DNA 脱メチル化を触媒することを見出した (Sci Rep, 2019)。また卵巣分化経路の抑制に関わるエピゲノム制御因子として CDYL を同定した (PNAS, 2023)。

1990 年に同定されて以降、全てのほ乳類の *Sry* は単一エクソン遺伝子であるとされた。ところが申請者らは、マウス *Sry* 遺伝子座に見逃されてきた第 2 エクソンが存在し、それがコードする新規翻訳産物 *SRY-T* が生体内で実質的に機能する真の性決定因子であることを見出した (Science, 2020)。この研究成果は、*Sry* の遺伝子構造に関する教科書の記載を書き換えた。

最近申請者らは、独自に開発した生殖腺体細胞を精製する技術を用い、生殖腺の精巣化を担う細胞 (受精後

11.5 日の XY 生殖腺体細胞) の遺伝子発現解析を行った。その結果、この細胞では代謝関連遺伝子の発現がユニークなプロファイルを示すこと、すなわち糖と脂質代謝によるアセチル CoA の産生、アミノ酸代謝による α -ケトグルタル酸 (α -KG) の産生、鉄の代謝による二価鉄 (Fe^{2+}) の産生につながる経路の律速酵素の遺伝子群が、他の細胞種に比べて有意に高発現していることを見出した (図 1)。

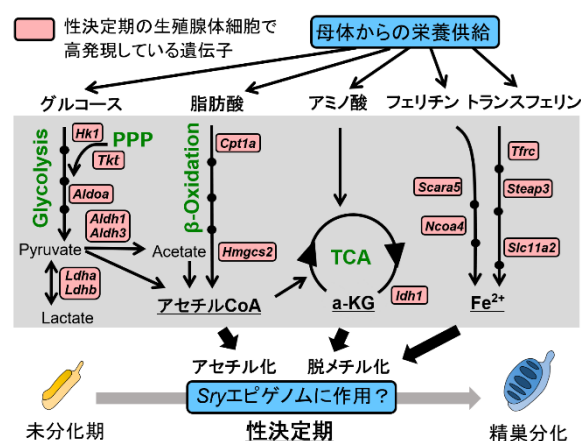


図1 性決定期の生殖腺体細胞の代謝とエピゲノムの相関の予想図

アセチル CoA はヒストンアセチル化、 α -KG と Fe^{2+} は DNA とヒストンの脱メチル化の酵素反応に必須の補因子である。このことから私たちは、「性決定期の生殖腺体細胞では、これらの代謝産物の産生経路が活性化することで *Sry* 発現に必要なエピゲノムが構築される」との仮説を立てた。本研究提案では、この仮説について検証する。マウス性決定に関わる細胞のメタボローム解析を行い、代謝産物の動的変化とエピゲノム制御との関りを明らかにする。本研究は、生殖細胞のメタボローム解析で特筆すべき実績を上げている貴研究所の林陽平博士とともに遂行した。

【研究経過の概要】

In vivo 発生胎仔の生殖腺のメタボローム解析：性決定期のマウス胎仔の生殖腺から性決定を担う体細胞を単離・精製した。性決定を担う生殖腺体細胞の同定には、過去に申請者が樹立した生殖腺体細胞の表面にタグが付加するようにデザインされたトランスジェニックマウスを用いた。性決定を担う細胞はフローサイトメトリーによって精製した。本法で得ら 20 匹の XY 胎仔を使い、 5×10^5 の 5 乗個の細胞を調整した。細胞の固定、タンパク質の変性処理を経た後に水

層に含まれるメタボライトを抽出し、質量分析による解析へと供した。

研究成果に関する議論は、zoom ミーティングと対面会議によって行った。zoom ミーティングについては、2024 年 7 月 4 日（参加者：立花、林、宮脇、黒木、立花研助教の岡下、立花研特任助教の前田）に行った。第 2 回目の zoom 会議は、2024 年 8 月 7 日（参加者：立花、林、宮脇、黒木、岡下、前田）に行った。対面での会議は、2024 年 12 月 26 日に博多の分子生物学会会場で、立花、林、前田で行った。また、2024 年 12 月 12 日には、加齢医学研究所にて、立花と林が対面会議を行った。2025 年 1 月 26 日から 29 日にかけて、大分県別府市にて立花、林、前田で研究の方向性について議論した。これらの他にも、メールにて頻繁に進捗報告と議論を進めてきた。

〔3〕 成果

（3－1）研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

E11.5 生殖腺における NR5A1-high 細胞（Sry を発現しているセルトリ前駆細胞）と、NR5A1-low 細胞（主に将来ライディッヒ細胞になる細胞や、体腔上皮細胞）のメタボライト解析を行い、その比較を行うことに成功した。図 2 に示すように、10 の 4 乗個の細胞では、NR5A1-high 細胞と low 細胞のメタボロームのプロファイルの分離が不完全であった。一方で、10 の 5 乗個の細胞を使ったサンプルでは、NR5A1-high 細胞と low 細胞のメタボロームのプロファイルが分離した。

以上の結果を踏まえ、10 の 5 乗個のメタボローム解析データをもとに、NR5A1-high 細胞と、NR5A1-low 細胞の代謝産物の比較を行った。その結果、以下の点が明らかになった。

- 1) NR5A1 low vs high で含有量が異なる metabolite の多くは TCA サイクル付近に集中していること
- 2) TCA サイクルの前半は NR5A1 low で含有量が多く、後半は NR5A1 high で含有量が多い傾向があること
- 3) NR5A1 high の細胞では、特に pyruvate, NADPH の合成を担う代謝経路の亢進が見られた。
- 4) NR5A1 high の細胞では、CPT1 の発現上昇に伴う脂肪酸酸化の亢進が示唆された。

（3－2）波及効果と発展性など

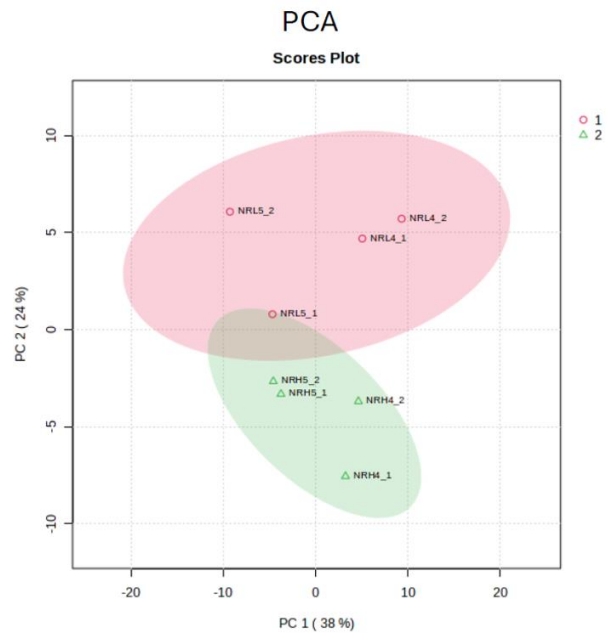


図2. NR5A1-high細胞とlow細胞のメタボローム解析結果のクラスタリング

本共同研究の成果を共有することで、他の分野の研究者との議論が飛躍的に活性化した。なかでも、胎盤の機能解析を行う研究者と密にディスカッションすることで、これまで知られていなかった、「母体栄養→胎盤機能→性分化の臨界期における生殖腺の性差形成→成体における生殖機能」の連関軸を明らかにするとの新たな研究目標が設定された。これにより、臨床応用へと発展することが見込める大型予算獲得の土台を構築することができた。

今後は、母体の餌の成分が胎仔生殖腺のエピゲノム形成にどう作用するのか、低栄養条件下で発生した生殖細胞は、それに由来する次世代の個体の健康へどのような影響を与えるのか、などの研究テーマも将来的に進めてみたい。また、生殖腺オルガノイドを扱う研究者ともディスカッションを行った。本研究の成果を応用することで、質の高い精巣オルガノイドの形成の筋道が示された。

〔4〕 成果資料

- (1) 第 42 回日本分子生物学会指定シンポジウム（招待講演）「Epigenetic regulation of mouse sex determination」2024 年 11 月、マリンメッセ福岡（福岡）
- (2) 第 9 回さがけ「エピジェネティクスの制御と生命機能」終了後会議「マウス性決定のエピジェネティック制御」2024 年 9 月、長良川国際会議場（岐阜）
- (3) 第 65 回日本生化学会中国四国支部例会（招待講演）「マウス性決定のエピジェネティック制御機構」2024 年 6 月、島根大学（島根）