

アルギニンメチル化酵素 PRMT1 の
スプライスバリエント 2 の役割に関する研究

2019 年 1 月

水上 早瀬

アルギニンメチル化酵素 PRMT1 の
スプライスバリエント 2 の役割に関する研究

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生物機能科学専攻

博士 (生物工学) 学位論文

水上 早瀬

目次

第 1 章 序論	p. 1
第 2 章 アルギニンメチル化酵素 PRMT1 のスプライスバリエント 2 の役割 (要約版)	
要旨	p. 6
背景	p. 8
結果	p. 11
考察	p. 12
参考文献	p. 13
第 3 章 MEF における KDM5D による H3K4 の脱メチル化の役割	
要旨	p. 16
背景	p. 17
材料と方法	p. 19
結果	p. 23
考察	p. 26
参考文献	p. 28
図表	p. 34
謝辞	p. 40

第1章 序論

タンパク質は、20種類のアミノ酸から合成され、筋肉や臓器などの、生物の“形”を司るだけでなく、ホルモンや酵素、免疫物質のように、生命活動を支える最も重要な構成成分の1つである。タンパク質の基本的な機能は、構成されるアミノ酸の配列に基づくと考えられているが、多くのタンパク質は、生合成された後にリン酸化、アセチル化、ユビキチン化やメチル化をはじめとする、様々な化学修飾を受けることで、活性や安定性、細胞内局在が調節される。例えば、リン酸化は酵素活性やタンパク質間相互作用を調節することでシグナル伝達を、ユビキチン化はタンパク質の分解などを制御する。これらの化学修飾を、翻訳後修飾と呼ぶ。

一方で、翻訳後修飾のひとつ、タンパク質中のアルギニン残基のメチル化は、ヒストンや転写因子、膜タンパク質やRNA結合タンパク質など、幅広いタンパク質でみられ、タンパク質アルギニンメチル基転移酵素 (PRMTs) により触媒される。培養細胞を用いた解析から、主要なメチル化酵素である PRMT1 によるアルギニンメチル化が、遺伝子発現や DNA 修復、シグナル伝達など、多彩な細胞プロセスを調節することが報告されている (1-3)。しかし、全身での PRMT1 遺伝子欠損マウスが胎生致死を示すため (4)、生体における PRMT1 によるアルギニンメチル化が制御する機能は長らく未解明であった。

私たちの生体内では、約 10 万種類のタンパク質がそれぞれに機能することで複雑な生命活動を可能にしている。しかし、タンパク質の設計図である遺伝子は約 2 万種類であることが明らかにされており、もし1つの遺伝子から1つ

のタンパク質が生合成されるとすると、2万足らずのタンパク質しか合成出来ないことになる。限られた遺伝子から多様なタンパク質を産生する機構が、ひとつの遺伝子から配列の一部異なるタンパク質（スプライスバリエント）を複数作り出す、選択的スプライシングである。スプライスバリエントは、それぞれ異なる機能を有することで、遺伝子の機能を役割分担する可能性がある。これまでに、個体におけるバリエントの機能解析に関する報告はほとんど無い。その理由として、個体レベルで人工的にバリエントを欠失・創生する技術が不十分であったことが考えられる。この問題を解決する技術として、2013年以降、CRISPR/Cas9システムが新しいゲノム編集技術として急速に普及し、ゲノム情報を自在に書き換えることが可能になった(5)。第2章では、CRISPR/Cas9システムにより、選択的スプライシングを制御し、マウス個体内で特定のバリエントのみ欠損させることを検討すると共に、スプライスバリエントの機能から、生体におけるPRMT1の機能を解明すべく、PRMT1のスプライスバリエント特異的な欠損マウスを作製し、PRMT1の欠損がマウス個体機能に及ぼす影響を検討した。

第2章で樹立したマウスの胎仔から線維芽細胞(MEF)を調製し、PRMT1バリエントの欠損が細胞内の遺伝子発現に与える影響を、次世代シーケンサーを用いたRNAシーケンスにより解析した。しかし、それぞれの細胞で遺伝子発現パターンにばらつきが大きく、野生型と欠損型でグループとして分離することが出来なかった(Fig. 1A)。ところが、由来する胎仔の性別でMEFを区別し、再度主成分分析を行うと、遺伝子型により2つのクラスターに分けることが出来た(Fig. 1B, 1C)。多くの生物には、オスとメスの性別が存在し、交配によ

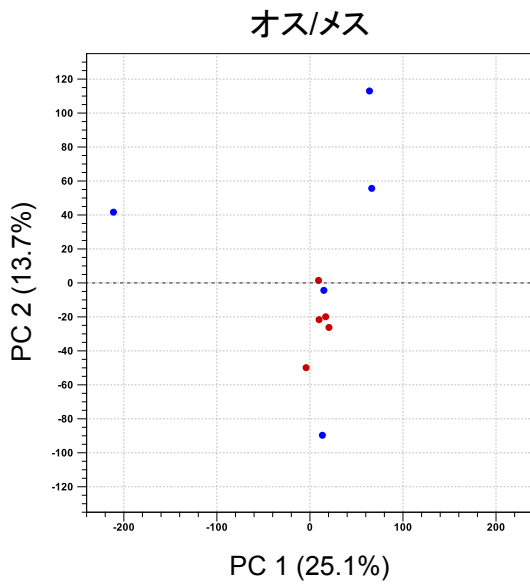
り子孫を残す。大多数の哺乳類の性別は、オスヘテロ型の性染色体構成により規定され、メスは相同な X 染色体を持つのに対し、オスは X 染色体と Y 染色体を持つ (XY 型)。PRMT1 バリエント欠損マウスの解析から、MEF においても由来する胎仔の性別により、遺伝子発現のプロファイルが異なる可能性が見出されたが、性別における網羅的遺伝子発現を比較した報告は無い。そこで第 3 章では、MEF の性差に着目し、野生型 C57BL/6 マウスからオスおよびメス由来の MEF を調製し、RNA シーケンス解析により、性別間による MEF の遺伝子発現の差や、その制御機構について解析した。

参考文献

1. Yamagata, K., Daitoku, H., Takahashi, Y., Namiki, K., Hisatake, K., Kako, K., Mukai, H., Kasuya, Y., and Fukamizu, A. (2008) Arginine Methylation of FOXO Transcription Factors Inhibits Their Phosphorylation by Akt. *Mol. Cell* **32**, 221-231
2. Wang, H. B., Huang, Z. Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B. D., Briggs, S. D., Allis, C. D., Wong, J. M., Tempst, P., and Zhang, Y. (2001) Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* **293**, 853-857
3. Yang, Y., and Bedford, M. T. (2013) Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 37-50
4. Pawlak, M. R., Scherer, C. A., Chen, J., Roshon, M. J., and Ruley, H. E. (2000) Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol. Cell Biol.* **20**, 4859-4869
5. Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* **8**, 2281-2308

Figure 1

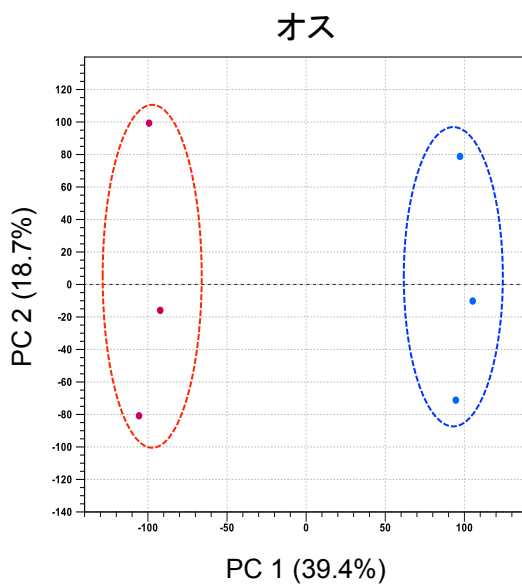
A



野生型 MEF

PRMT1バリエント欠損 MEF

B



C

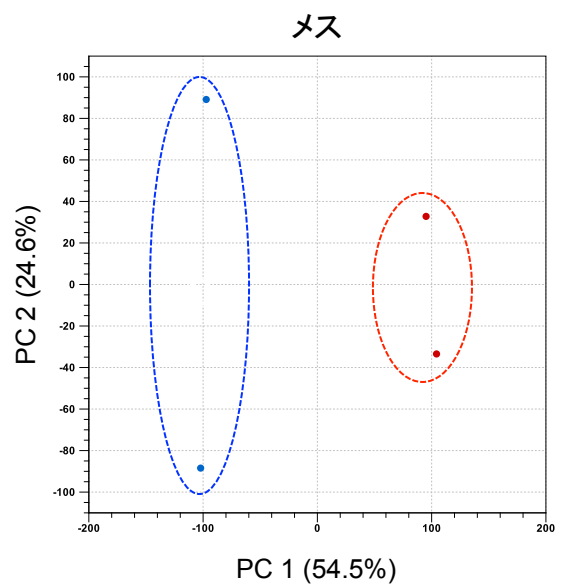


Fig. 1 マウス胎仔由来線維芽細胞 (MEF) を用いたトランスクリプトーム解析、主成分分析 (PCA)

妊娠14日目のマウスから単離したMEFs (野生型およびPRMT1バリエント欠損) のRNAシーケンスデータを用いて得られたPCAプロット (野生型: 青、欠損型: 赤) (A)。性差によるPCAプロットのクラスター解析、オス (B)、メス (C)。

第 2 章

アルギニンメチル化酵素 PRMT1 のスプライスバリエント 2 の役割 (要約版)

<要旨>

哺乳類の約 65%の遺伝子は、選択的スプライシングから配列の一部異なるタンパク質 (スプライスバリエント) を形成し、発現するタンパク質に多様性が生まれる。PRMT1 は、アルギニン残基のメチル化反応を触媒する酵素であり、核から細胞質に存在するタンパク質を標的とし、転写やシグナル伝達など、多彩な細胞機能を制御することから、生物学的に重要な因子であることが考えられる。また、PRMT1 には、細胞内局在の異なる 2 つの主要なスプライスバリエント (v1, v2) が存在し、v1 は核と細胞質に、v2 は細胞質にのみ局在する。この局在性の違いを生むバリエントが、PRMT1 の多様な機能を制御することが推測される。しかし、全身性の PRMT1 欠損マウスが発生早期 (胎生 6.5 日) に致死を示すため、PRMT1 の個体機能の研究はほとんど進展してこなかった。そこで本研究では、スプライスバリエントの解析から、PRMT1 の生体機能を理解することを考えた。

マウス個体を用いて PRMT1 バリエントの機能を解析するために、CRISPR/Cas9 を用いたゲノムの点変異置換により、PRMT1 のスプライシングを制御し、PRMT1v2 の特異的欠損マウスを樹立した。PRMT1v2 欠損マウスは、メンデルの法則に従って誕生し、その後も野生型と同様に生育した。まず初めに、PRMT1v2 の欠損が生体に与える影響を明らかにするため、野生型マウスを用いて PRMT1v2 の発現が変化する条件を探索した。その結果、代謝の中心的な

臓器である肝臓で、PRMT1v2 の mRNA 量がグルコースに応答して変化することが明らかとなった。そこで、樹立したマウスの糖代謝に着目し、グルコース負荷試験およびインスリン負荷試験を行った。その結果、PRMT1v2 欠損マウスは、インスリン抵抗性を伴う耐糖能異常を示した。また、PRMT1v2 欠損が遺伝子発現に与える影響を、RNA シークエンスにより解析し、肝臓において PRMT1v2 の欠損に伴い発現が変化した、糖尿病に関連する遺伝子群を同定した。この中には、糖代謝やミトコンドリア機能との関連が示唆されている tRNA メチル化酵素が含まれており、実際、PRMT1v2 欠損マウスの肝臓では RNA のメチル化の変化が認められた。次いで、2次元電気泳動法と抗メチル化アルギニン抗体を用いたウエスタンブロッティング法を組み合わせた手法により、PRMT1v2 欠損によるメチル化の変化を検出した。さらに、作製したマウスから MEF を調製して解析すると、細胞増殖に加え、ミトコンドリア機能に変化が認められた。以上のことから、PRMT1v2 が遺伝子発現やアルギニンメチル化を介して、マウスの糖代謝の恒常性を制御することが示唆された。

<背景>

タンパク質は、リン酸化・ユビキチン化・アセチル化そしてメチル化などの化学修飾を受けることで、活性や安定性、細胞内局在などが調節される。タンパク質のメチル化修飾では、リジン・ヒスチジン・アルギニンが標的とされる (1)。リジン残基のメチル化は、ヒストンのメチル化・脱メチル化修飾などのエピゲノム制御に重要な役割を果たしている (2)。ヒスチジン残基のメチル化は、2010年に出芽酵母において、リボソームタンパク質である RPL3 中のヒスチジン残基をメチル化する酵素が発見され、リボソーム構造の構築や翻訳機能に関与していることが示唆された (3)。アルギニン残基のメチル化は、1996年に Gray らが出芽酵母にてアルギニンメチル化酵素 RMT1 が(4)、さらに哺乳類にもそのホモログが保存されていることから (5)、酵素の同定によって精力的に研究が進められてきた。哺乳類のタンパク質アルギニンメチル基転移酵素ファミリー (PRMTs) は、SAM (*S*-adenosyl-L-methionine) をメチル基供与体として、アルギニン残基のグアノシル基にメチル基 (-CH₃) を転移する (6)。動物細胞では、10種類の PRMTs がメチル基転移の様式から3つのタイプに分類される (6, 7)。タイプ I PRMTs は、モノメチル化および非対称性ジメチル化を担う (PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT4, PRMT6, PRMT8, METTL23)。また、タイプ II PRMTs は、モノメチル化および対称性ジメチル化を担う (PRMT5, PRMT9) (8, 9)。そして、タイプ III PRMT は、モノメチル化のみを担う (PRMT7) (Fig. 1A) (10)。

タイプ I に分類される PRMT1 は、細胞内のアルギニンメチル化の約 85% を担う主要な酵素であり、核と細胞質に局在するヒストンや転写因子、RNA 結合タンパク質、リン酸化酵素など、多数のタンパク質が基質として報告されてい

る (11)。PRMT1 を介したアルギニンメチル化は、シグナル伝達、転写制御、DNA 修復など、細胞機能における重要な制御機構に関与することが明らかにされた (6, 12)。以上のように、培養細胞レベルでの PRMT1 の機能の理解は進んでいる。

当研究室では、PRMT1 による転写因子 FOXO1 のメチル化が、細胞の酸化ストレス応答に寄与していることを報告してきた (13)。最近では、PRMT1 の個体レベルの機能としては、線虫を用いた解析から、PRMT1 による転写因子 DAF-16 のアルギニンメチル化が寿命を制御する (14) ことを明らかにした。一方、PRMT1 の全身欠損マウスが発生段階 (胎生 6.5 日) で致死を示す (15) ことなどを理由に、長年 *in vivo* 研究が進展してこなかった。最近、当研究室では PRMT1 の組織特異的欠損マウスを作製・解析することで、PRMT1 の生体機能の解明に取り組んでいる。中枢神経特異的 PRMT1 欠損マウスの解析からは、PRMT1 が神経細胞や脳の発達、生後の生命維持に必須であることを明らかにした (16)。また、血管内皮細胞特異的 PRMT1 欠損マウスからは、発生過程で酸素や栄養素を全身へ循環させる血管の形成に PRMT1 が重要であることを報告した (17)。そして、ごく最近、心筋細胞特異的 PRMT1 欠損マウスの解析から、PRMT1 が心機能の恒常性維持や選択的スプライシングに関与することを報告した (18)。このように、組織毎に PRMT1 の重要性が明らかになりつつある。

ゲノムプロジェクトによって、タンパク質の設計図となる遺伝子は 2 万種類前後であることが判明したが、生体内には 10 万種類以上のタンパク質が存在している。これは、ひとつの設計図から複数種のタンパク質が作られているからであり、その仕組みが『選択的スプライシング』である。選択的スプライシングによって転写産物の配列構成が部分的に変化し、異なるタンパク質 (スプライ

スバリアント) が翻訳される。スプライスバリアントは、特定の細胞や発生段階などに応じた固有の機能を有すると考えられ、その多様な機能発現によって、生体は様々な環境に適応する生命活動を可能にしている (19)。

ヒト PRMT1 には選択的スプライシングの結果、エクソンの組み合わせが異なる 7 つのスプライスバリアントが存在する。*in vitro* の研究から、7 つの PRMT1 バリアント (v1~7) は、異なる細胞内局在を示すことが報告されている (20)。例えば、v1 は細胞内で細胞質に局在するのに対し、v2 は核に局在し、それぞれ結合するタンパク質も異なる (20, 21)。また、乳癌細胞では、PRMT1 の発現量が、特に v2 が増加することが明らかとされている (20)。個体レベルにおいて、v4~7 に関しては限られた組織にそれぞれが発現するのに対し、v1、v2、v3 は全身の組織において発現していることが報告されている (20)。PRMT1 は、核と細胞質で機能を発揮するため、これらのバリアントが、PRMT1 の多様な生理機能の制御に関与していることが考えられる。本研究では、個体レベルで PRMT1 のスプライスバリアント機能を解明することで、生体における PRMT1 によるアルギニンメチル化の重要性を明らかにすることを目的とする。

<結果>

まず、組織毎の PRMT1 バリエントの発現を検討した。その結果、マウスの主要な組織で PRMT1 v1 と v2、2つのバリエントが発現することが確認された。次に、マウス個体を用いて PRMT1 バリエントの機能を解析するため、PRMT1 のスプライシング機構を破壊させることで、PRMT1v2 の特異的欠損マウスを樹立した。本マウスは、メンデルの法則に従って誕生し、その後も野生型と同様に生育した。近年、PRMT1 はインスリンシグナル経路の最下流に位置する転写因子 FOXO1 のメチル化を介して、糖新生に関与する遺伝子の発現を調節することが報告されている。興味深いことに、本研究での RNA シーケンス解析により、PRMT1v2 欠損マウスの肝臓において糖尿病に関連する遺伝子群が同定された。そこで、糖代謝に着目し、グルコース負荷試験およびインスリン負荷試験を行った。その結果、PRMT1v2 欠損マウスは、インスリン抵抗性を伴う耐糖能の低下を示した。また、胎仔から樹立した線維芽細胞 (MEF) を用いた解析から、PRMT1v2 がミトコンドリアの呼吸能や形態に関与することを見出した。さらに、PRMT1v2 の標的因子の探索により、ミトコンドリアに局在するタンパク質が同定された。

<考察>

体内に取り込まれたグルコースは、解糖系によってピルビン酸へ代謝され、ミトコンドリアにおいて、クエン酸回路、電子伝達系を介して細胞のエネルギー源である ATP の産生に利用される。これまでに当研究室では、*Prmt-1* 欠損線虫において、ミトコンドリア機能が低下することを報告している (22)。PRMT1 の v2 を特異的に欠損したマウスは、糖代謝に加え、ミトコンドリア機能に変化が認められた。以上のことから、細胞質に局在する PRMT1 の v2 がミトコンドリアの機能制御を介し、糖代謝の恒常性維持に関与する可能性が考えられる。今後、PRMT1v2 による遺伝子発現や、アルギニンメチル化の詳細な解析や、その下流の分子機構を明らかにすることにより、PRMT1 が選択的スプライシングを受け、PRMT1v2 を産生することの生物学的意義を明らかにしたい。

<参考文献>

1. Paik, W.L., Paik, D.C., and Kim, S. (2007) Historical review: the field of protein methylation. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 146-152
2. Martin, C., and Zhang, Y. (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Reviews* **6**, 838-849
3. Al-Hadid, Q., Roy, K., Munroe, W., Dzialo, M.C., Chanfreau, G.F., and Clarke, S.G. (2014) Histidine methylation of yeast ribosomal protein Rpl3p is required for proper 60S subunit assembly. *Mol. Cell Biol.* **32**, 2903-2916
4. Gray, J.D., Lin, W.J., Yang, M.C., Herschman, H.R., and Clarke, S. (1996) The predominant Protein-arginine Methyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 12585-12594
5. Lin, W.J., Gary, J.D., Yang, M.C., Clarke, S., & Herschman, H.R. (1996) The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 15034-1504
6. Yang, Y., and Bedford, M. T. (2013) Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 37-50
7. Hatanaka, Y., Tsusaka, T., Shimizu, N., Morita, K., Suzuki, T., Machida, S., Satoh, M., Honda, A., Hirose, M., Kamimura, S., Ogonuki, N., Nakamura, T., Inoue, K., Hosoi, Y., Dohmae, N., Nakano, T., Kurumizaka, H., Matsumoto, K., Shinkai, Y., and Ogura, A. (2017) Histone H3 methylated at arginine 17 is essential for reprogramming the paternal genome in zygotes. *Cell Rep.* **20**, 2756-2765
8. Hadjikyriacou, A., Yang, Y., Espejo, A., Bedford, M. T., and Clarke, S. G. (2015) Unique features of human protein arginine Methyltransferase 9 (PRMT9) and its substrate RNA splicing factor SF3B2. *J. Biol. Chem.* **290**, 16723-16743

9. Yang, Y., Hadjikyriacou, A., Xia, Z., Gayatri, S., Kim, D., Zurita-Lopez, C., Kelly, R., Guo, A., Li, W., Clarke, S. G., and Bedford, M. T. (2015) PRMT9 is a type II methyltransferase that methylates the splicing factor SAP145. *Nat. Commun.* **6**, 6428
10. Zurita-Lopez, C. I., Sandberg, T., Kelly, R., and Clarke, S. G. (2012) Human protein arginine methyltransferase 7 (PRMT7) is a type III enzyme forming omega-NG-monomethylated arginine residues. *J. Biol. Chem.* **287**, 7859-7870
11. Tang, J., Frankel, A., Cook, R. J., Kim, S., Paik, W. K., Williams, K. R., Clarke, S., and Herschman, H. R. (2000) PRMT1 Is the Predominant Type I Protein Arginine Methyltransferase in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 7723-7730
12. Wang, H. B., Huang, Z. Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B. D., Briggs, S. D., Allis, C. D., Wong, J. M., Tempst, P., and Zhang, Y. (2001) Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* **293**, 853-857
13. Yamagata, K., Daitoku, H., Takahashi, Y., Namiki, K., Hisatake, K., Kako, K., Mukai, H., Kasuya, Y., and Fukamizu, A. (2008) Arginine Methylation of FOXO Transcription Factors Inhibits Their Phosphorylation by Akt. *Mol. Cell* **32**, 221-231
14. Takahashi, Y., Daitoku, H., Hirota, K., Tamiya, H., Yokoyama, A., Kako, K., Nagashima, Y., Nakamura, A., Shimada, T., Watanabe, S., Yamagata, K., Yasuda, K., Ishii, N., and Fukamizu, A. (2011) Asymmetric Arginine Dimethylation Determines Life Span in *C. elegans* by Regulating Forkhead Transcription Factor DAF-16. *Cell Metab.* **13**, 505-516
15. Pawlak, M. R., Scherer, C. A., Chen, J., Roshon, M. J., and Ruley, H. E. (2000) Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol. Cell Biol.* **20**, 4859-4869

16. Hashimoto, M., Murata, K., Ishida, J., Kanou, A., Kasuya, Y., & Fukamizu, A. (2015) Severe Hypomyelination and Developmental Defects are Caused in Mice Lacking Protein Arginine Methyltransferase 1 (PRMT1) in the Central Nervous System. *J. Biol. Chem.* **291**, 2237-2245
17. Ishimaru, T., Ishida, J., Kim, J. D., Mizukami, H., Hara, K., Hashimoto, M., Yagami, K., Sugiyama, F., and Fukamizu, A. (2017) Angiodysplasia in embryo lacking protein arginine methyltransferase 1 in vascular endothelial cells. *J. Biochem.* **161**, 255-258
18. Murata, K., Lu, W., Hashimoto, M., Ono, N., Muratani, M., Nishikata, K., Kim, J. D., Ebihara, S., Ishida, J., and Fukamizu, A. (2018) PRMT1 Deficiency in Mouse Juvenile Heart Induces Dilated Cardiomyopathy and Reveals Cryptic Alternative Splicing Products. *iScience* **8**, 200-213
19. Matlin, A. J., Clark, F., and Smith, C.W.J. (2005) Understanding Alternative Splicing: Toward a Cellular Code. *Nat. Review* **6**, 386-398
20. Goulet, I., Gauvin, G., Boisvenue, S., and Cote, J. (2007) Alternative Splicing Yields Protein Arginine Methyltransferase 1 isoforms with Distinct Activity, Substrate Specificity, and Subcellular Localization. *J. Biol. Chem.* **282**, 33009-33021
21. Baldwin, R. M., Bejide, M., Mulcahy, L. T., and Cote, J. (2015) Identification of the PRMT1v1 and PRMT1v2 specific interactomes by quantitative mass spectrometry in breast cancer cells. *PROTEOMICS* **15**, 2187-2197
22. Sha, L., Daitoku, H., Araoi, S., Kaneko, Y., Takahashi, Y., Kako, K., and Fukamizu, A. (2017) Asymmetric Arginine Dimethylation Modulates Mitochondrial Energy Metabolism and Homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell Biol.* **37**, e00504-00516

第 3 章

MEF における KDM5D による H3K4 の脱メチル化の役割

<要旨>

哺乳類において、オスとメスは性染色体である Y 染色体と X 染色体の他に 22 対の常染色体を持ち、大部分のゲノム配列を共通して有するにも関わらず、これらの性別間では異なる遺伝子発現を示す。マウス胎仔由来線維芽細胞 (MEF) は、遺伝子の機能を解析する際のツールとして幅広く用いられる。MEF においても、由来する胎仔の性別に依存して遺伝子の発現に性別特異的な差が認められることが考えられるが、それらを網羅的に解析した報告は無い。そこで、オスおよびメス由来 MEF のトランスクリプトームを比較するために、次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンス解析を行った。その結果、メスと比較して、オス由来の MEF では、ヒストン脱メチル化酵素である KDM5D を含む 27 個の遺伝子の発現が上昇し、7 個の遺伝子の発現が低下した。また、Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) 解析のデータベースを参照してみると、これらのうち 15 遺伝子の発現は、ヒストン修飾である H3K4me1 と H3K4me3 によって制御され得ることが明らかとなった。さらに、オスの MEF で KDM5D をノックダウンすることで、H3K4 のメチル化が上昇し、それに伴い遺伝子発現が変化することを見出した。これらの結果は、オス由来の MEF において、KDM5D によって H3K4 の脱メチル化が性別特異的な遺伝子発現を調節することを示唆するだけでなく、MEF を用いた研究に、性別によるトランスクリプトームの情報を提供し得るものである。

<背景>

ヒトでは、男性と女性は約2万種類のタンパク質をコードする遺伝子を共有している (1)。それにも関わらず、両性の生物学的な差異が性別特異的な遺伝病などに寄与することが報告されている (2)。実験動物においても、代謝などの表現型にオスとメスで差が認められる (3-5)。性別は、性染色体である Y 染色体の有無により決定される (6, 7) ことから、Y 染色体の遺伝子が、性別による表現型の重要な決定因子であると考えられている。

ヒストンタンパク質のリジン残基のメチル化は、真核生物の転写において重要な役割を果たす翻訳後修飾であり (8, 9)、ヒストン H3 の 4 番目のリジンのモノメチル化 (H3K4me1)、ジメチル化 (H3K4me2)、トリメチル化 (H3K4me3) や、それらの脱メチル化は、遺伝子発現に変化をもたらす (10)。例えば、H3K4me1 は、転写が活性化された遺伝子のエンハンサーやプロモーターの近傍に多く見られる (11)、H3K4me2 および H3K4me3 は転写開始部位にみられる (10, 12)。一方、リジン特異的脱メチル化酵素 (LSD1) や Jumonji C ドメイン含有リジン特異的脱メチル化酵素 (KDM5) ファミリーは、H3K4 を脱メチル化し、転写を抑制する (15, 16)。KDM5D (別名: SMCY, JARID1D) は、Y 染色体に位置し、エピゲノム制御に関与する (17)。最近の研究から、KDM5D の発現の減少が RNA プロセッシングやタンパク質合成を介して、前立腺ガン細胞の増殖や、アポトーシスの減少を誘導することが報告されている (18-20)。これらのことから、KDM5D は、H3K4me2 および H3K4me3 の脱メチル化を介して、オス特異的な機能を果たしていると考えられる。一方、H3K4me1 は、エンハンサー領域で見られるが、実際にエンハンサーの活性を制御するのかは不明なままである (21, 22)。

マウス胎仔由来線維芽細胞 (MEFs) は、遺伝子改変マウスにおける表現型の基礎となる遺伝学的、分子生物学的、および生化学的なメカニズムを研究するのに有用なモデルである (23)。現在、MEF は ES 細胞の未分化状態を維持するためのフィーダー細胞 (24) や、遺伝子機能を調べるためのツールとして用いられている (25)。このように、研究に幅広く用いられる MEF においても、オスマたはメスのマウス胎仔から調製されるため、潜在的に生物学的な性差が存在することが考えられる。

本研究では、RNA シーケンスにより、オスおよびメス由来の MEF のトランスクリプトームを比較し、オス特異的な KDM5D を含む、性別間の発現変動遺伝子を同定した。また、ENCODE 解析のデータベースを参照することによって、同定された発現変動遺伝子のいくつかは、H3K4me3、H3K4me1、H3K27Ac のヒストン修飾により、発現が制御され得ることが示唆された。さらに、H3K4me3 と H3K4me1 の2つのメチル化は、オス由来の MEF で KDM5D をノックダウンすることで上昇し、上述の遺伝子の発現に変化をもたらした。これらの発見は、KDM5D が、オスおよびメス由来の MEF 間における性特異的な遺伝子発現を調製することを示唆するだけでなく、MEF を研究に用いる際の、遺伝子機能および細胞応答の基礎となる情報を提供し得るものである。

<材料と方法>

抗体

ウエスタンブロッティングには、anti-Histone H3 抗体 (Cell Signaling Technology, #4499)、anti-H3K4me1 抗体 (Cell Signaling Technology, #5326)、anti-H3K4me2 抗体 (Cell Signaling Technology, #9725)、anti-H3K4me3 抗体 (Abcam, ab8580)を用いた。

MEF の樹立

オスおよびメス由来の MEF を樹立するために、妊娠 13 日目の C57BL/6 マウスをクレア・ジャパンから購入した。MEF は、文献を参考 (25, 26) に妊娠 14 日目のマウス胎仔から単離し、10% ウシ胎仔血清 (Gibco) および 100 U のペニシリン/ストレプトマイシン (Sigma) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (Nacalai Tesque) で培養した。

ゲノム抽出と MEF の性別判定

ゲノム DNA は、酢酸アンモニウム法で抽出した。調製した MEF を、溶解バッファー [50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 100 mM NaCl, 20 mM EDTA (pH 8.0), 1% ドデシル硫酸ナトリウム, 100 µg プロテイナーゼ K] を用いて、55°C で 2 時間溶解した。その後 RNaseA (Sigma) を加え、37°C のインキュベーターで 1 時間反応させ、7.5 M の酢酸アンモニウムによって除タンパクした。DNA を 100% イソプロピルアルコールで沈殿させ、70% エタノールで洗浄した。真空乾燥後、DNA を TE 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] に溶解した。MEF の性別は、

Sry および *Hprt* のゲノムを検出する PCR で判別した。抽出したゲノム DNA とプライマーを用いて、反応液 [2 mM 10x *Ex-Taq* buffer (with Mg^{2+}), 0.8 mM dNTP Mixture, 0.5 U *TaKaRa Ex-Taq*] で PCR 反応させた。

Sry および *Hprt* のゲノム上のコピー数は、SYBR Green PCR Master Mix と Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa Bio) を用いた real-time PCR で検出した。得られた結果は、性別間で同一コピー数である、*Fabp2* のコピー数で補正した。各遺伝子のプライマー配列を以下に示す。

• *Sry*: 5'-TATGGTGTGGTCCCGTGGT-3'

5'-CCAGCTGCTTGCTGATCTCT-3'

• *Hprt*: 5'-AAAGCCTAAGATGAGCGCAAG-3'

5'-CAGATGGCCACAGGACTAGAA-3'

• *Fabp2*: 5'-TGGACAGGACTGGACCTCTGCTTTCCTAGA-3'

5'-TAGAGCTTTGCCACATCACAGGTCATTCAG-3'

RNA シークエンス

ISOGEN II 試薬 (ニッポンジーン) を使用して、MEF からトータル RNA を抽出した。以前に報告した論文の条件で、RNA-Seq 解析を行った (27)。CLC Genomics Workbench バージョン 10.1.1 (QIAGEN) を用いて、マウスゲノム (mm10) にリードをマッピングし定量化した。遺伝子発現パターンの比較は、CLC Genomic Workbench を用いて、主成分分析 (PCA) とヒートマップで示した。オスおよびメス間での転写物の発現パターンを推定するために、CLC Genomic Workbench を用いて、得られた全リードを、各遺伝子 1000 塩基あたりのリード

数 (reads per kilobase per million: RPKM) で補正した。発現変動遺伝子 (differentially expressed genes: DEGs) は、fold-change ≥ 2 or ≤ -2 かつ false discovery rate (FDR, $p < 0.05$) を満たすものを選出した。遺伝子オントロジー解析は、オンラインの ToppGene (<http://toppgene.cchmc.org>) を用いて行った。また、ヒストン修飾の Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) 解析を、Enrichr (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>) で行った。

定量的リアルタイム PCR

製造元のプロトコールに従い、ISOGEN II (Nippon Gene) を用いてトータル RNA を抽出し、ReverTraAce (Toyobo) を用いてトータル RNA から cDNA を合成した。標的遺伝子の発現レベルを、SYBR Green PCR Master Mix および Thermal Cycler Dice リアルタイムシステム (TaKaRa Bio Inc.) を用いて定量した。定量解析は $\Delta\Delta C_t$ 法で行い、サンプル間における mRNA の発現量の補正は、ハウスキーピング遺伝子 *Gapdh* の発現量で補正した。プライマー配列は、Table 1 に示す。

KDM5D ノックダウン

KDM5D ノックダウン用の siRNA と、コントロールノックダウン用の siLuc は、Santa Cruz Biotechnology (SmcY siRNA (m), sc-153625) から購入した。MEF へ 20 $\mu\text{mol/L}$ の siRNA を、Neon transfection system (Invitrogen) を用いてエレクトロポレーションで導入した。

ウエスタンブロッティング

MEF を PBS で洗浄し、バッファー [20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% デオキシコール酸ナトリウム, 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム, 1x ホスファターゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque), 1x プロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque)] で溶解した。Bioruptor UCD-250 (Cosmobio) で超音波処理した後、氷上で 30 分静置することで、タンパク質を抽出した。14,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心した後、Bio-Rad protein assay dye reagent concentrate (Bio-Rad) を用いたブラッドフォードアッセイでタンパク濃度を測定した。濃度を調製したタンパク抽出物を、100 mM DTT を含む Laemmli サンプルバッファーと混合し、99°C で 5 分間変性させた。

サンプルを 15% の SDS-PAGE で分離し、Immobilon-P メンブレン (Millipore) に転写した。メンブレンは、Bullet Blocking One for WB (Nacalai Tesque) を用いて、室温で 5 分間ブロッキングした。その後、一次抗体を加え、4°C で一晩抗原抗体反応させた。次に、室温で 45 分間 HRP が結合した二次抗体で反応させ、Luminata Forte Western HRP substrate (Millipore) と、SuperSignal West Femto maximum sensitivity substrate (Thermo Fisher Scientific) で HRP を化学発光させ、X 線フィルム (Fujifilm) で検出した。

統計処理

実験により得られたデータの統計分析は、Prism7 (GraphPad Software) または Microsoft Excel 2016 for Mac (Microsoft) を用いて行い、スチューデント t 検定により有意差検定を行い、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ を有意とみなした。

<結果>

MEF の性別の決定

オスおよびメス由来の MEF における遺伝子発現を比較するために、妊娠 14 日目の C57BL/6 マウスから MEF を樹立した (Fig. 1A)。MEF の性別は、Y 染色体に存在する *Sry* 遺伝子と X 染色体に存在する *Hprt* 遺伝子を判別材料として、ゲノムを鋳型にした PCR により確認し (28)、*Sry* ポジティブな細胞 (オス) とネガティブな細胞 (メス) で、2 つのグループに分けた (Fig. 1B)。哺乳類において、オスは Y 染色体と X 染色体を 1 つずつ持つのに対して、メスは 2 つの X 染色体を持つ。そこで、PCR で分けた 2 つのグループについて、*Sry* と *Hprt* のゲノム上のコピー数を、リアルタイム PCR で検討した。その結果、*Sry* はオスでのみ検出され (Fig. 1C)、*Hprt* はオスと比較してメスで約 2 倍になっていた (Fig. 1D)。

オスおよびメス由来 MEF のトランスクリプトーム解析

次世代シーケンサーを用いて、3 回継代したオスおよびメス由来 MEF のトランスクリプトームを解析した (Fig. 2A)。得られた MEF の RNA-Seq データを全て用いて主成分分析すると、オスとメスでクラスタリングはされなかった (Fig. 2B, 2C)。次に、CLC Genomic Workbench を用いて、性別間で発現が変動した遺伝子を同定した (fold change ≥ 2 or ≤ -2 with a false discovery rate (FDR) $p < 0.05$)。その結果、メスと比較して、X 染色体および Y 染色体の遺伝子を含む、34 遺伝子 (増加: 27, 減少: 7) の発現が、オスで変化していた (Fig. 2D)。興味深いことに、34 遺伝子中の 28 遺伝子 (増加: 23, 減少: 5) は、常染色体遺伝子であり、性別によって発現が異なることが示唆された。

発現変動遺伝子のエンリッチメント解析

オスにおいて増加した 27 個の遺伝子について、ToppGene (29) で遺伝子オンロジー解析を行い、Molecular function、Biological process、Reactome pathway について、上位 10 項目を示した (Fig. 2E)。各項目には、ヒストンの脱メチル化が主に挙げられており、その中には、オス特異的に発現するヒストン脱メチル化酵素である、*Kdm5d* や *Uty* が含まれていた。これらのことから、オスにおけるヒストンの脱メチル化が、性特異的な遺伝子発現制御に関連する可能性が示唆された。

オス由来 MEF における KDM5D による H3K4 の脱メチル化

オス由来の MEF において、ヒストン修飾と発現変動遺伝子の関係を調べるために、ENCODE 解析のデータベースと照合した (30)。その結果、34 個の内 15 個の発現変動遺伝子でヒストン H3 の 4 番目のリジンのトリメチル化 (H3K4me3) およびモノメチル化 (H3K4me1) によって発現が制御され得ることが示唆された (Fig. 3A)。次に、オスおよびメス由来 MEF の H3K4 メチル化レベルを比較するため、anti-H3K4me1 抗体、anti-H3K4me2 抗体と anti-H3K4me3 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。その結果、メスと比較してオスでは H3K4me1 と H3K4me3 が低いことが明らかになった (Fig. 3B)。

これまでに、KDM5D は哺乳類において Y 染色体上に存在し、H3K4me3 と H3K4me2 の脱メチル化を介して遺伝子発現を負に制御することが報告されている (17, 18)。そこで、KDM5D を阻害した際の H3K4 のメチル化や、遺伝子発現の変化を調べるため、KDM5D の siRNA を MEF へトランスフェクションし、48

時間培養した。まず、siRNA による KDM5D 発現の抑制を、定量的リアルタイム PCR により確認し、*Kdm5d* の発現量がコントロールと比較して、半分以下になったことを確認した (Fig. 3C)。そこで、KDM5D の発現低下による H3K4 のメチル化状態を評価した。その結果、興味深いことに KDM5D のノックダウンにより、H3K4me1 と H3K4me3 のメチル化は上昇したが、H3K4me2 のメチル化に変化は認められなかった (Fig. 3D)。これらのデータは、KDM5D がオスの MEF において、H3K4me1 および H3K4me3 の脱メチル化に関与していることを示唆した。

KDM5D による遺伝子発現調節

KDM5D による H3K4me1 および H3K4me3 の脱メチル化が、性別間における発現変動遺伝子の発現に与える影響を調べるため、KDM5D ノックダウンによる遺伝子発現の変化を検討した。その結果、H3K4me3 によって制御される *Lhx2*、*Gjb3*、*Dleu7* の発現は、KDM5D ノックダウンによって低下した (Fig. 4A)。一方で、Y 染色体の遺伝子である *Eif2s3y* の発現は、KDM5D ノックダウンにより上昇した。H3K4me1 により制御される *Sod3* と *Angptl7* も、KDM5D ノックダウンによって発現が低下した (Fig. 4B)。また、H3K4me3 と H3K4me1 の両方にされる *Wnt10a* と *Themis2* も同様に低下した (Fig. 4C)。これらの結果から、オス由来の MEF において、KDM5D が H3K4me1 と H3K4me3 の脱メチル化を介して、遺伝子発現を調節することが示唆された。

<考察>

男性と女性は、大部分のゲノム配列を共通して有するにも関わらず、代謝、老化、寿命や様々な病気などに対して異なる応答を示す (31)。脳、心臓および肝臓のトランスクリプトーム解析により、2つの性の間では、常染色体の多数の遺伝子が異なる発現パターンを示すことが報告されている (32-34)。

マウスから調製した MEF においても、由来する胎仔の性別により、異なる遺伝子発現を示すことが予想されるが、今までに MEF を用いた網羅的遺伝子発現解析の報告は無い。本研究では、RNA-Seq により、メスおよびオス由来の MEF のトランスクリプトームを比較し、性別間で発現が変動した 34 個の遺伝子を同定した (Fig. 2D)。さらに、遺伝子オントロジー解析やパスウェイ検索により、発現変動遺伝子とヒストンの脱メチル化の関連を見出した。

H3K4me3 は、活性化された遺伝子のエンハンサーや転写開始点付近に多くみられることが報告されている (12)。さらに、性別によって H3K4me3 レベルに差がみられることが報告されており、特に脳での性別特異的な遺伝子発現に H3K4 のメチル化や脱メチル化が関連することが示唆されている (35, 36)。オスおよびメス由来 MEF で発現が変動した 15 個の遺伝子は、ENCODE 解析のデータベースを参照することで、H3K4me1、H3K4me3、H3K27ac により発現が制御され得ることが明らかになり (Fig. 3A)、さらに、ウェスタンブロッティングによって、MEF の H3K4 のメチル化状態を比較すると、メスに比べ、オスでは H3K4me1 と H3K4me3 が低いことが判明した (Fig. 3B)。オス特異的に発現する KDM5D は、H3K4me2 と H3K4me3 の脱メチル化酵素として知られているが、本研究でオスの MEF で KDM5D をノックダウンすると、H3K4me3 だけでなく、

H3K4me1 も上昇した。これらのことから、オス由来の MEF において、KDM5D は H3K4me1 の脱メチル化活性も有する可能性が示唆された。

これまでに、H3K4me1、H3K4me2 と H3K4me3 の 3 つのメチル化が性別特異的な遺伝子発現を調節することは考えられてきた (35) が、H3K4me1 についてはほとんど議論されてこなかった。本研究では、H3K4me1 もしくは H3K4me3 に制御され得る遺伝子の発現が、KDM5D のノックダウンにより変化することを見出した (Fig. 4)。H3K4 の 3 種類のメチル化は、転写を活性化させ、脱メチル化は抑制に働くことが知られている (10)。しかし、KDM5D ノックダウンでは、H3K4me1 と H3K4me3 が上昇したにも関わらず、*Lhx2*、*Gjb3*、*Dleu7*、*Sod3*、*Wnt10a*、*Themis2* と *Angptl7* の発現は低下した。一方で、ES 細胞、マクロファージ、MEF において、H3K4me1 が転写の抑制にも働くことも報告されているが、それらの脱メチル化酵素や機能については未解明である (37)。

以上、本研究から、ヒストンの修飾に KDM5D の潜在的な重要性を示すだけでなく、MEF を用いた遺伝学や生物学的研究に、オスおよびメス由来 MEF のトランスクリプトームの情報を提供することが可能になった。

第 3 章の結果は、下記の公表論文の内容に基づく。

Mizukami, H., Kim, J. D., Tabara, S., Lu, W., Kwon, C., Nakashima, M. and Fukamizu, A. (2019) KDM5D-mediated H3K4 demethylation is required for sexually dimorphic gene expression in mouse embryonic fibroblasts. *J. Biochem.* doi: 10.1093/jb/mvy106.

<参考文献>

1. Clamp, M., Fry, B., Kamal, M., Xie, X. H., Cuff, J., Lin, M. F., Kellis, M., Lindblad-Toh, K., and Lander, E. S. (2007) Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 19428-19433
2. Ober, C., Loisel, D. A., and Gilad, Y. (2008) Sex-specific genetic architecture of human disease. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 911-922
3. Burggren, W. W. (2014) Epigenetics as a source of variation in comparative animal physiology - or - Lamarck is lookin' pretty good these days. *J. Exp. Biol.* **217**, 682-689
4. Yang, X., Schadt, E. E., Wang, S., Wang, H., Arnold, A. P., Ingram-Drake, L., Drake, T. A., and Lusis, A. J. (2006) Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice. *Genome Res.* **16**, 995-1004
5. Reed, L. K., Lee, K., Zhang, Z., Rashid, L., Poe, A., Hsieh, B., Deighton, N., Glassbrook, N., Bodmer, R., and Gibson, G. (2014) Systems Genomics of Metabolic Phenotypes in Wild-Type *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **197**, 781-793
6. Koopman, P., Sinclair, A., and Lovell-Badge, R. (2016) Of sex and determination: marking 25 years of Randy, the sex-reversed mouse. *Development* **143**, 1633-1637

7. Larney, C., Bailey, T. L., and Koopman, P. (2014) Switching on sex: transcriptional regulation of the testis-determining gene Sry. *Development* **141**, 2195-2205
8. Martin, C., and Zhang, Y. (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.* **6**, 838-849
9. Lanouette, S., Mongeon, V., Figeys, D., and Couture, J. F. (2014) The functional diversity of protein lysine methylation. *Mol. Syst. Biol.* **10**, 724
10. Bernstein, B. E., Meissner, A., and Lander, E. S. (2007) The mammalian epigenome. *Cell* **128**, 669-681
11. Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K. R., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z. B., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. J. (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**, 823-837
12. Hyun, K., Jeon, J., Park, K., and Kim, J. (2017) Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Exp. Mol. Med.* **49**, e324
13. Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A., and Shi, Y. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**, 941-953
14. Culhane, J. C., and Cole, P. A. (2007) LSD1 and the chemistry of histone demethylation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 561-568

15. Greer, E. L., and Shi, Y. (2012) Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 343-357
16. Liu, X. Y., and Secombe, J. (2015) The Histone Demethylase KDM5 Activates Gene Expression by Recognizing Chromatin Context through Its PHD Reader Motif. *Cell Rep.* **13**, 2219-2231
17. Blair, L. P., Cao, J., Zou, M. R., Sayegh, J., and Yan, Q. (2011) Epigenetic Regulation by Lysine Demethylase 5 (KDM5) Enzymes in Cancer. *Cancers (Basel)* **3**, 1383-1404
18. Li, N., Dhar, S. S., Chen, T. Y., Kan, P. Y., Wei, Y., Kim, J. H., Chan, C. H., Lin, H. K., Hung, M. C., and Lee, M. G. (2016) JARID1D Is a Suppressor and Prognostic Marker of Prostate Cancer Invasion and Metastasis. *Cancer Res.* **76**, 831-843
19. Komura, K., Yoshikawa, Y., Shimamura, T., Chakraborty, G., Gerke, T. A., Hinohara, K., Chadalavada, K., Jeong, S. H., Armenia, J., Du, S. Y., Mazzu, Y. Z., Taniguchi, K., Ibuki, N., Meyer, C. A., Nanjangud, G. J., Inamoto, T., Lee, G. S. M., Mucci, L. A., Azuma, H., Sweeney, C. J., and Kantoff, P. W. (2018) ATR inhibition controls aggressive prostate tumors deficient in Y-linked histone demethylase KDM5D. *J. Clin. Invest.* **128**, 2979-2995
20. Jangravi, Z., Tabar, M. S., Mirzaei, M., Parsamatin, P., Vakilian, H., Alikhani, M., Shabani, M., Haynes, P. A., Goodchild, A. K., Gourabi, H., Baharvand, H., and Salekdeh, G. H. (2015) Two Splice Variants of Y Chromosome-Located Lysine-Specific Demethylase 5D Have Distinct Function in Prostate Cancer Cell Line (DU-145). *J. Proteome Res.* **14**, 3492-3502

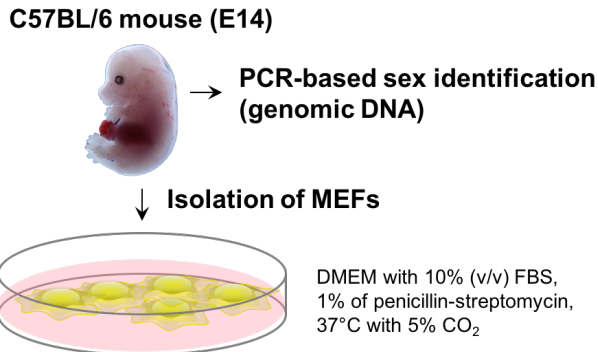
21. Choukallah, M. A., Song, S., Rolink, A. G., Burger, L., and Matthias, P. (2015) Enhancer repertoires are reshaped independently of early priming and heterochromatin dynamics during B cell differentiation. *Nat. Commun.* **6**, 8324
22. Dorighi, K. M., Swigut, T., Henriques, T., Bhanu, N. V., Scruggs, B. S., Nady, N., Still, C. D., Garcia, B. A., Adelman, K., and Wysocka, J. (2017) Mll3 and Mll4 Facilitate Enhancer RNA Synthesis and Transcription from Promoters Independently of H3K4 Monomethylation. *Mol. Cell* **66**, 568-576
23. Lengner, C. J., Lepper, C., Van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Stein, G. S., and Lian, J. B. (2004) Primary mouse embryonic fibroblasts: A model of mesenchymal cartilage formation. *J. Cell. Physiol.* **200**, 327-333
24. Eiselleova, L., Peterkova, I., Neradil, J., Slaninova, I., Hampl, A., and Dvorak, P. (2008) Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* **52**, 353-363
25. Qiu, L. Q., Lai, W. S., Stumpo, D. J., and Blackshear, P. J. (2016) Mouse Embryonic Fibroblast Cell Culture and Stimulation. *Bio. Protoc.* **6**, e1859
26. Durkin, M. E., Qian, X., Popescu, N. C., and Lowy, D. R. (2013) Isolation of Mouse Embryo Fibroblasts. *Bio. Protoc.* **3**, e908
27. Ohkuro, M., Kim, J. D., Kuboi, Y., Hayashi, Y., Mizukami, H., Kobayashi-Kuramochi, H., Muramoto, K., Shirato, M., Michikawa-Tanaka, F., Moriya, J., Kozaki, T., Takase, K., Chiba, K., Agarwala, K. L., Kimura, T., Kotake, M., Kawahara, T., Yoneda, N., Hirota, S., Azuma, H., Ozasa-Komura, N., Ohashi, Y., Muratani, M., Kimura, K., Hishinuma, I., and Fukamizu, A.

- (2018) Calreticulin and integrin alpha dissociation induces anti-inflammatory programming in animal models of inflammatory bowel disease. *Nat. Commun.* **9**, 1982
28. Yang, C., McLeod, A. J., Cotton, A. M., de Leeuw, C. N., Laprise, S., Banks, K. G., Simpson, E. M., and Brown, C. J. (2012) Targeting of > 1.5 Mb of Human DNA into the Mouse X Chromosome Reveals Presence of cis-Acting Regulators of Epigenetic Silencing. *Genetics* **192**, 1281-1293
29. Chen, J., Bardes, E. E., Aronow, B. J., and Jegga, A. G. (2009) ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res.* **37**, W305-W311
30. Kuleshov, M. V., Jones, M. R., Rouillard, A. D., Fernandez, N. F., Duan, Q., Wang, Z., Koplev, S., Jenkins, S. L., Jagodnik, K. M., Lachmann, A., McDermott, M. G., Monteiro, C. D., Gundersen, G. W., and Ma'ayan, A. (2016) Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* **44**, W90-W97
31. Austad, S. N., and Fischer, K. E. (2016) Sex Differences in Lifespan. *Cell Metab.* **23**, 1022-1033
32. Berchtold, N. C., Cribbs, D. H., Coleman, P. D., Rogers, J., Head, E., Kim, R., Beach, T., Miller, C., Troncoso, J., Trojanowski, J. Q., Zielke, H. R., and Cotman, C. W. (2008) Gene expression changes in the course of normal brain aging are sexually dimorphic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **105**, 15605-15610

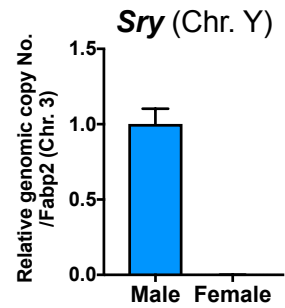
33. Isensee, J., Witt, H., Pregla, R., Hetzer, R., Regitz-Zagrosek, V., and Noppinger, P. R. (2008) Sexually dimorphic gene expression in the heart of mice and men. *J. Mol. Med. (Berl)* **86**, 61-74
34. Hirao, J., Nishimura, M., Arakawa, S., Niino, N., Mori, K., Furukawa, T., Sanbuissho, A., Manabe, S., Nishihara, M., and Mori, Y. (2011) Sex and circadian modulatory effects on rat liver as assessed by transcriptome analyses. *J. Toxicol. Sci.* **36**, 9-22
35. Shen, E. Y., Ahern, T. H., Cheung, I., Straubhaar, J., Dincer, A., Houston, I., de Vries, G. J., Akbarian, S., and Forger, N. G. (2015) Epigenetics and sex differences in the brain: A genome-wide comparison of histone-3 lysine-4 trimethylation (H3K4me3) in male and female mice. *Experimental Neurology* **268**, 21-29
36. Schneider, J. S., Anderson, D. W., Kidd, S. K., Sobolewski, M., and Cory-Slechta, D. A. (2016) Sex-dependent effects of lead and prenatal stress on post-translational histone modifications in frontal cortex and hippocampus in the early postnatal brain. *Neurotoxicology* **54**, 65-71
37. Cheng, J., Blum, R., Bowman, C., Hu, D. Q., Shilatifard, A., Shen, S., and Dynlacht, B. D. (2014) A Role for H3K4 Monomethylation in Gene Repression and Partitioning of Chromatin Readers. *Mol. Cell* **53**, 979-992

Figure 1

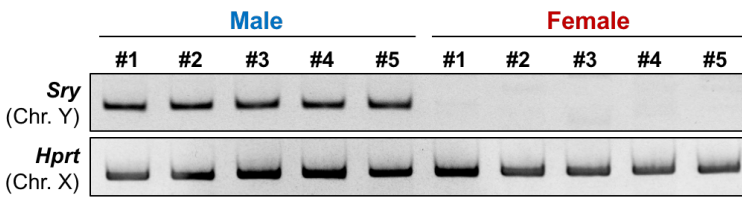
A



C



B



D

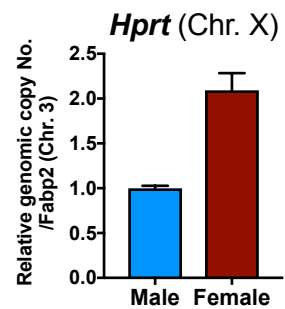


Fig. 1 マウス胎仔由来線維芽細胞 (MEF) の性決定

(A) MEFの単離および性決定の模式図 (B) MEFのゲノムDNAを鋳型にしたPCRによる、Y染色体遺伝子 *Sry* と X染色体遺伝子 *Hprt* の検出。(C) *Sry* および (D) *Hprt* 遺伝子のゲノム上のコピー数。それぞれの発現量は、3番染色体の *Fabp2* 遺伝子で補正した (n=5)。

Figure 2

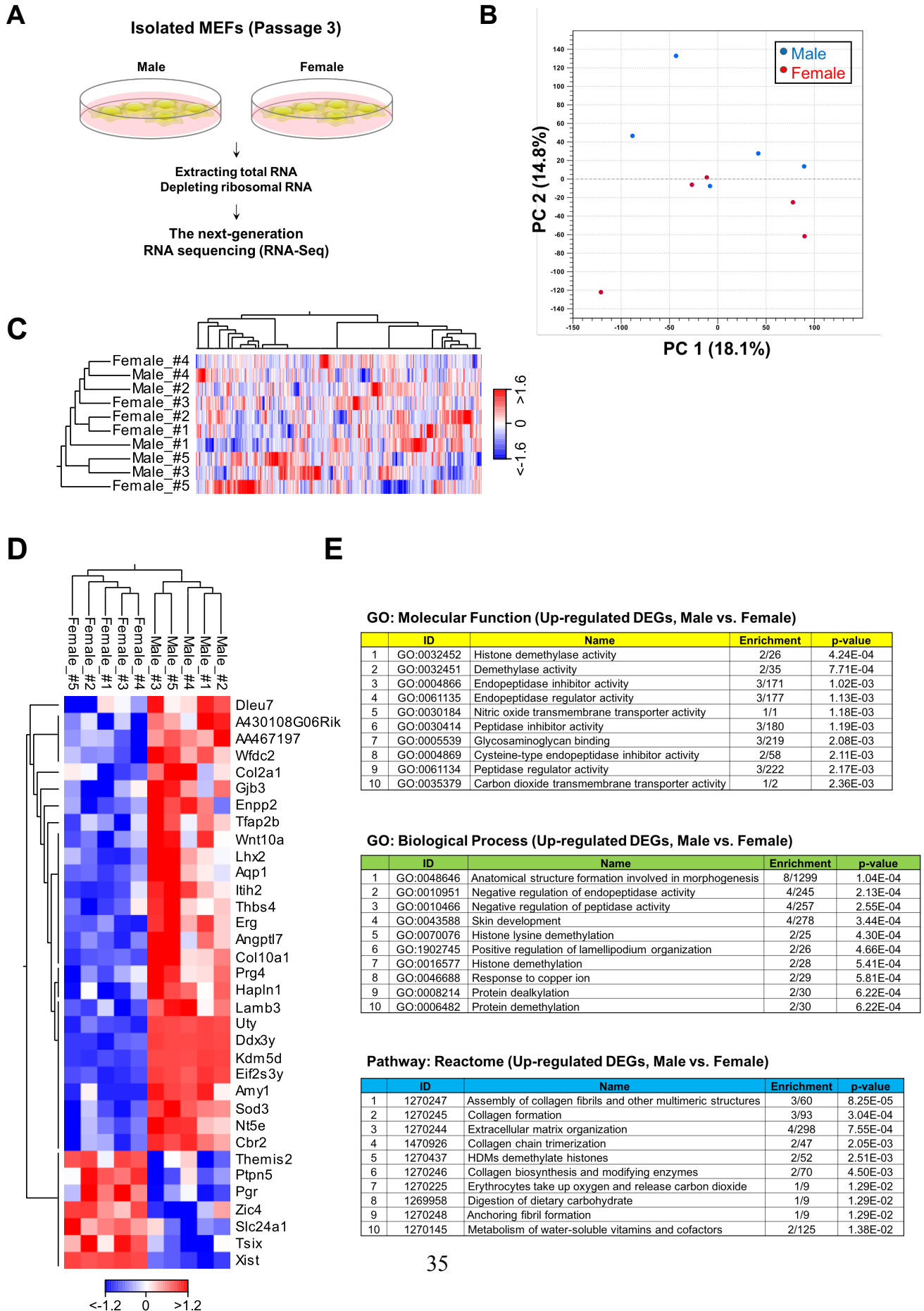


Fig. 2 性別間で異なる発現を示す遺伝子の同定

(A) オスおよびメス由来MEFを用いたRNAシーケンス解析の模式図 (B) 得られたデータをPC1 (X軸, 18.1%)、PC2 (Y軸, 14.8%) で主成分分析した。(C) 全遺伝子と (D) 性別間で変化のみられた遺伝子のクラスター分析をヒートマップに表した。赤は相対的に発現の高い遺伝子を、青は低い遺伝子を表す。(E) メスに対してオスで発現の高い27の遺伝子のエンリッチメント解析。Molecular Function (上段)、Biological Process (中段)、Reactome pathway (下段) の上位10位までを表に示した。

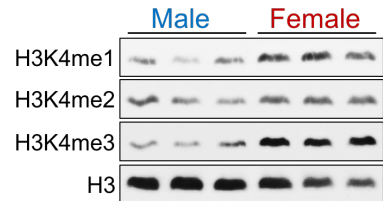
Figure 3

A

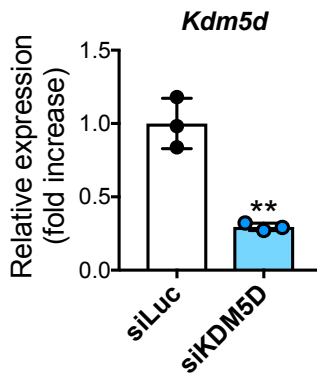
ENCODE Histone Modifications

Name	Species	Cell type	p-value	Genes
H3K4me3	mouse (mm9)	embryonic fibroblast	0.01678	<i>Wnt10a, Itih2, Themis2, Lhx2, Gjb3, AA467197, Eif2s3y, Dleu7</i>
H3K4me1	mouse (mm9)	embryonic fibroblast	0.048	<i>Wnt10a, Angptl7, Themis2, Col10a1, Sod3, Ptpn5, Hapln1</i>
H3K27ac	mouse (mm9)	embryonic fibroblast	0.8673	<i>Itih2, Col10a1</i>

B



C



D

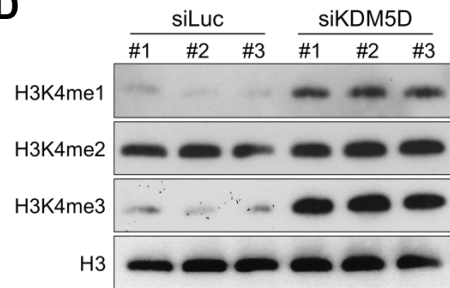
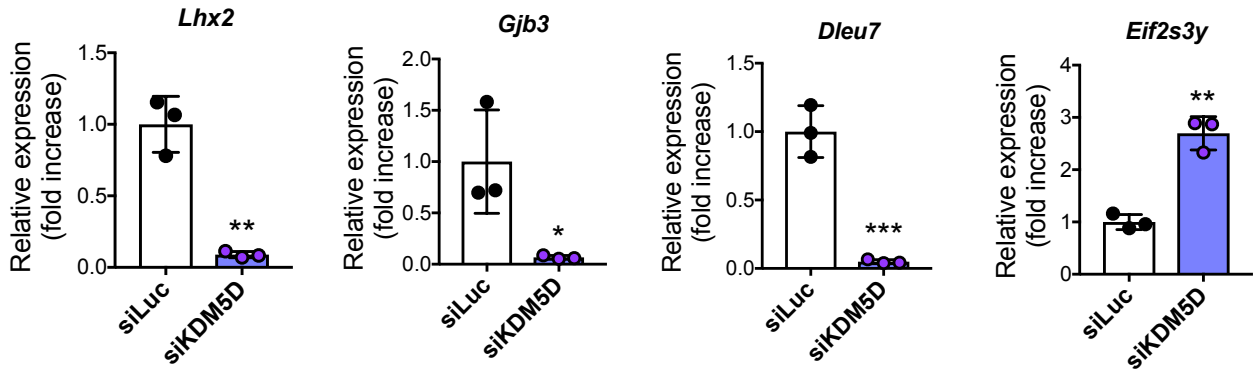


Fig. 3 オス由来MEFのH3K4メチル化に対するKDM5Dノックダウンの効果

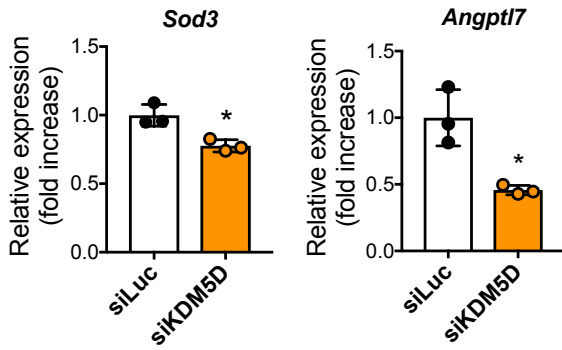
(A) ENCODE 2015データベースにより、発現が変動した遺伝子に関わるヒストン修飾を検索した。(B) オスおよびメス由来MEFにおける、抗H3抗体、抗H3K4me1抗体、抗H3K4me2抗体、抗H3K4me3抗体を用いたウエスタンブロッティング。(C) オス由来MEFにおけるKDM5Dノックダウン。qPCRにより、Kdm5dのmRNAが有意に減少したことを示す。n=3, **p<0.01 (D) ウエスタンブロッティングにより、KDM5DノックダウンによるH3K4メチル化の変化を確認。

Figure 4

A



B



C

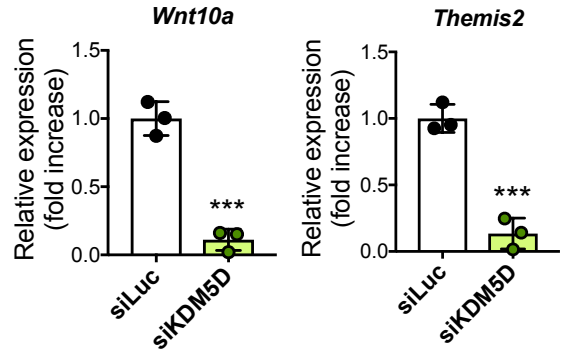


Fig. 4 KDM5Dノックダウンによる遺伝子発現変動

ENCODE解析により同定された遺伝子の発現を、qPCRで解析した。(A) H3K4me3に制御され得る遺伝子: *Lhx2*, *Gjb3*, *Dleu7*, *Eif2s3y* (B) H3K4me1により制御され得る遺伝子: *Sod3*, *Angptl7* (C) H3K4me1とH3K4me3両方に制御され得る遺伝子: *Wnt10a*, *Themis2*, それぞれ n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001。

Table 1. The primer sequences used in qPCR.

Gene	Forward	Reverse
<i>Lhx2</i>	GGCGAATACCCAGCACACTT	GGGAAGACCCAGCGGATTAG
<i>Gjb3</i>	GGGTGCTGGTGTATGTGGTG	GATGTTGGAGATGGGAAGAAG
<i>Dleu7</i>	GCCCTGCCAAGGAAACAGAA	GGCTACAGATGCTCTTGGTC
<i>Eif2s3y</i>	TATGCTGCTCCAGGTGGTCT	GACCTGCCCAACCATTCTATC
<i>Sod3</i>	TAGGACGACGAAGGGAGGTG	AGAACCAAGCCGGTGATCTG
<i>Angptl7</i>	AACTGAACAGCTACCGCCTCTT	GTTGTCGTTGTCCTTGCCTTG
<i>Wnt10a</i>	CCACTCCGACCTGGTCTACTTTG	TGCTGCTCTTATTGCACAGGC
<i>Kdm5d</i>	TTGTGATGGAGGAAGGTGGA	CGTTCGTAGTGGGACCGAAG
<i>Thems2</i>	GGAGGAAGAGGAGGACTTGGA	CCAGAGAGGTAGAGGGGTAGCA
<i>Gapdh</i>	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導頂きました筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 教授 深水 昭吉 先生に厚く御礼申し上げます。また、実際に数多くのご指導を賜りました筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 助教 金 俊達 先生に深く感謝致します。更に、ご自身の研究でお忙しい中、数々の御助言を賜りました筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 講師 石田 純治 先生、加香 孝一郎 先生、大徳 浩照 先生に心より感謝致します。そして、研究の協力のみならず、精神面においても大きな支えとなってくださいました、筑波大学 深水研究室の新生 翔 氏、横山 航 氏、田原 早央莉 氏、陸 偉哲 氏、権 哲源 氏、中島 実咲 氏をはじめとする、ラボメンバーの皆様に深く感謝致します。