



Title	SRY遺伝子に依存しない性決定様式をもつ哺乳類種を用いた、新たな性分化疾患メカニズムの探索〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	平田, 由里絵
Description	配架番号 : 2847
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15913号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92403
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	HIRATA_Yurie_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 平田 由里絵

学 位 論 文 題 名

SRY 遺伝子に依存しない性決定様式をもつ哺乳類種を用いた、新たな性分化疾患メカニズムの探索
(Exploring new mechanisms of disorders of sex development using *Sry*-deficient mammalian species)

【背景と目的】 ヒトを含めた哺乳類における性分化は、Y 染色体上の *SRY* (sex-determining region Y) 遺伝子によって制御されている。胎児期に *SRY* タンパクにより *SOX9* (*SRY*-box transcription factor 9) 遺伝子がアップレギュレートされることにより、未分化性腺は精巣に分化する。Y 染色体のない女性では、未分化性腺は卵巣へと分化する。一方で、哺乳類においても、Y 染色体と *SRY* 遺伝子に依存しない性決定様式をもつ数少ない特異的な種が存在する。アマミトゲネズミ (*Tokudaia osimensis*, 2n=25, XO/XO, 以下アマミ) は日本の南西諸島に生息する齧歯類に分類されるトゲネズミ属の一種である。アマミの性染色体は XO/XO 型で、Y 染色体と *SRY* 遺伝子は存在しない。

SRY による *SOX9/Sox9* の制御については、マウス、ヒトにおいてこれまで集中的に研究されており、セルトリ細胞の発現に関連するエンハンサーとして最初に同定された *testis-specific enhancer* (TES) 以外にも、近年いくつかの *Sox9* エンハンサー候補が同定されている。*Enh13* はヒトやマウス以外の哺乳類種でも広く保存されており、ヒトにおいてはこの領域を欠失すると 46, XY DSD (disorders of sex development) を引き起こすという報告がある。

Sry を持たないアマミにおいても、*Sox9* は精巣で高発現しており、性分化における *Sox9* の下流の制御機構は保存されている。今回私はアマミにおける *Sox9* エンハンサーに着目し、*in vitro* 実験系においてエンハンサー活性を測定したので報告する。

【材料と方法】 アマミの genome deoxyribonucleic acid (gDNA) より、既報のマウスの *Enh8*、*Enh13* 配列 (以降 *mEnh8*, *mEnh13*) を参考に、*Enh13* と *Enh8* をクローニングし、DNA シークエンシングを行い、配列決定を行った。アマミの *Enh13* については、以前に先行研究において作成されたアマミの bacterial artificial chromosome (BAC) ライブラリーから *Enh13* 配列を含む BAC クローンを選別した。同定した BAC クローンをプローブとして、fluorescence in situ hybridization (FISH) mapping を行い、アマミの染色体標本上にマッピングを行った。

次に、アマミの *Enh8*、13、14 (以降それぞれ、*tosEnh8*, *tosEnh13*, *tosEnh14*) のエンハンサー活性を確認するために、ルシフェラーゼアッセイを行った。プロモーターとして、human beta-globin minimal protein (HBG) promoter を使用した。HBG promoter が挿入された、pGL3 Luciferase Reporter Vector に 5' 末端と 3' 末端にそれぞれ制限酵素 *Kpn I*, *Mlu I* 配列付加したエンハンサー配列をクローニングしてレポーターベクターを作成した。マウスとアマミ *Enh13* の配列を部分的に置換するために、両配列に共通して存在する制限酵素配列 *Bstx*, *Sty I* を用いた。また *tosEnh13* の後半の配列をマウスの配列と置換するために、*tosEnh13* 塩基配列を十数塩基ずつ分割し、オーバーラップエクステンション PCR (Polymerase Chain Reaction) 法を用いてマウスと異なる塩基をそれぞれマウスの塩基に置換した。

発現ベクターとしてのプラスミドは pcDNA3.1 (+) vector を用いた。マウス *SOX9*、アマミ *SOX9*、マウス *SRY*、オキナワ *SRY*、および Nr5A1 (nuclear receptor family 5 group A member 1) のオープンリーディングフレームを pcDNA の *Hind III* と *BamHI* 認識部位にクローニングしたベクターを使用した。レポータージェンアッセイは 24 well プレートで 1 well あたり 1.5×10^5 個になるようカウントし、24 時間培養した COS7 細胞を用いて行った。プラスミドのトランスフェクションには Lipofectamine 3000 を用いて、エンハンサーレポータープラスミド、発現ベクター、コントロールベクター (pRL) をそれぞれ、1 well あたり 200 ng, 130 ng, 40 ng になるように調整して行った。トランスフェクションから 48 時間後、dual-

luciferase reporter assay system (Promega) を用いて、レポーター活性を測定した。レポーター活性は、内部コントロールとしてウミシタケルシフェラーゼ活性を測定し、内部補正を行った。各アッセイは3回行い、データは平均値±SD で示した。

【結果】 同定された Sox9 エンハンサー配列は、tosEnh8 は 677 bp、tosEnh13 は 635 bp の配列であった。Enh8 および Enh13 の塩基配列は既知のマウスの配列とそれぞれ、87%、90%の相同性を示した。mEnh13 内の SRY と SOX9 の binding site は以前に報告されているが、これらはアマミでも保存されていた。マウスで予測された NR5A1 の binding site はアマミでも一致した。

アマミ Sox9 エンハンサー活性を in vitro 実験系で解析した。mEnh8 は、SOX9 単体、または NR5A1 と共導入することにより活性が上昇した。mEnh14 でも mSOX9 単体、または NR5A1 と共導入した際に活性が上昇した。一方 tosEnh8 と tosEnh14 は有意なエンハンサー活性を示さなかった。

tosEnh13 は、mEnh13 と同様に、SOX9 単体および NR5A1 と共導入した場合にエンハンサー活性を示した。mEnh13 は NR5A1 と SRY で活性化したが、tosEnh13 には、SRY と NR5A1 の binding site が保存されているにもかかわらず、SRY に反応せず、活性の上昇は見られなかった。このことから、マウスとアマミで異なる 10%の配列の中に、NR5A1 と mSRY の結合に影響を与える配列が存在するのではないかと仮定した。この配列の特定のために、tosEnh13 の配列を、部分的にマウスの配列に置き換えたレポーターベクターを用いて、レポータージーンアッセイを行った。tosEnh13 の後半の配列をマウスの配列に置換すると、SRY と NR5A1 に対する活性が増加した。さらなる解析の結果、この部分内の複数の領域が NR5A1 と SRY に対する反応に寄与していることが判明した。さらに、特に後半の 49 bp が重要であると考えられた。この部位で、mEnh13 のみに存在し、tosEnh13 には存在しない binding site 候補を持つ転写因子を検索したところ、3つの転写因子、POU2F1、HOXA3、GATA1 がスクリーニングされた。

【考察】 本研究では、Sry を持たない哺乳類であるアマミの Sox9 エンハンサーに着目して、in vitro でエンハンサー活性の評価を行った。mEnh8 は以前に雌特異的胚性腺エンハンサーとしての報告があるが、本研究の解析では、NR5A1 と SOX9 によって活性化された。一方、tosEnh8 ではエンハンサー活性の上昇は観察されず、NR5A1 や SOX9 によって刺激されるエンハンサー活性が、tosEnh8 の責任配列の変異によって失われていることが示唆された。また、mEnh14 も SOX9 と NR5A1 によって活性化された。これは Enh14 が Sox9 に対して、初期の精巣決定以外の時期や、予備的に機能するという先行研究の仮説を支持するものである。一方、tosEnh14 では活性の上昇は観察されなかった。近年、アマミでは Enh14 を含む配列の雄特異的な重複が Sox9 制御に関与していることが明らかになっており、今後、アマミの性決定の分子機構を解明するためには、未知の転写因子の同定が必要である。Enh13 は哺乳動物種で高度に保存されており、SRY を介した性決定様式において重要なエンハンサーであると考えられている。tosEnh13 では SRY binding site 配列は保存されているにもかかわらず、SRY に対する活性を示さなかった。これに基づき、マウスとアマミの Enh13 配列を比較し、SRY 応答に関連するコア領域の同定を試みた。その結果、mEnh13 配列の一部だけでなく、mEnh13 配列の後半にある複数の領域が、NR5A1 および SRY に対する活性の上昇に必要であることが示唆された。これらのうち、後半の 49 bp が特に重要であることが示され、3つの転写因子、POU2F1、HOXA3、および GATA1 が、mEnh13 にのみ存在することがスクリーニングされた。今後、性決定時の生殖腺におけるこれらの転写因子の発現パターンや、Enh13 との結合についてのさらなる研究が望まれる。

【結論】 Sox9 エンハンサーが、SRY を持たないアマミにおいてもマウスと同様に保存され、活性を持つことを示した。トゲネズミ属は非常にユニークな性決定様式を持つ哺乳類種である。トゲネズミ属は非モデル動物であり、実験方法には制約があるが、ヒトやマウスとの比較研究を行うことにより、哺乳類の性決定時の分子メカニズムのさらなる解明が期待される。