



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the Sox9 gene regulation through the testis-specific enhancer in the Amami spiny rat (<i>Tokudaia osimensis</i>), an XO/XO mammal
Author(s)	光川, 祥一郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第16603号
Issue Date	2025-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16603
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98213
Type	doctoral thesis
File Information	Shoichiro_Mitsukawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称: 博士(生命科学) 氏 名 光川 祥一朗

学 位 論 文 題 名

Studies on the *Sox9* gene regulation through the testis-specific enhancer in the Amami spiny rat (*Tokudaia osimensis*), an X0/X0 mammal
(アマミトゲネズミにおける精巣特異的エンハンサーを介した *Sox9* 遺伝子制御の研究)

ほぼすべての有胎盤哺乳類の性は、Y 染色体上の *SRY/Sry* (sex-determining region Y) 遺伝子によって決定される。性染色体構成が XY 型である場合、転写因子として *SRY* が NR5A1 と共役して常染色体上の *SOX9/Sox9* (SR Y-box transcription factor 9) 遺伝子の発現上昇を誘導し、未分化生殖腺が精巣に分化することでその個体はオスとなる。このような *SRY-SOX9* 経路は、有胎盤哺乳類において広く保存されている。一方で、奄美大島の固有種であるアマミトゲネズミ (*Tokudaia osimensis*) は、染色体構成が 2n=25, X0/X0 であり、Y 染色体および *Sry* を欠失している稀有な例として知られている。本種は *Sry* による制御は失っているものの、*Sox9* の発現やそれに伴う下流の遺伝子群の発現制御は保存されていることから、*Sry* に依存しない性決定メカニズムをもつと考えられているが、詳細な分子機構は解明されていない。先行研究において、アマミトゲネズミゲノムにおける性差として、*Sox9* の約 440 kb 上流の領域に 17 kb を 1 ユニットとする重複をオスのみがヘテロでもっていることが明らかになった。また、この重複領域中に *tosEnh14* と呼ばれる配列が含まれていることが報告されている。*tosEnh14* と相同なマウスの *mEnh14* は、性決定時期直後の 13.5 日胚のセルトリ細胞においてオープンクロマチン領域に位置することが示唆されている。また、トランスジェニックマウスとノックインマウスを用いた先行研究では、本種の *tosEnh14* はマウスにおいて精巣特異的なエンハンサー活性を持ち、*Sox9* の発現量を有意に上昇させることが報告されている。すなわち、アマミトゲネズミでは *Sox9* の精巣特異的エンハンサーの重複の有無によって、*Sry* なしに *Sox9* の発現を制御することが示唆された。一方で、既存の転写因子である NR5A1 単独では *tosEnh14* の活性は上昇しないことから、*tosEnh14* を制御する未知の転写因子の存在が予想される。そこで本研究では、*tosEnh14* を介して *Sox9* の転写を制御する因子の同定を目的とした。

1. 成体精巣における *tosEnh14* 制御因子の探索

SOX9/Sox9 は胎児期の精巣分化において不可欠な因子としてよく知られている。一方で、*SOX9/Sox9* は成体の精巣でもセルトリ細胞において発現して精子形成に関与しているが、その詳細な機能はあまり知られていない。そこで、成体精巣における *tosEnh14* 制御因子の探索を行なった。アマミトゲネズミは国の天然記念物に指定されており、直接研究サンプルとして用いることができないこと、また先行研究の *tosEnh14* ノックインマウスにおいて *Sox9* の発現が上昇したことから、成獣マウスの精巣を用いて *tosEnh14* に特異的に結合しうる因子を質量分析にて解析した。その結果、275 個の遺伝子由来のペプチドを同定した。ジーンオンロジー解析を行い、DNA 結合能を持つタンパク質や転写に関わるタンパク質に着目した。さらに RNA-seq 解析により、精巣の *Sox9* 陽性細胞における発現を確認し、候補遺伝子の絞り込みを行なった。絞り込んだ候補遺伝子のリコンビナントタンパク質を作製し、DNA-タンパク質相互作用を確認した結果、RCOR3 (REST corepressor 3) が *tosEnh14* と特異的に結合することが示された。続いて、COS-7 細胞において RCOR3 を強制発現させて *tosEnh14* の活性を測定した結果、シングルコピーの *tosEnh14* は減少したのに対し、2 コピーの *tosEnh14* では有意にエンハンサー活性が上昇した。一方で内在性 RCOR3 をノックダウンした COS-7 細胞においては、RCOR3 を強制発現させても *tosEnh14* の有意なエンハ

ンサー活性の上昇は認められなかったことから、RCOR3 単独では tosEnh14 を直接制御できないことが予想された。

2. 胎児生殖腺における tosEnh14 制御因子の探索

性決定時期直後のマウスの胎児生殖腺からタンパク質を用いて、tosEnh14 を制御する因子の探索を行なった。質量分析の結果、174 個の遺伝子由来のペプチドを同定した。成体精巢を用いた解析と同様に、GO 解析および RNA-seq 解析を行い、*Sox9* の転写を制御しうる候補遺伝子を絞り込んだ。次に、胎児生殖腺における候補遺伝子の発現解析を行った結果、7 個の遺伝子が雌雄の性決定時期直後の生殖腺で発現しており、そのうち 5 個の遺伝子は *Sox9* 同様に精細管様に発現していることが明らかになった。この結果は、5 個の候補遺伝子が胎児期の生殖腺において tosEnh14 を介して *Sox9* の転写を制御している可能性を示唆するものであり、今後性決定時期における転写因子としての活性について解析されることが望まれる。

本研究では、発生時期の異なる精巢を用いて tosEnh14 を制御する因子を探索し、それぞれ違う因子を同定した。この結果は、tosEnh14 に異なる転写因子が結合することで *Sox9* を制御し、精巢における異なる機能をもたらしている可能性を示唆する。また、Y 染色体消失のモデル動物ともいえるアマミトゲネズミにおいて、本種特異的な遺伝子ではなくマウスでも保存された遺伝子が新たに性決定遺伝子としての機能を獲得したという可能性を実証した初めての知見である。