

論文の内容の要旨

獣医学専攻
平成 11 年度博士課程入学
氏名 横内 耕
指導教官 東條英昭

論文題目

マウス *Sry* の時期特異的転写制御領域に関する研究

精巣の分化を誘導し哺乳類の性を決定する因子は 1990 年に同定され、SRY(sex determining region Y)と命名された。SRY は Y 染色体の短腕上に位置する転写因子で、胎子の性分化期に一過性に発現する。また、SRY を導入した雌のトランスジェニックマウスが精巣を形成したことから、SRY 単独で精巣の分化を誘導することができ、また SRY の転写制御機構は雌にも存在しているといえる。現在、SRY の機能としては未分化生殖腺において発現してセルトリ細胞を分化させ、さらに中腎組織からの細胞移動を誘導して精細管構造をつくらせることで精巣の形成を誘導していると考えられている。SRY が DNA 結合ドメイン(HMG box)を有する転写因子であったことから、精巣分化に至る性決定のカスケードが予測され、多くの関連遺伝子が挙げられてきた。特に Sox9 は雄で特異的に高発現し、同じく精巣の分化を誘導することから SRY の制御下にあることが確実視されている。しかしながら、SRY の上流に存在し、SRY の発現を制御する遺伝子については明確ではない。主にノックアウトマウスを用いた解析から、WT1 あるいは SF1 が候補因子として挙げられているが、発現パターンなどの解析から、これら以外の因子の関与が予測される。さらにマウス *Sry* については、異なる転写開始点から linear form と circular form の 2 種類の転写産物がつくられ、circular form は主に成体の精巣生殖細胞において発現しているが、その転写制御機構についても不明である。

そこで本研究ではマウス Sry の時期特異的な転写制御機構を解明する目的で、そのゲノム上 5'上流域に着目し、転写制御領域の検出を試みた。

第一章 胎子生殖腺由来の核抽出物を用いた Sry 5'上流域の解析

はじめに、マウス Sry の 5'上流域において、Sry の発現時期特異的に因子の結合する領域を検出する目的で、ゲルシフトアッセイを行った。マウス Sry の発現は胎齢 10.5 日より開始し、11.5 日に最大となり、12.5 日には消失する。そこで胎齢 11.5 日から 13.5 日の胎子生殖腺よりそれぞれ核抽出物を調製し、Sry の 5'上流域を断片化したプローブに対して、それぞれゲルシフトアッセイを行うことで、胎齢による核蛋白質の結合の変化について調べた。その結果、5491 から 5798 の領域(-2541~-2234)にあたる A 断片に胎齢 11.5 日特異的に核蛋白質の結合を検出した。この結合は 12.5 日以降には消失することから、Sry の転写を正に制御している可能性が示唆された。さらに、A 断片における結合配列を同定する目的で、A 断片のさらなる細断片化とフットプリント法を行った。A 断片の制限酵素処理と exonuclease 処理によって得られた A-4 断片について調べた結果、5559 から 5616 にあたる配列(-2464~-2416)に胎齢 11.5 日特異的なフットプリントが検出された。この領域には SF1 や WT1 などの性分化に関わる転写因子の認識配列が含まれていないことから、結合した核蛋白質は未知の因子である可能性が考えられる。また、成体の精巣生殖細胞より調製した核抽出物についても A-4 断片をプローブとしてゲルシフトアッセイを行ったところ、胎子生殖腺と同様の核蛋白質の結合が見られた。したがって、この領域は成体精巣における circular form のみの発現にも関与していると思われる。

第二章 DNase I hypersensitive site の解析

ゲルシフトアッセイにより検出された核蛋白質の結合が、実際の生体内でも生じているかどうかを調べるため、ゲノム上の DNase I 感受性領域について検討した。ゲノム上の転写制御領域に転写因子が結合すると、ゲノムのヌクレオソーム構造が失われ、その結果その領域の DNase I 感受性が上昇する。この現象を利用することにより、ゲノム上に因子が結合しているかどうかを解析することが可能である。

胎齢 11.5 日雄胎子生殖隆起および成体精巣生殖細胞と肝臓より、核のライセートを調製して DNase I を作用させ、その後サザンブロット法により A-4 領域付近の DNA 断片を検出した。その結果、対照として用いた肝臓に対して Sry を発現している胎子生殖隆起と精巣生殖細胞においては、DNase I によって切断された DNA 断片が産生され、A-4 断片に相当する領域(A-4 領域)に DNase I hypersensitive site(HS)が存在することが予想された。このことから実際に Sry を発現している生体組織においても、A-4 領域に何らかの因子が結合していることが示唆された。また、circular form の転写開始点付近にも HS が検出され、circular form の転写制御に関わる因子

の結合が予測された。

第三章 **in vitro** 転写系を用いた解析

さらに、A-4 領域による Sry の転写活性への影響を *in vitro* 転写系により解析した。まず、*linear form* の転写開始点を含む 378bp からなる断片を *template* とし、各胎齢の胎子生殖腺由来の核抽出物を用いて *run-off assay* を行ったところ、胎齢に関わらず転写産物を検出した。この結果は以前報告された事実と一致しており、この *template* に含まれる領域のみで転写が生じることが確認された。

次に、この *template* に A-4 断片を連結し、転写に対する影響について検討した。その結果、胎齢 13.5 日雌生殖腺由来の核抽出物を用いた場合には転写に対する影響は見られなかったが、胎齢 11.5 日生殖隆起由来の核抽出物を用いた場合には転写量の上昇が認められた。また、*circular form* の転写開始点についても調べた結果、A-4 領域を欠失させた *template* では転写量の減少がみられた。これらのことから、A-4 領域には Sry の発現時期特異的にその転写を活性化する領域が含まれていることが明らかとなった。

以上の結果から、マウス Sry の発現時期特異的に因子が結合する転写活性化領域が、その 5'上流域の 5559 から 5616 の領域に位置していることが強く示唆された。また、この領域は *circular form* の発現制御にも関与すると考えられる。本研究により、Sry の上流因子の同定が進んでいない現状において、Sry の転写制御領域からその転写制御機構を解明する手がかりが得られたといえ、Sry の機能を中心とした哺乳類の性決定に関する研究を更に発展をさせる新たな方向性を示したと考える。