

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 横内 耕

精巣の分化を誘導し哺乳類の性を決定する転写因子 *SRY* は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* 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。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。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。

本研究は、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、転写制御領域の解析を行ったものである。

第一章では、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。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い、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* の発現パターンに一致しているといえ、A 断片に含まれる領域に *Sry* の転写を正に制御している転写制御領域が存在す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を検出した。この領域には *SFI* 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ことが示唆された。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い、胎子生殖腺と同様の核蛋白質の結合を検出した。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ことを示唆した。

第二章では、ゲルシフトアッセイにより検出した核蛋白質の結合が、実際の生体内でも起こっ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。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と比較して、*Sry* を発現している胎子生殖隆起

と精巢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)が存在することを推察している。また、circular form の転写開始点付近にも HS を検出し、circular form の転写制御に関わる因子の結合を予測した。

第三章では、A-4 領域による *Sry* の転写活性への影響を調べるため、*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。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で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を認めた。

以上、本研究の結果は、発現時期特異的に因子が結合するマウス *Sry* の転写活性化領域が、5'上流域の 5559 から 5616 の領域に位置していることを強く示唆した。本論文は、*Sry* の上流因子の同定が進んでいない現状において、*Sry* の転写制御機構を解明する上で重要な知見を示し、哺乳類性決定機構に関し学術上ならびに獣医学分野に貢献するところが少なくない。よって、審査員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。