

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成 13 年度博士課程進学

氏名 伊藤雅方

指導教官 東條英昭

論文題目 *Cre/loxP* 系を利用した *Sry* の発現細胞系譜ならびに発現制御領域に関する研究

哺乳類の性決定には Y 染色体上に存在する *Sry* (Sex determining region on Y chromosome) 遺伝子の発現が重要な役割を果たし、未分化生殖腺を精巣へ分化させる。発生過程で *Sry* の発現は厳密に制御されており、マウス *Sry* の発現は、胎齢 10.5 日から 12.5 日の未分化生殖腺に限局している。そのため、*Sry* 発現細胞が、将来生殖腺のどの種の細胞に分化するのか、*Sry* 発現細胞の細胞系譜についての確証が得られていない。そこで、本研究の第 1 章では、*Cre/loxP* 系によるトランスジェニック (Tg) マウスならびに未分化生殖腺細胞の初代培養を用いて、*Sry* 発現細胞の細胞系譜を解析した。すなわち、*Cre/loxP* 系を利用して内在性 *Sry* の一過性の発現を、持続的で強力な *LacZ* 遺伝子の発現に置き換えることにより、*Sry* を発現する細胞の細胞系譜の解析を試みた。また、未分化生殖腺における *Sry* の発現制御機構の理解に必須である 5'

上流領域については、適した株化細胞が樹立されておらず、ほとんど進展していない。さらに、*Sry* の発現レベルは極めて低く、その同定は困難である。そこで第 2 章では、未分化生殖腺初代培養細胞を材料に、*Cre/loxP* 系を利用して *Sry* 発現調節領域の解析を行った。

第 1 章 *Sry/Cre* Tg マウスを用いた *Sry* 発現細胞の細胞系譜の解析

未分化生殖腺における *Sry* 発現細胞が、分化完了後の生殖腺において、どのような細胞群の前駆細胞として機能しているのかを調べるため、*Cre/loxP* 系を利用し、個体レベルでの解析を行った。*Sry*9.9kb を導入した Tg マウスは XX 型で雄へ性転換することが知られているので、*Sry* 遺伝子とその上流域を含む 9.9kb のゲノム DNA 断片のうち *Sry* コード領域と *Cre* 遺伝子のコード領域を置換した *Sry/Cre* 融合遺伝子を作製した。*Sry/Cre* 融合遺伝子を受精卵前核に顕微注入する方法により *Sry/Cre* Tg マウスを作出した。作出した Tg マウスで *Sry/Cre* 遺伝子の発現が胎児期未分化生殖腺に限局していることを確認した。次に、*Sry/Cre* Tg マウスを *CAG/loxP/LacZ* Tg マウスと交配させて得た両導入遺伝子を発現するダブル Tg マウスを得た。成熟したダブル Tg マウスの精巣と卵巣の X-gal 染色を行った結果、精巣ではセルトリ細胞及び生殖細胞で X-gal 染色陽性細胞が観察され、一方、卵巣では顆粒膜細胞に X-gal 染色陽性細胞が観察された。このことから、胎児期の未分化生殖腺において *Sry* を発現した細胞は、精巣のセルトリ細胞へと分化し、雌における *Sry* の発現を誘導し得る細胞は卵巣の顆粒膜細胞に分化することが示唆された。一方、成体精巣の生殖細胞でも X-gal 染色陽性細胞が観察されたが、その理由を探るために、以下の実験を行った。マウスの成体精巣では機能不明の環状 *Sry* 転写物が産生されている。この環状転写産物はタンパク質には翻訳されないが、一部の転写産物が環状にならずにタンパク質に翻訳される可能性がある。現在免疫組織化学的解析に使用で

きるマウス Sry 抗体が存在せず、直接 Sry タンパク質を検出することができない。そこで Cre 抗体を用い、*Sry/Cre* Tg マウスの成体精巣を免疫染色した。その結果、精原細胞で Cre の発現が確認され、ダブル Tg マウスの生殖細胞での X-gal 染色陽性細胞は成体精巣の精原細胞で Cre が発現した結果であると考えられる。

第 2 章 *Sry* の時期及び組織特異的な発現調節領域の探索

第 1 章で確認された *Sry* の特異的な発現は *Sry* のどの制御領域に依存しているのかを初代培養細胞を用いて解析した。*Sry/Cre* 遺伝子を胎齢 11.5 日 もしくは 13.5 日の *CAG/loxP/lacZ* Tg 胎児の未分化生殖腺から調製した初代培養細胞に導入した。なお対照には脳及び肝臓から調製した細胞を使用した。その結果、雌雄ともに X-gal 染色陽性細胞は、胎齢 11.5 日の未分化生殖腺から調製した細胞にのみ観察された。このことから、作製した *Sry/Cre* 遺伝子が、*Sry* の時期及び組織特異的な発現を調節している領域を含んでいること、および、雌の未分化生殖腺においても *Sry* の発現を誘導する上流因子の存在することが確認された。この結果から本実験系が、*Sry* の時期及び部位特異的な発現を制御している調節領域を同定するために有用であることが確認できた。

9.9kb *Sry* ゲノム DNA は、*Sry* の転写開始点から 5' 上流域 4.1kb を含んでいるが、その 5' 上流域を部分的に欠失させた種々の大きさの *Sry/Cre* 遺伝子を作製し、同様の方法で、*CAG/loxP/lacZ* Tg 胎児の未分化生殖腺、脳及び肝臓から調製した初代培養細胞に導入した。その結果、5' 上流 1.4kb を持つ遺伝子は発現の特異性を保存しているが、5' 上流 0.4kb まで欠失させると、特異性が失われることが判明した。このことから、*Sry* の転写開始点より 5' 上流 0.4 ~ 1.4kb 間に *Sry* の時期及び組織特異的な発現に重要な領域が含まれていることが示唆された。

さらに、*Sry* の発現調節に重要な領域を詳しく同定する目的で、*Sry*5'上流 1.4kb、1.0kb、0.7kb、0.5kb、0.4kb のそれぞれと *Cre* の融合遺伝子を構築し、*Sry* の特異的発現に重要な領域を探索した。その結果、0.4kb~0.5kb の間に重要な領域が含まれていることが示唆された。この領域は胎児期の未分化生殖腺以外の組織では *Sry* の発現を常時抑制している役割を果していると推察された。

Sry が発現している胎齢 11.5 日、その発現が減少する胎齢 12.5 日、さらに発現が消失する胎齢 13.5 日の未分化生殖腺から抽出した核タンパク質はいずれも *Sry* の 5'上流 0.4kb~0.5kb の領域に結合することがゲルシフト解析により確認されている。このことは、上流 0.4~0.5kb の領域には、*Sry* の発現を抑制する何らかの因子が常時結合していることを示しており、*Sry* 発現細胞でのみ、この抑制因子の発現が消失するか、あるいは、抑制因子に拮抗する因子の作用によって、*Sry* 発現が誘導される可能性が考えられる。そこで、この 5'上流 0.4kb~0.5kb の発現調節領域が *Sry* 以外のプロモーターに作用するかどうか調べるため、上流 0.4~0.5kb 領域を *CAG/EGFP* ベクターに挿入した各種コンストラクトを構築した。これらのコンストラクトを *Sry* が発現していない時期の雄生殖腺初代培養細胞に導入したところ、対照と比べて *EGFP* の発現に差が観察されなかった。そのため、5'上流 0.4kb~0.5kb は *Sry* プロモーターに特異的な調節領域であることが示唆された。

以上、本研究では *Cre/loxP* 系の Tg マウスを利用して、*Sry* 発現細胞の細胞系譜について解析した結果、*Sry* 発現細胞は精巢のセルトリ細胞に分化することが確認された。また *Sry* 発現細胞に相応する細胞が、卵巣では顆粒膜細胞に分化することが実験的に初めて確認された。また、*Sry* の発現調節領域を初代培養細胞による *Cre/loxP* 系で解析した結果、*Sry* 5'上流 0.4~0.5kb の領域に常時何らかの *Sry* プロモーターに特異的に作用する因子が結合し、*Sry* の時期及び組織特異的発現を調節していることが示唆された。