

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 伊藤 雅方

---

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。マウス *Sry* の発現は、未分化生殖腺に限局しているため、*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。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。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。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 *Cre/loxP* 系を利用した *Sry* 発現細胞系譜の解析

*Sry* 遺伝子 (9.9kb) のコード領域を *Cre* 遺伝子のコード領域に置換した *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 Tg マウスを作製し、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/CreTg* マウスを *CAG/loxP/CAT/loxP/LacZTg* マウスと交配させて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 陽性細胞が観察され、一方、卵巣では顆粒膜細胞に X-gal 陽性細胞が観察された。このことから、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 陽性細胞が観察されたので、*Cre* 抗体を用い、*Sry/CreTg* 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* の発現が確認された。また、*Sry/Cre* 遺伝子を胎齢 11.5 日 もしくは 13.5 日の *CAG/loxP/CAT/loxP/LacZTg* マウスの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結果、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た。

第 2 章 *Cre/loxP* 系を利用した初代培養細胞による *Sry* 発現制御領域の解析

*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について、初代培養細胞を用いて解析した。*Sry* ゲノム DNA (9.9kb) の 5'上流領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/CAT/loxP/LacZTg* マウスの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 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* 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、0.4~0.5kb 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、12.5 日、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 0.4~0.5kb 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。そこで、この 5'上流 0.4~0.5kb 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。この結果から、5'上流 0.4~0.5kb 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、本研究の成果は、哺乳類性決定機構に関し学術上ならびに応用動物科学分野に貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。