

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 13 年度博士課程 入学

氏 名 城所 知秀

指導教員名 九郎丸 正道

論文題目: マウス性分化初期における *Sry* の *Sox9* 発現制御機構に関する研究

Sry (Sex-determining region of the Y chromosome) 遺伝子は Y 染色体に存在する精巢決定遺伝子であり, その発現はマウス生殖腺においては 12 tail somite (ts) stage (胎齢 11.0 日) から 24ts (胎齢 12.0 日) までの一過性で, 生殖腺中央部から前/後端に発現が波及する center-to-pole パターンを示す。また, *Sox9* (Sry-related HMG box 9) は *Sry* の下流で機能する精巢形成遺伝子であり, 1) *Sry* の発現上昇と一致して *Sox9* の発現量が雄特異的に上昇し, その発現は *Sry* と同様の center-to-pole パターンを示す, 2) ヒト *SOX9* 変異の一部が XY 女性を示す, 3) *Sox9* 単独により XX 雄マウスを誘導できることから, *Sox9* は *Sry* が直接制御する因子とされている。しかし, マウス *Sry* タンパクを検出する方法論が確立されていないことや, *Sry* を発現し解析に有用な細胞株が存在しないこと, *Sox9* の制御領域が約 1Mb に及ぶため解析が非常に困難であること等の理由により, *Sry* が *Sox9* を直接制御していることについての確固たる証拠は今までのところ得られていない。

そこで本研究では, *Sry* が *Sox9* を直接制御しているかどうかについて検証を行うと共に, *Sry* 遺伝子を導入した新たなトランスジェニック (Tg) マウスを作成し, このマウス生殖腺における *Sox9* の

発現解析から, *Sry* の *Sox9* 制御機構について検討を行った。

第1章においては性分化初期におけるマウス XY 未分化生殖腺での *Sry* および *Sox9* の発現の詳細を, whole-mount *in situ* hybridization 法, 免疫組織化学染色法により解析を行った。*Sry* の発現は 12ts の生殖腺中央部で初めて認められ, 16ts には前/後端に発現が波及していた。*Sox9* の発現開始は 13-14ts (mRNA), 14ts (タンパク) であり, *Sry* の発現から遅れること約 1-2ts (2-4 時間) である。また発現パターンは *Sry* と同様の center-to-pole パターンを示した。発現細胞は共に生殖細胞に隣接した細胞であり, 14ts においては共発現している領域を確認した。本章での両遺伝子の発現開始時期の差, 発現パターン, および発現細胞の結果は, *Sry* が *Sox9* を直接制御しているという従来の仮説を強く支持するものであった。

そこで次に, 生殖腺における *Sry* の発現パターンおよび発現量を改変したマウスを作成し, この生殖腺における *Sox9* の発現を観察することで, 「*Sry* が *Sox9* の発現を直接制御している」という仮説を再検証し, さらに *Sry* の *Sox9* 制御機構について検討した。

第2章において組織非特異的に低レベルの発現が認められる *Hsp70.3* 遺伝子のプロモーターに *Sry* を連結したコンストラクト (*HSP-Sry*) を用いて Tg マウスを作成した。得られた Tg マウスのうち, XX 雄の性転換を示し, 遺伝学的に正常であると考えられるラインについて *Sry* の発現を確認した。半定量的 RT-PCR 法により, XXTg 個体の胎齢 11.5 日における *Sry* の発現は, 生殖隆起を含む 8 臓器/部位全てにおいて確認されたことから, Tg 個体においては *Sry* が全身性に発現していることが示唆された。次に XXTg 生殖隆起における *Sry* の発現を確認したところ, 9ts (胎齢約 10.5 日) から胎齢 13.5 日までの全ステージにおいて確認されたことから, Tg 生殖隆起においては一過性ではなく恒常的に *Sry* が発現していると考えられる。続いて whole-mount *in situ* hybridization により *Sry* の発現部位を解析したところ, XXTg, XYTg サンプル共に 9, 13, 18, および 30ts の全ステージにおいて生殖腺領域で高い発現が認められた。また, 発現は生殖腺領域全体に一様であり, 部位特異性は認められなかった。さらに Tg 生殖腺では, wild type (wt) XY 生殖腺には認められない体腔上皮においても *Sry* の発現が認められ, 30ts では精巣索内に存在するセルトリ細胞で発現していることを確認した。胎齢 11.5 日において XXTg 生殖腺では *HSP-Sry* 由来の *Sry* が, XYTg 生殖腺では内在性 *Sry* と *HSP-Sry* 由来 *Sry* の両方が発現していることを RT-PCR により確認したこ

とから, XXTg 生殖腺は *Sry* が本来の発現よりも前から生殖腺全体に発現している発現パターン
変モデル, XYTg 生殖腺は発現パターン変化に加え, *Sry* 発現量過剰モデルであることが明らかと
なった。

第 3 章では第 2 章で作出した Tg マウスを用いて, *Sox9* の発現について解析を行った。
whole-mount *in situ* hybridization による解析から, XXTg, XYTg 生殖腺共に *Sox9* の発現は 12ts
以前では認められず, 13ts で初めて検出された。また発現パターンも中央部から 18ts までに前/
後端へと波及する center-to-pole パターンを示し, XYwt 生殖腺での発現と変わらなかった。*Sry* と
Sox9 の二重染色を行った 16, および 18ts のサンプルから横断切片を作製し, *Sox9* 発現領域の詳
細な検討を行ったところ, XXTg 生殖腺は *Sry* が生殖腺領域全体に発現しているにも関わらず,
Sox9 の発現領域は XYwt 生殖腺で見られる領域とほとんど変わらなかった。*Sox9* mRNA の発現量
をリアルタイム RT-PCR にて定量したところ, *Sox9* 発現開始直後の 14-16ts における XYTg 生殖腺
での発現量が XYwt に比べ有意に高い値を示したが, 18ts 以降では XXTg と共に差は認められな
かった。また, 免疫組織化学染色により生殖腺における *Sox9* タンパクを検出したところ, Tg 生殖腺
においても 13ts 以前で発現は検出されず, XYwt と同じく 14ts で初めて認められた。*Sox9* 陽性細
胞は生殖細胞に隣接しており, Tg 生殖腺において *Sry* の発現している体腔上皮などの細胞に
Sox9 タンパクの発現は認められなかった。しかし, 15-16ts における XYTg 生殖腺では中腎に近い
領域で, 生殖細胞に隣接していない *Sox9* 陽性細胞が検出された。この領域における *Sox9* 陽性細
胞は SF1/Ad4Bp(セルトリ前駆細胞を含む生殖腺内体細胞に発現)陽性でもあることから, Tg 生殖
腺における *Sox9* 陽性細胞は XYwt 生殖腺において発現の認められる細胞と同じ細胞系列である
ことが示唆された。それぞれの生殖腺における単位面積あたりの *Sox9* 陽性細胞数を定量したとこ
ろ, *Sox9* タンパク発現開始直後である 15-16ts の XYTg 生殖腺で XYwt 生殖腺と比べ有意に増加
していることが明らかとなった。これは, リアルタイム RT-PCR の結果と一致していた。

XYwt 生殖腺における *Sry*, *Sox9* の詳細な発現解析, および XYTg マウス生殖腺において
Sry 発現量依存的に *Sox9* の発現量が増加したことから, *Sry* が *Sox9* を直接制御していることが強く
示唆された。しかし, Tg 生殖腺において *Sox9* の発現開始時期および発現パターンは全く変化しな
かったことから, *Sox9* 発現制御には *Sry* 以外の他の因子が必要であることが示唆された。