

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 城所 知秀

Sry, および *Sox9* 遺伝子は共に哺乳類の精巣分化に重要な因子であり、性分化初期において *Sry* の発現直後に *Sox9* の発現が雄特異的に誘導されることから、「*Sry* が *Sox9* を直接制御している」という仮説が現在までのところ信じられている。しかし、この根拠は個々に報告された発現解析結果の比較でしかなく、明確な科学的根拠が示されていない。本研究ではこの仮説の是非について検証し、*Sry* の *Sox9* 発現制御機構について検討を行った。まず、仮説の根拠を検証するために *Sry*, および *Sox9* の発現解析を行った。その結果、*Sry* と *Sox9* の発現について、1) *Sox9* の発現開始は *Sry* の発現開始から遅れること約 1-2ts (2-4 時間) であり、2) 共に生殖腺中央部から前、後端に波及する center-to-pole パターンを示し、3) 共に生殖細胞に隣接した同じ細胞系列に発現することが明らかとなった。このことは *Sox9* が *Sry* の制御下に存在することは示唆するが、「*Sry* が *Sox9* を直接制御している」という仮説を支持するには至らない。

そこで、*Sry* が一過性ではなく恒常的で、かつ center-to-pole パターンではなく生殖腺領域全体に発現している遺伝子改変マウスを作出し、この遺伝子改変マウス生殖腺における *Sox9* の発現解析結果から仮説の再検証を行った。目的のマウスは、*Sry* 遺伝子の制御領域を *Hsp70.3* のプロモーターに置き換えたコンストラクト (*HSP-Sry*) を用いてマウス受精卵に導入するトランスジェニック (Tg) 法により作出した。得られた Tg マウスのうち、XX 雄の性転換を示すラインの生殖隆起における *Sry* mRNA の発現は一過性ではなく恒常的で、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、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前駆細胞で発現していることを確認した。さらに、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た。以上の結果から、XXTg 生殖腺では *HSP-Sry* 由来の *Sry* の発現が 1) 内在性 *Sry* の発現開始時期よりも前から、2) 生殖腺領域全体の細胞に均一であること、XYTg 生殖腺においては XXTg 生殖腺で見られる *HSP-Sry* 由来の *Sry* と内在性 *Sry* が共発現していることが明らかとなった。

続いて *Sox9* の発現解析を行った結果、XXTg, XYTg 生殖腺共に *Sox9* mRNA 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 パターンを示した。16, および 18ts において *Sry* と *Sox9* の二重染色を行ったところ, XXTg 生殖腺では *Sry* が体腔上皮を含む生殖腺領域全体の細胞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 の発現量は, *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, *Sox9* タンパク陽性細胞は 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。Tg 生殖腺において *Sox9* 陽性細胞は XYwt と同様に生殖細胞に隣接しており, *HSP-Sry* 由来の *Sry* が発現している体腔上皮を構成する細胞などに *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 陽性であり, *Sox9* 陽性, SF1/Ad4Bp 陰性を示す細胞は認められなかった。それぞれの生殖腺における単位面積あたりの *Sox9* 陽性細胞数は, *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たが, 18ts 以降ではほとんど差が認められなかった。以上の結果から, 1) 生殖腺における *Sox9* 発現制御には *Sry* 以外の因子が関与していること, 2) 生殖腺において *Sox9* を発現する細胞は限られた細胞系列であることが示唆された。

本研究は「*Sry* が *Sox9* を直接制御している」という仮説に疑問を投げかけるものであり, 今まで遅々として進まなかった *Sox9* 発現制御機構の解明に大きく寄与するものである。これらの成果は, 獣医学学術上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 (獣医学) の学位論文として価値のあるものと認めた。