

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 20 年度博士課程 進学
氏名 井上 和樹
指導教員 加藤 茂明

論文題目 Y 染色体遺伝子欠損マウスを用いた骨格性差構築の新規分子基盤の解明

第一章 序論

哺乳類の雌雄間には、生殖器官や性行動等の様々な性差が存在する。中でも、骨長や骨量においては、雄性が明確な優位を示すことが知られている。このような性差は、一般に性染色体上の遺伝子の機能と性ホルモン作用により生じるとされている。しかしながら、雄性特異的な Y 染色体の遺伝子群個々の生体内高次機能や性差構築での役割は不明であるのが現状である。

一方、性ホルモンである男性ホルモン(アンドロゲン)および女性ホルモン(エストロゲン)の作用機序は詳細な解析が行われてきた。アンドロゲンおよびエストロゲンは、標的組織におけるアンドロゲン受容体 (AR) およびエストロゲン受容体(ER α , β)を介した標的遺伝子の発現制御により、その生理作用を発揮する。現在までの遺伝子欠損マウスの解析により、これら性ホルモンは、雌雄の各生殖器官の発生や脳の性分化、雄性特異的な骨量の維持などにおいて機能する事が明らかとなっている。しかしながら、これら受容体遺伝子欠損雄マウスでの骨長は、雄性型優位を示すことから、骨格での性差構築には性ホルモン作用以外の要因が考えられた。そのため、雄性での性差には Y 染色体遺伝子群の関与が推測された。

Y 染色体の雄性化における生理機能は、ヒト Y 染色体領域欠損変異の解析により推測されており、精子形成不全領域 (AZF) や Y 特異的成長遺伝子領域 (GCY) の存在が知られている。中でも、ヒトでは GCY 欠損変異は低身長を引き起こすことから、この領域に位置する遺伝子群の雄性型骨長の構築への関与が示唆されている。しかしながら、GCY に座位する遺伝子群個々の機能は不明であり、責任遺伝子の同定には至っていない。

一方、マウスを用いた従来の遺伝学的アプローチによる Y 染色体遺伝子群の生体内高次機能は困難であった。Y 染色体の大半は非相同領域により占められているため、標的遺伝子座との相同組み換え効率に依存した従来の遺伝子ターゲティングでは組み換えは事実上不可能であった。

そこで、本研究では、組み換え効率の高い挿入型ターゲティングベクターと Cre/loxP システムを組み合わ

せることにより、世界に先駆けて Y 染色体遺伝子欠損マウスを作出することで、雄性化における Y 染色体遺伝子の生体内高次機能を解明することを目的とした。本研究では、GCY に座位する遺伝子群の中でも、エピゲノム制御に重要な JmjC ドメインを有する Uty 遺伝子に注目した。骨格形成を担う骨・軟骨細胞分化を制御する遺伝子発現調節では、ヒストンの翻訳後修飾を代表とするエピゲノム制御が必須であるため、本研究では、Uty の高次機能とともに、エピゲノム制御能についても解析を行った。

第二章 Y 染色体遺伝子 Uty 欠損マウスの作出

Y 染色体はパリンδροーム配列や反復配列に富み、他の染色体とは全く異なる複雑な構造を示すことから、Y 染色体では相同組み換え効率は、常染色体に比べて著しく低い。そのため、相同組み換えの原理に基づく従来の標的遺伝子組み換え法では、Y 染色体遺伝子欠損マウス作出は事実上不可能とされてきた。さらに、Y 染色体遺伝子の多くが生殖細胞の発生に重要であり、遺伝子欠損マウスが不妊を呈する可能性が高い。これら問題点を克服するために、本研究では、これまでよりも高頻度で組み換えを起こす挿入型ターゲティングベクターと、時期・組織特異的な遺伝子欠損法である Cre/loxP システムとを組み合わせることで、Y 染色体遺伝子欠損マウス作出を試みた。

まず、loxP 配列を有する挿入型ベクターを用い、2 段階で遺伝子全長の前後に loxP 配列を挿入することにより flox マウスの作出を行った。はじめに、Uty 遺伝子の 5' 側に一段階目の loxP 配列を挿入するため、挿入型ベクターを TT2 ES 細胞株にエレクトロポレーション(EP)法により導入した。ネオマイシンによる薬剤耐性を利用した選択の後、サザンブロット法により相同組み換え体の確認を行った。さらに、取得された 5' 側の相同組み換え体に対し、3' 側に 2 段階目の loxP 配列を挿入するベクターを EP 法により導入した。ピューロマイシンによる選択の後、サザンブロット法により相同組み換え体の確認を行った。得られた相同組み換え体をアグリゲーション法によりマウス 8 細胞期胚に導入し、Uty flox キメラマウスを作出し野生型マウスと交配することにより、Uty flox マウス(Uty^{XL2})を作出することができた。次いで、Uty^{XL2} と全身で Cre recombinase を発現する CMV-Cre 遺伝子トランスジェニックマウスとの交配により、全身性 Uty 遺伝子欠損マウス(Uty^{XL})の作出に成功した。

第三章 Y 染色体遺伝子 Uty 欠損マウス表現型の解析

外生殖器および内分泌系解析

Uty が精子形成不全領域 AZF にも座位していることから、生殖器官形成や精子形成において機能している可能性を考え、生殖器官における解析を行った。しかしながら、作出された Uty^{XL}の外生殖器官の外観は正常であり、精巣重量、組織形態、精子形態も正常であった。さらに、Uty^{XL}の生殖能力にも異常を認めなかった。このことから、Uty は雄性生殖機能に必須の因子ではないことが示唆された。

また、性差構築において性ホルモン作用は重要であるため、Uty が性ホルモンの生合成制御やその受容体の発現制御を介して性差構築を行う可能性を検討した。テストステロンおよびエストラジオールの血中濃度を測定したところ、Uty^{XL}は Uty^{XL2}と比較して異常を認めなかった。性ホルモン受容体の AR、ER α , β 各遺伝子の発現量についても、雌雄および Uty^{XL}間において差は認められなかった。以上の結果より、Uty による性差構築は性ホルモン非依存的であることが示唆された。

軟骨組織における解析

頭胴長計測での成長曲線により、若週齢において Uty^{XL}は成長遅延を示すことが明らかとなった。このことから、Uty が雄性特異的な骨成長や身長制御において機能すると考えられた。そこで、骨・軟骨組織に着目して解析を行った。骨格標本では、Uty^{XL}は明らかな骨格形態の異常を認めなかった。しかしながら、脛骨・大

腿骨骨長ともに、 Uty^{XL-} では Uty^{XL2} よりも約 10%の短縮を示し、雌とほぼ同程度の長さとなることが明らかになった。このことから、 Uty が骨成長を制御する事が示唆された。

このような骨長の長軸方向の伸長は成長板軟骨層が担っている。免疫染色により、 Uty が増殖軟骨層と前肥大軟骨層に強く発現することが明らかとなった。そこで、成長板全層および増殖軟骨層、肥大軟骨層の長さを測定したところ、成長板全層および増殖軟骨層の長さが、 Uty^{XL2} と比較して Uty^{XL-} では約 20%有意に短縮していた。このことから、 Uty が成長板軟骨層の厚さを増加させることが示唆された。

成長板軟骨層の短縮は、軟骨細胞の分化異常に起因すると考えられた。そこで、軟骨初代培養による軟骨細胞分化系を用いた結果、 Uty^{XL-} および雌由来細胞では Uty^{XL2} 由来細胞に比べてアルシアンブルーによる染色性の増加および肥大軟骨分化マーカー遺伝子 $Col10a1$ の発現上昇を認めた。このことから、 Uty^{XL-} 由来細胞では軟骨細胞分化が亢進していることが明らかとなった。

以上の結果より、 Uty は肥大軟骨細胞への分化を抑制することにより、成長板軟骨層および骨全長を伸長させる結果、身長雄性化を制御する可能性が示唆された。

骨組織における解析

さらに、 Uty の骨組織における発現細胞種を検討したところ、骨形成を担う骨芽細胞でも発現を認め、雄性特異的な骨量制御への関与が推測された。これまで Y 染色体遺伝子と骨量制御の関連は不明であったため、 Uty^{XL-} の骨組織における表現型解析を X 線学的に行ったところ、生後 12 週齢において Uty^{XL-} では軟 X 線の透過性が亢進し骨密度の低下が示唆された。そこで DXA 法にて骨密度を測定した結果、 Uty^{XL-} では脛骨・大腿骨ともに骨全体にわたり Uty^{XL2} よりも骨密度の低下が認められ、雌と同程度の骨密度を示した。以上の結果から、 Uty は雄性における骨増強作用に関与している可能性が示唆された。

第四章 Uty の分子機能解析

Uty^{XL-} の解析により、 Uty が軟骨細胞後期分化を抑制することが示唆された。また、 Uty はヒストン脱メチル化活性を担う $JmjC$ ドメインを有しているが、ヒストン脱メチル化活性の有無は不明であった。そこで、軟骨細胞分化における転写制御とヒストン修飾制御に着目して、 Uty の機能解析を行った。

まず、 Uty のヒストン脱メチル化活性を *in vitro* 系および *in vivo* 系により検討したところ、ヒストン脱メチル化活性は検出されなかった。

次に、 Uty が、軟骨分化制御転写因子 $Sox9$ および $Runx2$ に対する転写共役因子である可能性をレポーターアッセイにより検討した。その結果、 Uty は $Runx2$ のみ転写能を抑制することを見出した。そこで、両者の相互作用を明らかにするために、軟骨初代培養細胞を用いて $Runx2$ の標的遺伝子である $Col10a1$ の promoter 領域における ChIP アッセイを行った。その結果、 $Col10a1$ プロモーターに $Runx2$ および Uty がリクルートされることを見出した。 $Runx2$ のリクルートメントは Uty^{XL2} と Uty^{XL-} 由来軟骨細胞間で大きく変化はしなかった。一方で、 $Runx2$ の転写共役抑制因子である $Hdac4$ のリクルートメントが、 Uty^{XL2} 由来の軟骨細胞に比較して Uty^{XL-} 由来の軟骨細胞では減弱していた。さらに、免疫沈降法により、 Uty と $Hdac4$ との相互作用を見出した。このことから、 Uty が $Hdac4$ の $Col10a1$ プロモーターへのリクルートメントを促進することで、 $Runx2$ の転写能を抑制する可能性が示唆された。

また、 $Col10a1$ の発現変化が プロモーターでのヒストン修飾の変化に起因するものと考え、ChIP アッセイを行った。その結果、 Uty^{XL-} では転写活性化のマークである $H3K4me2$ および $H3Ac$ の修飾が亢進していることが明らかとなった。このため、 Uty^{XL-} では $Col10a1$ の発現が上昇すると考えられた。

以上の結果より、 Uty は $Hdac4$ と協調的に作用し、ヒストン修飾変動を介して、 $Runx2$ の転写能を減弱させ、その標的遺伝子である $Col10a1$ の発現を抑制するという分子機構が明らかとなった。

第五章 総合討論

本研究では、Y染色体遺伝子欠損マウスを作出することで、Y染色体遺伝子の性差構築における生理機能の解明を試みた。

Y染色体遺伝子欠損マウス作出法の樹立

本研究では、**Cre/loxP system** と組み換え効率の高い挿入型ベクターを用いた2段階のターゲティング法とにより、Y染色体遺伝子欠損マウスの作出に初めて成功した。これまで、Y染色体遺伝子の生体内高次機能解析は、自然発生した領域欠損マウスを用いた手法でしか行うことができなかった。しかしながら、本手法により、遺伝子欠損マウスを用いた生体内高次機能解析の手法を初めて導入できた。

また、Y染色体には、単一コピー遺伝子以外にも多コピー遺伝子や機能不明な **non-coding RNA** が数多く存在し、その生理機能に興味を持たれる。本手法を用いることで、これまで困難であった多コピー遺伝子や、広範囲に渡るゲノム領域を欠損させることが可能である。今後、本手法により、Y染色体特異的な多コピー遺伝子を始めとした機能未知 Y染色体遺伝子の新規生理機能が解明されると期待される。

Y染色体遺伝子の生理機能

近年、Y染色体遺伝子群の生体内機能の一端が解析されつつある。当研究室の秋本らにより、Y染色体遺伝子 **TSPY** が **AR** の転写抑制を介して精巣腫瘍の増殖を抑制すること¹⁾や、**SMCY** がエピゲノム制御を介して精子形成に関与することが、生化学的、細胞生物学的な手法により明らかにされている。しかしながら、これらの手法のみでは、Y染色体遺伝子の雄性化における生体内高次機能の説明に至らなかった。本研究では、**Uty** 遺伝子欠損マウスを用いた高次機能解析により、Y染色体遺伝子の生理機能の一端を初めて明らかにすることができた。

Uty^{XL}の解析により、**Uty** が雄型の骨長を規定する因子である事を見出した。即ち、**Uty** は雄性成長板軟骨層の増大を介して骨成長を促し、長軸方向の成長を促進する因子であった。**Uty** の分子機能解析により、**Uty** が雄性特異的に **Runx2** の転写活性化能を抑制することを明らかにした。**Uty** による **Runx2** 機能抑制は、増殖軟骨細胞から肥大軟骨細胞への分化を抑制し、増殖軟骨細胞数を増加させる。これにより、成長板軟骨層および骨長の伸長が促進されると考えられた。これまで、身長性の性差構築の分子機構は、性ホルモン作用では説明しえなかった。**GCY** 領域欠損患者のゲノム解析から、身長の雄性化に Y染色体の関与が推測されてきたが、責任遺伝子の同定に至らなかった。しかしながら、本研究により、**Uty** が性ホルモン非依存的な雄型身長性差構築を制御することが明らかとなり、**GCY** の責任遺伝子の一つである事が示唆された。

Uty^{XL}ではこれら骨長の短小化に加え、骨密度の低下を示したことから、**Uty** 雄型骨量制御への関与を明らかにすることができた。これまで、当研究室の河野らによる **AR** 遺伝子欠損マウスの解析から、雄性における骨量維持には **Androgen/AR system** が重要である事が明らかにされてきた[Kawano H, et al. *PNAS*, 100, 9416-21, (2003)]。その一方で、Y染色体遺伝子と骨量制御の関連は不明であった。本研究により、性ホルモンのみならず、Y染色体遺伝子も雄性骨量制御機構に関与する可能性が初めて示唆された。

総括

以上、本研究では、**Cre/loxP** システムと挿入型ターゲティングベクターを組み合わせた手法により、世界で初めて Y染色体遺伝子欠損マウスの作出に成功し、機能未知 Y染色体遺伝子 **Uty** の生体内高次機能の一端を初めて明らかにした。本研究により、性ホルモン非依存的な性差構築機構の一つとして Y染色体遺伝子 **Uty** による身長雄性化機能を明らかにすることができた。

1) Akimoto C, Ueda T, Inoue K, Yamaoka I, Sakari M, Obara W, Fujioka T, Nagahara A, Nonomura N, Tsutsumi S, Aburatani H, Miki T, Matsumoto T, Kitagawa H, Kato S. *PNAS*, 107, 19891-6, (2010)