

令和 2 年 4 月 30 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07429

研究課題名(和文) Sox9の生殖腺遠位エンハンサーの同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of a gonadal Sox9 enhancer

研究代表者

高田 修治 (TAKADA, SHUJI)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・部長

研究者番号：20382856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：SOX9は精巣分化に必須である。Sox9は遠位エンハンサーで制御されている。ヒト症例解析から、エンハンサーはSOX9上流0.6 Mbに位置する32.5 kbの配列中に存在することが示されており、マウスを用いてマウス配列中から711 bpの責任配列を同定していた。本研究では、711 bpがエンハンサー活性を有することを検討したが、その最中に他のグループから報告されたため中止した。また、711 bp中の機能配列の詳細マッピングをマウス受精卵とCRISPR/Cas9により行った。その結果、責任配列を1塩基まで同定した。この1塩基に結合する可能性のある因子を、データベース検索により推定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SOX9は精巣分化に必須である。Sox9の発現制御機構を解明することは、性分化の仕組みを理解するだけでなく、性分化疾患の原因解明にも重要である。本研究では、遺伝子改変マウスを作製することで、Sox9遺伝子の発現に重要であることが分かっている711塩基の配列の中から、その中心の役割をする配列を1塩基まで同定した。また、そこに結合する因子を推定できたため、今後その因子がどのようにして711塩基に作用するのかを解明することで、性分化の仕組みや性分化疾患の原因が明らかとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：SOX9 is essential for testes formation. Sox9 expression is regulated by an enhancer distal to Sox9 in the genome. In human, the enhancer is located somewhere in 32.5 kb region on 0.6 kb upstream to SOX9. Using mice and murine sequence corresponding to the 32.5 kb region, I identified 711 bp sequence as a responsible sequence. In this research, I tried to unveil the enhancer function of the 711 bp sequence by generation of transgenic mice. On the course of this analysis, another group reported that a fragment in the 711 bp sequence contains enhancer function. Next, I tried to map a responsible sequence in it by generation of mutant mice with microdeletion in the sequence by CRISPR/Cas9 system. The responsible sequence was successfully mapped at 9 bp. I generated mice with single nucleotide substitution in it, and single nucleotide was identified as the responsible sequence. Finally, I estimated a binding factor which binds to the single nucleotide by database search.

研究分野：発生生物学

キーワード：性分化 マウス ゲノム編集 遺伝子発言調節

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

SOX9 は軟骨形成、性決定に必須で、精巢分化の初期にも不可欠の遺伝子である。SOX9 の haploinsufficiency により発症する Campomelic dysplasia (CD)、Acampomelic dysplasia (ACD) は骨形成の異常が主徴である重度の先天性疾患であり、また XY の核型をもつ症例では約 2/3 で性分化疾患が見られる。これまでに CD、ACD 症例のゲノムが解析され、SOX9 の遺伝子自体に変異が見つかる症例と、SOX9 の遺伝子自体には変異がなくその周辺 2 メガベース (Mb) の転写単位が存在しない領域、いわゆるジーンデザートに転座や欠失などが起こっている症例が同定されている。後者の症例からジーンデザートにエンハンサーが存在し、それらの転座や欠失により SOX9 の発現量が低下したため、性分化疾患を伴う CD、ACD が発症したものと考えられている。近年申請者は骨形成に異常が全く存在しない XY 女性において、その SOX9 上流のジーンデザートの一部に欠失が存在していることを見いだした。胎児期生殖腺で SOX9 の発現低下が起こり、胎児期生殖腺が精巢へと分化しなかったため XY 女性になったと説明できる。また、他のグループからも同様の報告があり、XY 女性で共通に欠失している領域が SOX9 上流約 0.6 Mb に特定された。その領域は 32.5 kb で XYSR と名付けられ、ここに未同定の SOX9 の胎児期生殖腺エンハンサーが存在する。しかし、ヒトの症例から XYSR の責任配列となっているエンハンサーを同定することは困難である。

そこで、XYSR から SOX9 の胎児期生殖腺エンハンサーを CRISPR/Cas9 システムによりマウスをモデルに同定する研究を 2015 年に開始した。まずヒトの XYSR 配列を用いた比較ゲノム解析により、マウス Sox9 周辺ゲノム配列から XYSR に相当する配列を同定した (mXYSR と呼ぶ)。次に mXYSR の内外に 6 つの gRNA を設計し、すべてをまとめて Cas9 mRNA と共にマウス受精卵にマイクロインジェクションすることにより、mXYSR の nested deletion をマウス個体で作製した。その結果、gRNA1-gRNA6 を欠損したアレル 5 をホモに持つ個体だけでなく、gRNA1-gRNA2 を欠損したアレル 1 をホモに持つマウスは核型 XY でありながら雌となることが明らかとなり、mXYSR のエンハンサーを含む領域を 4.7 kb に狭めることに成功した。エンハンサー配列は進化上保存されていることが多いため、Sox9 が胎仔期生殖腺で発現していることが明らかとなっているヒト、マウス、オポッサムについて比較ゲノム解析を行うことにより、さらにこの領域を 711 bp まで狭めた。CRISPR/Cas9 システムによりこの配列を欠失したマウスを作製したところ、XY の核型でありながら雌を得た。このことから、711 bp の領域中にエンハンサー配列が存在することが明らかとなった。

### 2. 研究の目的

本研究では、この 711 bp がエンハンサーとして機能していることを明らかにし、さらにこの領域に存在するエンハンサーが機能する際に重要な配列の同定を目指す。また、重要配列を基に、エンハンサーが機能する際の分子機構を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1. 711 bp 配列のエンハンサー活性のトランスジェニックマウス作製による証明

711 bp 配列の欠損マウス解析からこの配列がエンハンサー活性を有すると考えられるため、トランスジェニックマウスを作製することによりエンハンサーの存在を検討した。

#### 2. 711 bp 配列中の機能に重要な配列の同定

野生型マウスと 711 bp 配列中をヘテロに欠損しているマウスをかけ合わせて得た受精卵に、2 つの gRNA を用いた CRISPR/Cas9 システムを導入し、711 bp 内に小さな欠失を誘導することで、711 bp 内の機能配列内を順次欠失したマウスを作製した。711 bp 内に小さな欠失を有するマウスの性染色体構成を確認し、XY である個体について、表現型としての雌雄を判別した。XY で雌になる領域を同定した。さらに、その領域内に gRNA を設計し、同様の実験を行うことで、機能配列の存在位置を明らかにした。このマッピングが数塩基までできたため、数塩基の中に 1 または 2 塩基の置換を誘導し、性染色体構成と表現型としての雌雄を判別し、711 bp 配列中の機能に重要な配列を詳細にマップした。

#### 3. 711 bp 配列が機能する際に必要な分子を探索

2 で同定した配列に対して、結合する分子を DNA 結合タンパク質/結合配列のデータベースから探索した。

### 4. 研究成果

(1) 711 bp がエンハンサーであることを検討するため、Sox9 プロモーター、LacZ、711 bp を順次繋いだ配列をトランス遺伝子としたトランスジェニックマウスを作製したが、エンハンサーの活性は確認されなかった。しかし、数を増やして解析していたときに、Gonen ら (Science 360:1469, 2018) により、この 711 bp を含む配列、Hsp68 プロモーター、LacZ を順次繋いだ配列

をトランス遺伝子としたトランスジェニックマウスが報告され、胎仔期雄生殖腺でのエンハンサーであることが報告されたため、*Sox9* プロモーター、*LacZ*、711 bp を順次繋いだ配列をトランス遺伝子としたトランスジェニックマウスの作製は中止した。

#### (2) 711 bp 配列中の機能に重要な配列の同定

野生型マウスと 711 bp 配列中をヘテロに欠損しているマウスをかけ合わせて得た受精卵に、2 つの gRNA を用いた CRISPR/Cas9 システムを導入し、711 bp 内に小さな欠失を誘導した結果、711 bp の中の 300 bp 程に責任配列が存在していることが明らかとなった。さらに、300 bp 程の中に gRNA を設計して解析した結果、106 bp にまで責任領域を狭めることができた。さらにこの解析を続け、9 bp にまで責任領域を狭めることに成功した。次に、9 bp の中の 2 塩基とその 2 塩基のうちの 1 塩基を野生型とは異なった配列に置換したマウスを作製した結果、XY 核型で外生殖器が雌型となった。このことから、711 bp の責任配列はこの 1 塩基の周辺に存在することが明らかとなった。

#### (3) 711 bp に結合する因子の探索

上記(2)で同定した 1 塩基に結合する因子を同定するため、1 塩基を含む周辺配列を DNA 結合タンパク質/結合配列のデータベースで検索した。その結果、1 塩基を含む配列が DNA 結合配列となっている一つの遺伝子ファミリーが結合する可能性が考えられた。この遺伝子ファミリーのうちいくつかは XY 核型の胎仔期生殖腺で発現しているため、そのうちの一つまたは複数がエンハンサーの機能に関与していると考えられた。この因子のノックアウトマウスは胎生致死である可能性があるため、今後組織特異的ノックアウトマウスの作製などにより、*in vivo* で実際にその因子が機能しているのかを検討していかなければならない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ogawa Y, Terao M, Hara S, Tamano M, Okayasu H, Kato T, Takada S	4. 巻 8
2. 論文標題 Mapping of a responsible region for sex reversal upstream of Sox9 by production of mice with serial deletion in a genomic locus.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17514
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-35746-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hara S, Takada S	4. 巻 63
2. 論文標題 Genome editing for the reproduction and remedy of human diseases in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 107 ~ 113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-017-0360-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高田修治
2. 発表標題 ゲノム編集技術によるマウス胎仔期生殖腺におけるSox9の発現をシスに調節する配列の探索.
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 ワークショップ「脊椎動物の性決定、性分化の分子機構」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川湧也、寺尾美穂、原聡史、玉野萌恵、岡安春佳、加藤朋子、高田修治
2. 発表標題 マウスを用いたゲノム編集による性分化疾患責任配列の1塩基レベルマッピング
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takada S
2. 発表標題 Identification of a regulatory sequence of Sox9 expression in gonads at single-nucleotide level
3. 学会等名 Symposium “Molecular Genetics of Mammalian Development”
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	寺尾 美穂 (TERAO MIHO)  (10792880)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・研究員   (82612)	