

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22388

研究課題名（和文）トランスポゾンの挿入によるほ乳類の性決定システムの進化

研究課題名（英文）Evolution of mammalian sex-determining system by insertion of transposons

研究代表者

立花 誠（Tachibana, Makoto）

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：80303915

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ほ乳類では、性決定遺伝子Sryによってオス化が促される。30年前に発見されて以降、Sryは単一エクソン遺伝子と信じられてきた。私たちは、マウスSry遺伝子座に隠れたエクソンが存在し、二つのエクソンからなるSry転写産物Sry-Tを発現していることを見出した。Sry-T欠損マウスはオスからメスに性転換し、Sry-Tを異所的に発現させたXXマウスはオスに分化した。Sry-Tが安定なタンパク質であるSRY-Tをコードしていたのに対し、旧来から知られているSRY-Sは分解を受ける不安定なタンパク質であった。私たちの研究成果は、SRY-Tこそが真の性決定因子であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Sryと呼ばれる遺伝子は、ほ乳類の性を決める（精巣を作る）ために必須です。ヒトを含めたすべてのほ乳類で、Sryはたったひとつのエクソンからなる遺伝子だと考えられていました。今回の私たちの研究は、マウスのSryがふたつのエクソンからなることを証明しました。Sryが発見されてから30年以上も経ちます。私たちの研究成果は、この間にずっと信じられてきた教科書の記載を書き換えるものとなりました。

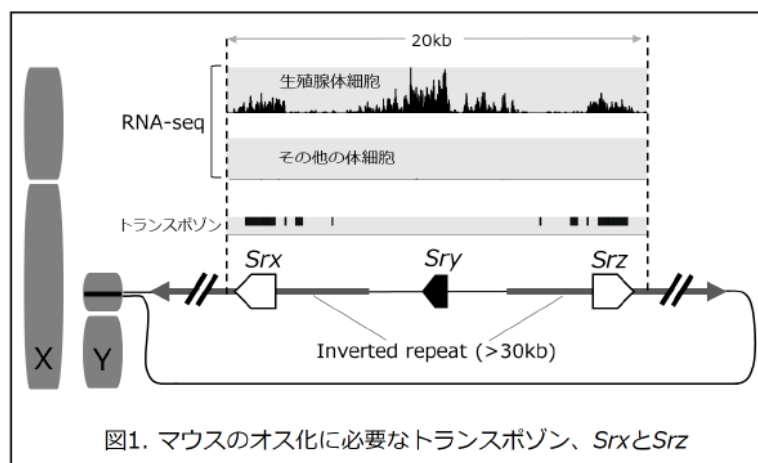
研究成果の概要（英文）：The mammalian sex-determining gene Sry induces male development. Since its discovery 30 years ago, Sry has been believed to be a single-exon gene. Here, we identified a cryptic second exon of mouse Sry and a corresponding novel transcript, two-exon Sry (Sry-T). XY mice lacking Sry-T were sex-reversed, and ectopic expression of Sry-T in XX mice induced male development. Sry-T mRNA is expressed similarly to that of canonical single-exon Sry (Sry-S), but SRY-T protein is expressed predominantly, due to the absence of a degron which we identified in the C-terminus of SRY-S. Sry exon2 appears to have evolved recently in mice, through acquisition of retrotransposon-derived coding sequence to replace the degron. Our findings suggest that in nature, SRY-T, not SRY-S, is the bona fide testis-determining factor.

研究分野：分子生物学

キーワード：性決定遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ほ乳類の Y 染色体には、性決定遺伝子である *Sry* が存在する。マウスの *Sry* の発現ピークは受精後 11.5 日であり、これが少しでも後ろにずれるとオス化がうまく進行しないことが明らかになっている。このような *Sry* 発現の時間的・量的・空間的 (= 細胞種特異的) な厳密性が、どのような分子機構によって担保されているの



か、これまで大きな謎であった。こういった背景の中で私たちは、2013 年に *Sry* 遺伝子座の抑制的エピゲノム修飾である H3K9 のメチル化を除去することがその発現に必須であることを突き止めた (Kuroki et al, Science 2013)。加えて、*Sry* 遺伝子座の H3K9 のメチル化のレベルはメチル基を付加する酵素である G9a/GLP と除去する酵素である *Jmjd1a* の拮抗作用によって厳密なチューニングを受けることを明らかにした (Kuroki et al, PLoS Genet 2017)。

私たちは、*Sry* の発現制御に関わるシス因子を同定すべく、*Sry* 遺伝子座の周辺で転写される機能配列 (エンハンサー RNA など) があるかどうかを調べた。その結果、*Sry* 遺伝子座近傍の逆位繰り返し配列の中にトランスポゾン配列が存在し、それが転写されていることを見出した (図 1)。このトランスポゾンは *Sry* 遺伝子座のそれぞれ 7kb 上流と 7kb 下流に、全く相同な配列として存在していた (図 1、発見当初は *Srx* と *Srz* と命名)。*Srx* と *Srz* の時間・空間的な発現の様式は、*Sry* のそれと一致していた。

Srx と *Srz* の欠損マウスを作製したところ、*Srx* 欠損マウスの全ての個体がオスからメスへ性転換していた (図 2)。トランスポゾンの挿入は宿主にとって脅威であり、遺伝子発現に悪影響を及ぼすのが一般的な概念である。私たちが見つけたものはそれとは異なり、トランスポゾンの挿入が性決定遺伝子の正しい発現を導いた可能性を強く示唆するものであった。

2. 研究の目的

上記の知見をもとに、「トランスポゾンの挿入が、ほ乳類の性決定様式の進化を加速させた」という全く新しい概念の証明に取り組む。上述の発見は、「*Sry* 遺伝子そのもの以外でオス化に必須な Y 染色体領域が存在する」という世界で初めてとなる知見であり、Y 染色体の機能の新たな側面を浮き彫りにするものである。加えて本申請は、ほ乳類の性決定システムの進化を探る上でも極めて重要な足がかりとなる。ウイルス由来の外來遺伝子の挿入は、内在遺伝子の翻訳領域や制御領域の機能破壊につながるため、生物にとって極めて危険なものとして捉えられてきた。本申請による研究提案は、このような既存の考え方を 180 度転換させる。すなわち、外來遺伝子の挿入が性決定遺伝子の時間的・量的・空間的な発現の厳密性の獲得をもたらした可能性を強く後押しする。このように本研究提案は、外來遺伝子の教科書的な概念を覆すものである。

3. 研究の方法

3-1. オス化における *Srx* と *Srz* の機能

前述したように、私たちは *Srx* がマウスのオス化に必須であることを明らかにしている。ゲノム編集技

術によって *Srz* 欠損マウスを作製し、*Srz* も *Srx* と同様にマウスのオス化に必要かどうかについて検証する。加えて、*Srx* と *Srz* の双方を欠損したマウスを作製し、*Srx* と *Srz* の機能の重複性、独立性について検証する。さらに、*Srx* のどの配列がオス化に重要なのかを明らかにする。具体的には、a) 転写終結シグナルを任意の部分に挿入してトランスポゾンの転写産物を短くする、b) 転写調節領域に相当する LTR 部分のみを欠損させて発現をなくす、c) 発現している非コード領域を別の配列 (EGFP 等) に置き換える、等の実験を試みる。



図2. *Srx*-KOマウスは雄から雌へ性転換する

3-2. *Sry* 発現における *Srx* と *Srz* の機能

マウスのオス化における *Srx* と *Srz* の作用点を明らかにする。その発現プロファイルから、関与が最も疑われる作用点は *Sry* の活性化である。E11.5 胎仔生殖腺を回収し、*Sry* の発現を定量的 PCR で調べる。さらに、*Srx* 欠損、*Srz* 欠損、*Srx/Srz* 両欠損のマウスにおける *Sry* の発現量を調べるとともに、3-1 の a) ~ c) で作製した各変位体の *Sry* の発現量を定量する。

3-3. *Sry* エピゲノム構築における *Srx* と *Srz* の機能

私たちは、*Sry* 遺伝子座の抑制的エピゲノム修飾である H3K9 のメチル化を除去することが *Sry* 発現に必須であることを突き止めた (Kuroki et al, Science 2013)。この場面では、H3K9 脱メチル化酵素が *Srx* あるいは *Srz* を標的として *Sry* 遺伝子座へとリクルートされる可能性について調べる。私たちが開発した方法によって各変異体マウスの胎仔期生殖腺から体細胞を精製し、クロマチン免疫沈降法によって *Sry* 遺伝子座の H3K9 メチル化のレベルを調べる。

4. 研究成果

ゲノム編集によって *Srz* を欠損したマウスを作製したところ、正常なオスに分化し、妊孕性にも問題がなかった。よって、*Srz* はオス化に必須ではないことが示された。

CAGE-seq によって転写開始点の解析を行ったところ、当初の予想に反し、*Srx* の 5'末端にも *Srz* の 5'末端にも CAP 構造を示すピークが見られなかった。この結果は、*Srx* と *Srz* は独立した転写産物ではなく、他の遺伝子のエキソンである可能性を強く示唆するものであった。*Srz* 遺伝子座を欠損したマウスの生殖腺の遺伝子発現を検証した結果、*Srx/Srz* 配列に相当する転写産物は消失していなかった。その一方で、*Srx* 遺伝子座を欠損したマウスの生殖腺の遺伝子発現を検証した結果、*Srx/Srz* 配列に相当する転写産物が消失した。このことから、*Sry* の近隣のパンドローム配列から転写産物が生み出されているのは *Srx* 遺伝子座であることが推察された。*Srx* も *Srz* も全く同じ配列を有しているため、*Srx* 転写産物が自動的に *Srz* にマッピングされていることが強く示唆された。Long-read RNA-seq 解析を行ったところ、*Srx* は、これまで知られていた *Sry* のエキソンからのスプライシングを受けた転写産物、すなわち *Sry* の第 2 エキソンであることが分かった (図 3)。

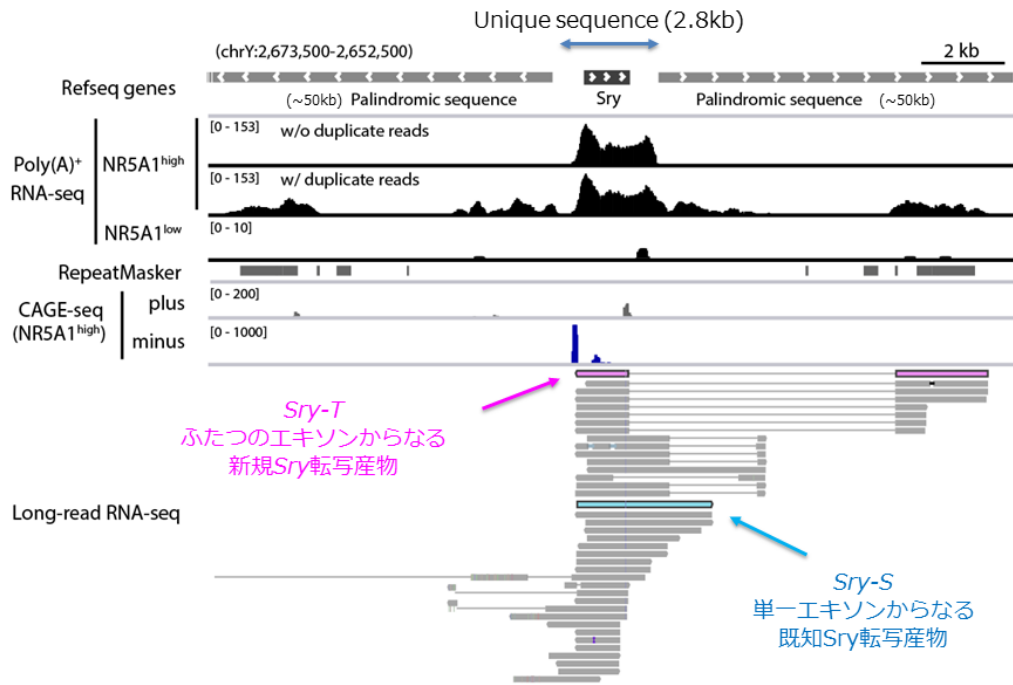


図3. *Sry*の第2エクソンと、新規転写産物*Sry-T*の発見

これまでの研究成果により、私たちは *Srx* が *Sry* の第 2 エクソンであることを示した。ふたつのエクソンからなる新規の *Sry* 転写産物を *Sry-T*、ひとつのエクソンからなる既知の *Sry* 転写産物を *Sry-S* と命名した。*Sry* 第 2 エクソンを欠損したマウスで、性決定期生殖腺における *Sry-S* の発現量の定量を行ったところ、当初の予想の予想に反し、*Sry-S* の転写量に変化がなかった。すなわち、*Sry* 第 2 エクソンを欠損したマウスは、*Sry-S* は通常通り発現していてもオス化できないことが明らかになった。

上述の研究背景結果は、*Sry-S* の翻訳産物である *SRy-S* が、*Sry-T* が存在していない状況では性決定因子として機能していないことを意味した。そこで私たちは、*SRy-S* と *SRy-T* のアミノ酸配列の違いに着目した。*SRy-S* と *SRy-T* は転写活性化に必須なアミノ酸は共通であるが、C 末配列が異なる。*SRy-S* に特異的な C 末の 18 アミノ酸端配列を S18、*SRy-T* に特異的な C 末の 15 アミノ酸端配列を T15 と命名し、それらを EGFP の C 末端に融合したタンパク質を発現させるようなレンチウイルスを作製した。その発現をフローサイトメーターで解析したところ、EGFP-T15 の蛍光強度は EGFP-S18 より 10 倍以上も高かった(図 4 の上図)。

EGFP-S18 を発現する細胞をタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド(CHX)で処理すると、その量が大幅に低下した。プロテアソーム阻害剤である MG132 を CHX と同時に加えると、EGFP-S18 のタンパク質の量の低下が抑えられた(図 4 の下図)。このことは、*SRy-S* の C 末端の 18 アミノ酸はタンパク質分解モチーフであるデグロンであることを示した。一方で、*SRy-T* は C 末端にデグロン配列を持たないため、安定なタンパク質であった。これらの研究成果は、生体内では *SRy-T* が真の性決定因子として機能しており、*SRy-S* はタンパク質が不安定なため、性決定因子として機能できないことを示した。

このことを裏付けるため、*Sry* 第 2 エクソンを欠損したマウスを使い、*SRy-S* の C 末端デグロン配列を改変したマウス(V394P マウス)を作製し、その表現型を調べた。その結果、*SRy-S*(V394P)の発現レベルは優位に上昇が観察された。加えて、*Sry* 第 2 エクソンを欠損した *SRy-S*(V394P) マウスは正常にオスに分化し、妊孕性も、認められた。この実験により、既知 *SRy* である *SRy-S* はデグロン含有の不安定

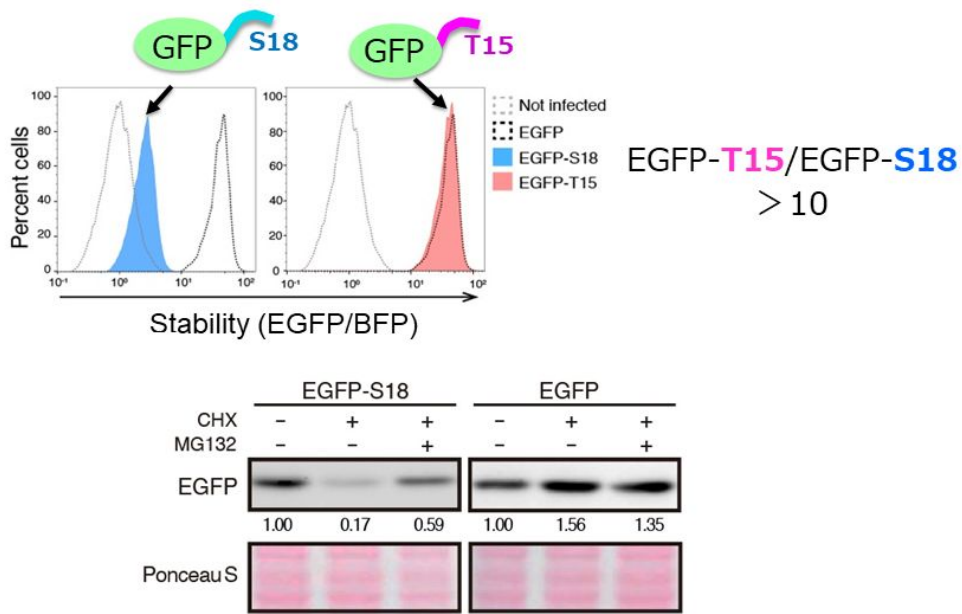


図4. SRY-SのC末端配列はタンパク質分解モチーフ（デグロン）である
 CHX, タンパク質合成阻害剤; MG132, プロテアソーム阻害剤

型性決定因子であり、それ単独では XY マウスのオス化に不十分であることが示された。これら一連の研究により、マウスの生体内で機能している真の性決定因子は、単一エクソンでコードされている既知の SRY-S ではなく、私たちが今回発見したふたつのエクソンでコードされている SRY-T であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 宮脇慎吾、立花誠	4. 巻 39
2. 論文標題 マウスの性決定遺伝子Sryにおける「隠れエキソン」の発見と、それがコードする真の性決定因子SRY-Tの発見	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 571 574
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takuma Nakatsuka, Keisuke Tateishi*, Hiroyuki Kato, Hiroaki Fujiwara, Keisuke Yamamoto, Yotaro Kudo, Hayato Nakagawa, Yasuo Tanaka, Hideaki Ijichi, Tsuneo Ikenoue, Takeaki Ishizawa, Kiyoshi Hasegawa, Makoto Tachibana, Yoichi Shinkai, Kazuhiko Koike	4. 巻 12
2. 論文標題 Inhibition of histone methyltransferase G9a attenuates liver cancer initiation by sensitizing DNA-damaged hepatocytes to p53-induced apoptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death and Disease	6. 最初と最後の頁 99 111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41419-020-03381-1	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 Shingo Miyawaki, Shunsuke Kuroki, Ryo Maeda, Naoki Okashita, Peter Koopman, *Makoto Tachibana	4. 巻 370
2. 論文標題 The mouse Sry locus harbors a cryptic exon that is essential for male sex determination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 121 124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.abb6430	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 該当する

1. 著者名 Hiroyuki Kato, Keisuke Tateishi*, Hiroaki Fujiwara, Hideaki Ijichi, Keisuke Yamamoto, Takuma Nakatsuka, Miwako Kakiuchi, Makoto Sano, Yotaro Kudo, Yoku Hayakawa, Hayato Nakagawa, Yasuo Tanaka, Motoyuki Otsuka, Yoshihiro Hirata, Makoto Tachibana, Yoichi Shinkai, Kazuhiko Koike	4. 巻 17
2. 論文標題 Deletion of Histone Methyltransferase G9a Suppresses Mutant Kras-driven Pancreatic Carcinogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Genomics Proteomics	6. 最初と最後の頁 695 705
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/cgp.20224	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 Shunsuke Kuroki, Ryo Maeda, Masashi Yano, Satsuki Kitano, Hitoshi Miyachi, Mikiko Fukuda, Yoichi Shinkai, *Makoto Tachinana	4. 巻 15
2. 論文標題 H3K9 demethylases JMJD1A and JMJD1B control prospermatogonia to spermatogonia transition in mouse germline	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 424 438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.06.013	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 Hisashi Ideno, Kazuhisa Nakashima, Koichiro Komatsu, Ryoko Araki, Masumi Abe, Yoshinori Arai, Hiroshi Kimura, Yoichi Shinkai, Makoto Tachibana, Akira Nifuji	4. 巻 137
2. 論文標題 G9a is involved in the regulation of critical bone formation through activation of Runx2 function during development.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 e115332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115332 e115332	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 宮脇慎吾、立花誠	4. 巻 71
2. 論文標題 遺伝子改変マウスの作成と技術進歩	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生産と技術	6. 最初と最後の頁 15, 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyawaki S, *Tachibana M.	4. 巻 134
2. 論文標題 Role of epigenetic regulation in mammalian sex determination.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Top Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 195, 221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.ctdb.2019.01.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Au Yeung WK, Brind'Amour J, Hatano Y, Yamagata K, Feil R, Lorincz MC, Tachibana M, Shinkai Y, *Sasaki H.	4. 巻 27
2. 論文標題 Histone H3K9 Methyltransferase G9a in oocytes is essential for preimplantation development but dispensable for CG methylation protection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 282, 283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.03.002.	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 該当する

1. 著者名 Okashita N, Kuroki S, Maeda R, *Tachibana M.	4. 巻 9
2. 論文標題 TET2 catalyzes active DNA demethylation of the Sry promoter and enhances its expression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 13462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50058-7	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 Sameda M, Kuroki S, Miyachi H, Tachibana M, *Yonehara S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Caspase-8, receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1), and RIPK3 regulate retinoic acid-induced cell differentiation and necroptosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Death Differ.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41418-019-0434-2.	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8件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 立花 誠
2. 発表標題 真のオス化因子をコードするマウスSryの "隠れ" エキシソンの発見
3. 学会等名 日本エピジェネティクス研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立花 誠、宮脇 慎吾、黒木 俊介、前田 亮、岡下 修己、Peter Koopman
2. 発表標題 マウスSry遺伝子座には、これまで未同定でかつオス化に必須な役割を有する第2エキソンが存在する
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 立花誠
2. 発表標題 哺乳類の生殖における抑制的ヒストン修飾の役割
3. 学会等名 2019 遺伝研研究会 有性生殖に関わる染色体・クロマチン・核動態に関する研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立花誠
2. 発表標題 マウス性決定におけるエピゲノム制御の役割
3. 学会等名 日本DoHAD学会学術集会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立花誠
2. 発表標題 H3K9のメチル化による生殖機能のエピジェネティック制御
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立花誠
2. 発表標題 Function of HP1 in H3K9 methylation dynamics
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮脇慎吾、黒木俊介、前田亮、岡下修己、立花誠
2. 発表標題 マウスY染色体のInverted repeat配列に存在する新規性決定領域の発見
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Tachibana
2. 発表標題 Dynamic regulation of H3K9 methylation in germ cell development
3. 学会等名 Gordon Research Conferences on Germinal Stem Cell Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪大学生命機能研究科立花研HP http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/072/ 新学術領域研究「性スペクトラム」 http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/sexspectrum/</p>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オーストラリア	Queensland Universtity			
カナダ	Th University of Blitish Columbia			
フランス	IGMM			