

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19262

研究課題名（和文）真の性決定遺伝子Sry-Tによる性決定の転写制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of Sex Determination by the Sex-Determining Gene Sry-T

研究代表者

黒木 俊介（Kuroki, Shunsuke）

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授

研究者番号：50735793

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Y染色体上の遺伝子Sryは、雄への分化を誘導する性決定のマスター転写因子である。しかし、1991年にSryが発見されてから約30年経つにも関わらず、Sryが雄分化を誘導する際の機能的な結合パートナーは未だに同定されていない。本研究では、BioID法を駆使してSry-Tと相互作用する可能性のある2つの遺伝子を同定した。これらの欠損マウスをゲノム編集により作出し、染色体XYの個体が雌に性転換するか調べた結果、うち1つの遺伝子について、そのホモ欠損体が性染色体XY型であるにも関わらず雌となることを見いだした。すなわちこの遺伝子が性決定に必須なSryのコファクターである可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ほ乳類Y染色体上の遺伝子Sryは、雄への分化を誘導する性決定のマスター転写因子である。しかし、1991年にSryが発見されてから約30年経つにも関わらず、Sryが雄分化を誘導する際の機能的な結合パートナーは未だに同定されていない。本研究では、BioID法を駆使してSry-Tと相互作用する可能性のある2つの遺伝子を同定した。本研究成果は、ほ乳類性決定の新たなメカニズム解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The Sry gene on the mammalian Y chromosome is the master transcriptional regulator that induces male differentiation. However, despite nearly 30 years passing since the discovery of Sry in 1991, the functional binding partners that allow Sry to induce male differentiation have remained unidentified. In this study, we utilized the BioID method to identify two potential interacting genes with Sry. We generated knockout mice for these genes using genome editing and examined whether XY individuals underwent sex reversal to females. We found that homozygous knockout of one of the genes caused XY individuals to develop as females, suggesting this gene may be an essential cofactor for Sry in sex determination.

研究分野：発生生物学

キーワード：性決定

1. 研究開始当初の背景

転写因子が標的遺伝子を制御する際には、各々が標的に応じた適切な結合パートナーと複合体を形成することが重要である。ほ乳類 Y 染色体上の遺伝子 *Sry* は、雄への分化を誘導する性決定のマスター転写因子である。種の保存という観点から *Sry* は最も重要な転写因子のひとつである。しかし、1991 年に *Sry* が発見されてから約 30 年が経つにも関わらず、*Sry* が雄分化を誘導する際の機能的な結合パートナーは未だに同定されていない。

2020 年、我々はこの状況の突破口となりうる新たな知見を発表した (Miyawaki S, Kuroki S et al., *Science* 2020)。すなわち、i) これまで報告・研究されてきた古典的 *Sry* はタンパク質の配列末端に分解シグナルが存在し、実際にはタンパク質としては殆ど発現しないこと、ii) *Sry* は近傍の反復配列に隠された第 2 エクソンが存在し、そこから発現する分解シグナルの無いバリエント (*Sry-T* と命名) こそが真の性決定遺伝子であることを発見した。今回の *Sry-T* の発見を契機として、*Sry* 転写制御メカニズムの全容解明は今まさに緒に付いた状況にある。

2. 研究の目的

Sry の結合パートナーが長らく不明だった 2 つ目の理由は、*Sry* の発現様式が非常に限られる点である。例えばマウスの場合、*Sry* を発現する細胞は生涯を通して染色体 XY 型の胎児生殖腺の一部のみ、発現時期も性決定期 (胎生 11.5 日) の前後 6 時間だけである。したがって、免疫沈降など一般的な手法による結合タンパク質の同定は難しかった。2013 年、この問題解決の糸口として近依存性標識法が報告された。この方法は、目的タンパク質に Biotin 標識酵素 (BirA) を融合し、近接した相互作用タンパク質を Biotin 化する。いったん Biotin 化したタンパク質は、BirA 融合タンパク質が消失した後でも回収し同定可能である。申請者は、この方法が *Sry-T* が形成するタンパク質複合体の解明に有効であると考え注視していた。しかし問題点として、BirA の Biotin 標識反応が 24 時間を要するため、*Sry* のように一過性にしか発現しない分子への適用は難しく、実際の使用は見送っていた。しかし 2018 年、反応時間を 1 時間に短縮した BirA 変異体 TbID が報告され (Branon et al., *Nat Biotechnol.* 2018)、その問題も解消された。

上述した経緯から、*Sry-T* に TbID を融合したノックインマウスを用いて、*Sry-T* の相互作用タンパク質を同定する本研究の着想に至った。本研究では、真の性決定遺伝子 *Sry-T* が形成するタンパク質複合体を同定し、*Sry-T* による性決定の転写制御メカニズムの解明することを目指した (Fig1)。

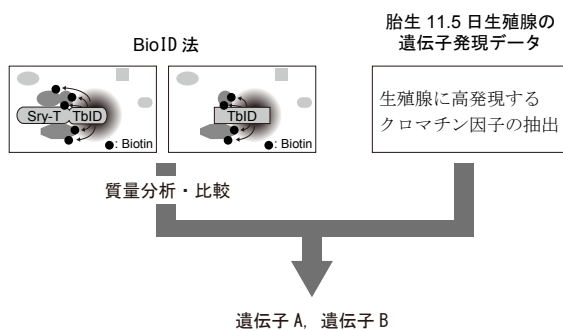


Fig1. BioID法による *Sry* 相互作用タンパク質の同定

3. 研究の方法

(1) 近依存性 Biotin 化酵素のノックインマウスの作製

Biotin 化酵素による近依存性標識法を用いて、*Sry-T* との相互作用タンパク質を同定する目的で、*Sry-T* 遺伝子の末端に *TbID* を融合したノックインマウスの作製を試みた。

(2) 近依存性 Biotin 化酵素のノックイン ES 細胞の樹立と BioID 解析

上記(1)が上手くいかなかった時の大胆策として、*Sry-T* に *TbID* を連結した誘導タンパク質を発現する ES 細胞株を樹立した。比較用のコントロールとして、核移行シグナルを付加した TurboID (TurboID-NLS) を発現する ES 細胞株も樹立した。これらの細胞を用いて、biotin 化タンパク質をプルダウンで回収した後、サンプルを LC-MS/MS による質量分析にかけ、タンパク質同定および相対定量数値化を行い、*Sry-T* に特異的に相互作用するタンパク質のリストを作成した。

(3) *Sry-T* 結合パートナー候補遺伝子の欠損マウスの作製と解析

上記(2)で同定した遺伝子 A/B が性決定に関与するならば、これらの遺伝子を欠損したマウスは性転換を呈することが予想される。これを検証する目的で、遺伝子 A または B の遺伝子欠損マウスを作成し F0 世代で解析した。受精卵エレクトロポレーション法により各遺伝子を欠損する胚を作製し、偽妊娠マウスに移植した後、出生した仔の生殖腺 (精巣または卵巣) から性転換の有無を判定した。

4. 研究成果

(1) 近依存性 Biotin 化酵素のノックインマウスの作製

最初に、最も活性の強い近依存性 Biotin 化酵素である TurboID を *Sry-T* 遺伝子 CDS 末端にノックインしたマウスを作製した。しかしこのマウスの F0 世代個体は雄から雌への性転換の表現型を示し、F1 世代の個体を得ることができなかった。TurboID の酵素活性が強すぎたことに性転換の原因があると考え、次に比較的活性がマイルドな Biotin 化酵素 AirID を *Sry-T* 遺伝子座にノックインしたマウスを作製した。この際、*Hsp-Sry* トランスジーンをもつ受精卵をゲノム編集に用いた。結果、*Sry Tg; Sry-T-AirID* マウスの F0 世代の雄を取得できた。しかし、マウスを元に *Sry-T-AirID* のマウス系統樹立を試みたが、F1 世代の *Sry-T-AirID* の XY 型の個体は雌に線転換した。結果として、近依存性 Biotin 化酵素のノックインマウスの系統の樹立はできなかった。

(2) 近依存性 Biotin 化酵素のノックイン ES 細胞の樹立と BioID 解析

MS 解析で得られた遺伝子リストを、申請者が既に取得している胎生 11.5 日生殖腺の遺伝子発現データと照合した。結果、特に生殖腺に発現する *Sry-T* 結合クロマチン因子の候補として遺伝子 A と遺伝子 B を同定した。

(3) *Sry-T* 結合パートナー候補遺伝子の欠損マウスの作製と解析

遺伝子 A をホモ欠損した個体 (XY 型) の生殖腺はすべて精巣であった (n=3)。一方で、遺伝子 B をホモ欠損した個体 (XY 型) の生殖腺はすべて卵巣であった (n=13)。これにより、遺伝子 B はオス化に必須なことが示された。

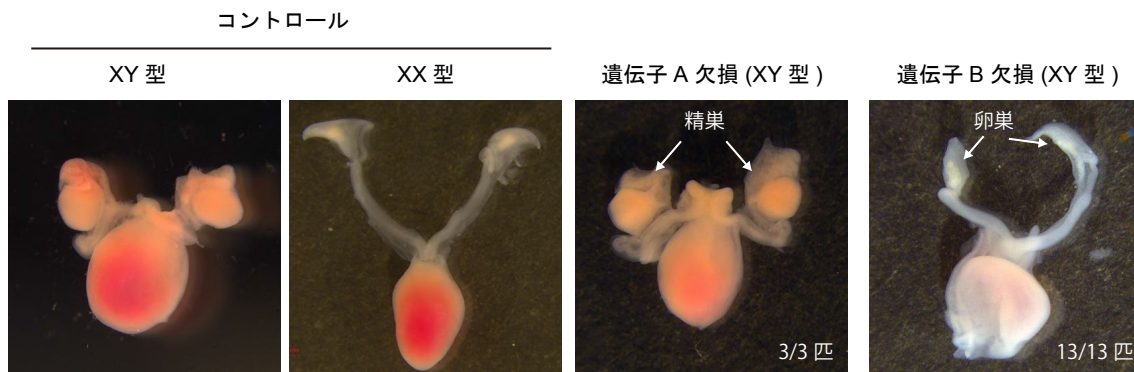


Fig2. 遺伝子欠損マウスにおける性転換の表現型解析

遺伝子 A または B の KO マウスをゲノム編集により作製し、F0 世代のホモ欠損体 (XY) 型の雌雄を生後 0 日で判定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒木俊介
2. 発表標題 全能性獲得における母性H3K9脱メチル化酵素 Jmjd1a/bの解析
3. 学会等名 新学術領域「全能性プログラム」領域会議（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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