

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2004～2008

課題番号：16086203

研究課題名（和文） 哺乳類における時間／空間的性決定機構の解明

研究課題名（英文） A spatiotemporal SRY action in mammalian gonadal sex determination

研究代表者

金井 克晃 (KANAI YOSHIKIRA)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：30260326

研究成果の概要：

本研究課題により、新たに *Sry* 機能解析用のモデル動物の樹立を目的とし、マウス *Hsp70* プロモーターに *Sry* を連結した発現ベクターを用いて、*Sry* 発現様式を改変したトランスジェニック (Tg) マウスの樹立を行った。その結果、ステージ・領域非特異的かつ恒常的に *Sry* 発現する XX 精巢の性転換ライン(#40、#46) 2 系統を樹立した。さらに、通常飼育下で繁殖能があり (XX 卵巣)、人為的に熱ショック (HS) を与えることにより、卵巣から XX 精巢へと性転換させることができる *Sry* 誘導モデルマウス (#44) の樹立に初めて成功した。本モデルマウスを用いて、1) 性分化初期 (11.0～11.25dpc) での *Sry* 発現が精巢誘導に必須であること (精巢誘導の臨界期の決定)、2) 初期の *Sry* 発現が *Wnt4* の発現の抑制に必須であること、3) SRY のみならず FGF9 因子が時空間的な *Sox9* 発現制御に重要であること、4) *Sry* 直下のカスケードに雄特異的に性腺にエネルギー供給する分子メカニズムの存在、5) *Sry* 単独では完全な精子形成能を持つセルトリ細胞に分化できないこと (XX/*Sry* セルトリ細胞の機能不全)、6) *Sry* 誘導により 6 時間以内に発現誘導される SRY 標的遺伝子を新たに 78 個の遺伝子を同定 - などを見い出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004 年度	9,100,000	0	9,100,000
2005 年度	9,100,000	0	9,100,000
2006 年度	9,100,000	0	9,100,000
2007 年度	9,100,000	0	9,100,000
2008 年度	9,100,000	0	9,100,000
総計	45,500,000	0	45,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：SRY, トランスジェニック、性決定、マウス

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の性決定は、Y染色体上の精巣決定遺伝子 Sry (Sex determining region on Y)の有無により支配されており、マウスでは、胎子の性分化期の生殖原基において、Sry が、一過性(10-12 時間)に中央部から前後端に波状に発現することにより、未分化性腺を卵巣から精巣に分化誘導する。しかし、当時、Sry が直接どの精巣/卵巣遺伝子を制御しているのか、Sry 自体の機能については不明であった。この Sry の標的遺伝子の同定、つまり、Sry の機能の解析の立ち後れの大きな原因としては、性腺での Sry の発現が非常に短時間、低発現であること、Sry から精巣誘導可能な細胞レベルの実験系が無いことなどが挙げられ、新たな Sry の機能解析ができる実験系あるいはモデル動物の樹立が望まれていた。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、新たな Sry 機能解析用のモデル動物の樹立を目的とし、時間/空間的な Sry 発現パターンを改変したトランスジェニック(Tg)マウス、誘導型プロモーターに連結した Sry 遺伝子を持つ Tg マウスを作出することを目的とした。本研究課題では、このモデルマウスを用いて、異なったステージでの Sry 発現の誘導により、1) 生殖原基での Sry による精巣誘導可能な critical period (卵巣への commitment ステージ) の決定、2) 既知の各性分化関連因子の Sry との直接的な関連性について新たなデータの提示を行い、さらに、3) Sry 発現の誘導可能な XXTg の生殖腺を用いて、同調的な Sry の発現誘導の有無により、DNA チップを用いた subtraction 法を試み、生殖原基の初期性分化の遺伝子群を網羅的に同定、単離し、Sry 下流の遺伝子ネットワークを解明することを主目的とした。

## 3. 研究の方法

マウス Hsp70.3 プロモーター (-617~+70bp) に Sry 遺伝子 (+8288~13780 ; first ATG から polyA site を含む) を連結した発現ベクター (HSP-Sry) を構築し、トランスジェニックマウス系統を樹立する。その中で、通常飼育下で繁殖能があり (XX 卵巣)、人為的に熱ショック (HS) を与えることにより、卵巣から

XX 精巣へと性転換させることができるラインを樹立する。このマウスを利用して、各ステージで熱ショック (HS) により SRY の精巣の分化能の臨界期、SRY 標的因子である SOX9、さらにその下流因子の発現解析を行い、時空間的な SRY 機能の制御を決定する。さらに、SOX9 発現の上昇が認められた卵巣を用いて、HS による Sry 発現による下流遺伝子群の動態を経時的にマイクロアレイにより解析し、SRY 直下の標的遺伝子、エネルギー代謝、精巣特異的な遺伝子ネットワークを解明する。

## 4. 研究成果

マウス Hsp70 プロモーターに精巣決定遺伝子 Sry を連結した発現ベクターを用いて、Sry 発現様式を改変したモデルマウスの樹立を行った。その結果、ステージ・領域非特異的に恒常的に発現する XX 精巣の性転換ライン (#40、#46) 2 系統を樹立した (Kidokoro et al., Dev Biol, 2005)。さらに、通常飼育下では繁殖能のある雌 (XX 卵巣) を示し、人為的に (熱ショックにより) 卵巣から XX 精巣へと性転換できる Sry 誘導モデルマウス (#44) の樹立に初めて成功した (Hiramatsu et al., Development, 2009; Research Highlights in Nature 456, 678, 2008)。

(1) 恒常的 Sry 発現を示す XX 精巣ライン (#40、#46) での性分化関連遺伝子群の動態：主に #40 の恒常的 Sry 発現ラインを用いて、SRY 標的遺伝子として考えられている Sox9 発現誘導に関して解析を行った。その結果、Sry 単独では未分化性腺における Sox9 の発現時期・部位を異所的に誘導することが出来ないことが判明し、Sox9 の時間/空間的な発現制御には SRY 以外の別の因子が重要であることが示唆された (Kidokoro et al., Dev Biol, 2005)。そこで、この時空間的な制御因子を同定するため、未分化生殖原基の前後軸に沿った 3 分割フラグメント・再構築培養を用いて、詳細なスクリーニングを行った。その結果、この制御因子が、以前より精巣形成に重要な成長因子の一つとして知られていた FGF9 であることが判明した。実際に、FGF9 が Sry 発現に少し遅れて Sry と類似した発現パターンを示すこと、さらに恒常的 Sry 発現の XX 精巣ライン (#40) の性腺に FGF9 添加により、Sox9 の発現が生殖腺全体に異所的に早まることを明らかにしている (Hiramatsu et

al., Development, 2010)。一方、性分化期の性腺では、Sry 発現に依存して PI3K-AKT を介した精巣特異的なグリコーゲン合成/蓄積が起こることを既に見出し、Sry 直下の下流カスケードに雄特異的に性腺にエネルギー供給する分子メカニズムが存在することを発見した (Matoba et al., J Cell Sci, 2005)。この精巣特異的なグリコーゲン合成の活性化に関して恒常的 Sry 発現マウス#40 を用いて解析した結果、発生初期から恒常的に Sry が発現することにより、Sry 依存的にグリコーゲンの合成が早まることが明らかとなった。以上の結果は、精巣特異的なグリコーゲン合成/蓄積は、Sry により直接的に制御されていること、Sox9 と別の経路/上流に位置することを強く示唆する (Matoba et al., Dev Biol, 2008)。

(2) 熱ショック (HS) による Sry 誘導ライン (#44) を用いた SRY の機能解析:

① 精巣決定の critical period (11.0~11.25dpc の約 6 時間): Sry 誘導可能 #44 ラインを用いて、器官培養系を用いて Sry による雄化を誘導できる臨界期 (精巣分化の critical period) を決定した。各発生ステージにおける XX Tg 未分化生殖腺を HS 処理後、4 日間の器官培養により性分化を誘導した。その結果、XX 精巣へ性転換した個体数は、10~11ts では 1/11 (9%), 12~13ts (11.0dpc): 15/19 (79%), 14ts: 7/9 (78%), 15ts: 3/11 (27%), 16ts (11.4dpc) 以降: 0/15 (0%) であることが判明した。これは、Sry により精巣へ誘導可能な critical period が 11.0~11.25dpc (12-14ts) のわずか約 6 時間の window であり、精巣への性分化には、Sry 発現開始初期における Sry 機能が重要であることを強く示唆する。詳細なマーカ解析から、16ts 以降は、HS 処理を施しても Sry から Sox9 間の pathway が、前後軸に沿った性腺の前/後部領域において正常に誘導できないこと、また、15~16ts においては、中央部領域に限局して、一部の細胞が SOX9 陽性と 3β-HSD 陽性を示すこと、17~24ts (12.0dpc) までは、中央部の中腎側において十数個の 3β-HSD 陽性細胞の集団が誘導されることが判明した。この結果は、卵巣への分化過程において、Sry により精巣化を誘導できる前駆細胞が、12.0dpc までは性腺中央部に存在することを示唆する。

② HS 処理による Sry の異所的発現に対する Sox9 の誘導: 恒常的 Sry 発現ラインを用いた解析により、10.5~16.5dpc の胎子各臓器における Sry の異所的発現に対する Sox9 の異所的な発現誘導は生殖腺以外では認められなかった。

③ 11.5dpc の XX Tg 性腺を用いて、Sry 誘導による様々な遺伝子の発現変化をマイクロアレイにより解析を行った。その結果、Sry

依存的に発現量の上昇した 78 個の遺伝子を同定した。さらに、他の研究グループの SF1 陽性細胞でのアレイ解析データと比較することにより、11 個の標的遺伝子候補に絞る事に成功した。この遺伝子群を Sigt 遺伝子 (Sry-induced gonadal transcripts) と命名した。さらに、各 Sigt 遺伝子について、恒常的に生殖腺内で Sry 発現が活性化している Sry 恒常発現型マウス (#40) における発現パターンを解析した。その結果、4 つの Sigt 遺伝子が、Sry 恒常活性化 XY 生殖腺で発現が上昇していた。この結果は、これら 4 つの Sigt 遺伝子が Sry の標的遺伝子であることを強く示唆された。

④ その他に、本 Tg マウスを利用して、XX/Sry セルトリ細胞の精子形成不全を見出し、マイクロアレイ解析により 5 つの Y 染色体上の候補遺伝子を同定した (Ishii et al., Development, 2007)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① Kidokoro, T., Matoba S., Hiramatsu, R., Fujisawa, M., Kanai-Azuma, M., Taya, C., Kurohmaru, M., Kawakami, H., Hayashi, Y., Kanai, Y., Yonekawa, H. (2005) Influence on spatiotemporal patterns of a male-specific Sox9 activation by ectopic Sry Expression during early phases of testis differentiation in mice. Dev. Biol. 278(2), 511-525.
- ② Matoba, S., Kanai, Y., Kidokoro, T., Kanai-Azuma, M., Kawakami, H., Hayashi, Y., Kurohmaru, M. (2005) A novel Sry-downstream cellular event which preserves the readily available energy source of glycogen in mouse sex differentiation. J. Cell Sci. 118(7), 1449-1459.
- ③ Kanai, Y., Hiramatsu, R., Matoba, S., Kidokoro, T. (2005) From SRY to SOX9 : mammalian testis differentiation. J. Biochem. 138, 13-19
- ④ Ishii, M., Kanai, Y., Kanai-Azuma, M., Tajima, Y., Tay, T.W., Kidokoro, T., Sanai, Y., Kurohmaru, M., Hayashi, Y. (2005) Adhesion activity of fetal gonadal cells to EGF and discoidin domains of MFG-E8, a secreted integrin-binding protein which is transiently expressed in mouse early gonadogenesis. Anat. Embryol. 209(6):485-494.
- ⑤ Matsuura, R., Kogo, H., Ogaeri, T.,

- Miwa, T., Kuwahara, M., Kanai, Y., Nakagawa, T., Kuroiwa, A., Fujimoto, T., Torihashi, S. (2006) Crucial transcription factors in endoderm and embryonic gut development are expressed in gut-like structures from mouse ES cells. *Stem Cells*, 24 (3): 624-630.
- ⑥ Matsui, M., Kanai-Azuma, M., Hara K., Matoba, S., Hiramatsu, R., Kawakami, H., Kurohmaru, M., Koopman, P., Kanai Y. (2006) Redundant roles of Sox17 and Sox18 in postnatal angiogenesis in mice. *J. Cell Sci.* 119 (17): 3513-3526.
- ⑦ Suzuki, T., Kanai Y., Hara, T., Sasaki, J., Sasaki, T., Kohara, M., Maehama, T., Taya, C., Shitara, H., Yonekawa, H., Frohman, M.A., Yokozeki, T., Kanaho, Y. (2006) Crucial role of the small GTPase ARF6 in hepatic cord formation during liver development. *Mol. Cell. Biol.* 26(16): 6149-6156.
- ⑧ Sohn, J., Natale, J., Chew, L-J., Belachew, S., Cheng, Y., Aguirre, A., Lytle, J., Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Gallo, V. (2006) Identification of Sox17 as a transcription factor that regulates oligodendrocyte development. *J. Neurosci.* 26(38): 9722-9735.
- ⑨ Ishii, M., Tachiwana, T., Hoshino, A., Tsunekawa, N., Hiramatsu, R., Matoba, S., Kanai-Azuma, M., Kawakami H., Kurohmaru, M., Kanai, Y. (2007) Potency of testicular somatic environment to support spermatogenesis in XX/Sry transgenic male mice. *Development* 134, 449-454.
- ⑩ Wilhelm, D., Hiramatsu, R., Mizusaki, H., Widjaja, L., Combes, A.N., Kanai, Y., Koopman, P. (2007) SOX9 regulates prostaglandin D synthase gene transcription in vivo to ensure testis development. *J. Biol. Chem.* 282, 10553-10560.
- ⑪ Sakamoto, Y., Hara, K., Kanai-Azuma, M., Matsui, T., Miura, Y., Tsunekawa, N., Kurohmaru, M., Saijoh, Y., Koopman, P., Kanai, Y. (2007) Redundant roles of Sox17 and Sox18 in early cardiovascular development of mouse embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360(3):539-544.
- ⑫ Honda, A., Hirose, M., Hara, K., Matoba, S., Inoue, K., Hiura, H., Miki, H., Kanai, Y., Kono, T., Shinohara, T., Ogura A. (2007) Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(30):12389-12394.
- ⑬ Shimoda, M, Kanai-Azuma, M., Hara, K., Miyazaki, S., Kanai, Y., Monden, M., Miyazaki, J. (2007) Sox17 plays a substantial role in late-stage differentiation of the extraembryonic endoderm in vitro. *J. Cell Sci.* 120(21), 3859-3869.
- ⑭ Mizukami, T., Kanai, Y., Fujisawa, M., Kanai-Azuma, M., Kurohmaru, M., Hayashi, Y. (2008) Five azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, specifically inhibits the testicular cord formation and Sertoli cell differentiation, in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 75(6), 1002-1010.
- ⑮ Kimura, T., Tomooka, M., Yamano, N., Murayama, K., Matoba, S., Umehara, H., Kanai, Y., Nakano, T. (2008) Akt signaling promotes derivation of embryonic germ cells from primordial germ cells. *Development* 135(5), 869-879.
- ⑯ Matoba, S., Hiramatsu, R., Kanai-Azuma, M., Tsunekawa, N., Harikae, K., Kawakami, H., Kurohmaru, M., Kanai, Y. (2008) Establishment of testis-specific SOX9 activation requires high-glucose metabolism in mouse sex differentiation. *Dev Biol.* 324(1), 76-87.
- ⑰ Hiramatsu, R., Matoba, S., Kanai-Azuma, M., Tsunekawa, N., Katoh-Fukui, Y., Kurohmaru, M., Morohashi, K., Wilhelm, D., Koopman, P., Kanai, Y. (2009) A critical time windows of Sry action in gonadal sex differentiation in mice. *Development* 36(1), 129-138.
- ⑱ Bradford, S.T., Hiramatsu, R., Maddugoda, M.P., Bernard, P., Chaboissier, M.C., Sinclair, A., Schedl, A., Harley, V., Kanai, Y., Koopman, P., Wilhelm, D. (2009) The Cerebellin 4 Precursor Gene Is a Direct Target of SRY and SOX9 in Mice. *Biol. Reprod.* 80(6), 1178-1188.
- ⑲ Hara K, Kanai-Azuma M, Uemura M, Shitara H, Taya C, Yonekawa H, Kawakami H, Tsunekawa N, Kurohmaru M, Kanai Y. (2009) Evidence for crucial role of hindgut expansion in directing proper migration of primordial germ cells in mouse early embryogenesis. *Dev Biol.* 330(2), 427-439.

全て査読あり

[学会発表] (計 13 件)

- ① Kanai Y.; XX/Sry Sertoli cells are not capable of supporting spermatogenesis in mice. The 1st SOX Meeting (organized

- by Hisato Kondoh and Peter Koopman). Aug 30th ~ Sep 2nd in 2005, Cairns, Australia.
- ② Kanai-Azuma M, Kanai Y.; Redundant roles of Sox17 and Sox18 in postnatal angiogenesis in mice. The 1st SOX Meeting (organized by Hisato Kondoh and Peter Koopman). Aug 30th ~ Sep 2nd in 2005, Cairns, Australia.
- ③ 金井; 哺乳類の性決定遺伝子 SRY の機能. シンポジウム「受精成立研究の最前線〜性決定からエピジェネティクスまで〜」. 第 76 回 日本動物学会. 2005 年 10 月. つくば国際会議場 (茨城県 筑波市).
- ④ 金井; 哺乳類の性決定遺伝子 SRY. シンポジウム「性分化と生殖細胞の増殖, 分化」第 111 回 日本解剖学会総会. 2006 年 3 月. 北里大学 (神奈川県).
- ⑤ Kanai Y.; Potency of XX/ Sry Sertoli cells to support spermatogenesis in sex-reversed XX male mice. The 4th International Symposium on Vertebrate Sex Determination (organized by Val Lance, Mark Bogart, Blanche Capel and Richard Behringer). April 10th to 14th in 2006, Hawaii, USA.
- ⑥ 金井; 性決定遺伝子 SRY とその時間/空間的な制御. 東海実験動物研究会. 2007 年 3 月. エーザイ川島工園 (岐阜).
- ⑦ 金井; Sry による性の人為的な制御と精子形成能. シンポジウム「精巢を用いた発生工学の最前線」第 143 回日本獣医学会. 2007 年 4 月. つくば国際会議場 (茨城).
- ⑧ Kanai, Y.; A critical time window of Sry action in gonadal sex determination. The 41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (Jointly sponsored by the International Society of Developmental Biologists). May 28th-30th, 2008, Tokushima, Japan.
- ⑨ 金井; 講演会 哺乳類の遺伝的な一次性決定とその後の可塑性. 2008 年 8 月. 早稲田先端医科学センター (東京)
- ⑩ 金井; 哺乳類の性決定および性分化機構について. シンポジウム「脊椎動物の性決定・性分化とステロイドホルモン」第 79 回日本動物学会. 2008 年 9 月. 福岡大学 (福岡).
- ⑪ Kanai, Y. Manipulation of the Timing of SRY Activity in Transgenic Mice Defines a Critical Window for Male Sex Determination. In International symposium for Gonad and Brain Sex Differentiation (organized by Ken Morohashi, Yoshitaka Nagahama, Yasuo

Sakuma, Kazuyoshi Tsutui and Gen Yamada). Sept 14-16th, Fukuoka, Japan.

- ⑫ Kanai Y.; A critical time window of Sry in gonadal sex determination in mice. The 2nd SOX Meeting (organized by Hisato Kondoh and Michael Wegner). Sept 16th ~ 19th in 2008, Awaji, Japan.
- ⑬ Kanai-Azuma M and Kanai Y.; Haploinsufficiency of Sox17 Results in Defective Maturation of Fetal Hepatocytes in C57BL6 Mice, The 2nd SOX Meeting (organized by Hisato Kondoh and Michael Wegner). Sept 16th ~ 19th in 2008, Awaji, Japan.

[図書] (計 3 件)

- ① 的場, 平松, 金井. (2006) 哺乳類の性決定遺伝子 *Sry*. 「特集: 雄と雌の生物学」**細胞工学** p. 369-373.
- ② 金井, 川上, 平松, 金井. (2006) ホルモンマウント *in situ* ハイブリダイゼーション -up to date. 分担「組織細胞化学 2006」中西印刷 p. 57-62.
- ③ 金井, 川上, 原, 金井. (2008) ホルモンマウント *in situ* ハイブリダイゼーション. 分担「組織細胞化学 2008」中西印刷 p. 51-58.

[産業財産権]

無し

[その他]

ホームページ等

<http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/kaibo/seibunka.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金井 克晃 (KANAI YOSHIKIRA)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号: 30260326

### (2) 研究分担者

恒川 直樹 (TSUNEKAWA NAOKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号: 50431838