

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03267

研究課題名(和文) 有胎盤哺乳類におけるSRY遺伝子に依存しない新しい性決定メカニズムの解明

研究課題名(英文) A novel sex-determining mechanism in the mammalian species lacking SRY

研究代表者

黒岩 麻里 (Kuroiwa, Asato)

北海道大学・理学研究院・教授

研究者番号：20372261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、Y染色体と、性決定遺伝子SRYを消失したアマミトゲネズミ(*Tokudaia osimensis*)において、SRY遺伝子に依存しない有胎盤哺乳類の新しい性決定メカニズムを明らかにすることを目的としている。本種におけるゲノム解析の結果、SOX9遺伝子上流にオス特異的な重複配列が確認された。さらに、重複配列中にSOX9の精巣特異的エンハンサーとして機能し得るエンハンサー候補配列が同定された。本エンハンサー配列を重複させたゲノム改変マウスを作成し、胎児期生殖腺における性分化関連遺伝子の発現と、成獣の卵巣および精巣の解剖学的解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SRYに依存しない性決定を行う有胎盤哺乳類は、トゲネズミを含め数種が知られているが、具体的な分子メカニズムが明らかにされた例は未だない。本研究は、SRY遺伝子に依存しない性決定メカニズムを世界で初めて明らかにしたものであり、さらにそれは遺伝子ではなくシス因子によるものであるという画期的な発見を成し遂げた。SOX9上流の変異はヒトの性分化疾患の原因となることが知られており、本研究で明らかになった重複領域やエンハンサー配列の情報は、医学分野においても有用な情報として提供できるものである。

研究成果の概要(英文)：To reveal a new sex-determining mechanism of SRY gene-independent, we analyzed the sex-determining mechanism in an unique mammalian species, Amami spiny rat (*Tokudaia osimensis*), which has no Y chromosome and SRY gene. As a result of genome analysis in this species, a male-specific duplication was identified upstream of the SOX9 gene. An enhancer candidate sequence capable of functioning as a testis-specific enhancer of SOX9 was identified in the duplication unit. Genome-editing mice with duplicated enhancer sequences of *T. osimensis* were produced, and the expression of sex differentiation-related genes in the fetal gonads and the anatomical analysis of adult ovaries and testes were performed.

研究分野：生殖発生遺伝学

キーワード：トゲネズミ X0 ゲノム編集 SOX9

1. 研究開始当初の背景

ほとんどの有胎盤哺乳類 (以下、哺乳類) では、性は Y 染色体上の *SRY* 遺伝子により決定される。*SRY* の直接の標的は、精巣分化に主要な働きをもつ *SOX9* 遺伝子である。マウスでは *Sox9* の上流に位置する TESCO (Sekido & Lovell-Badge, Nature, 2008) や Enh13 (Gonen *et al*, Science, 2018) などの精巣特異的エンハンサー配列に *SRY* タンパク質が結合し、*Sox9* の転写を促進する (図 1)。つまり、一般的な哺乳類における性決定の分子メカニズムとは、*SOX9* 上流に位置するエンハンサーを介して *SRY* タンパク質が *SOX9* の転写を上方制御することを指す。この *SRY* による性決定の仕組みは、ほとんど全ての哺乳類種に保存されている。さらにヒトにおいては、マウスのエンハンサーとは異なる *SOX9* 上流配列に重複が起こることで *SOX9* の発現増加が生じ、*SRY* をもたない XX 型が男性の表現型を呈する性分化疾患が報告されている (Kim *et al*, J Med Genet, 2015)。よって、*SRY* が標的とするエンハンサーは複数カ所存在し、さらに種によって異なることが示唆されているが、未解明な部分が多く残されている。

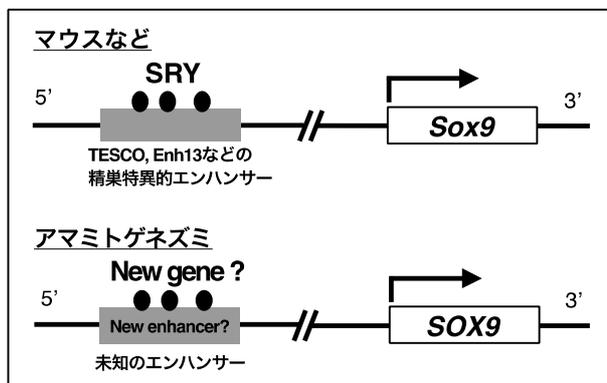


図1 Sox9/SOX9 の転写調節

トゲネズミ属 3 種

は、Y 染色体と *SRY* 遺伝子に極めてユニークな特徴をもつ。アマミトゲネズミ (*Tokudaia osimensis*, 以下、アマミ) は Y 染色体を失い、雌雄ともに X 染色体を 1 本しかもたない ( $2n=25, XO/XO$ )。さらに *SRY* もゲノム中から完全に消失して

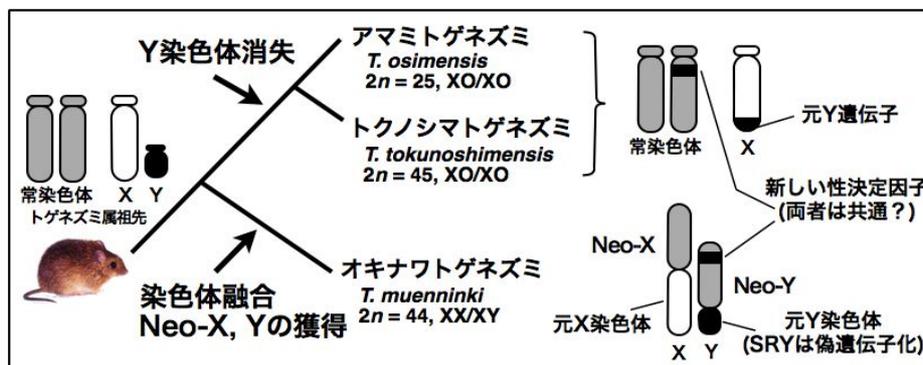


図2 トゲネズミ属の系統関係と性染色体の特徴

いる。我々は、本種の *SRY* 以外の元 Y 染色体連鎖遺伝子は、X 染色体長腕末端部に転座することにより雌雄のゲノム中に保存されていることを明らかにした (図 2) (Kuroiwa *et al*, Chromosoma, 2010)。さらに、雌雄が共通にもつ 1 本の X 染色体に性差はなく (Kobayashi *et al*, Chromosome Res, 2007; 2008)、性決定を担う領域は常染色体上に存在することが示唆されており、本種では *SRY* に依存しない新しい性決定メカニズムが獲得されている。また、Y 染色体と *SRY* の消失はアマミとトクノシマトゲネズミ (*T. tokunoshimensis*, 以下、トクノシマ) の共通祖先において生じたため、トクノシマもアマミと同じく新しい性決定メカニズムをもつと考えられる。一方、我々は、オキナワトゲネズミ (*T. muenninki*, 以下、オキナワ) では一対の常染色体が性染色体と融合し、neo-X, neo-Y 領域を獲得したことを明らかにしている (図 2) (Murata *et al*, Chromosome Res, 2016; Murata *et al*, BMC Evol Biol, 2015; Murata *et al*, Chromosome Res, 2012)。オキナワでは、*SRY* が過剰重複し 100 以上ものコピーが存在する (Murata *et al*, Chromosome Res, 2010)。しかし、我々の *in vitro* 実験解析により、本種の *SRY* は性決定の機能をもたず、すべてが偽遺伝子化していることが示唆されている (Kimura *et al*, PLoS One, 2014)。これらの知見から、オキナワでは neo-Y 領域に新たな性決定領域が獲得されている可能性が高い。さらに、オキナワの neo-X, neo-Y 領域には *SOX9* 遺伝子が位置することを確認している。

我々は、トゲネズミ属の TESCO には転写因子結合部位に塩基置換が生じており、エンハンサーとして機能しないことを報告している (Kimura *et al*, PLoS One, 2014)。しかし、アマミの精巣では *SOX9* の顕著な発現がみられ、さらに *SOX9* 以降の分子メカニズムは、マウス等と同様にアマミにおいても保存されていた (Otake & Kuroiwa, Sci Rep, 2016)。そのため、アマミでは未知のエンハンサーを介して *SOX9* の転写調節が行われているはずである (図 1)。よって、このエンハンサーを同定することが、*SRY* に因らない性決定の分子メカニズムを理解する上で、大変重要となる。

2. 研究の目的

本研究は、アマミを主な研究材料として、Y 染色体と、性決定遺伝子 *SRY* を消失したアマミト

ゲネズミにおいて、*SRY* 遺伝子に依存しない有胎盤哺乳類の新しい性決定メカニズムを明らかにすることを目的とした。*de novo* アセンブリ解析によりアマミ雄個体のドラフトゲノム配列を整備した。さらに、雌雄3個体ずつのゲノム配列のリードをドラフトゲノムにマップし、マップされたリード数を比較したところ、41カ所の領域において雌雄間で copy number variants (CNVs) が見られた。このうち、2カ所が *SOX9* 遺伝子の約 460 kb 上流に該当した。CNVs がみられた *SOX9* 上流配列について解析を進めると、オスのみがヘテロで重複をもつことが確認できた。我々はこの重複が *SOX9* の転写を促進し、性決定の機能を担う調節配列ではないかと考えた。さらにマウスの新しい *SOX9* 上流エンハンサー-Enh13 が報告されたが (Gonen *et al*, Science, 2018)、この論文の中でエンハンサー候補として挙げられたうちのひとつ、Enh14 がアマミの重複ユニット中に存在することが明らかとなった。マウス Enh14 は XY 個体の生殖腺 (精巣) で *Sox9* 発現を誘導するが、性決定に十分な量の発現上昇がないため、論文ではサブミゲノムデータに記載されているのみであった。アマミでは Enh14 を含む領域が重複した染色体をもつと、エンハンサーを2ユニットもつことになるため、精巣分化に十分な量の *SOX9* の発現上昇が生じ、性決定がなされるのではないかという仮説をたてた。そこで、本研究ではアマミの *SOX9* 上流にある重複配列をマウスの該当配列と組換えるゲノム改変マウスを作製し、機能解析を行う。さらに、情報解析により雌雄差が見られた CNVs は他にも 39カ所ある。前述した仮説は誤りであり、これらの中に *SRY* に代わる性決定遺伝子、調節配列、non-coding RNA (ncRNA) などが存在する可能性も残されている。そこで、すべての領域についてスクリーニングを行い、実際に雌雄のゲノム間に差があるかを実験により確認し、最終的にはゲノム改変マウスを作製して機能解析を行う。続いて、アマミで同定した性決定領域がトクノシマでも保存されているかを確認する。さらに、アマミで発見された重複がオキナワ neo-Y 領域の *Sox9* 上流にも存在しているとすれば、新規性決定メカニズムは属内で保存されていることになる。しかし、オキナワ独自のメカニズムを獲得している可能性も考えられるため、アマミで同定した領域がオキナワでも保存されているか、さらに neo-X, neo-Y 領域の配列を重点的に比較解析し、性差領域を確認する。

### 3. 研究の方法

#### Sox9 上流を重複させたゲノム改変マウスの解析

アマミの Enh14 配列 (1,278 bp、重複ユニット間の相同性は 100%) をタンデムに重複させたコンストラクトを作成し、ゲノム編集技術 (CRISPR/Cas9) によりマウスゲノム中該当配列と組換え、アマミの重複をマウスで再現させる。重複をもつ XX ゲノム改変マウスにおいて *SOX9* の発現解析と表現型解析を行い、性決定に対する重複の影響を確認する。

#### CNVs 領域のスクリーニング

アマミ雌雄間で CNVs がみられた 39 領域について、実際に雌雄のゲノム間に差があるかを分子生物学実験により確認する。また先行研究においてすでに得ている精巣 RNA-seq データと照合し、ncRNA の有無も確認する。

#### CNVs 領域ゲノム改変マウスの解析

で選定された性特異的な領域 (遺伝子配列、調節配列、ncRNA、欠失、挿入、重複、置換などを想定) をゲノム編集技術 (CRISPR/Cas9) によりマウスで再現し、表現型解析を行い性決定に対する影響を確認する。

#### トゲネズミ属全3種の比較解析

オキナワ、トクノシマ雌雄のゲノム配列を解読し、アマミで同定された性差領域が、両種にも存在するのかを、情報解析および分子生物学実験により確認する。得られた結果より、本属内での新規性決定メカニズムの起源と進化課程を推定する。

#### Neo-X, neo-Y の比較解析

オキナワの BAC ライブラリーから neo-X, neo-Y 領域由来のクローンを得て、配列を解読する。オキナワの neo-X, neo-Y は、アマミの3番染色体と相同であることがわかっている。よって、アマミのゲノム配列をリファレンスとして、neo-X, neo-Y のゲノム配列を整備し、neo-X と neo-Y 間で比較することにより性差領域を明らかにする。

### 4. 研究成果

アマミの Enh14 配列重複を、CRISPR/Cas9 の系によりマウスゲノムの該当配列と組換え、アマミの重複を *Sox9* 上流にもつゲノム編集マウスの作成に成功した。重複をホモでもつゲノム改変マウスの XX 成獣個体において、外部および内部生殖器官の解剖学的観察を行ったが、野生型 XX マウス個体との顕著な差は見られず、正常なメスの表現型を呈した。さらに、卵巣切片を HE 染色し、組織学的な観察を行ったが、野生型 XX 個体の卵巣切片との違いは見られなかった。つまり、アマミ Enh14 を重複させたゲノム改変マウスでは、XX 個体の性転換は見られなかった。

次に、アマミ Enh14 重複をホモないしヘテロでもつゲノム改変マウスの、胎齢 13.5 日胚 (マウスにおいて *Sox9* 発現の上昇が見られる発生時期) の生殖腺をサンプリングし、*Sox9* および卵巣分化マーカー遺伝子である *Foxl2* の発現局在を、生殖腺切片を用いた免疫組織化学により観察した。その結果、アマミ Enh14 重複をホモでもつ XX 個体では、生殖腺の一部の領域において *SOX9* 陽性を示す細胞が観察された。さらに、野生型 XX 個体に比べて、*FOXL2* 発現を示す蛍光シグナルが弱く観察された。さらに定量的 RT-PCR 法により、*Sox9* と *Foxl2* の発現量解析を行った

結果、アマミ Enh14 重複をホモでもつ XX 個体では、*Sox9* 発現量の増加が見られた。しかしその発現レベルは、野生型 XY 個体の発現レベルに到達するものではなかった。以上の結果から、アマミ Enh14 の重複配列をもつと、生殖腺の発生初期では *Sox9* の上昇は見られるものの、その発現レベルが十分でないため、完全な精巢分化へと移行せず、成獣ではメス(卵巣)の表現型をとることが示唆された。

本研究では、*Sox9* 上流の重複が同定された 2 つの CNVs 領域を除く 39 の CNVs 領域においても解析したが、これらは全て性差ではなく個体差であることが確認された。つまり、アマミにおける性差領域は、*Sox9* 上流の重複をもつか否かのみである、と結論づけることができた。また、アマミと同じ X0 型のトクノシマでも同様にオスのみが重複をもつこと、XX/XY 型であるオキナワでは、重複が存在しないことを明らかにした。

以上の結果から、ゲノム改変マウスが性転換を示さなかった結果について、ふたつの可能性を考察している。ひとつ目は、重複ユニット中の Enh14 以外のシス因子配列がアマミの性決定を担っている可能性である。ふたつ目は、性決定メカニズムの種差による可能性である。マウスは *Sry* 遺伝子を有し、SRY タンパク質が *Sox9* エンハンサーに結合することで性決定が起きるといふ、SRY に依存した性決定メカニズムをもつ。一方で、アマミは SRY なしにシス因子の性差で性決定が起きるため、マウス生体におけるアマミの性決定メカニズムを再現することが難しい、という可能性である。これらの可能性を検証するために、今後はアマミの重複領域全体 (17 kb × 2=34 kb) をもつゲノム改変マウスを作成する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kuroiwa A
2. 発表標題 Unique genome evolution of the Y-absent mammal in genus Tokudaia.
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒岩麻里
2. 発表標題 Y染色体とSRY遺伝子をもたない哺乳類種の性決定メカニズム
3. 学会等名 第92回日本遺伝学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒岩麻里，奥野未来，伊藤武彦，寺尾美穂，小川湧也，高田修治，水島秀成
2. 発表標題 トゲネズミ属におけるSRY遺伝子に依存しない性決定の分子メカニズム
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
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
研究分担者	高田 修治  (Takada Shuji)  (20382856)	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    (82612)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	伊藤 武彦  (Ito Takehiko)  (90501106)	東京工業大学・生命理工学院・教授    (12608)	

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