

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06678

研究課題名（和文）マウスを用いたヒトSOX9の発現調節機構の解明

研究課題名（英文）Identification of the regulatory mechanism of human SOX9 expression using mice

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：性決定初期で機能するSOX9の発現には、ヒト性分化疾患症例解析からXYSR領域、XXSR領域のエンハンサーが重要であることが分かっている。本研究では、XYSR領域に存在するマウスエンハンサーをヒトエンハンサーに置換したマウスの解析を行った。その結果、単に置換しただけではエンハンサーは機能せず、エンハンサーとSRY蛋白、Sox9プロモーターの種差が影響する可能性を考えた。それらもヒト配列に置換したマウスの作製を目指したが、完成には至らなかった。XXSR領域に変異を導入したマウスは、不完全浸透でXYで雌になる個体が存在した。この変異を確定するため、シークエンス解析したが、完成には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトとマウスのXYSR領域のエンハンサーはマウス個体内では互換性がないことから、エンハンサーが機能する際には種差の影響のある何かが関与することが示された。XXSR領域については、マウスが変異を有していても雄になる個体と雌になる個体がいたことから、遺伝的背景が影響するモディファイヤーの関与が示された。今後モディファイヤーの同定により、XXSRの機能の解明が可能になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The enhancers in the XYSR and XXSR regions are critical for SOX9 expression, which functions in the early stages of sex determination, based on analysis of human cases of disorders of sex development. In this study, mice in which a mouse enhancer in the XYSR region was replaced with a human one were analyzed. The results showed that the enhancers did not function by substitution, suggesting that species differences in the enhancer, SRY protein, and/or Sox9 promoter would affect the function of the enhancer. Generation of mice with those substituted with human sequences were attempted, but it was not completed. The mice with mutations in the XXSR region was generated. XY female mice were identified with incomplete penetrance. Sequence analysis was performed to determine this mutation, but was not completed.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：マウス Sox9 性分化 性決定 エンハンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

SOX9 は性決定初期に機能するマスター因子である。それをコードする *SOX9* 遺伝子の発現はエンハンサーによるものであると考えられている。XY の性分化疾患症例で共通して欠失が見つかる *SOX9* 上流の XYSR 領域と、XX の性分化疾患症例で共通して重複が見つかる *SOX9* 上流の XXSR 領域に存在する。ヒト XYSR 領域に相当するマウスゲノム領域から胎仔期生殖腺のエンハンサー mXYSRa/Enh13 が Ogawa らと (Ogawa et al, Sci Rep 8:17514, 2018)、Gonen ら Gonen et al, Science 360:1469, 2018)により同定され報告された。mXYSRa に相当するヒト配列 (XYSRa)を同定し、ゲノム編集により mXYSRa を XYSRa に置換したマウスを作製した結果、F₀世代で XY で雄であった。このマウスを解析することでヒト XYSRa の機能の解析を行うことを計画した。また、XX の性分化疾患症例で共通して重複が見つかる *SOX9* 上流の XXSR 領域に関しては、Croft らが (Croft et al, Nat Commun 9:5319, 2018)ヒト eSR-B としてエンハンサー配列候補を同定した。しかし、培養細胞とルシフェラーゼアッセイによる解析 (*SOX9* と SF1 存在下に発現上昇する配列の探索)による推測でありエンハンサーであることも示しておらず、重複により *SOX9* が発現上昇することも一切示されていない。本研究では、重複による性分化への影響を検討するため、XXSR 領域の遺伝子改変マウスを用いた解析を計画した。

2. 研究の目的

ヒトの性分化疾患を手がかりに同定されたエンハンサー配列の機能解明を目的とした。そのため XYSRa を有するマウスの機能配列の同定、XXSR 領域に相当するマウスゲノム領域の遺伝子改変マウスの解析を目指した。

3. 研究の方法

1. XYSRa 領域の解析

mXYSRa を XYSRa に置換した F₀世代のマウスを野性型マウスにかけ合わせ、F₂世代で XYSRa をホモに有するマウスを作出し、性分化の状態を観察する。雄の形質が観察されれば、XYSRa 内の機能配列のマッピングを行い、XYSRa が機能する際の分子機構の解明を行う。

2. XYSRa 領域の解析

XYSRa をホモに有するマウスが雌になったため、XYSRa をホモに有し、かつマウス *Sry* をヒト *SRY* に置換したマウスをゲノム編集により作製し、表現型の観察を行う。雄になれば、XYSRa 内の機能配列のマッピングを行い、XYSRa が機能する際の分子機構の解明を行う。雌であれば、マウス *Sox9* プロモーターをヒト *SOX9* プロモーターに置換したマウスをゲノム編集により作製し、表現型の観察を行う。雄の形質が観察されれば、XYSRa 内の機能配列のマッピングを行い、XYSRa が機能する際の分子機構の解明を行う。

3. XXSR 領域の解析

ヒト XXSR 領域に相当するマウスゲノム領域にゲノム編集により変異を入れたマウスを解析することで XXSR 領域の機能を解明する。ゲノム編集により作出したマウス XXSR を重複したマウスの部分欠失マウスを作製し、性分化の状態を観察することでマウス XXSR 内の機能配列の同定を行う。機能配列から XXSR が機能する際の分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) F₀の段階で得られたマウスは、遺伝子型判別から mXYSR 欠失/XYSRa であると判断され、XY で雄であった。そのため、XYSRa をホモに有する XY は雄になると考えた。しかし、かけ合わせにより作出した XYSRa をホモに有する XY は雌の表現型を示した。F₀のマウスがモザイク個体で、遺伝子型判別に用いた組織と胎仔期生殖腺での組織で、遺伝子型の異なった細胞の割合が異なったことが原因となったと考えられた。ヒトとマウスの XYSR 領域のエンハンサーはマウス個体内では互換性がないことから、エンハンサーが機能する際には種差の影響のある何かが発現することが示された。XYSRa をホモに有する XY で雄になる個体が必要であるため、その作出を目指した。XYSRa は *SRY* が発現することにより *SOX9* 遺伝子の発現を上昇させると考えられるため、マウス *Sry* をヒト *SRY* に置換したマウス、マウス *Sox9* プロモーターをヒト *SOX9* プロモーターに置換したマウス、その片方あるいは両方を有し、XYSRa がホモである XY が必要である。そのため、XYSRa ホモ、*Sry*/*SRY* 置換マウスをゲノム編集により作製することを目指したが、作出には至らなかった。ただ、ゲノム編集により、マウス *Sry* をヒト *SRY* に置換したマウスの作製自体は可能であった。*Sox9* プロモーター/ヒト *SOX9* プロモーター置換マウスもゲノム編集により作製することを目指したが、作出には至らなかった。

(2) XXSR に相当するマウス配列 mXXSR が重複しているマウスを用いて、順次重複を部分欠失させたマウスを作製することで機能配列の同定を目指した。mXXSR 重複を有するマウスは XY で雌になった。しかし不完全浸透であった。ゲノム編集により、mXXSR 重複の 1/3 を欠失させたマウス

スを2種類作製し、責任領域を1/3にまで狭めることができた。この実験の過程で、重複が大きく崩れていると考えられる個体が同定され、XYで雌であったことから、このマウスの解析により、機能配列が一気にマップできる可能性が考えられた。このマウスの遺伝子型の決定を試みたが、完成には至らなかった。今後、変異を確定し、その配列からXXSRが機能する際の分子機構を明らかにしたい。また、XXSR領域については、マウスが変異を有していてもXYで雄になる個体と雌になる個体があったことから、遺伝的背景が影響する Modifier の関与が示された。今後 Modifier の同定による、XXSRの機能の解明も可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuji-Hosokawa Atsumi, Ogawa Yuya, Tsuchiya Iku, Terao Miho, Takada Shuji	4. 巻 163
2. 論文標題 Human SRY Expression at the Sex-determining Period is Insufficient to Drive Testis Development in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 bqab217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endo/bqab217	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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川湧也、原聡史、浜田万里果、岡村晴紀、土屋育、辻敦美、後藤友二、久保田宗一郎、寺尾美穂、高田修治
2. 発表標題 SNPsを利用したゲノム編集による疾患候補領域重複マウスの作製.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会（招待講演）（国内学会）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻敦美、小川湧也、寺尾美穂、菊池咲希、土屋育、高田修治
2. 発表標題 ゲノムヒト化マウスモデルによるin vivoでのヒトSOX9発現調節候補領域の機能解析.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会（国内学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立研究開発法人国立成育医療研究センター研究所 システム発生・再生医学研究部 ホームページ
http://server45.joeswebhosting.net/~nr04581/systems/index.html
国立研究開発法人国立成育医療研究センター研究所 研究所 システム発生・再生医学研究部 ホームページ
http://server45.joeswebhosting.net/~nr04581/systems/index.html

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