

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18208

研究課題名(和文) 精巣形成マスター遺伝子SOX9のヒトにおける複数エンハンサーを介した転写制御解明

研究課題名(英文) Precise regulation of SOX9 expression during gonadal development by the testis specific enhancers using a genetically humanized mouse model

研究代表者

辻 敦美 (Tsuji-Hosokawa, Atsumi)

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・(非)研究員

研究者番号：40842414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は精巣発生マスター因子SOX9遺伝子の発現調節エンハンサー候補領域(hXYSRa)についてin vivoでの機能解析を目指して行った。1)in vitroレポーター解析でhXYSRaの機能性を確認し、転写因子結合部位を同定した。2)hXYSRaをマウスSox9の相同配列(mXYSRa)と置換したモデルマウス(hXYSRa subマウス)を作製した。この系統で遺伝学的背景の検討やhuman SRYの過剰発現を行うことにより、hXYSRa subマウスXY個体の一部で生殖器の雄性化が認められた。一定条件下でヒト発現調節配列がモデルマウス相同配列の機能を代償す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

本研究では、ヒトSOX9エンハンサー候補領域について関連転写因子の結合部位を明らかにし、生殖腺分化に重要な遺伝子の発現調節解明に寄与した。また発現調節領域について、マウスゲノムの相同領域とヒト相同配列を置換した場合、一定条件においてはヒトエンハンサーをモデル生物内で機能解析できる可能性が示唆され、non coding regionの機能解析において重要な知見をもたらしたと言える。

研究成果の概要(英文)：SOX9/Sox9 is a master gene for testis development. This study aimed to analyze function of candidate sequence for human SOX9 enhancer, hXYSRa, in in vivo setting. 1) in vitro reporter assay utilizing luciferase expression plasmid revealed enhancer function of hXYSRa. We identified one of transcriptional factor binding motifs within the sequence. 2) We generated genetically humanized mice of Sox9 enhancer. The homologous Sox9 enhancer region in murine genome was replaced with hXYSRa sequence (hXYSRa sub mice) and development of reproductive system in the model mice was screened. Some of hXYSRa sub/sub mice with XY karyotype showed virilization of external/internal genitalia when the line was backcrossed to the DBA/2 strain and overexpressed human SRY. This result suggested regulatory regions in human genome can compensate homologous sequence in murine genome and can be analyzed in the animal model.

研究分野：genome editing

キーワード：Sox9 sex determination testis enhancer regulatory region

## 1. 研究開始当初の背景

体外において ES/iPS 細胞などの多能性幹細胞から卵子・精子を分化誘導する技術が開発され、不妊治療分野における再生医療の応用が期待されている。しかし現状では卵子・精子への分化誘導には、生体から取り出した生殖腺（精巣・卵巣）と共に幹細胞を培養する過程が必要である(1,2)。全工程を再生医療で賄える状況には至っておらず、更なる技術進歩のため、生殖腺分化の詳細な理解が重要である。

生殖腺の分化に関わる遺伝子は、マウスモデルの解析や性分化疾患患者に対する網羅的遺伝子解析により同定され、近年はこれらの性分化関連遺伝子の発現調節領域の重要性についても認識されている(3)。しかしこれらの領域の研究については、従来レポーターアッセイ法が用いられ、ゲノム内の位置情報やヒストン修飾状態を加味した機能解析は困難な状況であった。

## 2. 研究の目的

我々は、マウスとの相同性解析から精巣分化のマスター因子であるヒト *SOX9* 遺伝子の発現調節エンハンサー候補領域を同定した(hXYSRa)。この領域について、より *in vivo* に近い状態での解析を目指し、マウスゲノム内の相同配列とヒト候補エンハンサー配列を置換した遺伝子改変マウスを作製し、候補領域の機能性解析・結合転写因子解析を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) hXYSRa 配列の結合転写因子候補選定および *in vitro* 機能解析

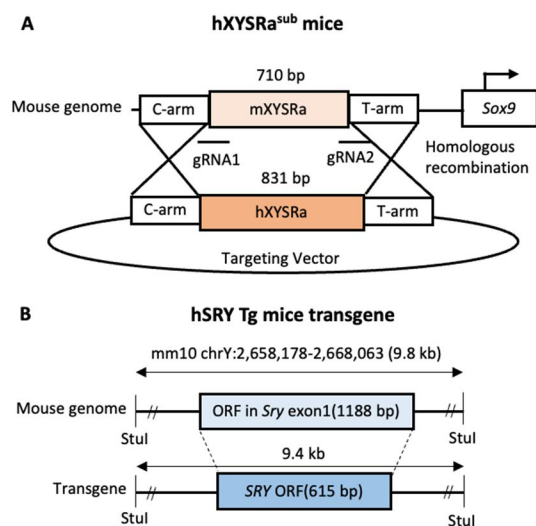
公開データベース JASPAR(4)を用い、hXYSRa 内の結合転写因子の候補選定を行なった。さらに hXYSRa 配列、ヒト グロブリン(*HBB*)プロモーター、ルシフェラーゼを繋いだコンストラクトを作製し、*in vitro* でのレポーター解析を行った。選定した転写因子結合配列が機能配列であるかをスクリーニングするため、候補領域に変異を挿入したコンストラクトも作製し、従来の *in vitro* ルシフェラーゼアッセイにて転写因子候補配列の同定を行った。

### (2) マウス *Sox9* 発現調節領域 mXYSRa をヒト *SOX9* 発現調節候補領域 hXYSRa に置換した遺伝子改変マウスの作製とその解析

*Sox9* の 5' 上流領域に存在する発現調節領域 mXYSRa をヒトで相同な hXYSRa 置換した遺伝子改変マウス (hXYSRa<sup>sub</sup> マウス) を CRISPR/Cas9 システムにて作製した [Fig.1A]。

研究期間中、当初作製時のマウス遺伝学的背景は C57BL/6 を主とした DBA/2 との交雑種であったが、hXYSRa<sup>sub</sup> homozygous XY マウスが雌の表現型を示した。そのため追加で 2 種類の変更を行った。

受精卵ゲノム編集にて、human *SRY* を過剰発現する直鎖状 DNA をゲノム内に有するトランスジェニックマウス



[Fig.1] 本研究における遺伝子改変マウス作製の模式図 (A) hXYSRa<sup>sub</sup> マウスの作製。C-arm, centromere side arm. T-arm, telomere side arm. (B) hSRY トランスジェニックマウスの作製。ORF, open reading frame. Tg, transgenic.

(*hSRY* Tg マウス)を別途作製し[Fig.1B]、*hXYSRa<sup>sub</sup>* マウスと交配した。

マウス遺伝学的背景を DBA/2 系統に戻し交配を行った。

以上により、*hXYSRa<sup>sub/sub</sup>* XY; *hSRY* Tg マウス(DBA/2 を主とする交雑種)を作製し、表現型解析を行なった。

#### 4 . 研究成果

##### (1) *hXYSRa* の in vitro assay 系確立と SOX9 結合配列の同定

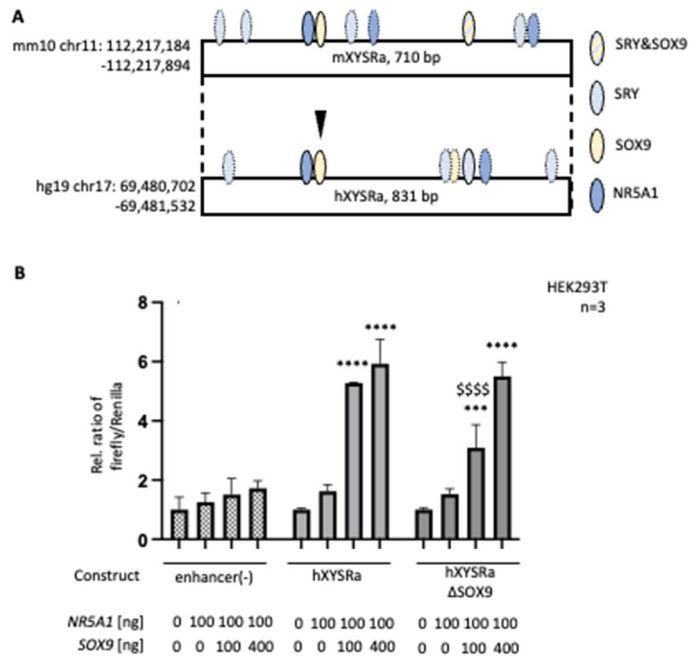
データベースを用いて *hXYSRa* 配列内の性分化関連転写因子の結合配列検索を行ったところ、NR5A1, SOX9, SRY の結合配列の存在が明らかとなった。さらに重要配列を特定するため、マウスゲノム相同領域 *mXYSRa* に保存された配列を明らかにした[Fig.2A]

in vitro 解析では当初 *Sox9* promoter を使用した luciferase コンストラクトを作製予定であったが、過去の文献(5)を参考に *HBB* promoter の 5'側に候補配列 *hXYSRa* 831bp を挿入したレポータープラスミド ( pGL4.10-*hXYSRa*-*HBBpro* ) を作製し、SOX9 および NR5A1 で正の反応が得られることを確認した。さらに前述の検索で明らかとなった SOX9 結合配列を別配列に置換したコンストラクトで反応低下が認められた[Fig.2B]。

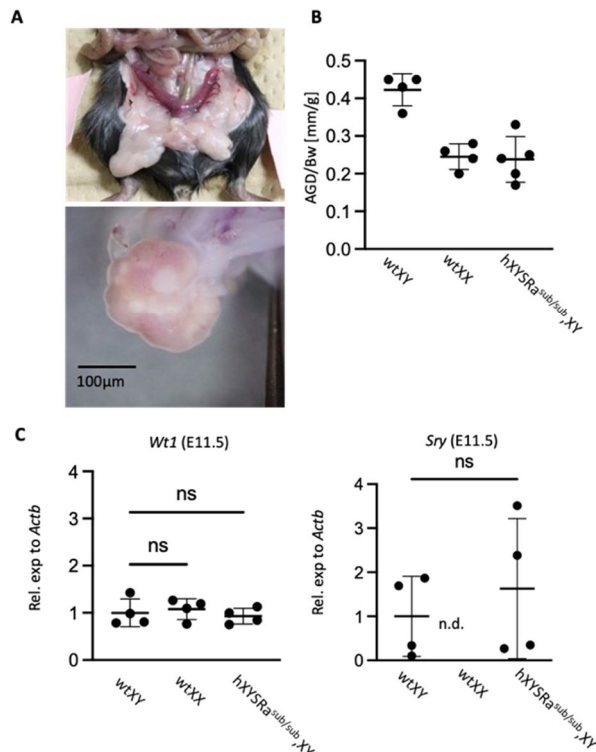
##### (2) *hXYSRa* のマウスゲノムでの機能性

当初 *hXYSRa sub* マウスは、B6D2F1 マウス受精卵で作製後、C57BL/6 に一度戻し交配しており、C57BL/6 を主とする遺伝学的背景であった。本系統で *hXYSRa<sup>sub/sub</sup>* XY マウスを作成したところ、XY で雌の外性器(膣・子宮卵管の形成、性周期あり)となり(n=5)、妊孕性は認められなかった。ただし本マウスの胎生 11.5 日性腺における *Sry* の発現量解析では、発現が検出された [Fig.3A-C]。

マウスゲノム内での候補配列の in vivo 機能解析を実現するため、本マウス系統の遺伝学的背景を DBA/2 に戻し交配し、



[Fig.2] *hXYSRa*内の結合配列検索と*hXYSRa*のレポーター解析結果。(A) *hXYSRa*内の性分化関連因子の結合配列とその種間保存性。実線: マウス・ヒトの保存性あり、点線: ヒトまたはマウス単独、黒三角: 本研究解析対象の配列 (B) *hXYSRa*のin vitroレポーター解析の結果。\*\*\*,  $p < 0.001$  vs the construct without enhancer. \*\*\*\*,  $p < 0.0001$  vs the construct without enhancer. \$\$\$\$ ,  $p < 0.0001$  vs the construct with wildtype *hXYSRa*.



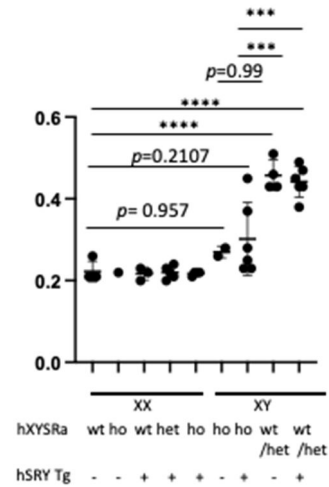
[Fig.3] *hXYSRa<sup>sub/sub</sup>* XYマウス(C57BL/6主体)の解析。(A) *hXYSRa<sup>sub/sub</sup>* XYマウスの内性器形態。(B) *hXYSRa<sup>sub/sub</sup>* XYマウスの肛門性器間距離(anogenital distance; AGD)。(C) 胎生11.5日(E11.5)の生殖腺・中腎管における*Sry*発現量解析。ns, no significant difference. n.d., not detected. Rel. exp, relative expression.

さらに human *SRY* を強制発現するマウスと交配した。その結果、*hXYSRa<sup>sub/sub</sup>* XY マウスでは C57BL/6 の際と同様メスの表現型であった一方(n=2)、さらに human *SRY* の過剰発現があった場合、一部内外性器が雄性化する個体が得られた(n=10)[Fig.4]。

### (3) 本研究の意義

本研究では、ヒトエンハンサー候補領域について、レポーター遺伝子を用いた *in vitro* 解析を用いて、*SOX9* の結合部位を明らかにし、生殖腺分化に重要な *SOX9* の発現調節解明に寄与した。

当初のモデルマウス解析により、*hXYSRa<sup>sub/sub</sup>* XY マウスで外性器が雌性化したものの、*Sry* 発現が検出されたことから、配列置換が *SRY* 発現以降の精巢形成因子の発現異常を引き起こしたと考えられた。またさらなる検討・追加ゲノム編集により、一部の個体ではあったが、*hXYSRa<sup>sub/sub</sup>* XY マウスで生殖器の雄性化が見られ、*hXYSRa* がマウス *mXYSRa* と一定の機能互換性を有する可能性が示唆された。このことからマウスゲノムの相同領域とヒト相同配列を置換した場合、一定条件においてはヒトエンハンサーをモデル生物内で機能解析できる可能性が示唆された。本研究で異種発現調節領域のモデルマウスを作製するにあたり、マウスの遺伝学的背景の違いにより、同じ遺伝子改変を行っても表現型が異なることが知られているため(6)、遺伝学的背景の検討を行なった。さらに *Sry/SRY* の相同性が低いことを鑑み、*SRY* の過剰発現を加えた。これらにより *hXYSRa<sup>sub/sub</sup>* XY 個体で雄性化が観察された。したがって種間で発現調節領域を置換する場合に整えるべき条件として、遺伝学的背景や関与する遺伝子の相同性の考慮が重要であることを明らかにした。しかし本研究の限界点として、遺伝学的背景が DBA/2 を主とする *hXYSRa<sup>sub</sup>* 系統で、*SRY* 過剰発現を伴わない *hXYSRa<sup>sub/sub</sup>* XY 個体の解析数は限られており、遺伝学的背景と *SRY* 発現、どちらの影響が大きいかについては結論を得ることはできなかった。性分化疾患の分野のみならず、non coding region の機能解明は各分野で急務である。これらの領域もクロマチン構造やメチル化などの生体内ゲノム修飾状態に機能が依存する領域である点から、*in vivo* で解析できることの意義は大きく、non coding region の機能解析において重要な知見をもたらしたと言える。



[Fig.4] *hXYSRa<sup>sub/sub</sup>*XYマウス (DBA/2主体) の肛門性器間距離(AGD)解析。\*\*\*,  $p < 0.001$ . \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ . wt, wildtype. ho, homozygous. het, heterozygous

### <引用文献>

- Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*. 2011;146(4):519–32.
- Hikabe O, Hamazaki N, Nagamatsu G, Obata Y, Hirao Y, Hamada N, et al. Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature* 2016 ;539(7628):299–303.
- Baxter RM, Arboleda VA, Lee H, Barseghyan H, Adam MP, Fechner PY, et al. Exome Sequencing for the Diagnosis of 46,XY Disorders of Sex Development. 2015
- Castro-Mondragon JA, Riudavets-Puig R, Rauluseviciute I, Berhanu Lemma R, Turchi L, Blanc-Mathieu R, et al. JASPAR 2022: the 9th release of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(D1):D165–73.
- Croft B, Ohnesorg T, Hewitt J, Bowles J, Quinn A, Tan J, et al. Human sex reversal is caused by duplication or deletion of core enhancers upstream of *SOX9*. *Nat Commun*.

2018;9(1):5319.

6. Park SY, Lee EJ, Emge D, Jahn CL, Jameson JL. A Phenotypic Spectrum of Sexual Development in Dax1 (Nr0b1)-Deficient Mice: Consequence of the C57BL/6J Strain on Sex Determination. *Biol Reprod.* 2008;79(6):1038.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0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 -
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 Ogawa Yuya, Terao Miho, Tsuji-Hosokawa Atsumi, Tsuchiya Iku, Hasegawa Midori, Takada Shuji	4. 巻 32
2. 論文標題 SOX9 and SRY binding sites on mouse mXYSRa/Enh13 enhancer redundantly regulate Sox9 expression to varying degrees	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 55 ~ 64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddac184	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 辻 敦美
2. 発表標題 In vivo functional analysis of a candidate for human regulatory element related to SOX9 expression using a genetically humanized mouse model
3. 学会等名 第54回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻 敦美
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年会
4. 発表年 2020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
---------	---------