

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26640055

研究課題名(和文)性決定遺伝子Sryの標的探索

研究課題名(英文)Analysis of target genes of the sex-determining gene, Sry

研究代表者

立花 誠 (TACHIBANA, Makoto)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授

研究者番号：80303915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ほ乳類のXY 個体ではY 染色体上の遺伝子であるSex-determining region Y (Sry)が胎児期に一過性に発現し、それまで未分化であった性腺が精巣へと分化する。申請者は、マウスの内在性SRYタンパク質を認識する抗体を樹立し、SRYの標的遺伝子座を明らかにする研究を進めた。胎生11.5日の生殖腺を用い、上記の抗体でクロマチン免疫沈降を行った。得られたDNAを次世代シーケンスで解析し、SRYタンパク質の標的遺伝子の候補について検討を行った。

研究成果の概要(英文)：In XY mammal, Sex-determining region Y (Sry) transiently expresses in undifferentiated embryonic gonads, thereby inducing testis differentiation. I tried to establish antibodies that recognize endogenous mouse SRY protein to identify SRY target genes. Gonads from mouse embryos at embryonic day 11.5 were subjected to ChIP analysis with the anti-SRY antibodies. Next, ChIPed DNA was applied to the next generation sequencing analysis to identify candidates of SRY target genes.

研究分野：分子生物学

キーワード：性決定遺伝子

1. 研究開始当初の背景

性決定の様式は生物種によって大きく異なる。われわれ人間も含め、多くのほ乳類の性は受精の際に (= 遺伝的に) 決定する。性染色体が XY であれば雄に、XX であれば雌になる。XY の個体では Y 染色体上の遺伝子である Sex-determining region Y (Sry) が胎児期の生殖腺で一過性に発現する。この現象は、それまで性的に未分化であった性腺を精巢へと分化させるために必須のイベントである。SRY タンパク質には DNA 結合能力があるため、転写因子として機能していることが予測されている。しかし、その機能の詳細、例えば、転写を正・負どちらに調節しているのか、標的遺伝子は何か、等については明らかになっていないのが実情である。

2. 研究の目的

これまでは特異性の高い SRY 抗体が市販されておらず、SRY の機能に関して生化学的な側面からの解析が困難であった。本研究ではこの点を克服すべく、特異性の高い SRY 抗体の作成を試みる。さらにそれを用いてクロマチン免疫沈降を行い、SRY の標的遺伝子の候補を決定することが研究の目的である。この研究課題が成功裏に進めば、人間を含めたほ乳類の性差構築過程の最初のプロセスを分子レベルで明らかになることが期待される。加えて、性染色体・常染色体の進化過程を理解するための重要な手がかりを与えてくれることも予想される。

3. 研究の方法

マウス SRY をクローニングし、その C 末のポリグルタミンリピートを大腸菌で発現させるような発現ベクターを構築する。大腸菌にタンパク質の発現を誘導させた後に勤怠を回収し、そこからリコンビナントタンパク質を精製する。得られたリコンビナントタンパク質をウサギとモルモットに免疫し、抗血清の反応性の評価を行う。評価の方法は、以下の通り。

- (1) 培養細胞に SRY を過剰発現刺させ、SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行う。発現した SRY に対する抗体の反応性について、ウエスタンブロット法で評価する。
- (2) 胎生 11.5 日目のマウス胎児から生殖腺を摘出し、切片を作成する。これを用いて、免疫組織化学的染色を行う。樹立した抗体が内在性のマウス SRY タンパク質を認識するかどうかを評価する。
- (3) 培養細胞に SRY を発現させた細胞株をホルマリン固定する。さらに、界面活性剤による可溶化と超音波による破碎を行った溶液を調整する。樹

立した抗体がこの溶液から SRY タンパク質を免疫沈降することが可能であるかを評価する。

胎生 11.5 日のマウス胎児生殖腺を摘出し、酵素処理によって細胞の懸濁液を調整する。細胞を上記 (3) と同様に固定し、さらに可溶化とゲノムの裁断を行う。抗 SRY 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、DNA を回収する。回収 DNA からライブラリを作製し、次世代シーケンスによって標的遺伝子の候補を明らかにする。

4. 研究成果

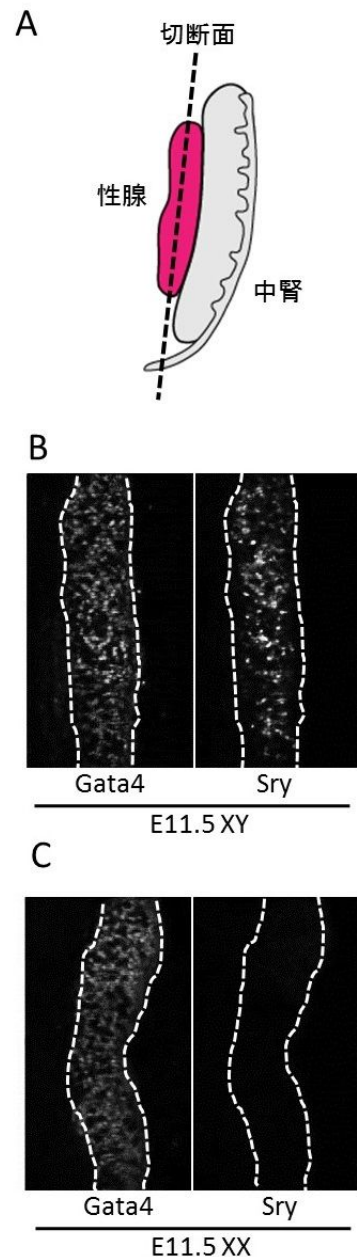


図 1. 抗 SRY 抗体 #0436-2 による生殖腺の組織染色像。A) 用いた生殖腺の断面の模式図。胎生期 11.5 日目のマウス生殖腺をパラフィ

ン包埋し、前後軸に沿って切片を作成した。B) XY 生殖腺の染色像。Gata4 は生殖腺体細胞のマーカである。XY 生殖腺では SRY 陽性の細胞が検出できる。点線は中腎との境界であり、本抗体は中腎の細胞には反応していないことが分かる。C) 同じく XX 生殖腺を #0436-2 抗体で染色した際の免疫組織像。XX 生殖腺には本抗体で陽性となる細胞が検出できなかった。

(1) マウス SRY のリコンビナントタンパク質を大腸菌 BL21 株で産生させ、菌体を回収後に精製した。これをウサギ 2 羽とモルモット 2 匹に免疫し、抗血清を得た。SRY タンパク質を培養細胞で過剰発現させたライセートを用い、ウエスタンブロット法にてこれらの抗体の評価を行った。4 つの抗血清のすべてが過剰発現した SRY を認識することが分かったが、なかでもモルモット #2 の抗血清が最も強く反応した。リコンビナント SRY タンパク質を架橋したカラムを作成し、モルモット #2 の抗血清をアフィニティークロマトグラフによって精製し、精製 SRY 抗体 (#0436-02) を得た。

(2) 上記 #0436-02 抗体を用い、内在性 SRY タンパク質の検出実験を行った。胎生 11.5 日のマウス胎子の生殖腺をホルマリンで固定し、パラフィンで包埋した後にマイクロトームによって切片を作成した。免疫組織化学的手法で切片の染色を行ったところ、XY 生殖腺では #0436-02 抗体による陽性細胞のシグナルが観察されたのに対し、XX 生殖腺ではシグナルが陽性の細胞は観察されなかった (図 1)。この結果により、#0436-02 抗体は内在性 SRY 抗体を認識している可能性が高いことが分かった。

(3) 上記 #0436-02 抗体が界面活性剤を含んだ溶液の条件下で、クロマチン免疫沈降実験に使用可能かどうかを調べた。HEK293T 細胞に SRY を安定に発現させた細胞株をホルマリンで固定し、高濃度の界面活性剤で変性させた。さらに超音波破碎機によってゲノム DNA を裁断した。その後界面活性剤を希釈して遠心し、上清を回収した。この溶液に #0436-02 抗体を加えてインキュベートした後、抗体をマグネットビーズで回収した。抗体-抗原複合体をウエスタンブロット法で解析した結果、SRY タンパク質が回収できていることが明らかになった。

(4) 胎生期 11.5 日目のマウス胎子生殖腺を回収し、トリプシン処理によって単一細胞レベルの懸濁液を調整した。得られた細胞を上記 (3) と同じ方法により固定し、可溶化とゲノム裁断を行った。これらの過程を経た後、同様にクロマチン免疫沈降実験を行った。得られたゲノム DNA 断片からライブラリを作成し、次世代シーケンスで解析を行った。

得られたリード数は 3194772 であった。うち 30428964 リードがゲノム配列にマッピング可能であった。マップ率は 97.6% であった。ピークとして認識できる部位に重なっている遺伝子は 72 個であった。

対照実験として抗 Flag 抗体によるクロマチン免疫沈降実験を行い、その結果との比較を行った。図 2 に示したように、抗 SRY 抗体で免疫沈降したゲノム DNA のおよそ 8 割が抗 Flag 抗体における免疫沈降産物と同じものであった。それに対し、36 のピークは #0436-02 抗体でユニークであったため、これらの遺伝子座 SRY の標的である可能性が示唆された。

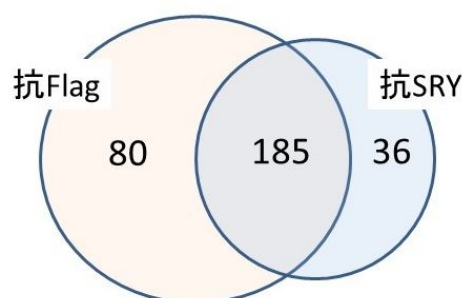


図 2. 抗 SRY 抗体クロマチン免疫沈降産物と、抗 Flag 抗体クロマチン免疫沈降産物 (対照実験) で回収された DNA の配列の共通性をグラフ化した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

The Hypoxia-Inducible Epigenetic Regulators Jmjd1a and G9a Provide a Mechanistic Link between Angiogenesis and Tumor Growth.

Ueda J, Ho JC2, Lee KL, Kitajima S, Yang H, Sun W, Fukuhara N, Zaiden N, Chan SL, Tachibana M, Shinkai Y, Kato H and *Poellinger L.

Mol. Cell. Biol. 34, p3702-3720, 2014

査読有

DOI: 10.1128/MCB.00099-14

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25071150>

Transgenic Expression of Map3k4 Rescues T-associated Sex Reversal (Tas) in Mice

Warr N, Siggers P, Carréa GA, Bogani D, Brixey R, Akiyoshi M, Tachibana M, Lydia Teboul L, Wells S, Sanderson J and *Greenfield A

Hum. Mol. Genetics, 23, p3035-3044, 2014

査読有、Open Access

DOI: 10.1093/hmg/ddu020

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24452333>

酵素がマウスの性決定を左右する
立花 誠
化学と生物 vol.52-No.4, p216-217, 2014、
査読有

〔学会発表〕(計2件)

エピゲノム調節によるほ乳類の性決定
機構

立花 誠(2014.12.4) 京王プラザホテル(東
京都新宿区) 招待講演
第59回日本生殖医学会学術講演会・総会 教
育講演

マウス性決定のエピジェネティックな
制御機構

立花 誠(2014.7.31)、ハイアットリージェ
ンシー東京(東京都新宿区) 招待講演
第32回日本受精着床学会総会・学術講演会、
シンポジウム「発生生物学トピックス」

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
[https://ouyoukous01.aist231.tokushima-u
.ac.jp/](https://ouyoukous01.aist231.tokushima-u.ac.jp/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立花 誠 (TACHIBANA Makoto)
徳島大学・疾患酵素学研究センター・教
授

研究者番号：80303915

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：