

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870891

研究課題名(和文)軟骨および性分化におけるSOX9の機能未知の標的遺伝子の同定と機能の解析

研究課題名(英文)Identification of function unknown target genes of SOX9 in cartilage and testicular development

研究代表者

山下 聡 (Yamashita, Satoshi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：40511077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ChIP-seq解析により得られたゲノムワイドなSOX9の結合領域情報と、RNA-seq解析による遺伝子プロファイルを統合的に解析し、さらにデータベースを利用することで軟骨および性分化における機能未知の標的遺伝子を同定した。

また、先行研究で同定したDhhの制御領域について詳細に解析し、SOX9とNR5A1(Ad4BP1/SF1)が発現制御に関わることとその結合領域を同定した。これらの結合領域を欠損する遺伝子改変マウスを作製して解析すると、Dhhの発現が約4割減少していた。これらの結果から、SOX9とNR5A1が協調的に働き、精巣形成時におけるDhhの発現が制御されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Combinatorial analysis of genome-wide SOX9 binding regions analyzed by ChIP-seq and gene expression profile analyzed by RNA-seq successfully identified novel target genes of SOX9 in cartilage and testicular development. Of those, noble target genes that did not have any known functions were identified using a public database.

In addition, we revealed that SOX9 and NR5A1 (Ad4BP1/SF1) cooperatively regulated Dhh expression and found those precise binding sites from regulatory region of Dhh that identified by prior research. We next analyzed in vivo function of the SOX9 and NR5A1 cooperation for Dhh expression by generating those binding sites-mutated mice, showing approximately 40% decrease of Dhh expression in developing male gonad. From these results, we demonstrated that SOX9 and NR5A1 cooperatively regulated Dhh expression during testicular development.

研究分野：分子生物学

キーワード：転写制御 性分化 ゲノム編集 TALEN SOX9 NR5A1 軟骨分化

1. 研究開始当初の背景

SOX9 は、コード領域もしくは近傍の領域の変異や転位により、軟骨形成不全に起因する骨形成異常を主徴とし、遺伝型がXYの約2/3の患者で性転換が見受けられるヒト先天性骨奇形症候群 Campomelic dysplasia (CD) を引き起こす原因遺伝子である。近年の遺伝子改変マウスを用いた詳細な研究においても、SOX9 が軟骨分化と性分化の両方に重要かつ中心的な転写因子であることが明らかとなっている。

SOX9 は間葉系細胞の凝集から始まる軟骨分化において初期から発現し、軟骨細胞への誘導、分化に必須であることが明らかとなっている。性分化においては、SOX9 はオスの性決定因子 SRY により発現が誘導され、精巢の形成に重要なセルトリ細胞の分化を誘導することで中心的な役割を果たしている。しかしながら、SOX9 のそれぞれの分化における機能は不明確な部分が多い。軟骨、性分化に中心的な転写因子である SOX9 の機能を解明することは、未だ不明点の多いそれぞれの分化の分子メカニズムの解明に繋がると考えられる。

研究代表者はこれまでに、軟骨分化での SOX9 の標的として *Bapx1* を同定し、不明確であった軟骨細胞成熟過程の SOX9 による抑制の分子メカニズムを明らかにした (Yamashita S, et al., *Exp Cell Res.* 2009)。また、SOX9 が SOX5、SOX6 と協調的に働き、軟骨の発生と恒常性の両方に関わる microRNA である miR-140 の軟骨特異的な発現を促進することを明らかにした (Yamashita S, et al., *JBiol Chem.* 2012)。これらコーディング、ノンコーディングの新たな標的遺伝子を明らかにすることで SOX9 の新たな機能を解明してきたが、それぞれの分化での重要性から考えると、未だ重要な標的遺伝子や機能が明らかにされていないと考えられる。

本研究に先立ち、マウス胚の肢芽とオス生殖腺を試料として SOX9 抗体でクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行ない、得られた DNA を次世代シーケンサーで解析する ChIP-seq 解析を行ない、SOX9 の軟骨および性分化における標的遺伝子を包括的に探索した。この解析により肢芽をサンプルとした解析では軟骨での既知標的遺伝子である *Col2a1* や *Col11a2*、オス生殖腺では性分化での既知標的遺伝子である *Amh* が問題なく検出されている。この軟骨および性分化特異的な SOX9 の結合領域の近傍の遺伝子情報を調べることにより得られた SOX9 の標的遺伝子候補の中には、オス生殖腺においてヒト疾患および遺伝子改変マウスの解析により性分化に重要であることが明らかとなっている遺伝子 *Dhh* が含まれていた。そこで、詳細な解析を行ない、SOX9 の結合領域を含む第一イントロンの領域が *in vivo* でオス生殖腺特異的なエンハンサー活性を持つことをトランスジェニックマウスの解析により明らかにした。また、SOX9 の

各標的遺伝子候補の機能を遺伝子オントロロジーにより調べた結果、多数の遺伝子が機能未知であるというデータを得ていた。

2. 研究の目的

- (1) 先行研究の ChIP-seq 解析により得られた SOX9 の軟骨および性分化における標的遺伝子候補の中で、特に機能未知遺伝子に着目して、新たな SOX9 の標的遺伝子の同定と、その機能を明らかにする。
- (2) 先行研究で同定した *Dhh* を含めた新規標的遺伝子の *in vivo* での発現における SOX9 の重要性について解明する。

これらの解析により、不明点の多い軟骨および性分化の新たな分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) RNA-seq を行い、軟骨細胞、セルトリ細胞の遺伝子発現プロファイルを作製した。この RNA-seq と ChIP-seq のデータを統合して解析を行い、SOX9 が近傍に結合し、それぞれの細胞で高発現の遺伝子を標的遺伝子候補として同定した。

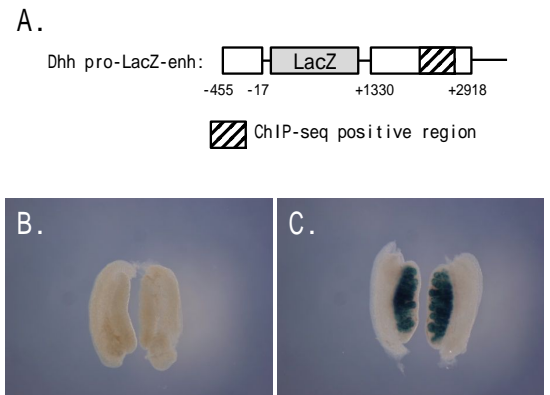


図1. SOX9 結合領域を含む *Dhh* の第一イントロンは *in vivo* でオス生殖腺特異的なエンハンサー活性を持つ。
(A) *Dhh* の上流領域と第一イントロンの DNA 配列を含む LacZ レポーター遺伝子のコンストラクト。数字は転写開始点からの位置を示している。A を導入したトランスジェニックマウスの (B) メスと (C) オス生殖腺の LacZ 発現パターンの染色像。

- (2) ChIP-seq 解析とその後の詳細な解析により *Dhh* の第一イントロン内に性分化時にエンハンサー活性を持つ領域を同定していた (図1)。本研究では、この発現制御領域に含まれる SOX9 の結合配列を欠損するマウスを作製して、*in vivo* での *Dhh* の発現制御における SOX9 の役割について解析した。そのため、本研究では、ゲノム編集技術である Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN) (Christian M, et al.,

Genetics. 2010)を用いて、受精卵への RNA のマイクロインジェクション法による導入 (Takada S, et al., *PLoS One*. 2013; Kato T, et al., *Sci Rep*. 2013) により迅速かつ安価に遺伝子改変マウスを作製して解析を行った。

作製した遺伝子改変マウスは発生時の *Dhh* の発現や表現型を調べることで、その *in vivo* での発現制御における SOX9 の重要性について解析した。

4. 研究成果

(1) SOX9 の軟骨および性分化における機能未知の新規標的遺伝子の同定

本研究に先行して行った ChIP-seq 解析により得られたゲノムワイドな SOX9 の軟骨および性分化における結合領域情報から近傍の遺伝子情報を基に標的遺伝子候補を得ていた。この標的遺伝子候補の中には、機能未知の遺伝子は軟骨および性分化のそれぞれにおいて数十個程度と以降のそれぞれの組織形成における機能を調べる解析対象とするには数が多かった。また、ChIP-seq 解析では SOX9 の結合情報のみであり、それぞれの結合が近傍の遺伝子の制御に機能的かどうかはわからない。

そこで、それぞれの細胞で高発現する遺伝子のプロファイル RNA-seq 解析により取得して ChIP-seq データと統合的に解析することにより、詳細な標的遺伝子候補の同定を行った。

そのため、軟骨細胞で Cre を発現する Col2-Cre マウスと Cre が発現する組織でレポーター遺伝子を発現する Rosa26 reporter (R26R) マウスを交雑させて軟骨細胞でレポーター遺伝子を発現するマウスと、セルトリ細胞でレポーター遺伝子を発現する SRY-GFP マウスを用いて、Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) によりそれぞれ、胎生期の軟骨細胞、セルトリ細胞を単離した。これらを試料として RNA を抽出し、ライブラリを作製したのち、次世代シーケンサー (illumina) で解析を行う RNA-seq 解析を行い、それぞれ、全胚と同様に解析したデータと比較して軟骨細胞、セルトリ細胞で高発現する遺伝子のプロファイルを取得した。このデータと ChIP-seq データと組み合わせる解析を行い、それぞれ 325、32 の有力な標的遺伝子候補を同定した。これらの遺伝子の Gene Ontology をデータベースを利用して探索すると、軟骨細胞では 9、セルトリ細胞では 3 の遺伝子が Biological Process が定義されていない機能未知遺伝子であった。

SOX9 は軟骨および性分化の両方で中心的に働く転写因子であることから、これらの新たに同定した標的遺伝子候補、特に機能未知遺伝子はそれぞれの分化に関わる新規の遺伝子であることが期待できる。今後、これらの新規標的遺伝子候補の機能を解明することで、それぞれの分化の分子メカニズムの解明

に繋がるのが期待できる。

(2) 標的遺伝子の *in vivo* での発現における SOX9 の重要性の解析

先行研究で得られている *Dhh* の制御領域について、培養細胞をルシフェラーゼアッセイによる詳細な解析を行い、SOX9 の詳細な結合領域を検討し、同定した。この結合領域への SOX9 の結合が、*Dhh* の精巣形成時における発現に重要かどうか解析を行うため、この結合領域を欠損する遺伝子改変マウスをゲノム編集技術である TALEN により作製した。SOX9 が認識する DNA 配列は (A/T) (A/T) CAA (T/A) G の 7 塩基であり、数塩基から数十塩基の欠損を誘導できる TALEN の技術で充分欠損させることができた (図 2)。

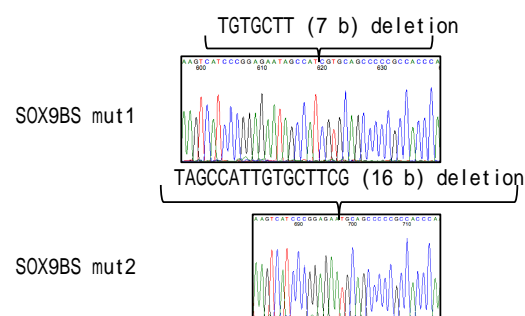


図 2. TALEN により作製した SOX9 Binding Site (BS) を欠損する遺伝子改変マウスの DNA 配列

2 種類の異なる欠損を持つ、この遺伝子改変マウスを用いて解析した結果、13 日胚のオス生殖腺での *Dhh* の時空間的な発現への影響は観察されなかった。

そこで、精巣形成時において、SOX9 と協調して働く NR5A1 (Ad4BP1/SF1) について培養細胞を用いた検討を行い、*Dhh* の発現制御において SOX9 と協調して働いていること、および、詳細な結合領域を同定した。この NR5A1 および SOX9 の結合領域を両方欠損した遺伝子改変マウスを同様に TALEN により作製して解析を行った結果、野生型のマウスに比べて、胎生期の精巣で約 4 割、*Dhh* の発現が減少していた。これらの結果から、SOX9 と NR5A1 が協調的に働き、精巣形成時における *Dhh* の発現が制御されていることを明らかにした (論文投稿準備中)。

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 3 件)

1. Doiguchi M, Nakagawa T, Imamura Y, Yoneda M, Higashi M, Kubota K, Yamashita S, Asahara H, Iida M, Fujii S, Ikura T, Liu Z, Nandu T, Kraus WL, Ueda H, Ito T.

SMARCAD1 is an ATP-dependent stimulator of nucleosomal H2A acetylation via CBP, resulting in transcriptional regulation.

Sci Rep 査読あり 6 2016

DOI: 10.1038/srep20179.

2. Hara S, Tamano M, Yamashita S, Kato T, Saito T, Sakuma T, Yamamoto T, Inui M, Takada S.

Generation of mutant mice via the CRISPR/Cas9 system using FokI-dCas9.

Sci Rep 査読あり 5 2015

DOI: 10.1038/srep11221.

3. Inui M, Miyado M, Tamano M, Kubo A, Yamashita S, Asahara H, Fukami M, Takada S.

Rapid generation of mouse models with defined point mutations by the CRISPR/Cas9 system.

Sci Rep. 査読あり 4 2014

DOI: 10.1038/srep05396.

〔学会発表〕(計2件)

1. 山下 聡、宮嶋さなえ、浅原弘嗣
Sox9 による Sox5、Sox6 の発現制御領域の探索
第28回日本軟骨代謝学会 2015年3月6日 東京医科歯科大学(東京、文京区)
2. 山下 聡、加藤朋子、山口勝司、重信秀治、乾雅史、高田修治、浅原弘嗣
SOX9 はオス生殖腺において *Dhh* の発現を直接制御する
第37回日本分子生物学会年会 2014年11月27日 パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下 聡(YAMASHITA, Satoshi)

東京医科歯科大学・医学部・助教

研究者番号: 40511077

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし