

氏 名 田 村 勝

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第331号

学位授与の日付 平成10年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 ディファレンシャルスクリーニング法により単離された
マウス生殖巣形成過程において性依存的な発現を示す新
規basic helix-loop-helix型転写因子に関する研究

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 小原 雄治
教 授 今村 孝
教 授 池村 淑道
助 教 授 城石 俊彦
教 授 高木 信夫（北海道大学）

論文内容の要旨

個体の性はいかにして決まるのか、この疑問は古来から多くの人々の関心を集めているが、現在においても決定的な解答は得られていない。1990年に一種の転写因子と考えられる遺伝子、Sry (Sex-determining region on Y chromosome) が単離され、翌年にはSry 遺伝子をXX マウスに導入したトランスジェニックマウスが作成された。そしてこの遺伝子が精巣決定因子としての条件を満たすことが示された。しかしながらSry 遺伝子のみで性決定のすべてが明らかになったわけではなく、他の多くの遺伝子の関与が予想されている。現在ではSry 遺伝子の他にも性決定に関与する遺伝子としてWT-1、DAX-1、SOX-9、Ad4BP (SF-1) などが挙げられるが、これらの遺伝子もほぼ全てが転写因子であり、性分化に直接関わる機能分子については全く未同定であるなど、解明すべき点が多く残されている。そこで私は実験動物としてマウスを用い哺乳類性決定の分子メカニズムを明らかにすることを目的として13.5 dpc 雌雄生殖巣間での遺伝子発現の差を指標に性分化に関与する新規遺伝子、機能分子の単離を試みた。

実験方針としてまず雄で発現している遺伝子を雌で発現している遺伝子によりサブトラクトすることにし、そこで得られた雄サブトラクトcDNAと雌cDNAを用いて11.5~13.5 dpc マウス生殖巣cDNAライブラリーをディファレンシャルスクリーニングすることにした。その結果、効率良く性分化関連候補遺伝子を単離する実験系を確立することができた。サブトラクション法としてビオチンとストレプトアビジン結合磁気ビーズを用いたシステムを採用し実験を行った結果、サブトラクションを3回繰り返すことによりハウスキーピング遺伝子であるG3PDHはサザンブロット解析において検出されないレベルまで取り除くことができ、逆にこの時期において雄生殖巣特異的に発現していることが知られているDesert hedgehog 遺伝子は大幅に濃縮することができた。

雄サブトラクトcDNAと雌cDNAを用いて11.5~13.5 dpc マウス生殖巣cDNAライブラリーをディファレンシャルスクリーニングした結果、約千プラークに対して1個の割合で雌雄生殖巣で発現の異なる性分化に関与することが期待される候補遺伝子が単離された。ディファレンシャルスクリーニングを繰り返すことにより243個の候補遺伝子を単離し、それらクローンについてPCR サザン解析、ドットブロット解析を行うことにより32個の性分化関連候補遺伝子を単離した。これらの塩基配列の決定を行ったところ、20クローンはMullerian inhibiting substance やステロイド代謝酵素である P-450 17 α hydroxylase などの今までに報告のある既知の遺伝子群であり、残り12クローンは新規遺伝子群であった。新規遺伝子群の内訳は、ベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス型転写因子が3クローン、EGF 様繰返し配列を有するものが1クローン、シスタチン様タンパク質をコードするものが3クローン、リラキシン様タンパク質をコードするものが1クローンで、残り3クローンは他のものに全く相同性がない新規遺伝子であった。また、既知の遺伝子群の中にもマウス胎仔生殖巣での発現に関する報告がなく性分化に関与することが期待されるものが存在していた。

これらの中でも新規ベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス型転写因子、MR-7 についてさらに解析を進め、その時間的、空間的な発現パターン等を詳細に調べた。MR-7は、その塩基配列から予想されるタンパク質が m-Twist や paraxias などの中胚葉

系に発現がみられるヘリックス・ループ・ヘリックス型転写因子と高い相同性があり、その発現はWhole-mount in situ hybridizationの結果 8.5 dpc 胚で最初に予定鰓弓領域から尿膜基部にかけて確認された。9.5 dpc 胚になると鰓弓、心臓の一部、泌尿生殖隆起予定域に発現がみられ、さらに発生が進み 10.5 dpc 胚になると心外膜、鰓弓、泌尿生殖隆起、尿管芽等に発現がみられた。生殖巣においては 13.5 dpc 生殖巣で雄に非常に強い発現を示し、雌では弱い発現が観察されこの発現パターンは 18.5 dpc 生殖巣になるまで継続した。またその発現細胞は雄ではライディッヒ細胞、雌では卵丘細胞または間質細胞であることが考えられた。生後の精巣、卵巢での MR-7 の発現をノーザンブロット法を用いて解析を行ったところ、精巣では出生後発現量が時間を経過するに従って減少し、5 週齢精巣においてはかろうじて発現を検出できるレベルになった。これとは対照的に、卵巢での発現は出生後 1 週から 2 週目にかけては胎児期と同様に弱い発現が続いたが、2 週目から 3 週目にかけて発現量が増加し 4 週目にその発現のピークを迎えることが明らかとなった。すなわち、精巣と卵巢での発現量は、生後 2 週目から 3 週目にかけて逆転することが観察された。以上述べた生殖巣での発現パターンおよびヘリックス・ループ・ヘリックス型転写因子であることから、MR-7 は生殖巣形成と性分化に関与する WT-1 もしくは Ad4BP / SF -1 を制御する遺伝子である可能性が考えられ、生殖巣の発生および性分化の分子メカニズムを解明するための新たな手がかりが得られた。

論文の審査結果の要旨

哺乳類の性決定、とりわけ性巣分化の機構は非常に興味深い問題である。精巣決定因子としてSry遺伝子が見つけれられ、さらにWT-1, DAX-1, SOX-9, Ad4BPなどの転写因子が関わるということが明かにされてきたが、その分子メカニズムには未解明な点が多い。

田村勝君は、性分化に直接関わる機能分子の解明を目的に、マウスの生殖巣の分化初期で雄雌の間で発現に差がある遺伝子を探索するアプローチをとった。本論文では、生殖巣の性分化にはっきりした違いが見られる13.5dpcの雌雄生殖巣間で遺伝子発現に差のある遺伝子クローニングをおこなった。試行錯誤の結果、ストレプトアビジン結合磁気ビーズを用いたサブトラクション法で雄特異的に発現する遺伝子を濃縮することに成功した。これをプローブにマウス生殖巣cDNAライブラリーをスクリーニングし、最終的に雄生殖巣で強い発現を示すものとして12種類の遺伝子のクローンを得た。うち5種類は既知の遺伝子であり、雄特異的遺伝子として知られているMISやP-450 17 α が含まれていた。残りの7種は新規遺伝子であり、それぞれに特徴的な発現パターンを見いだした。DHH (Desert hedgehog) など発現量が低いものでも差シグナルをあたえるプローブであることが確認された。

ついで田村君はこの中から転写因子である可能性の高い新規塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス型遺伝子MR-7に着目し、ノーザン法と*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて発現パターン解析を詳細におこなった。その結果、胎児期とは異なり生後2~3週目で精巣と卵巣での発現強度が逆転すること、生殖巣分化の初期での発現パターンが上記のWT-1, Ad4BPとよく一致していることなどを見いだした。このタイプの塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス型遺伝子はE-boxとよばれる配列に結合して転写制御をしていることが知られており、WT-1, Ad4BPの調節領域にE-boxが見つかることから、今後の実験的な検討が必要であるが、これらの間の制御関係について推論をおこなった。

以上のように、高品質のサブトラクションプローブ作成に成功したことから、今後生殖巣分化のより初期でのディファレンシャルスクリーニングが可能となり、スクリーニングのスケールをあげることでこの過程に関わる遺伝子群を総ざらえすることも期待される。マウス生殖巣分化の分子メカニズム解明への今後の寄与は極めて大きいと考えられるものであり、このような系をつくりあげたことは学位授与の要件を満たすものと判断した。

公開発表に続き、5名の審査委員が田村君と質疑応答をおこない、実験結果の解釈、博士論文及び関連分野での知識と考察力を質した。特に実験系の問題点、推論の検証法などについての理解がなされていることを確認し、学位にふさわしい学力を有していると判定した。英語力については、すでに国際誌に発表された1編と現在作成中の論文原稿から十分な実力があると判定した。