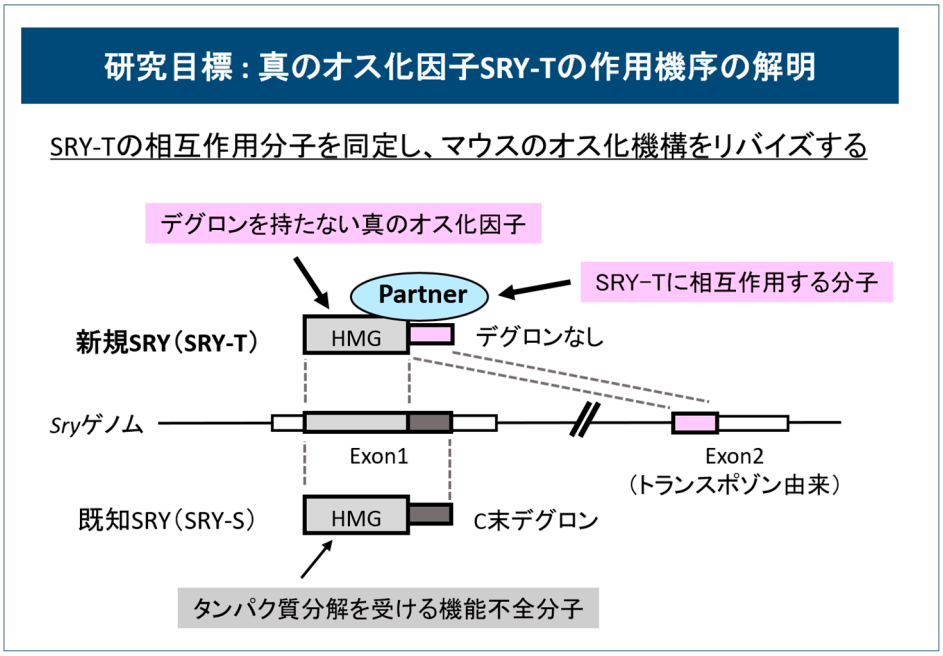
28　ほ乳類のオス化の分子メカニズムの解明	立花　誠

【目的】2020 年に私たちは、それまで単一エクソンと考えられてきたマウス性決定遺伝子 *Sry* の遺伝子座に「隠れたエクソン」が存在すること、さらにそのエクソンが、これまで未同定だった真の性決定因子 SRY-T タンパク質の C 末端をコードすることを明らかにした。またこの研究により、既知の性決定因子 SRY-S がタンパク質分解を受ける機能不全分子であることも分かった。これらの私たちの研究成果は、これまで SRY-S をもとに構築されてきたマウスのオス化の分子機構も見直しを促すものであった。すなわち、真の性決定因子 SRY-T を材料にしてマウスのオス化機構を再構築する必要があった。本研究では、SRY-T と協調して働くパートナー分子を同定することで、ほ乳類オス化カスケードのスイッチングの分子機構の実体を明らかにする。

【方法】TurboID と呼ばれる変異型ビオチン化酵素を用い、細胞内で SRY-T タンパク質に近接して存在するタンパク質を網羅的に同定する。それら SRY-T 相互作用タンパク質のうちで、胎仔期のマウス生殖腺において性決定を実行する細胞（プレセルトリ細胞）で発現が特異的に高い分子を選抜し、SRY-T の相互作用分子の候補とする。得られた候補分子について変異体マウスを作製し、生殖腺の性分化の表現型解析を行う。

【結果】SRY-T の相互作用分子の候補として、BAHCC1 タンパク質を同定した。BAHCC1 タンパク質は TurboID-SRY-T 融合タンパク質によってビオチン化されること、*Bahcc1* 転写産物はプレセルトリ細胞特異的に高く発現していることを見出した。遺伝学的な解析により、*Bahcc1* を欠損した XY マウスはオスに分化することが分かった。

本研究の概要：真の性決定因子 SRY-T の相互作用分子を同定し、マウスのオス化機構を理解する



28. ほ乳類のオス化の分子メカニズムの解明

立花　誠

大阪大学 大学院生命機能研究科 細胞ネットワーク講座 エピゲノムダイナミクス研究室

Key words：生殖腺，性決定，Sry，SRY-T，相互作用分子

緒　言

我々人間を含めた高等動物は、オスかメスのどちらか一方へと分化（性分化）し、自身の遺伝情報を子孫へと伝えていく。ほ乳類のY染色体には、オス化を促す遺伝子が存在することが古くから提唱されてきた［1］。ほ乳類のオス化遺伝子の強力な候補である *SRY* がヒトで同定されたのは今から34年前であり［2］、その翌年には *Sry* 遺伝子の外来的な導入がXXマウスをオス化することが示された［3］。SRYタンパク質は、DNA結合ドメインを有する転写因子であるSOXファミリー分子群に属している。SOXファミリー転写因子は相互作用するパートナー分子と協調して機能を発揮することが分かっているが［4］、SRYのパートナー分子はいまだ見つかっていない。このような背景から、本研究ではSRYと協調してオス化を促すパートナー分子の同定とその機能解明を目指す。

すべてのほ乳類のSRYは単一エクソン遺伝子であるとの概念は、性の研究領域における常識であった。対し、私たちは、マウス *Sry* 遺伝子座にはこれまで見過ごされてきた第2エクソンが存在し、これがマウスのオス化に必須であることを見出した。さらに、これまでマウスのオス化因子であると考えられてきた単一エクソン型の既知翻訳産物SRY（SRY-S）は、C末端にタンパク質分解モチーフのデグロン配列を有しているために速やかに分解を受けること、一方ふたつのエクソンに由来する新規翻訳産物SRY-Tは、デグロン配列を持たないためにSRY-Sよりはるかに安定であることを見出した。すなわち私たちの研究成果により、SRY-Sではなく SRY-Tがマウスの真のオス化因子であることが分かった（要旨の図を参照）［5］。

このような背景から、これまでSRY-Sをもとに構築されてきたマウスのオス化の分子機構は、SRY-Tをもとにして再構築すべきであると結論した。本研究では、真のオス化因子である SRY-T と協調して働くパートナー分子を同定することで、ほ乳類オス化カスケードのスイッチングの分子機構を明らかにする。ヒトのXY女性患者のうち、SRYを含む既知の性決定・性分化遺伝子に変異がない症例は約半数にものぼる。本研究提案によってオス化に必要な新たな因子を同定することで、性分化疾患の新たな発症機構の解明につながる可能性がある。

方法および結果

1. SRY-T 相互作用タンパク質の候補、BAHCC1（BAH and Coiled-Coil Containing 1）の同定

マウスES細胞（TT2細胞株）にTurboIDとSRY-Tの融合タンパク質（HA-TurboID-SRY-T）の発現プラスミドを導入し、HA-TurboID-SRY-Tを安定的に発現する株を取得した。当該ES細胞の培地にビオチンを加え、ビオチン化反応を促した。その後グアニジンを含むlysis溶液でES細胞を破砕し、変性条件下で総タンパク質を抽出した。ストレプトアビジンビーズによってビオチン化されたタンパク質を回収した。回収したタンパク質をトリプシンで断片化し、LC-MS/MSによるタンパク質の質量分析を行った。質量分析は、徳島大学先端酵素学研究所の小迫英尊博士との共同研究で進めた。

HA-TurboID-SRY-Tによってビオチン化されたペプチドは1,000種類以上同定された。私たちは対照試料として、TurboIDと核局在シグナルを付加したEGFPの融合タンパク質（HA-TurboID-NLS-EGFP）を安定的に発現するES細胞を用い、この細胞でも同様のビオチン化実験を行った。HA-TurboID-SRY-Tによってビオチン化されたペプチ

ドと、HA-TurboID-NLS-EGFP によってビオチン化されたペプチドを比較し、前者で有意にビオチン化される分子に着目した。さらにそのうちで、核局在分子、DNA 結合能を持つ分子、転写因子など、SRY-T の機能を補佐する可能性のある分子に特に着目して解析を行った。その結果、BAH and Coiled-Coil Containing 1（BAHCC1）タンパク質が有力な候補となった。BAHCC1 は、その C 末端にある BAH（bromo-adjacent homology）ドメインにより、H3K27 me3 を認識することが分かっている［6］。H3K27me3 はマウス生殖腺のオス化に重要な役割を果たすことを我々は見出しており［7］、このことも、BAHCC1 が SRY-T による性決定に関与している可能性を支持した。HA-TurboID-SRY-T によってビオチン化された BAHCC1 のリジン残基を図 1 に示した。ビオチン化されたリジン残基は、主として N 末端側に多く分布していた。また C 末端の BAH ドメイン近傍にもひとつだけ存在することが明らかになった（図 1）。

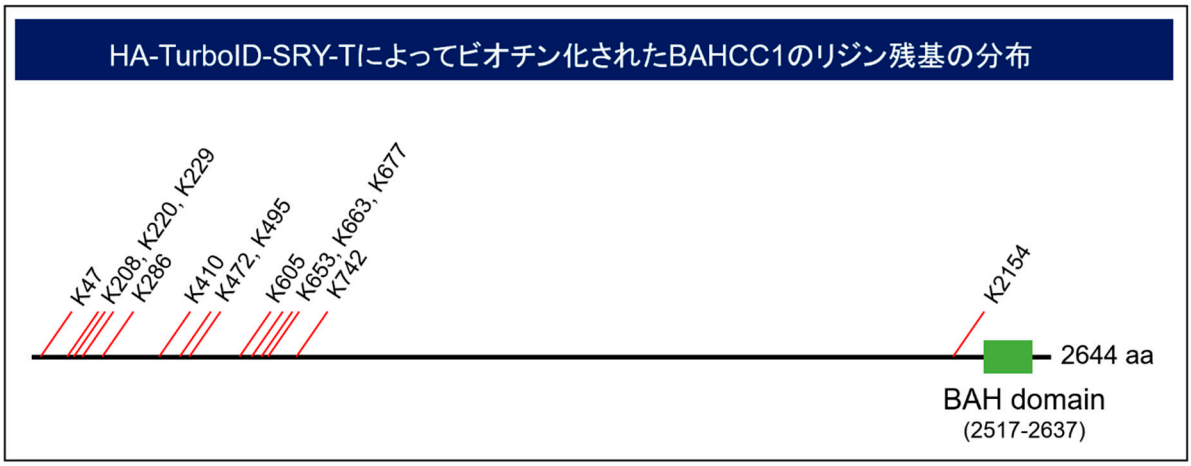


図 1. HA-TurboID-SRY-T によってビオチン化された BAHCC1 のリジン残基の位置

2. マウスの胎仔期生殖腺における *Bahcc1* の発現

次に胎仔期のマウス生殖腺における *Bahcc1* 転写産物の発現解析を行った。私たちは過去に、マウス胎仔期生殖腺から *Sry* を発現して性決定を担う体細胞（プレセルトリ細胞、*Nr5a1*-high 細胞）と、*Sry* を発現しない体細胞（*Nr5a1*-low 細胞）を分離・精製する実験系を確立していた［8］。この実験系を用い、胎生 10.5 日、11.0 日、11.5 日の生殖腺から、*Nr5a1*-high 細胞と *Nr5a1*-low 細胞を精製し、mRNA-seq 解析を行った。その結果、図 2 に示すように、どのステージにおいても、*Bahcc1* 転写産物の発現は、*Nr5a1*-low 細胞のそれよりも *Nr5a1*-high 細胞のそれのほうが高いとの結果が得られた（図 2）。また、*Nr5a1*-low 細胞では Sry の発現が検出されず、一方で *Nr5a1*-high 細胞では *Sry* の発現が胚発生とともに上昇していた。これは細胞の分画がうまくいっていることの証左であった。このような *Bahcc1* の遺伝子発現プロファイルは、BAHCC1 が *Sry* の発現制御に正に関わっているとの仮説に矛盾しないものであった。

3. *Bahcc1*-KO マウスの作出と表現型の解析

次に *Bahcc1*-KO マウスの作出を試みた。図 3 示すように、*Bahcc1* 遺伝子は 28 個のエクソンで構成されている。このうちエクソン 5 と 6 を CRISPR/Cas システムによって欠損させるとのストラテジーで、*Bahcc1*-KO マウスの作出を行った。このストラテジーではフレームシフトが生じるため、正常な BAHCC1 タンパク質が翻訳されず、186 アミノ酸からなる truncated タンパク質が産生されると予想される。電気穿孔法により、二つの gRNA、ドナーssDNA、およびリコンビナントタンパク質をマウス受精卵に導入した。ゲノム編集を行った胚は、翌日に仮親に移植し、出生後の性分化の表現型観察に供した。

上記実験の結果、計 8 匹の新生仔マウスを得ることができた。生後 1 日目に PCR によるゲノタイピングを行った結果、*Bahcc1* アレルがホモで欠損したマウスが 3 匹存在した（#2、#3、#6）。このうち、#2 および#3 が XY、#6 が XX であった。これらのマウスの内部生殖器を摘出し、その形状を観察した（図 4）。XY *Bahcc1*-KO マウスにおいては、#2 と#3 ともに内部生殖器はオス（精巣）であった。また、XX *Bahcc1*-KO マウスにおいては、卵巣が観察された。

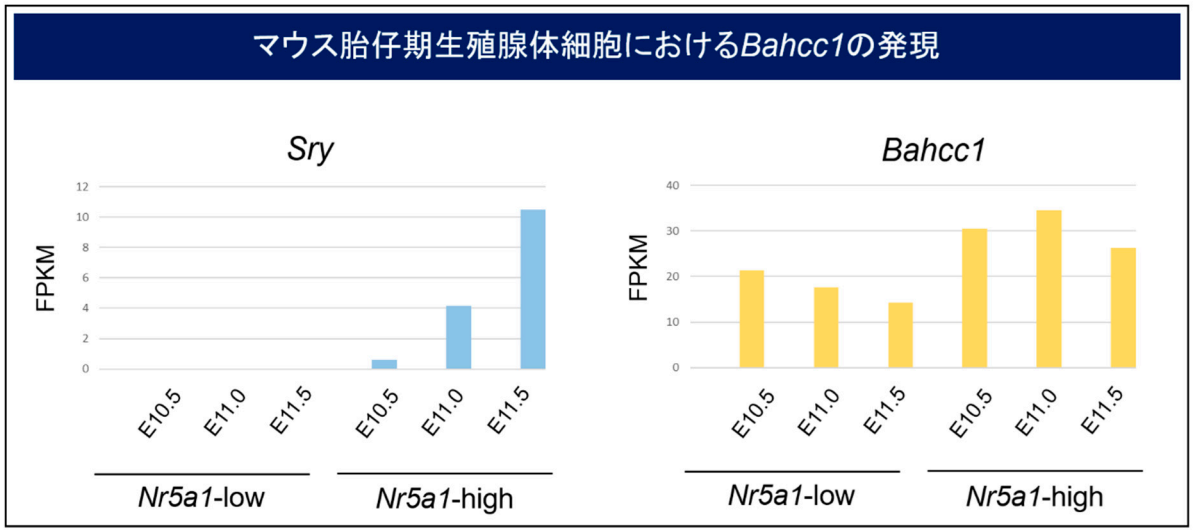


図 2.　マウス胎仔生殖腺における Bahcc1 の発現

胎仔期のマウスから生殖腺を摘出し、性決定を実行する細胞（*Nr5a1*-high 細胞）と性決定に関与しない細胞（*Nr5a1*-low 細胞を精製）に分画した。それらを mRNA-seq に供し、*Bahcc1* および *Sry* の発現プロファイルを解析した。

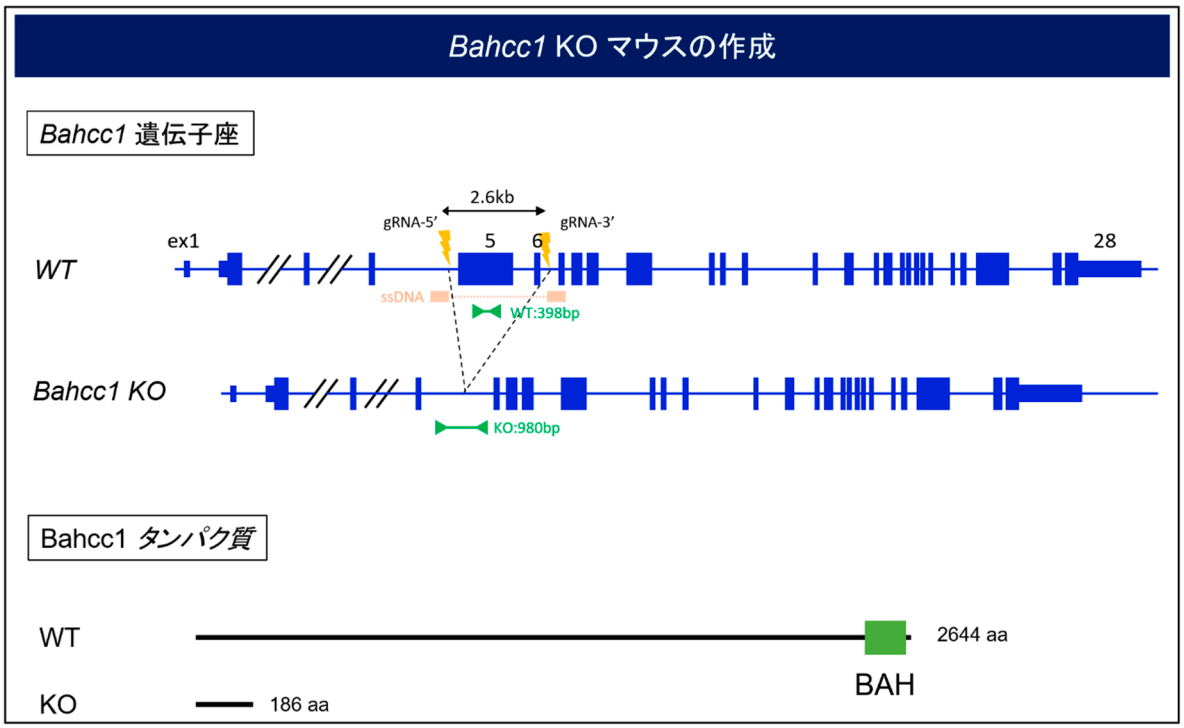


図 3.　*Bahcc1*-KO マウスの作出

CRISPR/Cas システムにより、*Bahcc1* 遺伝子のエクソン 5 と 6 を欠損させた。これにより、フレームシフトが生じるため、エクソン 7 以降は正しく翻訳されなくなる。ゲノタイピングプライマーの位置とアンプリコンサイズを緑色で示した。KO アレル検出 PCR（980 bp）でアンプリコンが検出され、かつ WT アレル検出 PCR（398 bp）でアンプリコンが検出されなかったものを KO と判定した。

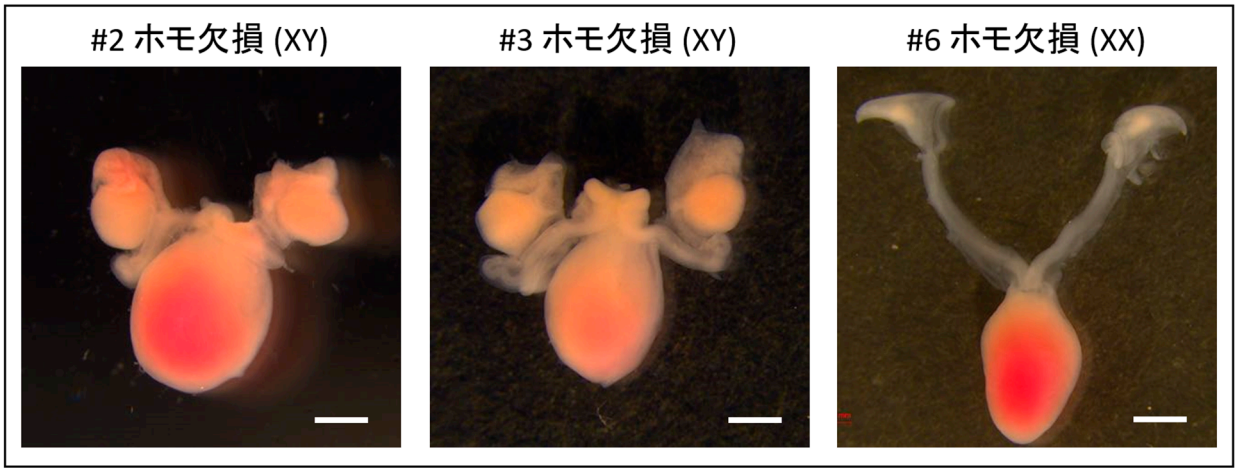


図 4. *Bahcc1*-KO マウスの内部生殖器

ゲノム編集により、XY *Bahcc1*-KO マウスを 2 匹得ることができた（#2、#3）。それらのマウスはともに二つの精巣を有していた。また XX *Bahcc1* -KO マウスを 1 匹得ることができた（#6）。このマウスは二つの卵巣を有していた。スケールバーは 2 mm を示す。

考　察

1. SRY-T と BAHCC1 の相互作用について

図 1 に示すように、HA-TurboID-SRY-T によってビオチン化されたリジン残基は、BAHCC1 の N 末端側に集中していた。この結果は、SRY-T は BAHCC1 の N 末端部分と相互作用する可能性を強く示唆した。今後は、細胞株を使った強制発現による共免疫沈降実験を行い、SRY-T と BAHCC1 の結合様式を明らかにして行く必要がある。

2. BAHCC1 のマウス性決定における役割について

BAHCC1タンパク質は、マウスのオス化に必須ではないとの結果が得られた。しかしこの結果は、BAHCC1がSRY-Tのパートナー分子であることを否定するものではない。図1に示すように、BAHCC1のN末はSRY-Tと強く相互作用する可能性があり、今後は生化学的にそれを検証していく必要がある。また、BAH ドメインは様々な転写抑制分子、転写活性化因子に保存されている［9］。このことから、これらBAH ドメイン含有タンパク質がBAHCC1の機能を相補している可能性がある。この点を考慮し、性決定を担う細胞（*Nr5a1*-high細胞）（図2）で高く発現しているBAH ドメイン含有タンパク質の機能についても、今後検討していくべきである。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、徳島大学先端酵素学研究所シグナル伝達学研究室の小迫英尊教授である。

文　献

1） McLaren A. Sex determination in mammals. Trends Genets 1988 Jun;4(6):153-7. doi: 10.1016/0168-9525(88)90020-0. PMID: 3076297

2） Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature. 1990 Jul 19;346(6281):240-4. doi: 10.1038/346240a0. PMID: 1695712

3) Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. Nature. 1991 May 9;351(6322):117-21. doi: 10.1038/351117a0. PMID: 2030730
4) Wilson M, Koopman P. Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. Curr Opin Genet Dev. 2002 Aug;12(4):441-6. doi: 10.1016/s0959-437x(02)00323-4. PMID: 12100890
5) Miyawaki S, Kuroki S, Maeda R, Okashita N, Koopman P, Tachibana M. The mouse Sry locus harbors a cryptic exon that is essential for male sex determination. Science. 2020 Oct 2;370(6512):121-124. doi: 10.1126/science.abb6430. PMID: 33004521
6) Fan H, Lu J, Guo Y, Li D, Zhang ZM, Tsai YH, Pi WC, Ahn JH, Gong W, Xiang Y, Allison DF, Geng H, He S, Diao Y, Chen WY, Strahl BD, Cai L, Song J, Wang GG. BAHCC1 binds H3K27me3 via a conserved BAH module to mediate gene silencing and oncogenesis. Nat Genet. 2020 Dec;52(12):1384-1396. doi: 10.1038/s41588-020-00729-3. Epub 2020 Nov 2. PMID: 33139953
7) Okashita N, Maeda R, Tachibana M. CDYL reinforces male gonadal sex determination through epigenetically repressing Wnt4 transcription in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2023 May 16;120(20):e2221499120. doi: 10.1073/pnas.2221499120. Epub 2023 May 8. PMID: 37155872
8) Kuroki S, Matoba S, Akiyoshi M, Matsumura Y, Miyachi H, Mise N, Abe K, Ogura A, Wilhelm D, Koopman P, Nozaki M, Kanai Y, Shinkai Y, Tachibana M. Epigenetic regulation of mouse sex determination by the histone demethylase Jmjd1a. Science. 2013 Sep 6;341(6150):1106-9. doi: 10.1126/science.1239864. PMID: 24009392
9) Goodwin GH, Nicolas RH. The BAH domain, polybromo and the RSC chromatin remodelling complex. Gene 2001 May 2;268(1-2):1-7. doi: 10.1016/s0378-1119(01)00428-0. PMID: 11368894