

奨励金No.1504

性的多様性の理解に向けた Sry の機能的タンパク質複合体の解明

黒木 俊介

大阪大学大学院 生命機能研究科 准教授

Identification of Sry protein complexes for understanding sexual diversity

Shunsuke Kuroki

Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, Associate Professor



Y 染色体上の遺伝子 Sry は、オス化を誘導するマスター転写因子である。転写因子が正しく機能するためには、各々が特定の結合タンパク質と複合体を形成する必要がある。しかし、Sry は発見から 30 年経つにも関わらず、いまだその結合タンパク質は同定されていない。本研究では、近年登場した新たな相互作用タンパク質の同定法 BioID を駆使して、Sry が形成する機能的タンパク質複合体を同定し、Sry の転写制御メカニズムの解明を目指した。

Sry on the Y chromosome is a master transcription factor essential for male development in mammals. Although it has been 30 years since Sry was discovered, its co-factors have not been identified. In this study, we aimed to identify the functional protein complex formed by Sry using the BioID method.

1. 研究内容

1.1 近依存性ビオチン化標識法による Sry-T 相互作用タンパク質の同定

近年、免疫沈降に代わる結合タンパク質の同定法として、近依存性標識法（BioID 法）が注目されている。BioID 法は、biotin 標識酵素を bait となるタンパク質に融合し、bait に近接するタンパク質を網羅的に biotin 化することで、高感度に結合タンパク質を回収・同定できる。本研究では、Sry-T が形成するタンパク質複合体を同定する目的で、Sry-T に biotin 化酵素 TurboID を連結した誘導タンパク質を発現する ES 細胞株を樹立した。比較用のコントロールとして、核移行シグナルを付加した TurboID（TurboID-NLS）を発現する ES 細胞株も樹立した。これらの細胞を用いて、biotin 化タンパク質をプルダウンで回収した後、サンプルを LC-MS/MS によるタンデム質量分析にかけ、Mascot 検索によるタンパク同定および相対定量数

値化を行い、Sry-T に特異的に相互作用するタンパク質のリストを作成した。得られた遺伝子リストを、申請者が既に取得している胎生 11.5 日生殖腺の遺伝子発現データと照合し、特に生殖腺に発現する Sry-T 結合クロマチン因子の候補として遺伝子 A と遺伝子 B を同定した。

1.2 Sry-T 相互作用候補因子の欠損マウスの作製と解析

仮に同定した遺伝子 A/B が性決定に関与するならば、これらの遺伝子を欠損したマウスは性転換を呈することが予想される。これを検証する目的で、遺伝子 A または B の遺伝子欠損マウスを作出し F0 世代で解析した。受精卵エレクトロポレーション法により各遺伝子を欠損する胚を作製し、偽妊娠マウスに移植した後、出生した仔の生殖腺（精巣または卵巣）から性転換の有無を判定した（Fig. 1）。結果、遺伝子 A をホモ欠損した個体（XY 型）の生

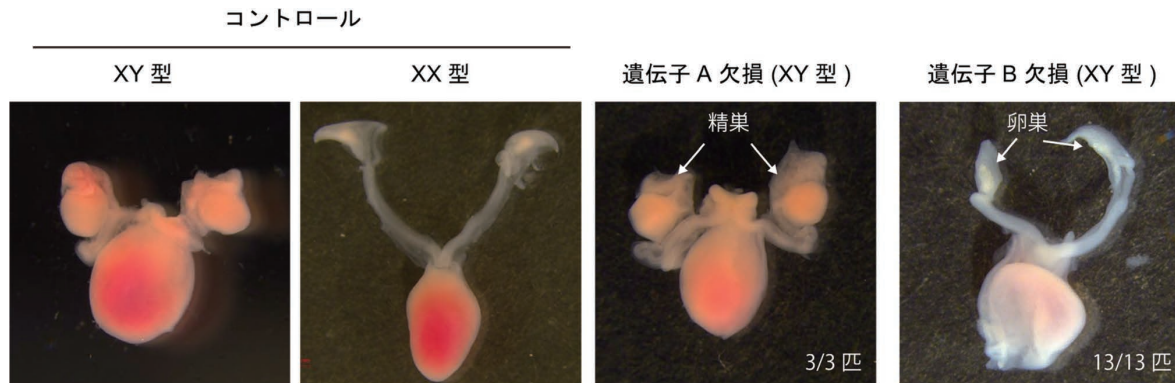


Fig. 1

殖腺はすべて精巣であった ($n=3$)。一方で、遺伝子 B をホモ欠損した個体 (XY 型) の生殖腺はすべて卵巣であった ($n=13$)。これにより、遺伝子 B はオス化に必須なことが示された。

1.3 Sry-T 相互作用候補因子の作用機序の解明

最初に、性決定・分化経路における遺伝子 B の作用点を明らかにする目的で、遺伝子 B 欠損マウスの胎生 11.5 日（性決定期）の生殖腺を解析した。最初に、遺伝子 B 欠損マウス (XY 型) の生殖腺体細胞を用いて RNA-seq を行い、既知の性決定関連遺伝子の発現量を野生型 (XY 型) と比較した。その結果、性決定遺伝子 Sry の発現と Sry 下流因子でオス化に必須の転写因子 Sox9 の発現が顕著に低下していた。次に、遺伝子 B 欠損マウス (XY 型) の生殖腺体細胞における Sry と Sox9 の発現を組織免疫染色により調べた (Fig. 2)。結果、RNA-seq の解析結果と一致して、タンパク質レベルでも Sry と Sox9 の発現量が顕著に減少していた。

1.4 まとめ

初年度は BioID 法を用いて Sry と結合するタンパク質を探索し、特に性決定期生殖腺に高発現するクロマチン因子として遺伝子 A と B を絞り込んだ。これらの遺伝子の欠損マウスを作製し雌雄を調べた結果、遺伝子 B の欠損マウスで雄から雌への性転換が観察された。遺伝子 B の欠損マウスの

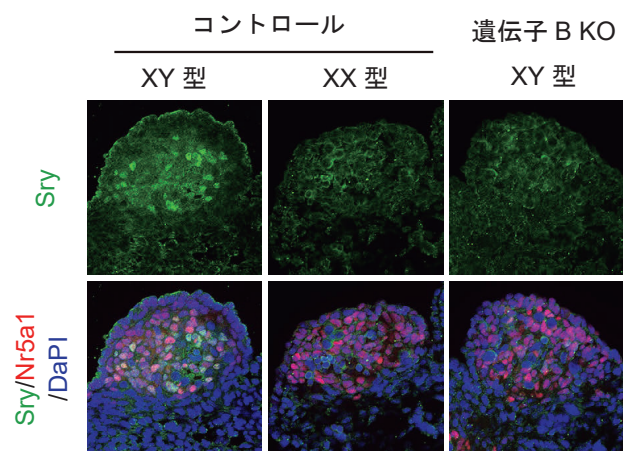


Fig. 2

性決定期生殖腺において Sry と Sox9 の発現は顕著に低下していた。異常の結果から、遺伝子 B がマウスのオス化に必須であることが示唆された。当初、遺伝子 B は Sry と結合するタンパク質として同定したことから、性分化経路において Sry の下流で機能することが予想された。しかし、遺伝子 B 欠損マウスで Sry 自体の mRNA 発現量が低下していたことから、少なくとも Sry の上流でも作用することが示唆される。今後、性決定シグナル経路における遺伝子 B の作用点を詳細に解明する予定である。

2. 発表（研究成果の発表）

なし（今後発表予定）