



Molecular morphological and genetic study on the mechanisms of the failure of sex differentiation

三觜, 友子

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2010-03-25

(Date of Publication)

2010-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4948

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004948>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	三觜 友子
博士の専攻分野の名称	博士（農学）
学 位 記 番 号	博い第 4948 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 22 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Molecular morphological and genetic study on the mechanisms of the failure of sex differentiation
(性分化の破綻機構に関する分子形態遺伝学的研究)

審 査 委 員

主 査	教 授	星 信彦
	教 授	北川 浩
	教 授	三宅 正史

氏名	三 腎 友 子		
論文 題目	Molecular morphological and genetic study on the mechanisms of the failure of sex differentiation (性分化の破綻機構に関する分子形態遺伝学的研究)		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	星 信彦
	副 査	教 授	北川 浩
	副 査	教 授	三宅 正史
	副 査		
	副 査		印

要 旨

概要

生物が遺伝的多様性を獲得するために構築した有性生殖は、次世代に遺伝情報を受け継ぐシステムであり、性分化は極めて重要な個体発生の分化過程あるいは生命活動と考えられる。ヒトをはじめとする哺乳類の性分化は、雄型と雌型の2通りのプログラムが用意されているわけではなく、基本型は雌型であり雄型は雌型から誘導される形で分化するとされる。すなわち、未分化性腺を精巣に誘導する精巣決定遺伝子であるY染色体上の*SRY* (*sex determining region of the Y chromosome*) 遺伝子が働く場合のみ雄に分化し、働かない場合は自動的に雌に分化する。*SRY* 遺伝子の同定により性分化機構は速やかに解明されるものと思われたが、*SRY* 遺伝子の突然変異や欠失、転座では説明のつかない性逆転の例が明らかになるにつれ、1つの遺伝子によって制御されるほど単純なものではないことが明らかとなった。

本論文では、原因不明のXY染色体型表現型女性(XY女性)に関して、従来の細胞分子形態学的解析に加え、新たに*SRY* 遺伝子の発現制御機構とエピジェネティクスとの関連ならびに発現変動を示す遺伝子の相互作用や全体の協調的な挙動、転写因子やバスクエイレベルでの発現変動に注目し、性逆転を引き起こした分子基盤を明らかにするとともに、新たな雄化破綻機構を提案することを試みている。

第I章では、FISH解析も含めた詳細な細胞遺伝学的検索でY染色体の腕間逆位、46,X,inv(Y)(p11.2q11.2)を突き止めたが、*SRY* 遺伝子の転座はなく、またY染色体に欠失も認められないことを明らかにしている。一方、*SRY* 遺伝子のシークエンス解析を行い、613C→Tの同義置換およびSNPの存在を明らかにし、さらに索状性腺は*SRY* 蛋白陽性であったことから、*SRY* 遺伝子の転写翻訳機能に異常がないことを示している。*SRY* 遺伝子の発現状態を検討した結果、患者の性腺および皮膚線維芽細胞で*SRY* mRNAの過剰発現を認めるとともに、正常男性由来皮膚線維芽細胞ではほとんど発現がみられず、時空間的に発現制御されるべき*SRY* 遺伝子の発現調節異常の疑いを提示した。*SRY* 遺伝子領域におけるヒストンH3のアセチル化状態を解析し、正常男性と比較して患者では、遺伝子発現を活性化するアセチル化ヒストンの割合が極めて高いことを明らかにし、mRNAの高発現を裏付けている。さらにGeneChipを用いたマイクロアレイ解析では、ヒストンアセチル化酵素(histone acetyl transferase: HAT)を活性化するPCAF(*p300/CBP-associated factor*)遺伝子の高発現を明らかにしている。転写誘導とよく相関するヒストン修飾として、ヒストンH3 K9とK14のアセチル化が知られているが、PCAFは主にK14をアセチル化修飾することが明らかとなっている。PCAF遺伝子の高発現がクロマチン・リモデリング因子をリクルートし、本来、サイレンシング状態にあるべき*SRY* 遺伝子を活性化しているものと推察している。遺伝子カスケードの雄化スイッチとし

氏名	三 腎 友 子		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	星 信彦
	副 査	教 授	北川 浩
	副 査	教 授	三宅 正史
	副 査		
	副 査		印

て機能する*SRY* 遺伝子は、正常な個体発生において、その発現時期および発現量が巧妙に制御されている。この*SRY* 遺伝子の発現調節異常は、下流カスケードを担う遺伝子群の時空間的な発現をも攪乱すると考えられ、本患者の場合、おそらくは胎児期において、*SRY* 遺伝子の高発現を主とする発現調節異常が存在したものと推測している。さらには、従来、原因不明であったXY女性症例において、エピジェネティック異常が原因の一つである可能性が考えられ、多様な性分化疾患の発症機構において、*SRY* 遺伝子のエピジェネティックな変異が関与することを強く示唆している。

第II章では、患者および正常男性由来皮膚線維芽細胞において、マイクロアレイ解析で得られた遺伝子発現プロファイルの差異を検討し、22,283個の遺伝子のうち、1,820個の遺伝子に発現変化があることを明らかにしている。それらの遺伝子の生物学的解釈を行うため、多数の遺伝子の発現データから特徴的な発現パターンを発見し、生物学的意義を見出すデータマイニング技術によりGene Ontology(GO)解析を行っている。GOは、遺伝子産物がどのような生物学的プロセスに関与するか、どのような細胞構成要素に含まれているか、どのような分子機能を持っているかを記述するための体系化された用語(GO term)とその用語間の関係を定義したものであり、GO term間の関係は“Biological process”, “Cellular component”, “Molecular function”の3つのGO termを最上位とする階層構造で表現される。本解析により、“Biological process”において比較的上位階層であるGO term“development”に含まれる遺伝子群のアップレギュレーションの存在を明らかにし、さらにその下層にGO term“sex determination”を見出した。また、バスクエイレベルにおいては、胚発生時に重要な機能を果たす“TGF- β signaling pathway”や“Wnt signaling pathway”が変動していた。すなわち、発生や形態形成に関わる遺伝子群の発現変化や胚発生に関わるバスクエイレベルの変化を明らかにし、それらは胎児期における性分化異常の原因の痕跡として残っているものと考察している。また、ヒトの性分化疾患に関し、パイオインフォマティクスを駆使した解析はこれまでになく、今回得られた知見から、データマイニング法は原因不明のXY女性の発症原因を研究する上で有用なツールになり得ると考察している。これらのことより、胎児期に起きる性分化異常の痕跡は、*SRY* 遺伝子をはじめとする性分化関連遺伝子の発現異常として生後も性腺や線維芽細胞等の体細胞に残っていることを示し、さらにその痕跡はバスクエイレベルで見出されることを示している。この結果は、性分化疾患の発症機構を解明する上で、新たな基礎的知見を提起するものであると考えられる。また、正常な雄への性分化には、*SRY* 発現が適切な時期に適切な量存在することが極めて重要であり、たとえ正常な*SRY* 蛋白に翻訳されたとしても、不適切な時期に作られた転写因子(蛋白質)によるその発現調節異常は下流の遺伝子カスケードを攪乱し、雄化が障害され、その結果、哺乳動物の原型としての雌型へ誘導されることを推察している。さらに本症例で得られた解析結果は、*SRY* 遺伝子領域のヒストンアセチル化異常というエピジェネティックな関与を初めて示すとともに多くの重要な基礎データを提供するためであり、これまで原因不明であったXY型性逆転の発症機構の解明に新たな展開をもたらすものと期待される。

以上のように本論文では、従来不明なままで終わることの多い性分化過程の多様な障害の中でもXY染色体型性逆転において、エピジェネティック変異が関与していることを初めて示し、普遍的な性分化破綻機構を明らかにしたことは、基礎医学、獣医学及び畜産学を通じて生物の性決定・分化ならびに生殖遺伝学の展開および発展に大きく貢献するものと考えられ、価値ある研究成果の集積であると認める。よって学位申請者の三腎友子氏は、博士(農学)の学位を得る資格があると認める。

別紙様式3（博士論文審査等内規第2条関係）

博士論文内容の要旨

氏 名 三觜 友子

専攻・講座 資源生命科学専攻・応用動物学講座

論文題目（外国語の場合は、その和訳を併記すること。）

Molecular morphological and genetic study on the mechanisms of the failure of sex differentiation

性分化の破綻機構に関する分子形態遺伝学的研究

指導教員 星 信彦 教授

生物が遺伝的多様性を獲得するために構築した有性生殖は、次世代に遺伝情報を受け継ぐシステムであり、性分化は極めて重要な個体発生の分化過程あるいは生命活動と考えられる。ヒトをはじめとする哺乳類の性分化は、雄型と雌型の2通りのプログラムが用意されているわけではなく、基本型は雌型であり雄型は雌型から誘導される形で分化するとされる。すなわち、未分化性腺を精巣に誘導する精巣決定遺伝子であるY染色体上のSRY（sex determining region of the Y chromosome）遺伝子が働く場合のみ雄に分化し、働かない場合は自動的に雌に分化する。SRY遺伝子の同定により性分化機構は速やかに解明されるものと思われたが、SRY遺伝子の突然変異や欠失、転座では説明のつかない性逆転の例が見つかるにつれ、1つの遺伝子によって制御されるほど単純なものではないことが明らかとなった。近年の分子生物学的手法の発展ならびに性分化疾患の症例解析から多くの性分化関連遺伝子が明らかになり、未分化性腺で時空間的に作用する性分化関連遺伝子群の存在が明らかになるにつれて、性腺発生の複雑さが再認識され、性の分化とその破綻に関する研究分野は、SRY遺伝子の同定から20年経った現在も未だ端緒の域にあるとさえ言えるかも知れない。たとえば、XY染色体型表現型女性（XY性逆転）症例においてSRY遺伝子の異常等の原因が明らかとなっているのは15%程度にすぎず、XY性逆転発症の分子基盤は、依然として不明な点が多く残されている。

ゲノムの塩基配列の変化を伴わず細胞分裂後も継承される遺伝子機能の変化とそのしくみ（およびその学問領域）であるエピジェネティクスは、発生・分化に伴う細胞の表現型の情報記憶に中心的な役割を担っていることが明らかとなり、近年、大きく注目されている。エピジェネティクスは、DNAのメチル化とクロマチンのリモデリングによる遺伝子発現変化と捉えられており、エピジェネティクスに異常を来すと発生分化に障害が生じる。遺伝子発現の増減を決めているのは転写因子の働きであるが、遺伝子のオン/オフにはDNAメチル化とクロマチン構造変換が関与しており、性分化異常の分子基盤解明においても、従来の細胞遺伝学的・分子生物学的解析に加え、エピゲノム解析の展開が期待される。また、性分化とその破綻の複雑な発症機構においては、分子背景の網羅的解析が必須であると考えられる。近年、DNAマイクロアレイ技術とパイオインフォマティクスの発展により、数万の遺伝子発現を網羅的に解析し、既存の遺伝子データベースと照らし合わせ、新たな生物学的解釈を見出すことが可能となった。

本論文では、原因不明のXY型性逆転症例に関して、従来の細胞分子形態学的解析に加え、新たにSRY遺伝子の発現制御機構とエピジェネティクスとの関連ならびに発現変動を示す遺伝子の相互作用や全体の協調的な挙動、転写因子やパスウェイレベルでの発現変動に注目し、性逆転を引き起こした分子基盤を明らかにするとともに、新たな雄化破綻機構を提案することを試みた。

第1章では、FISH解析も含めた詳細な細胞遺伝学的検索で46,X,inv(Y)(p11.2q11.2)、すなわち、Y染色体の腕間逆位が明らかとなったが、SRY遺伝子の転座はなく、またY染色体に欠失も認められなかった。一方、SRY遺伝子に613C→Tへの置換が明らかとなったが、同義的置換のSNPであり、さらにSRY蛋白陽性の索状性腺であったことから、SRY遺伝子および転写翻訳機能に異常はないと考えられた。

SRY遺伝子の発現状態を検討した結果、患者の性腺および皮膚線維芽細胞でSRY mRNAの過剰発現が認められ、一方、正常男性由来皮膚線維芽細胞ではほとんど発現がみられず、時空間的に発現制御されるべきSRY遺伝子の発現調節異常が疑われた。SRY遺伝子領域におけるヒストンH3のアセチル化状態を解析したところ、正常男性と比較して患者では、遺伝子発現を活性化するアセチル化ヒストンの割合が極めて高いことが明らかとなり、mRNAの高発現が裏付けられた。さらにGeneChipを用いたマイクロアレイ解析では、ヒストンアセチル化酵素（histone acetyl transferase）を活性化するPCAF（p300/CBP-associated factor）遺伝子の高発現が患者に認められた。転写誘導とよく相関するヒストン修飾として、ヒストンH3K9とK14のア

セチル化が知られているが、PCAFは主にK14をアセチル化修飾することが明らかとなっている。PCAF 遺伝子の高発現がクロマチン・リモデリング因子をリクルートし、本来、サイレンシング状態にあるべきSRY遺伝子を活性化しているものと推察された。

遺伝子カスケードの雄化スイッチとして機能するSRY遺伝子は、正常な個体発生において、その発現時期および発現量が巧妙に制御されている。このSRY遺伝子の発現調節異常は、下流カスケードを担う遺伝子群の時空間的な発現をも攪乱すると考えられ、本患者の場合、おそらくは胎児期において、SRY遺伝子の高発現を主とする発現調節異常が存在したものと推測された。さらには、従来、原因不明であったXY型性逆転症例において、エピジェネティック異常が原因の一つである可能性が考えられ、多様な性分化疾患の発症機構において、SRY遺伝子のエピジェネティックな変異が関与することが強く示唆された。

第II章では、患者および正常男性由来皮膚線維芽細胞において、マイクロアレイ解析で得られた遺伝子発現プロファイルの差異を検討したところ、22,283個の遺伝子のうち、1,820個の遺伝子に発現変化が認められた。それらの遺伝子の生物学的解釈を行うため、多数の遺伝子の発現データから特徴的な発現パターンを発見し、生物学的意義を見出すデータマイニング技術によりGene Ontology (GO) 解析を行った。GOは、遺伝子産物がどのような生物学的プロセスに関与するか、どのような細胞構成要素に含まれているか、どのような分子機能を持っているかを記述するための体系化された用語 (GO term) とその用語間の関係を定義したものであり、GO term 間の関係は“Biological process”, “Cellular component”, “Molecular function”の3つのGO term を最上位とする階層構造で表現される。本解析により、“Biological process”において比較的上位階層であるGO term “development”に含まれる遺伝子群のアップレギュレーションが明らかとなり、さらにその下層にGO term “sex determination”が見出された。また、パスウェイ解析においては、胚発生時に重要な機能を果たす“TGF- β signaling pathway”や“Wnt signaling pathway”が変動していた。すなわち、発生や形態形成に関わる遺伝子群の発現変化や胚発生に関わるパスウェイの変化が認められ、それらは胎児期における性分化異常の原因の痕跡として残っているものと考えられた。また、ヒトの性分化疾患に関し、パイオインフォマティクスを駆使した解析はこれまでになく、今回得られた知見から、データマイニング法は原因不明のXY型性逆転症例の発症原因を研究する上で有用なツールになり得ると考えられた。

以上より、胎児期に起きた性分化異常の痕跡は、SRY遺伝子をはじめとする性分化関連遺伝子の発現異常として生後も性腺や線維芽細胞等の体細胞に残っていることが示唆され、さらにその痕跡はパスウェイレベルで見出されることが明らかとなった。この結果は、性分化疾患の発症機構を解析する上で、新たな基礎的知見を提起するものであると考えられる。また、正常な雄への性分化には、SRY発現が適切な時期に適切な量存在することが極めて重要であり、たとえ正常なSRY蛋白に翻訳されたとしても、不適切な時期に作られた転写因子 (蛋白質) によるその発現調節異常は下流の遺伝子カスケードを攪乱し、雄化が障害され、その結果、哺乳動物の原型としての雌型へ誘導されることが推察された。さらに本症例で得られた解析結果は、SRY 遺伝子領域のヒストンアセチル化異常というエピジェネティックな関与を示唆するとともに多くの重要な基礎データを提供するものであり、これまで原因不明であったXY型性逆転症例の発症機構の解明に新たな展開をもたらすものと期待される。