

卵巣の分化と抗精巣遺伝子

関戸 良平

イギリス国立医学研究所幹細胞および発生遺伝学研究部門

はじめに

すべての生物にとって、生殖は種の繁栄に不可欠である。有性生殖を行う生物は、基本的に精巣と卵巣を個別に発達させて、精子と卵子を供給しなくてはならない。したがって、性を決定するメカニズムが必要になってくる。性を決定する要因は動物種によってさまざまであるが、哺乳類における性決定は性染色体の構成に依存している。ごく稀な場合を除き、オスはXY型、メスはXX型である。胎齢初期の生殖腺原基に雌雄の違いはなく、精巣にも卵巣にも分化できる状態にあるが、オスではやがてY染色体上に存在する精巣決定遺伝子 *SRY* が発現して精巣への分化、ひいてはカラダ全体のオス化が始まる。Y染色体はX染色体に対して優性なので、Yがあればオスになる。この裏を返し、哺乳類の性はYに依存しないメスこそが原型であると一部では解釈されてきたが、最近の研究から性分化は *SRY* の有無だけでは議論できない複雑なメカニズムがあることが分かってきた。本総説では、抗精巣遺伝子という考えを導入することでみえてくる卵巣の分化機構について述べたいと思う。

精巣決定にはたらく遺伝子経路

1. 精巣決定遺伝子 *Sry* の発見

今から100年ほど前にさまざまな動物から性染色体が相ついで発見され、性決定機構の遺伝学的な解析が始まった。当時はショウジョウバエにおける研究に基づいて、常染色体セットに対してX染色体が何本あるかという比率が性を決定すると考えられていた [1]。ところが、ヒトの染色体不分離による疾患を調べてみると、これに当てはまらないことが分かった。例えば、XO患者（ターナー症候群）には卵巣、XXY患者には（クラ

インフェルター症候群）精巣が形成される [2, 3]。ここで重要なことは、Yは精巣の形成に必要であるということと、Xが複数存在していてもYが1つあれば男性化に十分であるということである。これはY上に何らかの精巣決定遺伝子が存在していることを示しており、かくしてその遺伝子を単離する競争が繰り返されることとなった。もちろん当時はゲノム解読もされていなければ、Yに何個の遺伝子が存在しているかさえ分かっていないので、ヒトやマウスで性逆転を示す症例からYの欠失や転座をみつけ出し、クローン化して塩基配列を決定する作業が繰り返された。いくつかの遺伝子が候補に挙げられたが、1990年にヒトとマウスのYから最有力候補として *SRY*（マウスは *Sry* と表記）遺伝子が発見された [4, 5]。実際、*Sry* とその近傍の制御領域を含む14kbのゲノミック断片をXXマウス個体に外来遺伝子として導入すると精巣が形成されることから、精巣決定因子は *Sry* であるということを決着がついた [6]。

SRY/Sry 遺伝子の塩基配列が解読され、HMGボックスをDNA結合ドメインに有する転写因子をコードしていることが明らかになると、*SRY* がどのような遺伝子を制御しているのかと次なる疑問がもちあがった。ヒトやマウスの遺伝学的解析からさまざまな遺伝子が *SRY* の標的遺伝子候補に挙げられたが決定的な証拠はなかった。一般に、転写因子がある遺伝子を制御していると証明するためには、その因子のタンパク質の挙動や転写活性を調べる必要がある。ところが当時、このような研究に使える *SRY* に特異的な抗体は存在していなかった。そこでわれわれは、14kbの発現制御領域下で *Sry* に *myc* タグを組込んだトランスジェニックマウス (*SryMyc*) を作製し、抗MYC抗体を用いてタンパク質の局在を調べることとした [7]。その結果、*SRY* は胎齢11.0日から12.5日までセルトリ前駆細胞で特異的に発現し、成熟した細胞ではその発現がなくなることをつきとめた。この時期に前駆細胞で発現する遺伝子はいくつか知られていたが、そのなかでも *Sox9* に注目した。*Sox9* の発現は胎齢10.5日の両性で弱く活性化された後、オスでは *Sry* の発現に伴って増大し、メスでは胎齢11.5日までに消失する [8]。また、*Sox9* の機能喪失および機能獲得変異

連絡先：関戸良平, Division of Stem Cell Biology and Developmental Genetics MRC National Institute for Medical Research
The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA, United Kingdom.
TEL : +44-208-816-2120
FAX : +44-208-816-2009
E-mail : rsekido@nimr.mrc.ac.uk

体は *Sry* のそれらと同様の性逆転を示す [9-15]. このような相関性から *Sox9* は SRY の直接の標的遺伝子ではないかと推測された.

2. SRY の標的遺伝子の同定

Sox9 は精巣を含めた多くの組織で発現するので、おそらく遺伝子の近傍にそれらの組織特異的な発現を規定するエンハンサー群が存在しているものと思われる. しかし, *Sox9* の精巣における発現調節領域は十分に解析されていなかった. この種の解析には細胞株にレポーター遺伝子のトランスフェクションを行うのが一般的であるが, セルトリ細胞に関しては細胞株の性質が曖昧であったため, われわれはトランスジェニックマウスを作製して *in vivo* の発現を解析するに決めた. まず, *Sox9* の近傍を広く含む BAC クローンに *LacZ* レポーター遺伝子を組み込み, *in vivo* で精巣における発現を確認した. さらに発現調節領域を絞り込み, 最終的に精巣特異的なエンハンサー (TESCO) を同定することに成功した [16]. TESCO に ECFP をつないだレポーター遺伝子 (TESCO-CFP) をもつトランスジェニックマウスを解析すると, ECFP は内在 *Sox9* と同様に, 胎齢 11.0 日頃からセルトリ細胞前駆細胞から成体のセルトリ細胞まで発現することが分かった.

TESCO の塩基配列を調べてみると, これまで報告されていた SRY 結合配列がいくつか存在していた. もし SRY が TESCO を介して *Sox9* の発現を直接に制御しているならば, これらの配列に結合することが予想される. これを確認するために, 前述の *SryMyc* マウスから精巣を摘出し, 抗 MYC 抗体を使ってクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行ったところ, 予想通りこれらの結合配列を有する TESCO 内の DNA 断片が濃縮されてきた. さらに興味深いことに, SRY の結合配列の近くには SF1 の結合配列も多く見つかった. SF1 は本来ステロイドの合成に関わる遺伝子群の転写活性化因子として発見されたが, *Sry* や *Sox9* の発現開始にも必要であることが示されている. そこで, SF1 についても ChIP を行ったところ, やはり SRY と同様な濃縮が観察された. 次に, TESCO 内に存在するこれらの結合配列に塩基置換変異を導入し, ECFP をつないでトランスジェニックマウスを作製して *in vivo* における活性を調べた. この結果, 双方同時に変異を入れた場合にのみエンハンサー活性が失われることが分かり, TESCO の活性化には SRY と SF1 の協調的なはたらきが必要であるという分子機構を明らかにすることができた [16]. これらの実験により, これまで同定されていなかった SRY の標的遺伝子が *Sox9*

であることが証明された.

マウスの *Sry* は胎児期に一過的にしか発現しないのに対し, *Sox9* の発現は成体でも続くことから *Sox9* には SRY に依存しない発現維持機構が存在するはずである. SRY と SOX9 がともに HMG ボックス型の転写因子であること, そして SOX9 と SF1 が物理的に相互作用していることが知られていた [17], SRY の発現が消失した後は SOX9 が代わりに TESCO に結合し, 自己制御によってエンハンサー活性を維持する可能性が考えられる. そこで今度は SOX9 について ChIP を行ったところ, SRY や SF1 と同様の TESCO 断片が濃縮されてきた. つまり, TESCO は SOX9 自身の標的でもある [16].

卵巣の分化

それでは卵巣はどのようにして分化するのであろうか? 未分化生殖腺は通常 (Y がなければ) 卵巣へと分化するようにプログラムされていると考えられているが, もしそれが正しければ, XX 個体にいかなる機能喪失変異が起きようとも雄への性逆転は生じないはずである. しかし実際は, *Wnt4*, *R-spondin 1* (*Rspo1*), *Foxl2* といった遺伝子にこのような変異が起きると性逆転や半陰陽を生じる. したがって, 卵巣の分化は単なる受動的プログラムの遂行ではなく, 積極的に精巣の分化を抑えることにより達成されると考えた方が理にかなう. こうした考えから抗精巣遺伝子の存在が着目されるようになった. 実際, 卵巣の分化過程における *Wnt4*, *Rspo1*, *Foxl2* の発現様式を調べてみると胎齢 125 日頃から *Sox9* の発現低下に伴って増大してくることが観察される. ここで, 抗精巣遺伝子が *Sox9* の発現を抑制することにより卵巣が分化すると結論づけることができれば一件落着なのであるが, 話はそう簡単ではない.

1. 出生後の卵巣ではたらく抗精巣遺伝子

Foxl2 はフォークヘッドドメインを有する転写因子であり, この遺伝子の機能喪失変異は, ヤギなどの家畜を無角にする *polled* という優性変異の原因となる [18]. ところが興味深いことに, *polled* をホモにもつ XX 個体は高頻度に性逆転を引き起こす (したがって, この変異は *polled-intersex* と呼ばれる). 本来角がない人では, *Foxl2* 変異は 瞼裂縮小陥没内眼角贅皮逆位症候群 (BPES) という瞼の形成異常の原因となる. さらに, ヤギと違って XX 個体に性逆転は起きないが, 早発性卵巣機能不全 (POF) を生じる [19]. マウスでもジーンターゲットングにより *Foxl2* を恒常的に欠損したノックアウト

ト個体 (*Foxl 2*^{-/-}) が作製され、詳しい解析がなされている [20, 21]. *Foxl 2*^{-/-}マウスもヒトと同じように BPES と POF の表現型を示す. POF 卵巣では、出生後数日間に原始卵胞は形成され減数第 1 分裂複糸期までは至るもののそれ以降は進行しない. 通常この時期に、*Foxl 2* は卵母細胞を取り囲む顆粒膜細胞で発現するが、*XXFoxl 2*^{-/-} の顆粒膜細胞では出生後 1 週間もすると *Sox 9* の発現が観察されるようになる. つまり、顆粒膜細胞からセルトリ細胞への分化転換が起きていると考えられる.

さて、*Foxl 2* は正常マウスで胎齢 12.5 日頃から胎児性顆粒膜細胞で発現し始めるにもかかわらず、ノックアウトマウスで卵胞形成に異常がみられるのが出生後 1~2 週間経ってからという点に疑問をもつ方もおられると思う. では *Foxl 2* は胎児期に機能していないのだろうか、あるいは何らかの不明瞭な障害が胎児期にも存在していて、それが 2 次的に出生後の表現型に反映されているのであろうか. この疑問に答えるために、内在 *Foxl 2* 座位を LoxP 部位で修飾したアレル (*Foxl 2*^{lox/lox}) と、タモキシフェンで誘導可能な Cre 組換え酵素遺伝子 (*Rosa 26-CreERT*) を合わせもつコンディショナルノックアウトマウスが作製された. 8 週齢の成体メスに誘導をかけて *Foxl 2* を欠失させ、3 週間後に生殖腺の表現型を調べてみたところ、卵巣が精巣様に分化していることが観察された [22]. この精巣内には SOX9 陽性細胞を有する精細管様の構造もみられ、テストステロン量も野生型雄と同レベルにまで上昇していた. これは、POF 表現型は胎児期の欠損による 2 次的効果なのではなく、*Foxl 2* が出生後の卵巣分化の維持に必要なことを示しているといえる.

一体どのような分子機構で卵巣から精巣への分化転換が起きるのであろうか. *Foxl 2* と *Sox 9* の発現が相反することから、前者が後者の発現を抑制している可能性が考えられた. われわれは上述の *Sox 9* の精巣特異的エンハンサー (TESCO) に着目し、FOXL2 が TESCO に結合して転写を直接的に抑制するのではないかという仮説を立てた. それを検証するため、成体メスの卵巣に対して抗 FOXL2 抗体で ChIP を行うと、期待通り TESCO の塩基配列の濃縮を確認することができた. 実際、TESCO 内には既知の FOXL2 の結合配列が多数存在しており、ここでも興味深いことに、これらの結合配列の近くに核内受容体型転写因子であるエストロゲン受容体 (ESR) の結合配列がいくつか見つかった. マウスには ESR1 と ESR2 の 2 つの受容体が存在するが、両方を欠損した XX 個体では生後 2.5 ヶ月くらいから卵巣が精巣様に分化することが報告されている [23]. *Foxl 2* と *ESR 1/2* の欠

損が時期に差こそあれ、出生後に POF 表現型を示すということから、両遺伝子間の相互作用が示唆される. そこで、両因子を培養細胞で強制発現させ免疫共沈降アッセイを行ったところ、FOXL2 と ESR1/2 にタンパク質間相互作用があることは示された. 続いて、抗 ESR 抗体で ChIP を行ったところ、やはり FOXL2 同様に TESCO が濃縮されてきた. 最後に、TESCO 内のそれらの結合配列に塩基置換変異を導入してから ECFP につなげ、トランスジェニックマウスで活性を調べてみると、双方同時に変異をもつ場合に卵巣で TESCO 活性の強い脱抑制化が起きることが分かった. 以上のことから、出生後の卵巣では FOXL2 と ESR が協調的に TESCO 活性を抑制することにより、*Sox 9* の発現と精巣化を積極的に抑えていると結論できる [22].

2. 胎児期の卵巣ではたらく抗精巣遺伝子

では、胎児期の卵巣で *Sox 9* の発現を抑制している因子は何なのだろうか. 先にも述べたように、*Wnt 4* や *Rspo 1* はその有力な候補である. それぞれの遺伝子のノックアウトマウス (*Wnt 4*^{-/-}, *Rspo 1*^{-/-}) は似たような表現型を示し、XX 個体の生殖腺に精巣様の血管構造やテストステロンの合成が誘導されるが、性逆転にまでは至らない [24-26]. *Sox 9* の発現をみてみると、*XXWnt 4*^{-/-} 生殖腺では胎齢 11.5 日から 12.0 日のごく短期間だけであるが *Sox 9* の脱抑制化が起きる [27]. しかし、それ以降は何らかの機構で再び抑制されてしまう. *XXRspo 1*^{-/-} 生殖腺でも SOX9 陽性細胞が認められるが、生殖腺の一部分にしかすぎない. たぶん、*Wnt 4* や *Rspo 1* 単独では *Sox 9* の発現を十分に抑制できないのであろう. そして、これは *Foxl 2* にも当てはまると思われる. 出生後の卵巣において FOXL2 が ESR と協調的に TESCO の活性を抑えるように、胎児期でも FOXL2 が転写抑制因子としてはたらくためには何かしらコファクターが必要なかもしれない. 実際に、われわれが *Foxl 2* と *Wnt 4* のダブルノックアウトマウスを解析したところ、少なくとも胎齢 18.5 日から SOX9 陽性細胞を観察することができた. つまり、この時期における胎児性卵巣において、*Sox 9* の発現は *Foxl 2* と *Wnt 4* によって協調的に抑制されていると結論づけることができる. 最近、*Foxl 2* と *Rspo 1* のダブルノックアウトでも協調的な効果が報告された [28]. おそらく、卵巣分化過程には多段階の *Sox 9* の発現抑制機構が存在していると思われる. われわれは抗精巣遺伝子を組み合わせることで、その機構が説明できるのではないかと考えている.

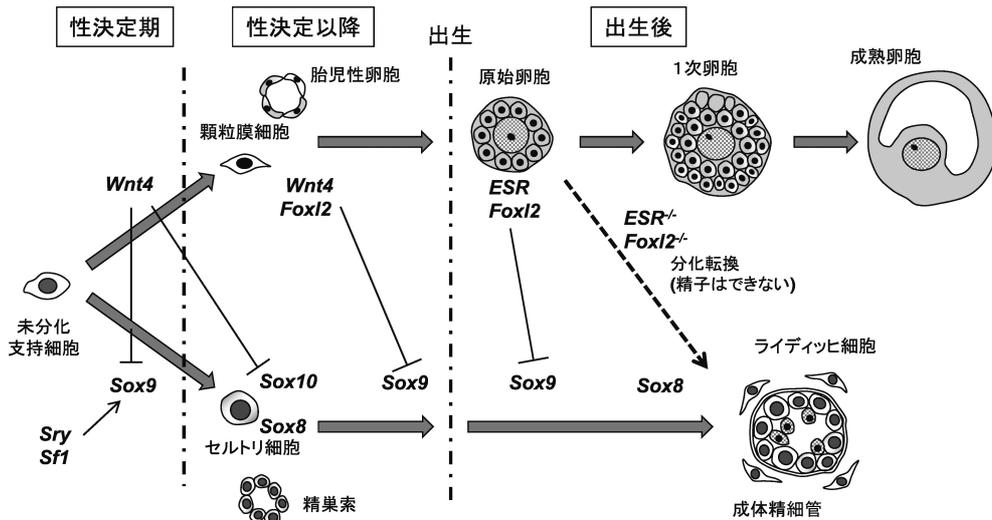


図 1

SoxE グループ遺伝子群の抑制

われわれは $XXWnt4^{-/-}$ 生殖腺内で SOX9 陽性細胞がどのような振る舞いをするのかをイメージする目的で、TESCO-CFP トランスジェニックマウスと $Wnt4^{-/-}$ ヘテロ欠損マウス掛け合わせ、その子孫同士との交配から得られる $XXWnt4^{-/-}; TESCO-CFP$ 生殖腺を観察した。すると、内在性の $Sox9$ の発現は胎齢12.0日以降抑制されたままなのに、TESCO-CFP 陽性細胞が胎齢14.5日から増えてくるのが分かった。TESCO が活性化されるのに、なぜ $Sox9$ は発現しないのであろうかという議論は後述するとして、まず TESCO 活性が誘導される機構について考察した。ここで $Sox9$ の精巣における機能について分かっていることを整理してみよう。 $Sox9$ は SRY の標的遺伝子として精巣の分化に必要不可欠であるため、性決定期（胎齢10.5から12.5日）、あるいはそれ以前に $Sox9$ を欠損すると性逆転を生じる。ところが、 $Sox9$ を性決定期以降に精巣からコンディショナルに欠損させても性逆転は起きない [29]。その代わりに出生後5ヵ月くらいから精細管の退行が始まる。おそらく性決定期以後から出生後5ヵ月にかけて、何か他の因子が $Sox9$ 欠損を補償しているのであろう。 $Sox9$ が、その塩基配列の相同性から $Sox8$ と $Sox10$ とともに $SoxE$ グループを形成していることを考えると、 $Sox8$ と $Sox10$ はその有力な候補であるといえる。それらの生殖腺における発現は $Sox9$ と比べて低いものの、ほぼ同時期に精巣特異的に発現する [30]。ただ、それらの機能喪失変異が性逆転を引き起こさないことから、これまでは性分化に無関係であると考えられてきた。しかし最近の研究で、

$Sox8$ ノックアウトマウスも出生後5ヵ月過ぎから精細管の退行を示すことや [31]、このマウスに $Sox9$ コンディショナルマウスを掛け合わせると精細管異常が早期に現れることが示された [29]。また、ヒト $Sox10$ 遺伝子の近傍に重複をもつ患者は性逆転を生じること、 XX マウスの生殖腺に $Sox10$ を強制発現させると性逆転が起きることも報告された [30]。そして何より興味深いのは、SOX8とSOX10はSOX9同様にSF1と協調してTESCOを活性化できるという点である [30]。つまり、 $XXWnt4^{-/-}$ 生殖腺で $Sox8$ か $Sox10$ のどちらか、あるいは両方が脱抑制化により発現が上昇していれば、結果的にTESCOが活性化されても不思議ではない。本当にそのようなことが起きているのか、*in situ* ハイブリダイゼーション法で $Sox8$ と $Sox10$ の発現を調べたところ、 $Sox10$ の発現が選択的に脱抑制化されていることが分かった。

さて、最初の疑問に戻ってみよう。なぜ TESCO-CFP が脱抑制化されても内在 $Sox9$ の発現がみられないのであろうか。仮に TESCO が SOX10 により活性化されとしても $Sox9$ の発現をオンにする閾値には達していないのかもしれない。実際 *in vitro* のトランスフェクション系で活性化のレベルを測定してみると、SOX10による活性化はSOX9に比べて弱いことが示されている [30]。TESCO-CFP はトランスジーンなので内在 $Sox9$ のおかれている環境と異なるかもしれない。また、 $Sox9$ の発現には TESCO 以外の制御領域も必要である可能性も否定できない。この疑問に関しては、TESCO をジーンターゲットで欠失させることにより答えが出るはずである。

おわりに

以上の話を簡略にまとめて図に示したので参照されたい (図1)。多くの下等動物は両性具有であり、性の選択は可塑的である。また脊椎動物でもある種の魚類は、その集団のおかれた環境によって性転換を起こすことが知られている。しかし哺乳類の性転換は不可能であるとされてきた。本研究はこれまでの定説を覆し、*Foxl 2* というたった1つの遺伝子を成体から欠損させるだけで卵巣から精巣へ転換するという点で衝撃的である。もちろん、外生殖器や子宮といった組織までが分化転換を起こすわけではなく、完全性転換とは呼べない。また、性逆転の場合と同様に、この性転換した生殖腺内では生殖細胞が死滅してしまうので、生殖細胞の生存および卵細胞から精細胞への分化転換も今後の大きな課題となってくる。

最後に、読者のなかには精巣から卵巣への逆の転換はできないのかと疑問をもつ方がおられると思う。われわれは当初 *Sox 9* を成体オスから欠損させることでこの転換が可能であろうと楽観的に考えていたが、それほど単純ではなかったようである。*Sox 9* を1つ除いたところで、*Sox 8* や *Sox 10* がその欠損を補償してしまうからである。ところが最近、*Dmrt 1* という転写因子をコードする遺伝子を成体オスのセルトリ細胞から欠失させると、この転換が起きることが示された [32]。*Dmrt 1* の属する DM ドメイン遺伝子ファミリーは、シヨウジョウバエや線虫、さらにメダカやアフリカツメカエルでも性決定に関わっており、*SRY* よりも古くから存在する性決定・分化因子といえる。性逆転や両性具有などの性分化疾患 (DSD) は出生後に診断される。ここで紹介したキーとなる遺伝子を後天的に操作することで、DSD やそれに伴う生殖細胞異常に対する治療へ新たな知見もたらされることを期待している。

引用文献

1. Bridges CB (1921) Triploid Intersexes in *Drosophila melanogaster*. *Science* 54, 252-254.
2. Jacobs PA, Strong JA (1959) A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183, 302-303.
3. Ford CE, Jones KW, Polani PE, De Almeida JC, Briggs JH (1959) A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1, 711-713.
4. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1990) A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346, 245-250.
5. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346, 240-244.
6. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 351, 117-121.
7. Sekido R, Bar I, Narvaez V, Penny G, Lovell-Badge R (2004) SOX9 is up-regulated by the transient expression of *SRY* specifically in Sertoli cell precursors. *Dev Biol* 274, 271-279.
8. Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R (1996) *Sox9* expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet* 14, 62-68.
9. Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, et al. (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an *SRY*-related gene. *Nature* 372, 525-530.
10. Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, et al. (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the *SRY*-related gene *SOX9*. *Cell* 79, 1111-1120.
11. Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J (1999) Autosomal XX sex reversal caused by duplication of *SOX 9*. *Am J Med Genet* 87, 349-353.
12. Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG, Schedl A (2001) *Sox9* induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet* 28, 216-217.
13. Chaboissier MC, Kobayashi A, Vidal VI, Lutzkendorf S, van de Kant HJ, Wegner M, de Rooij DG, Behringer RR, Schedl A (2004) Functional analysis of *Sox8* and *Sox9* during sex determination in the mouse. *Development* 131, 1891-1901.
14. Barrionuevo F, Bagheri-Fam S, Klattig J, Kist R, Taketo MM, Englert C, Scherer G (2006) Homozygous inactivation of *Sox9* causes complete XY sex reversal in mice. *Biol Reprod* 74, 195-201.
15. Bishop CE, Whitworth DJ, Qin Y, Agoulnik AI, Agoulnik IU, Harrison WR, Behringer RR, Overbeek PA (2000) A transgenic insertion upstream of *sox9* is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat Genet* 26, 490-494.
16. Sekido R, Lovell-Badge R (2008) Sex determination involves synergistic action of *SRY* and *SF1* on a specific *Sox9* enhancer. *Nature* 453, 930-934.
17. De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, Sudbeck P, Scherer G, Poulat F, Berta P (1998) Direct interaction of *SRY*-related protein *SOX9* and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 18, 6653-6665.
18. Pailhoux E, Vigier B, Chaffaux S, Serval N, Taourit S, Furet JP, Fellous M, Grosclaude F, Crihiu EP, Cotinot C,

- et al. (2001) A 11. 7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nat Genet* 29, 453-458.
19. Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, et al. (2001) The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* 27, 159-166.
 20. Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier AC, Treier M (2004) The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 131, 933-942.
 21. Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D, Pilia G (2004) Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet* 13, 1171-1181.
 22. Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, Kress J, Treier AC, Klugmann C, Klasen C, Holter NI, et al. (2009) Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell* 139, 1130-1142.
 23. Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, and Korach KS (1999) Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science* 286, 2328-2331.
 24. Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP (1999) Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397, 405-409.
 25. Tomizuka K, Horikoshi K, Kitada R, Sugawara Y, Iba Y, Kojima A, Yoshitome A, Yamawaki K, Amagai M, Inoue A, et al. (2008) R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Hum Mol Genet* 17, 1278-1291.
 26. Chassot AA, Ranc F, Gregoire EP, Roepers-Gajadien HL, Taketo MM, Camerino G, de Rooij DG, Schedl A, Chaboissier MC (2008) Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet* 17, 1264-1277.
 27. Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, DiNapoli L, Brennan J, Chaboissier MC, Poulat F, Behringer RR, Lovell-Badge R, Capel B (2006) Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol* 4, e187.
 28. Auguste A, Chassot AA, Gregoire EP, Renault L, Pannetier M, Treier M, Pailhoux E, Chaboissier MC (2011) Loss of R-Spondin1 and Foxl2 Amplifies Female-to-Male Sex Reversal in XX Mice. *Sex Dev* 5, 304-317.
 29. Barrionuevo F, Georg I, Scherthan H, Lecureuil C, Guillou F, Wegner M, Scherer G (2009) Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of Sox9 but fails in the combined absence of Sox9 and Sox8. *Dev Biol* 327, 301-312.
 30. Polanco JC, Wilhelm D, Davidson TL, Knight D, Koopman P (2010) Sox10 gain-of-function causes XX sex reversal in mice: implications for human 22q-linked disorders of sex development. *Hum Mol Genet* 19, 506-516.
 31. O'Bryan MK, Takada S, Kennedy CL, Scott G, Harada S, Ray MK, Dai Q, Wilhelm D, de Kretser DM, Eddy EM, et al. (2008) Sox8 is a critical regulator of adult Sertoli cell function and male fertility. *Dev Biol* 316, 359-370.
 32. Matson CK, Murphy MW, Sarver AL, Griswold MD, Bardwell VJ, Zarkower D (2011) DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature* 476, 101-104.