

令和元年5月31日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19372

研究課題名(和文) 幹細胞制御因子Pax6の精子形成過程における増殖・分化制御と性比決定機構の解明

研究課題名(英文) The role of Pax6 in spermatogenesis and determination of sex bias in the mouse

研究代表者

大隅 典子(Osumi, Noriko)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00220343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、自然発症Pax6変異ヘテロ接合(Sey/+)マウスに観察された性比バイアスの生じる原因が精子形成の過程にある可能性を検証した。精祖細胞数はSey/+マウスと野生型の同腹仔とで同等であったが、精母細胞数はSey/+マウスにおいて有意に減少していたことより、Pax6の機能不全が減数分裂に影響する可能性が示唆された。さらに、性染色体をFISHにより検出し、円形精子細胞における性染色体の割合を解析し、Sey/+マウスでY染色体の割合が有意に増加することを見出した。この結果から、Sey/+マウスに生じる性比バイアスは精子形成過程でY染色体を持つ精子の割合が増加することに起因すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

出生時の男女比は人種等に関わらずほぼ1.05対1であるが、その理由是不明であった。哺乳類の性は精子の性染色体によって決定され、減数分裂によりXおよびY染色体を持つ配偶子が同じ数だけ産生されるため、仔の性比は理論的には1:1となることが予想され、もし性バイアスが生じるのであれば、なんらかのメカニズムが必要となる。本研究は、減数分裂過程における転写制御因子・クロマチンリモデリング因子Pax6の機能不全が仔の性比に影響することを示した画期的な研究であり、今後その機構を明らかにすることで哺乳類の有する仔の性比調節において、精子形成の制御を介したエピジェネティックな機構が明らかになると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined whether the cause of biased sex ratio observed in spontaneous Pax6 mutant heterozygous (Sey/+) mice is in the process of spermatogenesis. Although the number of spermatogonia in the testis was similar between Sey/+ mice and wild-type littermates, the number of spermatocytes was significantly reduced in Sey/+ mice, suggesting that Pax6 dysfunction may affect the meiotic process. Furthermore, with fluorescent in situ hybridization for X and Y chromosomes, we also analyzed the proportion of sex chromosomes in round spermatids. Surprisingly, it became clear that the proportion of Y chromosome is significantly increased in round spermatids of Sey/+ mice. These results suggest that the biased sex ratio observed in Sey/+ mice may be due to the production of a large proportion of sperm having Y chromosome.

研究分野：発生生物学

キーワード：Pax6 精子形成 性比バイアス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

一般的にヒトの出生の時点において、男/女比は人種に関わらず、およそ 1.05 と報告されている (The World Fact Book 2013-2014 等)。これは「男児は女児よりも乳幼児死亡率が高いため、それを保証する機構が働く」と、合目的な説明が為されてきた。だが減数分裂の過程で、精母細胞から X 染色体を有する X 精子と、Y 染色体を有する Y 精子が産生される割合は、理論的には 1 : 1 になるべきであり、もし若干でも男児が生まれる確率が高いのであれば、跡継ぎとして男児が好まれるというような社会的な要因とは別に、性比バイアスが生じる背景には何らかの生物学的メカニズムが備わっているはずである。

哺乳類を用いた性比バイアスの研究としては、雌の栄養状態等の影響や、環境因子による Y 精子の割合の変化などが注目されてきた。また、Y 染色体の長腕が欠損した MSYq マウスの雄に由来する仔マウスでは、雄が少なく雌が多く生まれるという報告がある (Moriwaki et al., 1988; Conway et al., 1994)。しかしながら、雄が多く雌が少なくなる性比バイアスについては唯一、ノンコーディング RNA の *Xist* による X 染色体不活性化を阻止する因子 *Tsix* の変異マウスにおいて報告されているのみである (Lee, 2002)。

## 2. 研究の目的

我々はごく最近、神経幹細胞の鍵因子である *Pax6* が雄性生殖細胞系列において特徴的な発現様式を示すことを発見した (Kimura et al., 2015)。とくに、*Pax6* は精母細胞の核において減数分裂の進行とともにダイナミックな局在変化を示し、X 染色体と Y 染色体が部分的に対合した XY 体と呼ばれる構造に特異的に集積する。さらに、我々は自然発症 *Pax6* 変異ヘテロ接合 (*Sey/+*) マウスの行動解析を行う研究において偶然、*Sey/+* マウス精子と野生型マウス卵子を用いて体外受精 (IVF) を行った場合に、仔マウスでは有意に雌の割合が少ないことを見出した。すなわち、*Pax6* のハプロ不全と IVF 操作が重なった場合に、仔の性比決定に影響することが示唆される。そこで本研究では、*Sey/+* マウスの生殖細胞系列に生じる変化に着目することにより、精子形成を介した仔の性比調節機構の一端を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

*Sey/+* マウスに観察された性比バイアスの生じる原因を明らかにするために、本研究では、以下のケース A~E の仮説を順に検証した。もし、精子形成の段階ですでに X 精子の割合が少ない性比バイアスが認められる場合には、減数分裂の過程のどこかに問題があることになる (ケース A)。精子形成の段階では性比バイアスが無く、着床前胚の段階で性比バイアスが生じているのだとすると、精子の受精能力が X 精子と Y 精子で異なる可能性 (ケース B) か、初期発生において雌選択的に発生異常が生じている可能性 (ケース C) がある。精子形成の段階や着床前の胚で性比バイアスが無く、着床後に性比バイアスが認められる場合には、雌胚選択的に何らかの着床異常が生じていることが予測される (ケース D)。精子形成段階、初期発生段階、着床段階、後期発生段階を通じて性比バイアス無い場合には、出産直後に雌の仔マウスが選択的に母マウスに喰殺されている可能性 (ケース E) が考えられる。

## 4. 研究成果

本研究では前述のケース A の検討として *Sey/+* 雄マウス精巣の解析を行った。*Pax6* の発現は精祖細胞および精母細胞に比較的高い発現が確認されることから (Kimura et al., 2015)、まず *Pax6* の機能不全がこれらの細胞の細胞数に及ぼす影響を解析した。精祖細胞数は *Sey/+* マウスと野生型の同腹仔とで同等であった (図 a) 一方で、精母細胞数は *Sey/+* マウスにおいて有意に減少していた (図 b) ことより、*Pax6* が減少分裂の過程で機能する可能性が示唆された。

我々の過去の観察により、*Pax6* は一過的に精母細胞の性染色体へ局在することが観察されている (Kimura et al., 2015)。そこで次に *Pax6* の機能不全が減数分裂完了後の性染色体の割合に及ぼす影響について解析した。本研究では X 染色体と Y 染色体を蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) により検出し (図 c)、円形精子細胞における性染色体の割合を解析した。野生型マウスの精巣では円形精子細胞の X:Y の比は 1:1.06 と Y 染色体の割合がやや多く (図 d)、ヒトの女:男の比が人種に関わらず、およそ 1 : 1.05 とされていることとほぼ一致していた。これに対し、*Sey/+* マウスの精巣では円形精子細胞の X:Y の比は 1:1.44 であり (図 d)、Y 染色体の割合が有意に増加していた。アポトーシスマーカーで

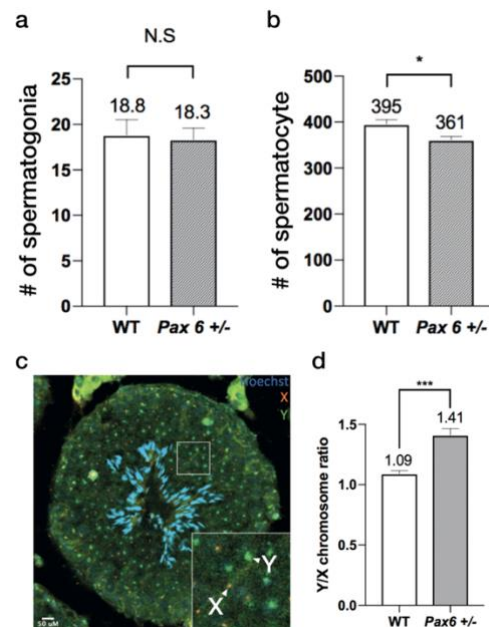


図. *Sey/+* 雄マウス精巣に観察された精子形成異常。a) 精祖細胞数の比較。b) 精母細胞数の比較。c) 精巣組織 FISH による X 染色体 (橙) と Y 染色体 (緑) の検出。d) 円形精子細胞数における性染色体の比の比較。

ある活性型 Caspase3 の発現は野生型と同等であったことから、Pax6 の機能不全によりどのように性染色体の割合が変化しているかについては今後の検討課題とした。

以上の結果から、*Sey/+*マウスに生じる性比バイアスは *Sey/+*雄マウスの精子形成過程で Y 染色体を持つ精子の割合が多く産生されることに起因すると考えられた。現在、精巣特異的に Pax6 を欠損する遺伝子改変マウスを作出中であり、今後の解析により、Pax6 による精子形成の制御と仔の性比調節機構の詳細が明らかになると期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. 木村 龍一, 稲田 仁, 大隅 典子 【自閉症学-自閉症・発達障害の病態解明に向けて】 自閉スペクトラム症発症リスクとエピジェネティクス 医学のあゆみ 268(3) 180-183 2019 年 ( 査 読 無 し )  
<https://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiBookDetail.aspx?BC=926803>
2. Inada H, Numayama-Tsuruta K, Mochizuki K, Sasaki-Hoshino M, Osumi N Pax6-dependent regulation of the rat Fabp7 promoter activity. Genes to cells 23:702-714 2018 年 (査読有) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29984875>
3. Osumi N Calling rikejo. Nature 555(7697) S59 2018 年 ( 査 読 有 )  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29565412>
4. Kikkawa T, Casingal CR, Chun SH, Shinohara H, Hiraoka K, Osumi N The role of Pax6 in brain development and its impact on pathogenesis of autism spectrum disorder. Brain research 1705:95-103 2018 年 (査読有) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29499177>
5. Kimura R, Yoshizaki K, Osumi N Risk of Neurodevelopmental Disease by Paternal Aging: A Possible Influence of Epigenetic Alteration in Sperm. Advances in experimental medicine and biology 1012 75-81 2018 年 ( 査 読 有 )  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29956196>
6. Yoshizaki K, Koike K, Kimura R, Osumi N Early postnatal vocalizations predict sociability and spatial memory in C57BL/6J mice: Individual differences in behavioral traits emerge early in development. PloS one 12(11) e0186798 2017 年 (査読有) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29091920>
7. 大隅 典子, 木村 龍一 【エピジェネティクスと臨床-DOHaD 学説のインパクト】 父加齢・エピゲノム・精神疾患 Medical Science Digest 43(12) 612-615 2017 年 (査読無し)  
<https://www.molcom.jp/products/detail/119671/>

[学会発表] (計 5 件)

1. Germeraad J., Kimura R., Tatehana M., Osumi N. Pax6 deficiency leads to an altered YX ratio in round spermatids during spermatogenesis. 第 52 回発生生物学会大会 2019 年 5 月 (ポスター発表)
2. Kimura R., Yoshizaki K., Koike T., Oki S., Aoki N., Mochizuki K., Kobayashi H., Kikkawa T., Inada H., Matsui Y., Kono T., Osumi N. Paternal aging affects offspring's behavior and gene expression possibly through transmission of hypomethylated DNA regions in NRSF/REST binding sites. Neuroscience2018. 2018 年 11 月 4 日 (ナノシンポジウム)
3. 木村龍一, 吉崎嘉一, 小池佐, 沖真弥, 青木七菜, 望月研太郎, 小林久人, 吉川貴子, 稲田仁, 松居靖久, 河野友宏, 大隅典子 Paternal ageing affects phenotypes of mice progeny possibly through epigenetic alteration in sperm. 第 41 回 日本神経科学大会 2018 年 7 月 28 日 (シンポジウム)
4. 木村龍一, 吉崎嘉一, 小池佐, 沖真弥, 青木七奈, 望月研太郎, 小林久人, 吉川貴子, 稲田仁, 河野友宏, 松居靖久, 大隅典子 高齢による精子 DNA 低メチル化が子孫の遺伝子発現と行動表現型に及ぼす影響 AMED-CREST 研究開発領域「エピゲノム研究に基づく診断・治療に向けた新技術の創出」平成 29 年度 領域会議 2018 年 2 月 9 日 (ポスター発表)
5. 木村龍一, 吉崎嘉一, 小池佐, 沖真弥, 青木七奈, 望月研太郎, 小林久人, 吉川貴子, 稲田仁, 河野友宏, 松居靖久, 大隅典子 Trans-generational transmission of ASD-like phenotypes possibly via sperm DNA de-methylation caused by paternal age. 「次世代脳」プロジェクト 冬のシンポジウム 2017 年 12 月 20 日 (ポスター発表)

[図書] (計 1 件)

1. 大隅 典子 脳の誕生 (ちくま新書) 276 ページ 筑摩書房 2017 年

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：木村 龍一  
ローマ字氏名：KIMURA Ryuichi  
所属研究機関名：東北大学  
部局名：医学系研究科  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：00781759

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：Jasper Germeraad  
ローマ字氏名：Jasper Germeraad

研究協力者氏名：舘花 美沙子  
ローマ字氏名：TATEHANA Misako

研究協力者氏名：Lingling Mai  
ローマ字氏名：Lingling Mai

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。