

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19380162

研究課題名 (和文) 卵細胞を産生する雄マウスの解析から明らかになる新たな生殖生物学

研究課題名 (英文) Development of reproductive biology by analysis of oocyte-producing male mouse strain

研究代表者

昆 泰寛 (KON YASUHIRO)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号：10178402

研究成果の概要 (和文)：MRL マウス精巣精細管内には卵細胞が存在する。解析の結果、精巣内卵細胞は卵巣内卵細胞と類似した発生動態、形態ならびに機能を有していた。すなわち、1) 減数分裂が雄胎子で既に開始すること、2) 出現要因が雄性決定因子 *Sry* の変異と関連すること、及び 3) 精子受容能力を持つことが示唆された。これらは、マウス精巣において生殖細胞が潜在的に卵細胞となる能力を有することを証明するもので、新たな生殖生物学を拓く重要な知見を提供する。

研究成果の概要 (英文)：The oocytes exist in seminiferous tubules of male MRL mice. As a result of the analysis, the testicular oocytes had several similar developmental dynamics, morphological characteristics, and functions to the ovarian oocytes. In the male MRL, the summaries are the following; 1) the meiosis has already begun during embryogenesis, 2) *sry* mutation, male sex-determining factor was related with appearance of testicular oocytes, and 3) testicular oocytes have an ability for sperm acceptance. These results suggest an important finding that develop a new reproductive biology by the concept having an exchangeable availability of primordial germ cells from male to female.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：マウス 精巣 卵巣 始原生殖細胞 精巣内卵細胞 性決定因子 セルトリ細胞 透明帯

1. 研究開始当初の背景

(1) 生殖生物学の根源的疑問

雌雄とは、種の存続を図り遺伝的多様性を生み出すという生殖戦略の手段で、その分子

基盤は近年、解明されつつある。すなわち、単孔目を除く哺乳類の Sry、ならびに魚類の DMY が同定され、これら性決定遺伝子発現の動態によって、“見た目の性”が決定される (Sinclair et al, Nature 346, 240-244, 1990; Matsuda et al, Nature 417, 559-563, 2002)。しかし、生物学の根源的疑問である「なぜ雌雄が存在するか」を解き明かすには、現在の生殖生物学の常識を翻す新たな発想とモデルが必要である。

(2) 精子形成プログラム制御

精子は雄のみが作り卵子は雌のみが作り、それらの受精によって個体が作られることは常識である。その機構はエピジェネティックな現象の発見によって、明らかにされつつある (Hajkova & Surani, Science 303, 633-634, 2004; Horike et al, Hum Mol Genet 9, 2075-2083, 2000)。精巣では、精子形成過程で不良な細胞は、セルトリ細胞のもつ監視機構によって排除される。不良性を獲得したままの精子が、すべてのチェックポイントをかいくぐって卵子と出会った場合、奇形・発癌のリスクを負うことになる (Baarends et al, Reproduction 121, 31-39, 2001)。つまり、精子形成は厳密なプログラムによって制御されている。

(3) MRL マウスの広域的組織幹細胞

MRL マウス精巣は、1) 減数分裂中期特異的アポトーシスの出現、2) 熱ショック耐性精母細胞の存在という表現型を持つ (Kon, Anat Sci Int 80, 141-152, 2005)。これらに關与する遺伝子として Exo1 を単離した (Namiki et al, Mol Reprod Develop 64, 179-188, 2003)。Exo1 は不良に複製された DNA 配列を除去する機能を持つことから、癌化とも関連する (Edelmann & Edelmann, Am J Med Genet C 129C, 91-99, 2004)。上述の MRL マウス精巣に見られる特異な表現型は Exo1 の機能異常と関連し、精祖細胞の異常な分裂・分化、不良精子排除機構に伴うアポトーシス出現、さらには精母細胞の熱ショック耐性機構をもたらす。発想を転換すれば、MRL マウスの精祖細胞は広域的組織幹細胞と言える。

2. 研究の目的

我々の研究目的は、MRL マウス広域的組織幹細胞の存在を証明し、新たな生殖生物学を開花させることである。予備的研究で生後の MRL マウス精巣に卵細胞を発見し、その発生動態、形態、機能の一端を解析するとともに、その責任因子の一つを分子生物学的に明らかにした。

3. 研究の方法

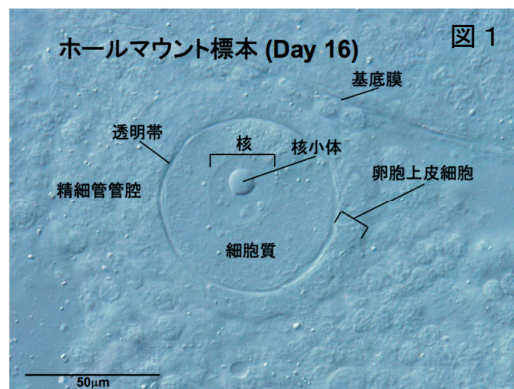
- (1) 精巣内卵細胞出現の証明—形態学的解析と分子生物学的解析
- (2) 精巣内卵細胞における卵細胞としての性質の検証—発生学的解析と精子受容能解析
- (3) 精巣内卵細胞出現に関わる責任遺伝子の同定—遺伝学的解析と塩基配列比較

動物は MRL マウスの M+ と lpr の 2 系統、MRL マウスの遺伝的背景にある C57BL/6、AKR、C3H/H3 を含むこれら計 8 系統の近交系と MRL と C57BL/6 の F1 を用いた。精巣内卵細胞の形態的特徴を顕微鏡ならびに電顕で観察し、MRL 精巣における卵細胞特異的遺伝子の発現を RT-PCR 法で検出、卵巣や B6 の精巣のものと比較した。免疫組織化学的にこれらのタンパク質の局在を明らかにし、精巣内卵細胞の精子受容能力を検証するため、Sperm-egg fusion assay を行った。また、各近交系マウス間で Sry 遺伝子およびアミノ酸配列を比較した。Sry はエクソンが 1 つしかなく、DNA と mRNA がほぼ同一であるため、DNA を用いて検証した。

4. 研究成果

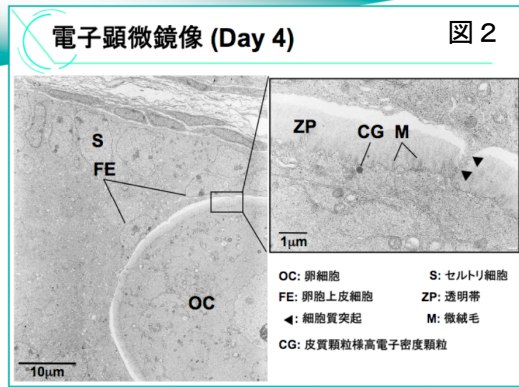
(1) 精巣内卵細胞出現の証明

まず、MRL マウスにおける精巣卵細胞の出現の証明を試みた。精巣内卵細胞はホルマウント標本下で、生後 7 日目から 30 日目まで観察された。MRL マウスの双方の系統で出現が認められた。精巣内卵細胞は主に精巣網付近で認められ、精巣内に複数ある場合は、お互いが近接して観察された。16 日齢の精巣内卵細胞のホルマウント標本で詳細を説明すると、卵細胞は精細管内に明らかに存在し、直径 50 μm ほどで、周囲に透明帯や卵胞上皮細胞が認められた (図 1)。



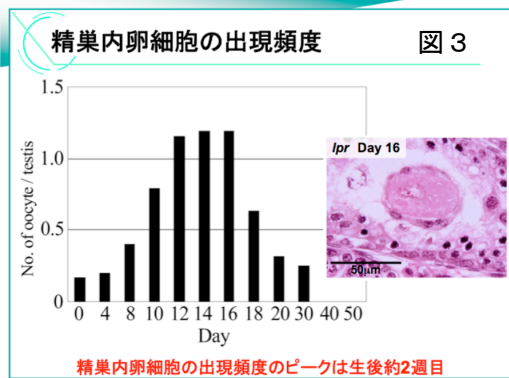
ホルマウント標本では 7 日目以前の精巣では検出されなかったため、パラフィン連続切片を作製し、観察した。その結果、精巣内卵細胞は生後 0 日には観察され、4 日目にはセルトリ細胞由来と考えられる卵胞上皮細胞が認められた。卵胞上皮細胞が 2~3 層存在する初期の二次卵胞構造は確認されたが、それ以上の発育は確認できなかった。

4日齢の精巣内卵細胞とその卵胞上皮細胞を電顕的に観察した(図2)。右の写真は左の写真の拡大像で、ここが卵細胞、透明帯、卵胞上皮細胞になる。卵細胞は透明帯に入り込む多数の微絨毛を持ち、皮質顆粒様の高電子密度を有する顆粒が出現していた。また、卵胞上皮細胞は透明帯を貫通し、卵細胞と連絡する細胞質突起を有していた。



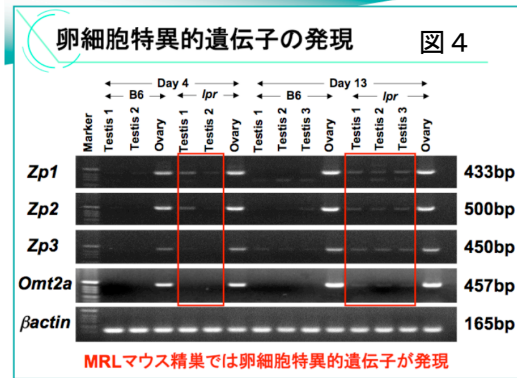
透明帯様構造をより詳細に観察するため、PAS-H染色を行い、卵巣内卵細胞との比較を行った。精巣内卵細胞の透明帯は卵巣内卵細胞のものと同様、PAS陽性を示し、8日齢のものでは卵細胞を完全に囲っていた。同腹の雌個体卵巣卵細胞に比較すると、生後0-4日目では雌で透明帯が形成されていなかったのに対し、精巣内卵細胞では不完全ではあるが既に形成されている点は注目し得る。

生後0-50日のMRLマウス精巣のホルマウント標本を作製し、卵細胞数を計測した。その結果、卵細胞は1精巣当たり約1.2個が観察された生後14日目を最大に増減していた(図3)。その存在は約1ヶ月齢まで観察されたが、40日、50日齢の精巣では検出されなかった。出現頻度のピークが見られた14日を過ぎると、変性した卵細胞がしばしば観察された。



MRLマウスの精巣では透明帯タンパクをコードしているZP-1~3、oocyte-specific maternal transcriptであるOmt2αの卵細胞

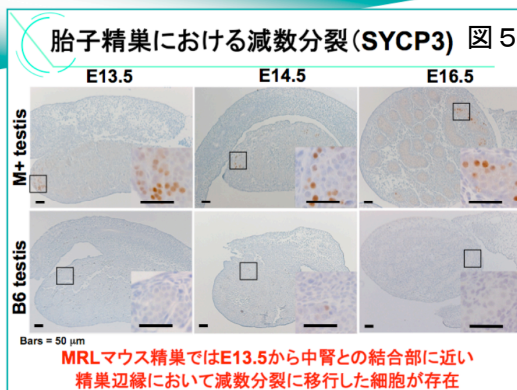
特異的遺伝子が発現していた(図4)。これらの遺伝子の発現は雌よりは弱く、また、4日齢のものよりも13日齢のもので強い傾向があった。



その形態学的特徴や卵細胞特異的遺伝子の発現から、MRLマウスの精巣内には確かに卵細胞が出現することが明らかになったが、その発育及び、出現期間は限られていることがわかった。精巣内卵細胞の存在はこれまでに何例か報告されており、キメラマウス、性転換したXX雌マウス、移植実験などでの出現が知られているが、繁殖能力のある性染色体組成がXYである哺乳類の雄では報告がなく、MRLマウスが初めての事例になる。

(2) 精巣内卵細胞における卵細胞としての性質の検証

哺乳類の生殖細胞の性分化は胎子期に雌の生殖細胞がSYCP1~3やDMC1を発現して減数分裂に移行することから始まり、マウスではこの現象は胎齢13.5日目に起こる。また、胎子期から出生直後の卵巣では、卵細胞形成に重要なFOXL2が体細胞から、卵細胞自身からはFIGLAやNOBOXが発現し、原始卵胞の形成が起こる。MRL胎子精巣における卵細胞の分化を検出するため、減数分裂前期の特異的マーカーであるSYCP3を検出した(図5)。

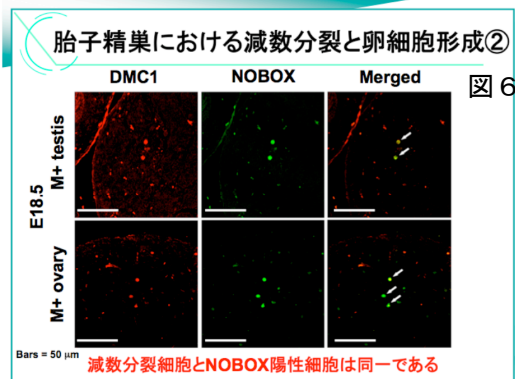


その結果、MRLマウス精巣では胎齢13.5日から連続して陽性細胞が観察され、これらの減

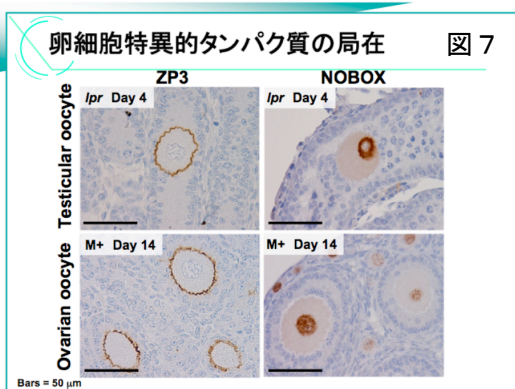
数分裂に移行した細胞は中腎との結合部に近い精巣辺縁に多く認められた。一方、B6 マウスでは胎齢 14.5 日から 15.5 日にかけて、わずかな陽性細胞が一過性に認められたのみで、それ以前も以後も陽性細胞は観察されなかった。

次に胎齢 18.5 日の精巣の連続切片を用いて、SYCP3 で減数分裂を、NOBOX で卵細胞形成を検出した。その結果、SYCP3 と NOBOX の陽性細胞は MRL マウスでのみ検出され、これらの細胞の存在領域が一致することがわかった。

減数分裂に移行した細胞と卵細胞形成にある細胞が同一であることを確かめるため、SYCP3 同様、減数分裂マーカーである DMC1 を用いて NOBOX との二重染色を行った。胎齢 18.5 の生殖腺において、DMC1 と NOBOX の陽性細胞は同一であることが分かった (図 6)。

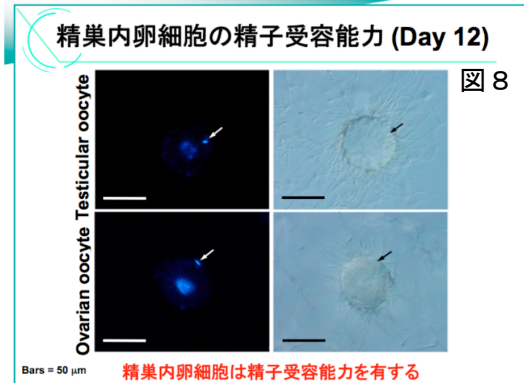


出生後の精巣内卵細胞における卵細胞特異的タンパク質である ZP3 と NOBOX を検出した結果、卵巣内卵細胞と同様に ZP3 は透明帯に、NOBOX は核にそれぞれ反応が得られた (図 7)。



精巣内卵細胞の精子受容能力を検討した (図 8)。核を特異的に染色する Hoechst を導入した卵細胞に、媒精した精子を加えてインキュベートした結果、卵細胞へ侵入し、Hoechst で染色された精子の核が観察された。このことから、精巣内卵細胞は精子受容能力

を有することが確認された。



MRL マウス胎子精巣では本来阻害されるはずの減数分裂が開始、進行することがわかった。また、精巣内卵細胞は、始原生殖細胞から派生し、精子受容能力を有するなど、卵巣内卵細胞と同様の性質をいくつか有することが明らかになった。

(3) 精巣内卵細胞出現に関わる責任遺伝子の同定

MRL マウスで最大の出現頻度を示した生後 14 日目に他系統のマウス及び MRL と C57BL6 マウスの F1 を用いて精巣内卵細胞の検出を試みたところ、AKR マウスと MRL マウスを父に持つ F1、B6MRLF1 でのみ精巣内卵細胞が観察された (図 9)。しかし、双方のマウスともに MRL マウスと比較すると、卵細胞の出現頻度は同日齢の MRL マウスに比べると低い傾向にあった。

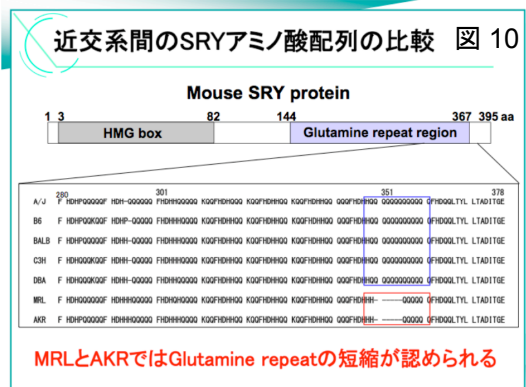
他の近交系・F1での出現頻度 図 9

Strain	No. of testis	No. of oocyte	Oocyte score
M+	98	121	1.23
<i>lpr</i>	30	38	1.27
AKR	78	12	0.15
B6MRLF1	68	20	0.29
MRLB6F1	68	0	0

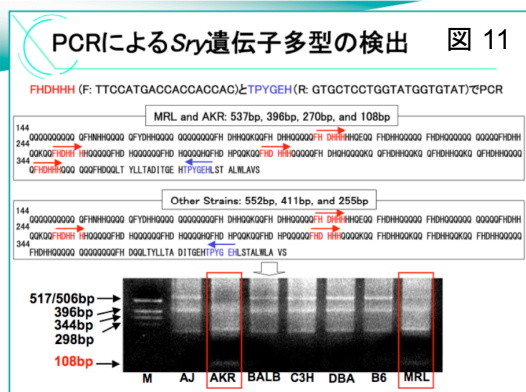
AKRとMRLを父にもつF1でのみ卵細胞が出現

精巣内卵細胞は MRL に由来する Y 染色体を有するマウスでのみ出現し、B6 に由来する Y 染色体をもつ個体では出現しなかったことから、責任遺伝子の少なくとも 1 つは Y 染色体上に存在することが明らかになった。Y 染色体には性決定を担う遺伝子、Sry が存在する。Sry の変異は雄から雌への性転換を引き起こすことから、精巣内に本来雌の生殖細胞である卵細胞が出現することと関連があると推測された。

マウスのSryはDNA結合部位であるHMGが前半に、CAGリピート、アミノ酸配列にするとグルタミンが繰り返されるグルタミンリピート領域が後半に存在する。MRLとB6間で、その配列を比較したところ、違いのほとんどはグルタミンリピート領域に存在した(図10)。このため、精巣内卵細胞を有する系統、MRLとAKRを他の近交系マウスの中でグルタミンリピート領域の配列を比較した。B6を含む他系統のマウスでは青枠で示したグルタミンが13個連なっている部分が、MRLとAKRでのみ、赤枠で示すように6個に短縮されていた。



次に、グルタミンリピート領域に繰り返し存在するフェニルアラニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、ヒスチジン3つの部分(FHDHHH)とC末端部分のトレオニン、プロリン、チロシン、グリシン、グルタミン酸、ヒスチジン(TPYGEH)に相当する部分でプライマーを設計してPCRを行い、増幅パターンを比較した(図11)。



Forward Primerに相当する部分を赤字で、リバースプライマーに相当する部分を青字で示してある。FHDHHHの数が系統間で違うため、それぞれ違った長さの増幅物が産生されると考えられた。結果、MRLマウスとAKRマウスでは4本のバンドが、その他の系統では、3本のバンドが得られ、系統間で異なることが確認された。特にMRLとAKRで特徴的な

108bpのバンドが認められた。この方法は、SRYグルタミンリピートの短縮、すなわち、精巣内卵細胞を有する可能性のある系統のスクリーニングに有用であると考えられた。

F1の検証から、責任遺伝子の1つはY染色体に存在することが明らかになった。さらに、AKRとMRLマウスに共通して精巣内卵細胞の出現とSRYグルタミンリピートの短縮が観察されたことから、精巣内卵細胞出現の表現型はSRYの多型と強く関連することが示唆された。

結論として、MRLマウスの精巣内卵細胞は、始原生殖細胞から胎子期の減数分裂を経て形成され、MRL胎子精巣では精子形成過程と同時に卵細胞形成過程が開始、進行し、これらはSRYグルタミンリピート領域の多型と関連することが示唆された。

出生後の精巣内卵細胞は卵胞上皮細胞やZP3を含む透明帯を有し、核にはNOBOXが発現することで卵細胞形成過程に存在することが明らかになった。その発育は限られているものの、精子受容能力を具備し、卵細胞としての性質の一部を有することが明らかになった。今後、SRYグルタミンリピート短縮と生殖細胞分化機構の関連を解明し、精巣内卵細胞の配偶子としての可能性を検証していくことで、哺乳類における生殖細胞の性分化過程の解明につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計20件)

1) Ichii O, Konno A, Sasaki N, Endoh D, Hashimoto Y, Kon Y. (2009): Onset of autoimmune glomerulonephritis derived from the telomeric region of MRL-chromosome 1 is associated with the male sex hormone in mice. *Lupus*, 18(6), 491-500. (査読あり)

2) Otsuka, S., Konno, A., Hashimoto, Y., Sasaki, N., Endoh, D. and Kon, Y. (2008): Polymorphism in MRL and AKR mice Sry: a candidate gene for the appearance of testicular oocyte. *Jpn. J. Vet. Res.*, 56(3), 129-138. (査読あり) <http://hdl.handle.net/2115/35113>

3) Otsuka, S., Konno, A., Hashimoto, Y., Sasaki, N., Endoh, D. and Kon, Y. (2008): Oocytes in newborn MRL mouse testes. *Biol. Reprod.*, 79(1), 9-16. (査読あり)

4) Ichii, O., Konno, A., Sasaki, N., Endoh, D., Hashimoto, Y. and Kon, Y. (2008): Altered balance of inhibitory and active Fc gamma receptors in murine autoimmune

glomerulonephritis. *Kidney Int.*, 74(3), 339-347. (査読あり)

5) Ichii, O. Konno, A., Sasaki, N., Endoh, D., Hashimoto, Y. and Kon, Y. (2008): Autoimmune glomerulonephritis induced in congenic mouse strain carrying telomeric region of chromosome 1 derived from MRL/MpJ. *Histol. Histopathol.*, 23, 411-422. (査読あり)

6) Kon, Y., Konno, A., Hashimoto, Y. and Endoh, D. (2007): Ovarian cysts in MRL/MpJ mice originate from rete ovarii. *Anat. Histol. Embryol.*, 36(3), 172-178. (査読あり)

[学会発表] (計 30 件)

1) 大塚沙織. MRL/MpJ マウスに出現する精巣内卵細胞の解析. 平成 21 年度日本顕微鏡学会. 2009 年 12 月 12 日、酪農学園大学 (江別市).

2) Kon, Y. Analyses of germ cell abnormalities in MRL/MpJ mice. - Approaching by molecular anatomy - The 3rd Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. 2009 年 11 月 5 日、忠北大学 (韓国 清州市).

3) Lee, S.-H. Quantitative trait loci analysis of development of ovarian cysts originated from rete ovarii in the MRL/MpJ mice. The 3rd Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. 2009 年 11 月 5 日、忠北大学 (韓国 清州市)

4) 千原正尚. マウス精子形成過程における血液精巣閉門構成成分の動態. 第 148 回日本獣医学会. 2009 年 9 月 25 日、とりぎん文化会館 (鳥取市).

5) 市居 修. (DBA/2 X C57BL/6) F2 交雑マウスに出現する水腎症 第 148 回日本獣医学会. 2009 年 9 月 25 日、とりぎん文化会館 (鳥取市).

6) 李 慎暁. MRL/MpJ マウスに出現する卵巣嚢腫の量的形質遺伝子座解析. 第 147 回日本獣医学会. 2009 年 4 月 2 日、栃木県総合文化センター (宇都宮市).

7) 大塚沙織. MRL マウスに出現する精巣内卵細胞の減数分裂能と精子受容能. 第 147 回日本獣医学会. 2009 年 4 月 2 日、栃木県総合文化センター (宇都宮市).

8) 市居 修. 腎疾患の新しい診断指標—IL1-F6 は尿管管傷害マーカーになり得る—. 第 147 回日本獣医学会. 2009 年 4 月 2 日、栃木県総合文化センター (宇都宮市).

9) 市居 修. Ifi200 遺伝子群と自己免疫性糸球体腎炎の関連性. 第 146 回日本獣医学会. 2008 年 9 月 24 日、ワールドコンベンションセンター・サミット (宮崎市)

10) 昆 泰寛. MRL/MpJ マウス精巣内に出現

する卵細胞と Sry 遺伝子変異との関連性. 第 54 回日本解剖学会東北・北海道連合地方会. 2008 年 9 月 6 日、市民プラザ・ビッグアイ (郡山市).

11) 昆 泰寛. MRL マウスの精細胞アポトーシスに影響する第 2 染色体因子. 第 145 回日本獣医学会. 2008 年 3 月 28 日、麻布大学 (相模原市).

12) 大塚沙織. マウスの精巣内卵細胞出現と Sry 遺伝子. 第 145 回日本獣医学会. 2008 年 3 月 28 日、麻布大学 (相模原市).

13) 市居 修. 性腺摘出が自己免疫性糸球体腎炎の病態に与える影響について. 第 145 回日本獣医学会. 2008 年 3 月 28 日、麻布大学 (相模原市).

14) 昆 泰寛. MRL マウス精巣が小型化する責任因子の探索. 第 53 回日本解剖学会東北・北海道連合地方会. 2007 年 9 月 29 日、北海道医療大学 (札幌市).

15) 市居 修. 自己免疫性糸球体腎炎と Fc gamma receptor III (FcγRIII) の関連性について. 第 144 回日本獣医学会. 2007 年 9 月 2 日、酪農学園大学 (江別市).

16) 大塚沙織. MRL マウス精巣内卵細胞の染色体組成. 第 144 回日本獣医学会. 2007 年 9 月 2 日、酪農学園大学 (江別市).

17) 昆 泰寛. C57BL/6. MRLc1 (82-100) コンジェニックマウス精巣を用いたマイクロアレイ解析. 第 143 回日本獣医学会. 2007 年 4 月 3 日、つくば国際会議場 (つくば市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

昆 泰寛 (KON YASUHIRO)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号：10178402

(2) 研究分担者

遠藤 大二 (ENDO DAIJI)

酪農学園大学・獣医学部・教授

研究者番号：40168828

(H19→H20：連携研究者)

佐々木 宣哉 (SASAKI NOBUYA)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号：20302614

(H19→H20：連携研究者)