

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450439

研究課題名(和文) MRLマウスの精巣内卵細胞を用いた哺乳動物の性分化機構解明と雄性単性生殖への挑戦

研究課題名(英文) Challenges to elucidate mechanisms of sexual differentiation in mammals and to produce paternal-derived mouse using testicular oocytes in MRL mice

研究代表者

大塚 沙織(Otsuka, Saori)

北海道大学・獣医学研究科・客員研究員

研究者番号：10566152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：MRL/MpJマウスの雄は、胎子期から新生子期に精巣内で精細胞だけでなく卵細胞も産生する。精巣内卵細胞の機能と産生メカニズムについて研究した。まず、生後の精巣内卵細胞は同齢の卵巣内卵細胞と同様のDNAメチル化状態を示し、雌性パターンのエピゲノムを獲得する資質を有する可能性が示された。また、本表現型の責任遺伝子は複数存在し、Y染色体と一番染色体に存在することが推測され、それぞれ独立して精巣内卵細胞産生を誘導することがわかった。精巣内卵細胞は胎子期に始原生殖細胞から減数分裂を経て分化するが、その際、精巣では卵巣の分化機能に関与する遺伝子群の発現が観察され、精巣内卵細胞産生への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Male MRL/MpJ mice produce not only spermatogenic cells but also oocytes in their testes during fetal to neonatal life. In this study, functions of testicular oocytes and mechanisms of testicular oocyte production were studied. First, DNA methylation status of testicular oocytes was similar to ovarian oocytes at the same age. Additionally, there were at least two responsible genes in this phenotype, one on chromosome Y and the other on chromosome 1. Moreover, the expression of ovary-determining genes which should be inhibited in fetal testes was observed in fetal testes of MRL mice indicating its relationship to the production of testicular oocytes.

研究分野：農学

キーワード：性分化 生殖細胞 MRL/MpJマウス 精巣内卵細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳動物の雌は卵のみを、雄は精子のみを産生する

哺乳類の性は、精子のもつ性染色体によって受精時に決まるが、生殖腺および生殖細胞は本来雄にも雌にもなれる性質を有する。生殖腺の性分化は胎子期に雄の生殖腺体細胞が Y 染色体上の性決定因子である *Sry* (sex determining region on Y chromosome) を発現し、精巣への分化を誘導することから始まる。この時、精巣では *Sry* の下流にあるとされる *Sox9* (SRY-box containing gene 9) をはじめ、*Fgf9* (fibroblast growth factor 9) や *Cyp26b1* (cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1) といった精巣の分化・機能に参与する遺伝子が働く。それに対し、雌では *Wnt4* (Wnt family member 4) や *Rspo1* (R-spondin 1), *Fst* (follistatin) といった卵巣の分化・機能に参与する遺伝子が発現し、卵巣が形成されていく。一方、生殖腺体細胞と異なり、生殖細胞の性はその性染色体組成ではなく、周囲の生殖腺体細胞の性ならびに機能に依存する。すなわち、生殖細胞はその性染色体組成にかかわらず胎子期に減数分裂に移行して卵細胞となる資質を有するが、雄では周囲の体細胞が減数分裂移行を阻害し、生殖細胞を精細胞へと分化させる。この機構により、雌では卵のみが、雄では精子のみが産生される。

(2) MRL/MpJ マウスの雄は卵細胞を産生する哺乳類ではキメラ動物、卵精巣や半陰陽を除き、雄が卵細胞を産生するという報告はない。しかしながら、MRL/MpJ (MRL) マウスの精巣精細管内には卵細胞が出現する。精巣内卵細胞は、透明帯や卵胞上皮細胞など、卵巣内卵細胞と類似した形態学的特徴を呈し、XY の性染色体と精子受容能を有している。さらに MRL マウスの胎子精巣では、減数分裂、ならびに卵細胞マーカー陽性の生殖細胞が精巣辺縁や中腎との境界部付近に観察され、一部の始原生殖細胞が減数分裂に移行して卵細胞へと分化することが明らかになった。

(3) 胎子期の精巣内卵細胞は雌性パターンのエピゲノムを呈する

配偶子発生過程では、ヒストン修飾や DNA のメチル化状態がゲノムワイドに再編成され、これによって生殖細胞に特徴的な遺伝子発現が確立される。中でも DNA のメチル化やヒストン H3 の 9 番目のリシン残基 (H3K9) のジメチル化は性特異的なパターンを示す。DNA の再メチル化は、精細胞では出生前には完了するのに対し、卵細胞では生後の成熟過程で進行する。一方、H3K9 は胎子期の精細胞では低メチル化を示すが、卵細胞では高メチル化を示す。MRL マウスの胎子期精巣内卵細胞における DNA の再メチル化と H3K9 のジメチル化を免疫組織化学的に検証した結果、胎子期精細胞が DNA 高メチル化、H3K9 低メチル

化を示す一方で、胎子期精巣内卵細胞は同胎齢の卵巣内卵細胞同様、DNA 低メチル化、H3K9 高メチル化を示していた。

(4) 責任遺伝子は常染色体と Y 染色体に存在する

MRL マウスと精巣内卵細胞を産生しない C57BL/6 (B6) マウスの間で作出した F1 マウス、ならびに種々の戻し交配系マウスの観察から、本表現型には複数の遺伝子が関与し、中でも責任遺伝子は常染色体と Y 染色体にあることがわかった。MRL マウス由来の Y 染色体がそれのみで B6 マウスに本表現型を誘導する一方で、常染色体の責任遺伝子は MRL ホモ劣性を示すことがわかった。また、B6 マウス由来の Y 染色体と MRL ホモあるいは MRL/B6 ヘテロの常染色体を有する N2 マウス (MMB マウス) における精巣内卵細胞の出現頻度から、常染色体の責任遺伝子座は 1 つであることが推測された。

(5) 精巣内卵細胞の産生には左右差がある哺乳動物の生殖腺の性分化異常には左右差があり、人では左側が、マウスでは右側がより雌性に傾くことが知られている。興味深いことに、MRL マウスにおける精巣内卵細胞は胎子期・新生子期を通じて右で左よりも有意に多く出現することがわかっている。

2. 研究の目的

(1) 精子しか産生しないはずの精巣で卵細胞が産生されるメカニズムを明らかにし、哺乳類における生殖腺、および生殖細胞の性分化機構を解明する。

(2) 精巣内卵細胞を用いて雄由来のゲノムのみを有する個体 <Paternal-derived mouse> を作出することで、雄性単性生殖の可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) MMB マウスを用いた常染色体上の責任因子の解析

精巣内卵細胞産生に参与する常染色体上の因子を明らかにするため、MRL 雌マウスと MRLB6F1 雄マウス間の N2 である MMB マウスを観察した。本表現型の常染色体の責任遺伝子はホモ劣性であるが、MMB マウスは B6 マウス由来の Y 染色体と MRL ホモあるいは MRL/B6 ヘテロの常染色体を有する。この精巣内卵細胞が検出された MMB マウスの遺伝型を調べ、共通して MRL ホモ型を示す遺伝子座の検出を試みた。

(2) 生後 14 日齢における精巣内卵細胞の DNA メチル化解析

生後 14 日齢の精巣内卵細胞の DNA メチル化状態を卵細胞マーカーである Nobox (NOBOX oogenesis homeobox) および、DNA メチル化酵素である Dnmt3a (DNA methyltransferase 3A)、

あるいはメチル化シトシン (5-MeC) に対する免疫組織化学的染色を用いて検証し、同日齢の卵巣内卵細胞のものと比較した。

(3) 胎子精巣における性分化関連遺伝子の発現解析

生殖腺体細胞の性ならびに機能は始原生殖細胞の性分化を決定することから、MRL マウスの精巣内卵細胞産生にも関与することが推測された。MRL マウスの胎子精巣では、精巣頭尾側辺縁に位置する一部の XY 始原生殖細胞が胎齢 12.5-14.5 日に減数分裂に移行する。このため、胎齢 13.5 日の胎子精巣を精巣内卵細胞産生領域 (辺縁部) と非産生領域 (中央部) に分離し、これらの領域の間で精巣の分化機能マーカー (*Sox9*, *Fgf9*, *Cyp26b1*) および卵巣の分化機能マーカー (*Wnt4*, *Rspo1*, *Fst*) の発現を比較した。

(4) 精巣内卵細胞産生にみられる左右差の解析

精巣が形成されるはずの雄マウスにおける精巣から卵巣あるいは卵巣への性分化異常は左よりも右側で高率に観察される。MRL マウスの精巣内卵細胞も右側でより多く観察される。上述の精巣あるいは卵巣の分化機能マーカーの発現を胎齢 13.5 日の MRL マウスの左右間で比較し、精巣内卵細胞産生の左右差との関連を検証した。

4. 研究成果

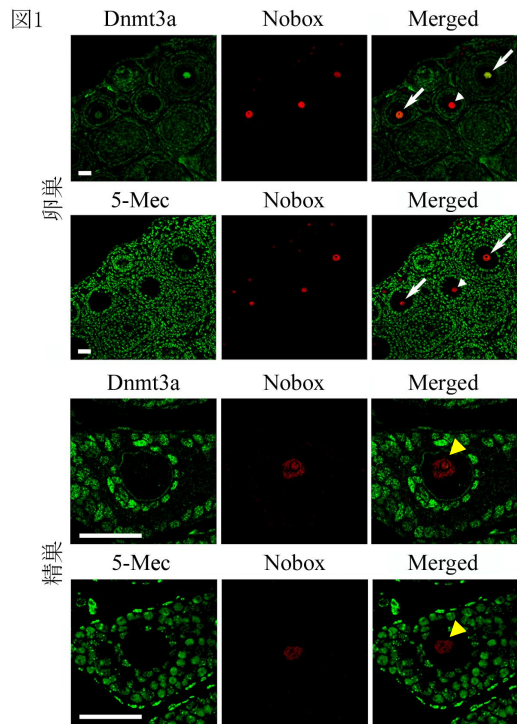
(1) MMB マウスを用いた常染色体上の責任因子の解析

作出した MMB マウス 513 個体のうち、精巣内卵細胞は、12 個体で観察され、それら全てで MRL ホモ型が見られたのは 1 番染色体の 0.00 - 2.46cM 領域のみであった。このことから、本領域が責任遺伝子座であることが推測された。マウス 1 番染色体 0.00 - 2.46cM 領域について Mouse Genome Informatics で検索したところ、1.60-2.46cM の範囲に既知のタンパク質をコードする遺伝子が 29 存在することがわかった。これらの遺伝子の配列ならびに胎子精巣内における発現を解析し、精巣内卵細胞産生との関連を明らかにする。

(2) 精巣内卵細胞のエピゲノム解析

Nobox 陽性の精巣内卵細胞は Dnmt3a 陰性を示したが、卵巣では二次卵胞以上の大きな卵細胞が Dnmt3a 陽性を示した一方で、Dnmt3a 陰性の卵細胞も観察された (図 1)。直径を比較したところ、陽性となった卵細胞は 50 μ m 以上で、陰性だった精巣内卵細胞ならびに卵巣内卵細胞は 50 μ m 未満であった。また、5-Mec に対しては精巣内卵細胞と直径 50 μ m 未満の卵細胞が陰性を示す一方、二次卵胞以上の直径 50 μ m 以上の卵細胞が弱い陽性反応を示した。このことから、生後 14 日齢の精巣内卵細胞は同サイズの卵細胞と同様、DNA の再メチル化は開始しておらず、雌性パターンのエ

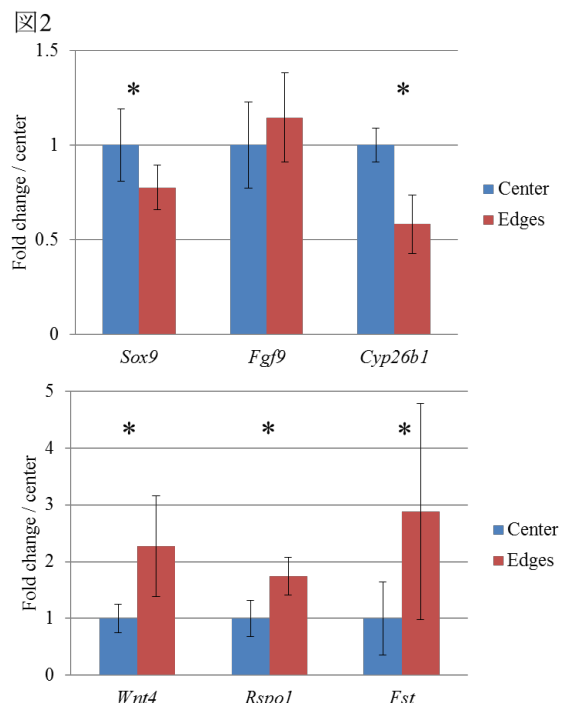
ピゲノムを獲得する資質を有する可能性が高いと考えられた。



白矢頭: 卵巣内卵細胞 (直径 < 50 μ m)、矢印: 卵巣内卵細胞 (直径 \geq 50 μ m)、黄矢頭: 精巣内卵細胞、スケールバー: 50 μ m

(3) 精巣内卵細胞産生に関する遺伝子の発現解析

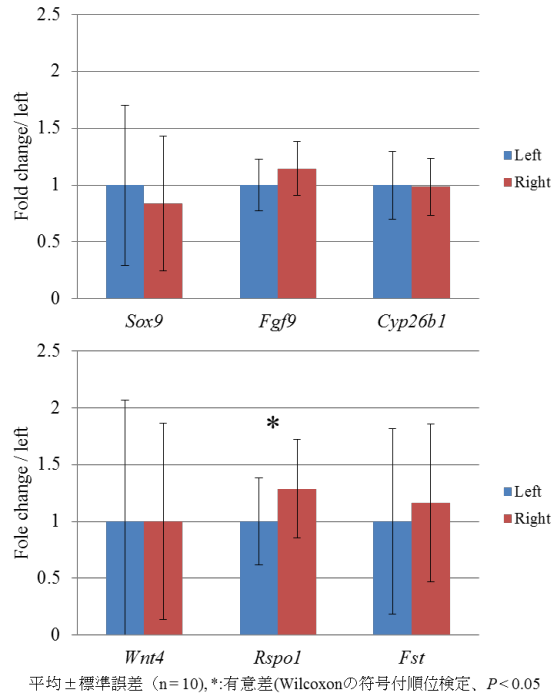
精巣内卵細胞産生領域である辺縁部では、*Sox9* および *Cyp26b1* の発現が非産生領域より有意に低く、卵巣の分化機能マーカーは有意に高かった (図 2)。このことから、MRL マウスの精巣頭尾側辺縁は、一部卵巣としての性質を有し、生殖細胞の雌性化と関連していることが推測された。



平均 \pm 標準誤差 (n = 8), *: 有意差 (Wilcoxon の符号付順位検定, $P < 0.05$)

(4)精巣内卵細胞産生にみられる左右差の解析
 精巣内卵細胞がより多く産生される右側精巣では、*Sox9* の発現が左側よりも低い傾向に、また *Rspo1* および *Fst* の発現は高い傾向にあった(図3)。

図3



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 1件)

Otsuka-Kanazawa S, Ichii O, Kon Y. Testicular oocytes in MRL/MpJ mice possess similar morphological, genetic, and functional characteristics to ovarian oocytes. *Mach Dev.* 137:23-32. 2015. 査読有り.

[学会発表](計 2件)

Saori Otsuka-Kanazawa, Autosomal Causative Locus for Production of Testicular Oocytes in MRL/MpJ Mice, The 5th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists, February 12, 2015, Discovery Kartika Plaza Hotel (Bali, Indonesia).

大塚沙織、MRL/MpJ マウスに出現する精巣内卵細胞のエピゲノム解析、第157回日本獣医学会学術集会、2014年9月9日、北海道大学(北海道・札幌市)。

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

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

取得状況(計 0件)

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

[その他]
 ホームページ等

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/anat/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大塚 沙織 (OTSUKA SAORI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・客員研究員

研究者番号：10566152

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：