

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780278

研究課題名(和文) MRLマウスの精巣はなぜ卵細胞を作るのか - 精巣内卵細胞の産生機構解明と機能評価 -

研究課題名(英文) Why do MRL mice produce oocytes in their testes - analysis of producing mechanism and functional evaluation of testicular oocyte

研究代表者

大塚 沙織 (Otsuka, Saori)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・助教

研究者番号：10566152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：MRL/MpJ(MRL)マウスに出現する精巣内卵細胞の常染色体の責任遺伝子は1つであることがわかった。また、本表現型の関連遺伝子は15番染色体上にあることが示唆された。MRLマウスの胎子期精巣内卵細胞は、同時期の卵巣内卵細胞と類似したヒストン蛋白ならびにDNAのメチル化パターンを示すことがわかった。さらに、胎子期から出生後のMRLマウスの精巣内卵細胞の出現には左右差があり、精巣内卵細胞の産生あるいは生存が右側で有意に高いことがわかった。

研究成果の概要(英文)：There is only one autosomal causative gene for production of testicular oocytes in MRL/MpJ mice. In addition, the related gene for this phenotype seems to locate on chromosome 15. The fetal testicular oocytes show the similar methylation patterns of histone and DNA to ovarian oocytes at the same age. Furthermore, right testes of fetal and postnatal MRL/MpJ mice contain significantly higher number of testicular oocytes than left testes.

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：発生・分化 MRL/MpJマウス 性分化 精巣内卵細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 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。一方、生殖細胞はその性染色体組成に関わらず、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、生殖細胞を精子形成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 マウスの精巣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、申請者は自己免疫疾患モデルとして知られる MRL マウスの精巣精細管内に卵細胞を発見した。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た。さらに胎子期の精巣では、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た。これらのことは、MRL 胎子精巣内では性染色体 XY の始原生殖細胞の一部が減数分裂に移行して卵細胞へと分化し、精子発生と卵子発生が同時進行することを示す。

(3) 責任遺伝子は Y 染色体に存在するマウスと精巣内卵細胞を産生しない C57BL/6 (B6) マウス間で作出した 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 染色体にあり、特に常染色体の責任遺伝子はホモ劣性を示すことがわかった。MRL マウスの祖先系統 (B6、C3H/He、AKR) における本表現型を検証した結果、AKR マウスでのみ精巣内卵細胞が観察された。さらに、Y 染色体上の性決定因子である Sry に着目し、配列を様々な近交系マウス間で比較したところ、精巣内卵細胞を産生する MRL マウスと AKR マウスでのみ、Sry の CAG リピートの多型が観察された。これらのことから、本表現型は AKR マウスに由来し、Sry の多型と関連することが示唆された。

## 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關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。現在まで 459 個を作出した。

(2) 胎子期精巣内卵細胞の DNA メチル化解析  
生殖細胞は性特異的な DNA のメチル化を呈する。またその DNA メチル化が起こる時期も雌雄で異なり、精細胞では胎子期に開始・完了するのに対し、卵細胞では生後開始する。胎齢 (E) 18.5 の MRL マウスの精巣を用いて、胎子期精巣内卵細胞の DNA メチル化状態を免疫組織化学的に検証した。

(3) 胎子期精巣内卵細胞のヒストンメチル化解析

生殖細胞が有するヒストン蛋白の一部は性特異的なメチル化を呈する。E16.5 の MRL マウスの精巣を用いて、胎子期精巣内卵細胞のヒストン蛋白 3 の 9 番目のリジン残基 (H3K9) のメチル化状態を免疫組織化学的に検証した。

(4) 精巣内卵細胞産生にみられる左右差の解析

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報告されている精巣内卵細胞の出現に、左右差があるかどうか、出生前後の個体を用いて検証した。

## 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

MMB マウス 459 個体中、10 個体で卵細胞が検出され、その出現頻度から常染色体の責任遺伝子は 1 つであることが推測された。今後これらの個体の遺伝型を明らかにし、責任遺伝子を含む遺伝子座を同定する。

(2) 胎子期精巣内卵細胞の DNA メチル化解析  
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の結果から、卵細胞マーカーである Nobox (NOBOX oogenesis homeobox) 陽性の精巣内卵細胞では同胎齢の卵巣内卵細胞同様、DNA の再メチル化はまだ始まっていないことがわかった (図 1)。今後は生後の精巣内卵細胞の DNA メチル化状態について解析する。

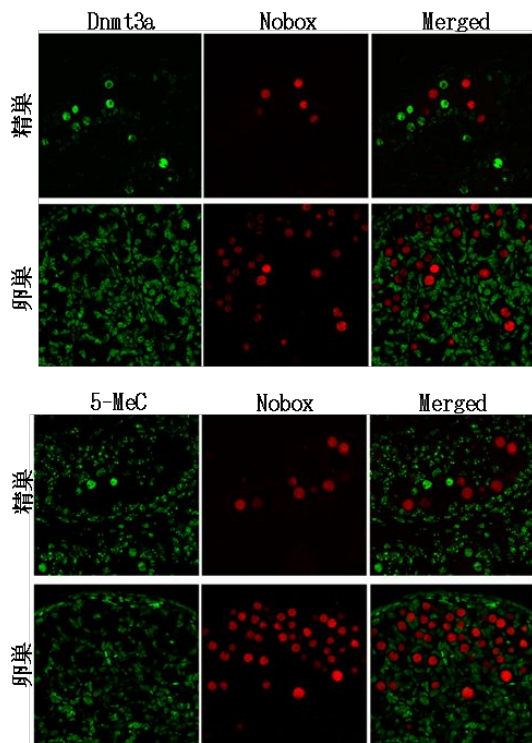


図1

(3) 胎子期精巣内卵細胞のヒストンメチル化解析

精巣内卵細胞は卵巣内卵細胞と同様、生殖細胞マーカーである Tra98、胎子期卵細胞を検出する減数分裂マーカー Dmc1 (DNA methyltransferase 3A)、H3K9 のメチル化を検出する H3K9me2 の全てに陽性を示す一方で、Tra98 陽性、Dmc1 陰性を示す精細胞は H3K9me2 に陰性を示した(図2)。このことから、E16.5 の精巣内卵細胞は卵巣内卵細胞と同様に H3K9 のメチル化状態を示すことがわかった。

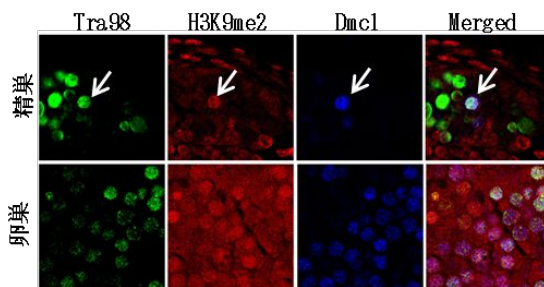


図2

矢印：精巣内卵細胞

(4) 精巣内卵細胞産生にみられる左右差の解析

生後7日齢から30日齢のMRLマウスでは、1精巣辺りの精巣内卵細胞は、左側が0.78、右側が1.83と右側で有意に高いことがわかった。一方、免疫組織学的手法を用いてE18.5の精巣で精巣内卵細胞を検出した結果、左側では5.15、右側で9.69と、胎子期においても右側で有意に出現頻度が高いことがわかった。このことから、精巣内卵細胞の産生、あるいは生存率が左右で異なることが推測される。今後は、胎子期から出生前後のMRL

マウス精巣について、表現型ならびに遺伝子発現を精査、左右間で比較することで、性決定および分化機構、ならびに精巣内卵細胞産生機構における左右差の生じるメカニズムを明らかにする。

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 1件)

Otsuka S, Ichii O, Namiki Y, Sasaki N, Hashimoto Y, Kon Y. Genomic analysis of the appearance of testicular oocytes in MRL/MpJ mice. Mamm Genome. 23:741-8. 2012. 査読有り.

〔学会発表〕(計 2件)

大塚沙織、MRLマウス胎子精巣における卵細胞形成過程の解析、日本解剖学会・第59回東北・北海道連合支部学術集会、2012年9月22日、山形大学(山形県・山形市)。

Saori Otsuka, Initiation of meiosis in fetal testis of MRL mouse to produce testicular oocytes, The 4<sup>th</sup> Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists, October 25, 2012, Phuket Graceland Resort & Spa (Phuket, Thailand).

〔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・助教  
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：