

はなく、性比が1,202:542にとどまっているということは、卵巣への分化を促す因子も存在しており、両性因子の競争の結果、生殖巣はどちらかの性にただれを打つように分化してゆくものと考えられた。たとえば、最近、遺伝子の変異によって、家族性のXX型性転換症をひき起こすR-spondin 1のような分子が報告された⁸⁾。また、性が決まらずに、1個体の中で生殖巣の片側が卵巣で、もう片側が精巣になっているような雌雄同体は、観察を行なったうちの約6%であったが、雌雄の細胞が混在しても個体としては原則として雄または雌のどちらかの性が選ばれるということが、大量の雌雄キメラを作製することにより確認された。

III. 精巣内における雌由来(XX型)生殖細胞の性分化

次に、精巣の中に存在する雌由来(XX型)の生殖細胞はいったいどのような運命をたどるのかについて、検討することにした。

これまでの報告によると、生殖細胞の性分化は性染色体の組合せよりも生殖巣の性、すなわち、周りの体細胞の性に影響されるといわれていた⁹⁾。卵巣内では本来、XY型の性染色体をもっている卵子になり、精巣内ではXX型の性染色体をもっている精原細胞になるということである¹⁰⁾。これは通常、卵子は胎仔期に減数分裂を起こすが、精子は生まれるまで減数分裂を起こさない。そして、精巣内のXX型細胞は胎仔期に減数分裂を開始していないということを根拠にしている。しかし減数分裂は雌雄どちらの生殖細胞でも普遍的に起こる現象なので、それだけの理由で本当に精原細胞に分化しているのかどうか、完全に証明されているとはいえないのではないかと考えた。そこで筆者らは雌雄キメラマウスの精巣から雌由来(XX型)細胞をGFP蛍光によって追跡、回収することにより、精巣内の雌由来(XX型)生殖細胞の性分化について、より詳しい解析を行なった。

1. 雌雄キメラマウスにおけるX染色体の不活性化

X-linked GFPマウスを用いた今回の研究で、GFP蛍光を目印に細胞を追跡するときに1つ問題点がある。それは、哺乳類の雌由来のXX型細胞では、2本あるX染色体のうち片側からはほとんど遺伝子の転写が行なわれな

い、X染色体不活化(X inactivation)という現象が起こることである。そのため、GFP蛍光をもつ細胞は雌由来であると断定できるが、蛍光をもたない細胞のなかには、X染色体不活化を受けて、GFPが発現していない雌由来の細胞も存在しうるために、それを雄由来の細胞とは断定できないことになる。しかし、好都合なことにはほぼすべての生殖細胞は、誕生までに両方のX染色体がともに活性化された状態になるといわれている^{11,12)}。X-linked GFPとXX型性転換マウスを組み合わせて、XX型生殖細胞がどの程度GFPによって追跡できるのか調べた。その結果、新生仔のXX型性転換マウスの精巣内にみられた約93%の生殖細胞(XX型)はGFP蛍光をもっていることがわかり(筆者ら:未発表)、X染色体不活化の解除が起こるために、雌雄キメラの精巣内の雌由来(XX型)生殖細胞はほぼすべてGFP蛍光によって追跡できることが示された。

2. 精巣内の雌由来(XX型)生殖細胞

生まれたばかりの雌雄キメラ新生仔の精巣中には、全体にくまなくGFPで光る細胞が分布していることが観察できた。また、生殖細胞に対して特異的に反応する抗体(TRA98)¹³⁾の免疫染色により、これらのなかには生殖細胞も含まれていることが確かめられた(図1b)。しかし、5週齢以降の精巣を観察すると、セルトリ細胞やライディッシュ細胞、ミオイド細胞といった体細胞はGFP蛍光をもつ細胞が確認できたが、生殖系列の細胞は全く見あたらなくなる(図1c)。また、雄の雌雄キメラを野生型の雌と交配させて得られる仔のなかにはGFP遺伝子が伝わった仔はまったく含まれなかったため、雌の細胞に由来する精子は存在しないことが再確認された。

そこで筆者らは、新生仔の雌雄キメラ精巣中にみられた雌由来(XX型)生殖細胞がいままでの報告どおり、本当に精原細胞に分化しているのかどうかを見きわめるために、キメラの精巣からGFPで光っている雌由来(XX型)の生殖細胞のみを回収して、分子生物学的な解析を行なうことにした。

雌雄キメラマウスの精巣中からGFPで光っている雌由来(XX型)の生殖細胞のみを回収する方法は、先に述べたように、雌雄キメラを作製するときに生殖細胞でとくにGFP蛍光の強いX-linked GFPマウスの系統を用いれば、簡単にできると考えていたが、1回の実験に要する1~2万個の雌由来の生殖細胞を回収するのに約50匹分の雌雄

キメラマウスの新生仔“精巢”が必要で、50匹のキメラマウスを作製するためには雄となるものが約70%なので、70匹以上のマウスが必要になり、これらを生ませるためには、誕生率から考えて、180個程度の集合キメラを移植する必要があった。また、そのためには360個以上の初期胚の性を分別するところからスタートしなければならないし、実験はこれを数回くり返す必要があるというわけで、分別は簡単であるが分子生物学的な解析という部分になると、そう簡単というわけではなかった。このほかにも実験のコントロールになるX-linked GFPマウス、とくに雄のX染色体は母親からしか伝わらないので、まず、X-linked GFPをもつ雌をつくり、それを雄と交配させて、X-linked GFPマウスの雄を誕生させることになる。したがって、これらの誕生予定日を合わせて、細胞を調製するには少々苦勞することになった。

こうして回収した細胞を用いて、雌雄の生殖細胞で異なっているといわれている減数分裂とゲノムインプリンティングについて、詳しい解析を行なった。

生まれたときに減数分裂を開始しているかどうかについては、これまでの組織切片の核の形態を見て判定する

という方法¹⁰⁾ではなく、フローサイトメーターを用いた細胞周期を測定するという方法を用いた。その結果、精巢中の雌由来(XX型)生殖細胞は第1次減数分裂の前期で休止している卵子とは異なり、精原細胞と同じG1/G0期の状態にあることが示され、これまでの報告を裏づける結果が得られた(図2a)。

次に、未分化な生殖細胞の性の分化を判定するにはゲノムインプリンティング¹⁴⁾が決定的な指標になると考えて解析を行なった。ゲノムインプリンティングは雄の生殖細胞の場合、減数分裂が始まる前に完了し、誕生時には母性メチル化遺伝子が低メチル化状態で、父性メチル化遺伝子が高メチル化状態になる。一方、雌の生殖細胞に分化すれば、減数分裂がまず起こり、その後、誕生して約1週~3週にかけて母性メチル化遺伝子が高メチル化状態になっていくことが知られている^{15,16)}。

筆者ら自身でバイサルファイト法を用いてDNAのメチル解析を試みたが、なかなかうまくいかず、少量のサンプルながら何度も調製するのも大変なので、ゲノムインプリンティングの解析を東京工業大学の石野ら(現:東京医科歯科大学)にお願いした。その結果、新生仔精巢内か

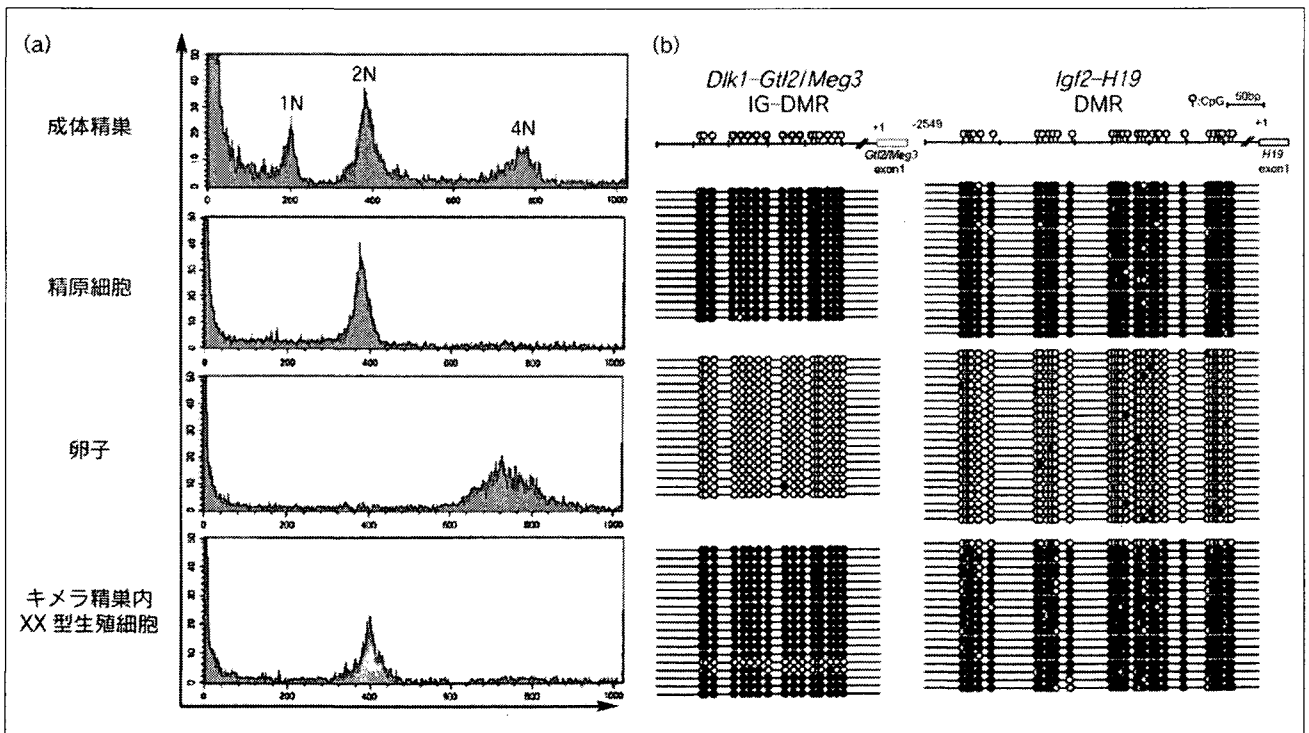


図2 新生仔雌雄キメラマウスの精巢内XX生殖細胞の性分化²¹⁾

(a) フローサイトメーターによる細胞周期の解析。(1N: 1倍体の精子や精子細胞, 2N: 2倍体のG1/G0期の精原細胞, 4N: 4倍体のM期やG2期の卵子または精母細胞)。(b) 新生仔生殖細胞のゲノムインプリンティングの解析(●: メチル化シトシン, ○: 非メチル化シトシン)。

ら回収した雌由来(XX型)の生殖細胞は核型が雌であるにもかかわらず、父性メチル化遺伝子である *Dlk1-Gtl2/Meg3* や *Igf2-H19* の DMR(differential methylated region)は高度にメチル化されており、野生型の雄の生殖細胞(精原細胞)と同じパターンを示すことがわかった。すなわち、Y染色体を全くもたない生殖細胞であっても、精巣内におかれると父型のインプリントを獲得する。言い換えると、雌由来の生殖細胞であっても、精巣内に置かれた場合は雄性化し、精原細胞として分化していることが示唆された(図2b)。しかし、XX型の生殖細胞が誕生後間もなく精巣内から消えてしまう原因についてはわかっておらず、クラインフェルター症候群(XXY型男性)などとの関連ともあわせ、現在検討を進めているところである。

3. “精巣卵”の発生と分化

精巣内の雌由来(XX型)生殖細胞は精原細胞として分化するものの、誕生後間もなく消滅してしまった。ところが、XX型の精原細胞がなくなってしまったあとの、1週齢以降の雌雄キメラマウスの精巣のなかに、25%くらいの頻度で緑色の蛍光をもつ巨大な細胞(すなわちXX型である雌胚由来の細胞)が見いだされた(図3a)。その大きさから見て、卵子が成熟しているようであった。このような大型の細胞は誕生直後には全く観察されないの、これは生後、精細管の中で大きく育ってきたものであることに間違いはない。精細管内で卵子が成熟するのは大発見であると非常に興奮したのだが、実は筆者らの不勉強で、30年くらい前に、XX型性転換マウス(*Sxr^a*マウス)の精巣内に巨大な細胞が存在するという報告がなされていた¹⁷⁾。しかし、30年も前の報告であるのでそれらは精巣の切片を用いた形態的な観察のみで、大きさ以外にどのような特徴をもっているかは全く調べられていなかった。そこで、筆者らはGFP標識の利点を活かして巨大な細胞を生きたまま精細管内から回収し、どのような細胞であるのかを詳細に調べた。

雌雄キメラマウスの精巣より回収した巨大な細胞は、同じ精巣内にある他の体細胞やXY型の生殖細胞に比べてはるかに大きく、未成熟卵子にみられるGV(germinal vesicle: 卵核胞)様の構造がみられ、明らかに未成熟な卵子であるようにみえた。しかし、理由はわからないが、キメラ精巣内の巨大な細胞は4週齢をこえるあたりで確認できなくなった。

そこで、これら精巣から回収した巨大なXX型細胞を

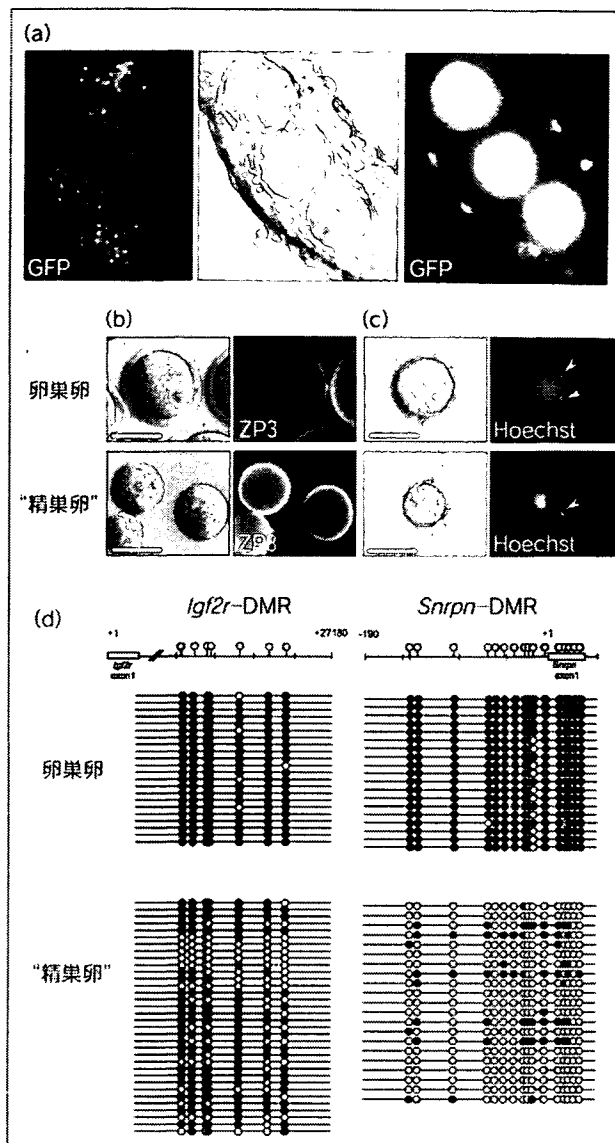


図3 雌雄キメラマウスの精巣内にみられる巨大なXX生殖細胞²¹⁾

(a) 2週齢の精細管内にみられる巨大な細胞。(b) 3週齢の“精巣卵”における透明帯とその主成分の1つであるZP3の検出。(c) 3週齢の“精巣卵”における、精子との融合の様子(矢じり: 融合した精子)。(d) 卵巣内卵子と“精巣卵”のゲノムインプリンティングの解析(●: メチル化シトシン, ○: 非メチル化シトシン)。

[口絵3(p.2019)参照]

顕微鏡で観察したところ、透明帯様のものが確かめられ、これには透明帯の主成分の1つであるZP3が含まれていることも免疫染色により明らかにした(図3b)。また、1~3週齢の雌雄キメラの精巣内の巨大細胞と卵巣から得られる卵子の大きさを比較したところ、1週齢のころには形態的には区別がつかないほどよく似ていたが、3週齢になると精巣内の巨大な細胞は卵巣内の卵子に比べ透明帯が

薄く、卵子径は小さく、生育に遅れがみられた。

もしも、この細胞が成熟した卵子であれば減数分裂の休止期に入っているはずである。回収した巨大な XX 型細胞を *in vitro* 成熟用の培地で培養したが、GV 核膜の崩壊や第 1 次極体の放出といった、減数分裂の再開を示す現象は認められなかった。しかし、成熟して第 1 次極体を放出した MII 期の状態でも卵巣内の GV 卵子は精子と融合するといわれていた^{18,19)} ので、巨大な細胞に精子と融合する能力があるかどうかを調べた。精子との融合は、生細胞の膜を透過する Hoechst33342 をあらかじめ封入した巨大細胞と精子を一緒に培養することにより行なった。巨大細胞と精子が融合を起こすと卵子の細胞質に封入された Hoechst33342 が精子の核を染色することになり、図 3c のように精子が融合している様子が観察できた。成熟した卵子のように、精子核の膨大や前核の形成は起こらなかったものの巨大細胞は卵子であることが示され、筆者らはこれを“精巣卵”とよぶことにした。

さらに、“精巣卵”のゲノムインプリンティングについて調べるために、3 週齢の雌雄キメラマウスから GFP 蛍光を指標に 1,000 個以上のサンプルを回収した。すべての雌雄キメラマウスに“精巣卵”が存在するわけではないので、約 80 匹の雌雄キメラマウスを 3 週齢まで飼育し、そのうち 16 匹の精巣を実体顕微鏡下でほぐして、ピペットで 1 個ずつ吸い取り集める必要があった。この解析も失敗しては労力が水の泡になるので、再度、石野らにお願いした。その結果、父性メチル化遺伝子については卵巣内の卵子と同様に“精巣卵”も低メチル化状態を示した。一方、母性メチル化遺伝子の *Snrpn* と *Igf2r* の DMR は卵巣内の卵子では高度にメチル化されていたが、“精巣卵”では *Snrpn* の DMR がほとんどメチル化されていなかった。しかし、*Igf2r* の DMR は比較的高度なメチル化状態であることがわかった (図 3d)。この結果は、日浦らが報告している 15 日齢の卵巣内の卵子のメチル化パターン¹⁶⁾ とよく似ていた。精巣内における卵子の成熟は卵巣内のものよりも遅くなるようなので、15 日齢ころの卵巣内の卵子をコントロールにするほうがよかったのかもしれない。しかし、精巣という環境の中でも“精巣卵”は不完全ではあるが、母型のインプリントを獲得しており、生殖細胞のインプリンティングは環境からの刺激により形成されるのではなく、生殖細胞の性が決定されればその決定どおりに進行することが示唆された。

■ おわりに ■

X-linked GFP マウスを用いることで、雌雄キメラマウスの作製法が簡便化されただけでなく、精巣から雌由来 (XX 型) の生殖細胞だけを回収するという初の試みが可能になった。このことによって、生殖細胞の性分化に関する分子生物学的な解析が可能になった。これまでに、ゲノムインプリンティングの獲得は性転換マウスの始原生殖細胞を用いた研究により、性染色体の組合せに関係すると報告されていた²⁰⁾ が、筆者らは誕生後の生殖細胞を解析することによって、性染色体の組合せに関係なく起こることを示した²¹⁾。のちに、始原生殖細胞で研究していた Durcova-Hills らのグループも、誕生後の生殖細胞を解析することで筆者らの結果を再現し²²⁾、ゲノムインプリンティングの獲得は性染色体の組合せに関係なく起こることについて決着をつけた。また、今回は誌面の都合上、割愛したが、“精巣卵”の分布には偏りがみられ、その発

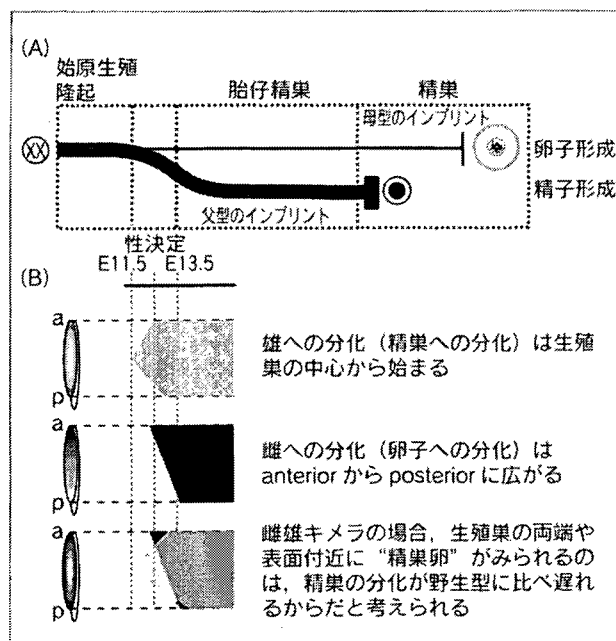


図 4 生殖細胞の性分化の概念図

(A) 雌雄キメラマウスの解析によりわかった XX 型生殖細胞の性分化の概念図。(B) 雄の生殖巣の分化は中心から始まり、anterior (a)、posterior (p) の順に広がるといわれており^{25,26)}、また生殖細胞の性決定は雄の環境が強く影響することも報告されている^{9,10)} ので、生殖巣の雄への分化と生殖細胞の雄への分化は運動していると思われる。一方、雌への分化は卵子への分化が a から p にかけて、波打つように広がることが知られている^{27,28)}。雌雄キメラマウスではすべての細胞が XY 型ではなく、とくに“精巣卵”がみられるような精巣へ分化するときは、“精巣卵”の分布が a, p 付近に多いという結果から、中心から広がる雄への分化が全体に広まる前に、卵子への分化が始まったのだらうと考えている。

生と分布は生殖巣や生殖細胞の性決定メカニズムを探る手がかりになるかもしれない(図4)。

最近、生殖細胞の性決定に関して、卵子への分化誘導にはレチノイン酸が関与しているということが示され²³⁾、精原細胞への分化に関係する因子として、レチノイン酸を分解するCyp26b1が報告された²⁴⁾。しかし、Adamsらの行なった始原生殖細胞と生殖巣の再構成の実験結果¹⁰⁾は、卵子への誘導因子よりも、精原細胞への誘導因子の存在を示唆するもので、最新の報告とは矛盾する部分もある。生殖細胞の性分化研究はまだ始まったばかりで、さらに新しい因子が見つかり、これからますます発展することと思われる。

文 献

- 1) Erickson, R. P. : *Nat. New Biol.*, 243, 210-212(1973)
- 2) Wang, S., Hazelrigg, T. : *Nature*, 369, 400-403(1994)
- 3) Okabe, M. *et al.* : *FEBS Lett.*, 407, 313-319(1997)
- 4) Niwa, H., Yamamura, K., Miyazaki, J. : *Gene*, 108, 193-199(1991)
- 5) Nakanishi, T. *et al.* : *Genomics*, 80, 564-574(2002)
- 6) Hadjantonakis, A. K. *et al.* : *Nat. Genet.*, 19, 220-222(1998)
- 7) Lovell-Badge, R., Robertson, E. : *Development*, 109, 635-646(1990)
- 8) Parma, P. *et al.* : *Nat. Genet.*, 38, 1304-1309(2006)
- 9) McLaren, A. : *Dev. Biol.*, 262, 1-15(2003)
- 10) Adams, I. R., McLaren, A. : *Development*, 129, 1155-1164(2002)
- 11) Tam, P. P., Zhou, S. X., Tan, S. S. : *Development*, 120, 2925-2932(1994)
- 12) Jamieson, R. V. *et al.* : *Dev. Biol.*, 199, 235-244(1998)
- 13) Tanaka, H. *et al.* : *Int. J. Androl.*, 20, 361-366(1997)
- 14) Surani, M. A. : *Nature*, 414, 122-128(2001)
- 15) Ueda, T. *et al.* : *Genes Cells*, 5, 649-659(2000)
- 16) Hiura, H. *et al.* : *Genes Cells*, 11, 353-361(2000)
- 17) McLaren, A. : *Nature*, 283, 688-689(1980)
- 18) Usui, N., Yanagimachi, R. : *J. Ultrastruct. Res.*, 57, 276-288(1976)
- 19) Ducibella, T., Duffy, P., Reindollar, R., Su, B. : *Biol. Reprod.*, 43, 870-876(1990)
- 20) Durcova-Hills, G., Burgoyne, P., McLaren, A. : *Dev. Biol.*, 268, 105-110(2004)
- 21) Isotani, A. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 4039-4044(2005)
- 22) Durcova-Hills, G. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 11184-11188(2006)
- 23) Koubova, J. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 2474-2479(2006)
- 24) Bowles, J. *et al.* : *Science*, 312, 596-600(2006)
- 25) Albrecht, K. H., Eicher, E. M. : *Dev. Biol.*, 240, 92-107(2001)
- 26) Hiramatsu, R. *et al.* : *Dev. Dyn.*, 228, 247-253(2003)
- 27) Menke, D. B., Koubova, J., Page, D. C. : *Dev. Biol.*, 262, 303-312(2003)
- 28) Yao, H. H., DiNapoli, L., Capel, B. : *Development*, 130, 5895-5902(2003)