

Studies on developmental dynamics and causing factors of testicular oocyte in MRL/MpJ mice

(MRL/MpJ マウスにおける精巣内卵細胞の
発生動態と責任因子に関する解析)

学位論文内容の要旨

多細胞生物を構成する細胞系列は、大きく体細胞系列と生殖細胞系列とに分けられる。体細胞系列は、個体の発生と共に様々な組織に分化し、その死と共に役割を終える。一方、生殖細胞系列は雌雄に分かれ、有性生殖を行うことで、種の存続と遺伝的多様性を生み出し、生命の連続性を担う。

哺乳類の個体の性は、常に X 染色体をもつ卵細胞と X あるいは Y 染色体をもつ精子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両性性を有する。生殖腺の性分化には Y 染色体上の *Sry* (Sex determining region on Y) が重要な役割を有しており、雄では個体発生初期に *Sry* が発現することによって精巣が形成される。一方、始原生殖細胞はそれ自身の性染色体組成ではなく、周囲の体細胞の性によって決まる。すなわち、始原生殖細胞はその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、雄では生殖腺内の体細胞が Y 染色体上の *Sry* を発現し、始原生殖細胞の減数分裂移行を阻害、精子形成細胞へと分化させる。いずれにしても、いったん雄として生まれた個体が卵細胞を有することは、人為的操作を行わない限り決してあり得ない。

しかし、生後間もない MRL/MpJ マウス精巣について詳細な解析を行った結果、精細管内に卵細胞が発見された。本マウスの精巣内卵細胞を解析することによって、卵細胞分化の新たなモデルを提供することが出来る。本研究の目的は、MRL マウスに出現する精巣内卵細胞の発生動態を形態学的に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することである。

まず、MRL マウスにおける精巣内卵細胞を経時的に検出し、その形態的特徴を観察した。その結果、精巣内卵細胞は精巣網付近の精細管内に存在し、透明帯や卵胞上皮細胞を有する直径約 50 μ m の細胞として観察された。卵胞上皮の軽度重層化(初期二次卵胞)まで成長しているものが観察されたが、卵胞腔を有

するものは観察されなかった。電子顕微鏡下では、卵細胞は多数の微絨毛と皮質顆粒を有し、卵胞上皮細胞から透明帯を貫通して卵細胞に連絡する細胞質突起が観察された。また、精巣内卵細胞は生後 0 から 30 日の間に出現し、1 精巣あたり約 1.2 個が観察された生後 14 日を中心に出現頻度のピークが見られ、その後徐々に減少した。さらに、MRL マウス精巣では *Zp* や *Omt2a* などの卵細胞特異的遺伝子の発現が認められた。これらのことから、出生直後の MRL マウス精巣内には卵細胞が出現することが証明された。

次に、精巣内卵細胞の発生動態、およびその機能について、卵巣内卵細胞のものと比較検証した。MRL マウスの胎子精巣では減数分裂特異的マーカーである *DMC1*、および卵細胞形成マーカーである *NOBOX* の双方に陽性反応を示す細胞が認められ、これらの細胞は精巣の辺縁あるいは、中腎との結合部に集合していた。このことから、精巣内卵細胞は胎子期に始原生殖細胞から派生することが示唆された。また、精巣内卵細胞は透明帯に透明帯タンパクである *ZP3* を含んでいた。しかしながら、精巣内卵細胞の卵胞上皮細胞は、その機能に重要である *FOXL2* を欠いていた。さらに *Sperm-egg fusion assay* により、精巣内卵細胞への精子の侵入が観察され、精巣内卵細胞が精子受容能力を有することが明らかになった。

最後に、精巣内卵細胞出現の要因を明らかにするため、MRL/MpJ-+/+、MRL/MpJ-*lpr/lpr*、C57BL/6、BALB/c、C3H/He、DBA/2、A/J、AKR/N の近交系マウスと、MRL マウスと C57BL/6 の間の F1 である B6MRLF1 と MRLB6F1 の精巣を検索した。その結果、精巣内卵細胞は 2 系統の MRL マウスに加えて AKR/N と B6MRLF1 にも検出された。F1 での解析から、精巣内卵細胞出現の責任遺伝子の 1 つが Y 染色体上にあることが明らかになった。Y 染色体上の性決定因子である *Sry* に注目し、近交系マウス間でその遺伝子配列を比較した結果、MRL マウスと AKR/N に共通して *Sry* の CAG リピートの一部欠失が見られた。また、F1 及び AKR における精巣内卵細胞の出現頻度は MRL のものに比べると低く、常染色体上にも責任遺伝子の存在が示唆された。

上述の結果は、精巣内卵細胞が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することを示す。また、精巣内卵細胞出現の責任因子の一つとして *Sry* と強い関連性を有することが示唆された。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。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 昆 泰 寛
副 査 教 授 高 橋 芳 幸
副 査 教 授 橋 本 善 春
副 査 准教授 佐々木 宣 哉

学 位 論 文 題 名

Studies on developmental dynamics and causing factors of testicular oocyte in MRL/MpJ mice

(MRL/MpJ マウスにおける精巣内卵細胞の
発生動態と責任因子に関する解析)

哺乳類において、いったん雄として生まれた個体が卵細胞を有することは、人為的操作を行わない限りあり得ない。しかし、生後間もない MRL/MpJ (MRL) マウス精巣精細管内に卵細胞が発見された。その解析をすることによって、卵細胞分化の新たなモデルを提供することができる。本研究の目的は、精巣内卵細胞の発生動態を形態学的に解析するとともに、その責任因子の一つを分子生物学的に明らかにすることである。

MRL マウスの精巣内卵細胞は精巣網付近の精細管内に存在し、透明帯や卵胞上皮を有する直径約 50 μ m の細胞として観察された。電子顕微鏡下では、卵細胞は多数の微絨毛と皮質顆粒を有し、卵胞上皮細胞から透明帯を貫通して卵細胞に連絡する細胞質突起が観察された。また、精巣内卵細胞は生後 0 から 30 日の間に出現し、1 精巣あたり約 1.2 個が観察された生後 14 日を中心に出現頻度のピークが見られ、その後徐々に減少した。さらに、MRL マウス精巣では *Zona pellucida glycoprotein (Zp)* や *Oocyte maturation, alpha (Omt2a)* などの卵細胞特異的遺伝子の発現が認められた。

MRL マウスの胎子精巣では減数分裂特異的のマーカである *Disrupted meiotic cDNA1 homolog (DMC1)*、及び卵細胞形成マーカである *Nobox oogenesis homeobox (NOBOX)* の双方に陽性反応を示す細胞が認められた。さらに、*Sperm-egg fusion assay* により、精巣内卵細胞への精子の侵入が観察され、精巣内卵細胞が精子受容能力を有することが明らかになった。

精巣内卵細胞出現の要因を明らかにするため、各種近交系マウスと、MRL と C57BL/6J の F1 マウスを解析した結果、精巣内卵細胞は AKR/N と B6MRLF1 で検出された。F1 での解析から、精巣内卵細胞出現の責任遺伝子の 1 つが Y 染色体上にあることが明らかになった。Y 染色体上の性決定因子である *Sex determining region on Y (Sry)* に注目し、近交系マウス間でその遺伝子配列を比較した結果、MRL マウスと AKR/N に共通して *Sry* の CAG リピートの一部欠失が見られた。

上述の結果から、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することが明らかになった。また、精巣内卵細胞出現の要因は *Sry* と強い関連性を有することが示唆された。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。

よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者 大塚 沙織 氏 の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規程による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。