

生殖細胞の新たな機能

自然科学研究機構基礎生物学研究所生殖遺伝学研究室
田中 実

はじめに

生殖細胞は将来の卵や精子になる生殖において重要な細胞である。この生殖細胞は発生初期に体内を移動し、生殖腺が形成されるタイミングで生殖腺へと入り込む。その後、卵になるか精子になるかの決定や配偶子形成は、生殖腺を構成する体細胞に依存していると考えられてきた。すなわち、生殖過程の制御は生殖細胞非自律的に制御され、体細胞や内分泌環境に依存しているとされてきた。そしてこの制御の主要な部分は哺乳類から魚類までのすべての脊椎動物で保存されていると予想されている。

哺乳類の場合、体細胞側で決まる性によって生殖細胞の運命も異なることが解析されてきた。生殖腺で精巣決定遺伝子 (*Sry*) が発現して精巣形成が始まると、生殖細胞は精子を作り続けることのできる生殖幹細胞へ分化し、体細胞側はその生殖幹細胞のためのニッチ領域形成をする。一方の雌で卵巣形成が始まると、すべての生殖細胞は卵形成過程へと進行し、その後の生殖期間に必要な数の卵母細胞のプールを出生時まで蓄える。したがって、哺乳類の卵巣には卵を作り続ける生殖幹細胞は存在しないのではないかと一般には考えられている。

生殖細胞と生殖腺性分化

生殖細胞の生殖過程への関与を考えたとき、生殖細胞が性決定分化過程にどの程度貢献しているのかを知ることが重要といえよう。実際この問題は30年も前から生殖細胞が減少もしくは欠如するげっ歯類を用いて詳しく調べられてきた [1, 2]。その結果、生殖細胞はやはり受動的な存在であり、生殖腺の性には積極的に関与しないというコンセンサスが得られてきた。その一方で、2つのエストロゲン受容体遺伝子の同時破壊マウスの例 [3, 4] など、卵巣で卵母細胞が失われるとほぼ同時に精巣様構造が出現する例がその後の研究で報告されていた。そこでわれわれはモデル脊椎動物の1つであるメダカを用い、生殖細胞が生殖腺へ入り込むことを阻害することによって、生殖細胞のまったくない生殖腺をもったメダカを作製して解析を行った。メダカは哺乳類と同

様XY型の性決定を行う。驚くべきことに生殖細胞のないすべての個体は遺伝的な性に関係なく雄の第2次性徴を示した。遺伝的雌 (XX) でも生殖細胞がないと estradiol-17 β はほとんど検出されず、メダカアンドロゲンである11keto-testosterone が検出されたのである [5]。性分化時に estradiol-17 β を産生する雌特異的なステロイド産生である莢膜細胞は (図1)、生殖腺内でひとたびは分化するものの維持されず、雄型に転換してしまうことが明らかとなった [6]。このことは、生殖細胞が適切な卵巣分化には必須であることを示しているのみならず、生殖細胞のない生殖腺と身体全体は、内分泌学的にも遺伝子発現のレベルからも雄化してしまうことを示している。

この生殖細胞の重要性はメダカ突然変異体 (*hotei*) の解析からも支持される。この変異体はミューラー管阻害因子 (AMH/MIS) 受容体に変異があり、生殖細胞が過剰に増える。しかも先の生殖細胞のない個体とは反対の表現型、すなわち雌へと性転換する個体がこの変異体から出現してくる [7, 13]。このシグナル系は体細胞で働き生殖細胞には直接働かない。また生殖細胞をなくすと性転

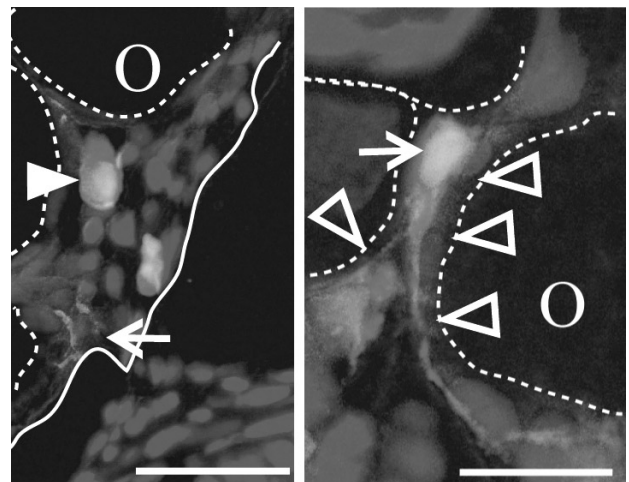


図1 メダカ生殖腺に存在する2種類のステロイド産生莢膜細胞
矢印: *aromatase* 発現雌特異的の莢膜細胞, 白矢頭: *P450c17* 発現莢膜細胞, 黒矢頭: *foxl2* 発現顆粒膜細胞, O: 卵母細胞. *aromatase* 発現細胞と *P450c17* 発現細胞は明らかに異なる (左図). *aromatase* 発現細胞は卵母細胞に対して *foxl2* 発現顆粒膜細胞の層の外側に存在する (右図). *aromatase* 発現雌特異的の莢膜細胞の維持には生殖細胞の存在が必須である. 文献 [6] より改変.

換しないことからこの変異体での雌への性転換は、結果的に増えた生殖細胞を介していると結論され、前段に記した生殖細胞の性分化における重要性を支持している。遺伝的に性が決まっても性の適切な発現のためには、生殖細胞と体細胞との間の協調が正しく働くことが必須であり、AMH系はこの協調を制御していると理解される(図2) [8, 9, 13].

卵巣生殖幹細胞とニッチ構造

一方でわれわれは、哺乳類 *Sry* の直接の制御下にあり、雄決定に必須の *Sox9* 遺伝子のメダカオソログ *sox9b* が雌卵巣でも発現することを見出した。そしてこの遺伝子を発現している細胞が、生殖上皮 (germinal or surface epithelium) と呼ばれる卵巣外層でコード様のネットワーク (ovarian cord) を形成していること、そして卵形成の初期の生殖細胞がすべてこの ovarian cord 内にコロニーを形成していることを見出した (図3)。

哺乳類の精巣では *sox9* 遺伝子を発現するセルトリ細胞 (Sertoli cell) がコード様の精細管を形成し、そこには精子を作り続ける生殖幹細胞が存在している。われわれは、精巣とよく似た ovarian cord 内に卵の生殖幹細胞とそのニッチ構造が存在しているのではないかと予測し、クローン解析を行った。その結果、ある群の生殖細胞

(*nos2* 発現細胞) からすべての発達段階の卵細胞が生み出されることが判明し、しかもメダカの生殖期間約3ヵ月にわたってこの生殖細胞由来の次世代が得られることが明らかとなった。これは *nos2* 発現細胞に生殖幹細胞が存在することを示しており、われわれは ovarian cord 内のニッチ領域を「Germinal Cradle (生殖細胞のゆりかご)」と名付けた [10].

生殖と性を制御する「生殖細胞のゆりかご」

それではこのニッチ領域でどのようなシグナルが働いて生殖を制御しているのだろうか？ 1つ不思議なのは *sox9b* の発現である。哺乳類 *Sox9* は雄化に必要十分な因子で精巣にしか発現しない。しかしメダカ *sox9b* はゆりかご領域を含む卵巣の ovarian cord でも発現している。この *sox9b* 機能を欠失したメダカ変異体を調べてみると、生殖腺はほぼ正常に形成され、支持細胞 (ovarian cord や Sertoli 細胞) は生殖細胞を取り囲む。ところが、支持細胞の細胞外基質の発現や分布に障害があり、ほぼ正常に見える生殖腺の中で生殖細胞が徐々に失われることが明らかとなった。変異体細胞と正常細胞との間で生体内キメラを作製してみると変異体由来の支持細胞が生殖腺から除外されてしまうことから、支持細胞としての identity は保たれているが細胞相互作用が著しく減

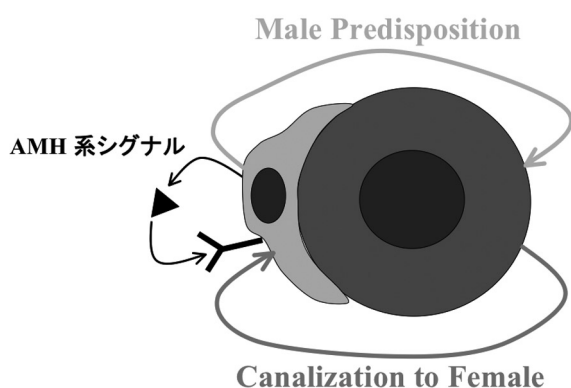


図2 生殖細胞は適切な性分化に必須。体細胞は、精巣決定遺伝子存在下では生殖細胞を雄化するだけでなく、生殖細胞がなくとも自律的に雄化する (male predisposition)。一方、生殖細胞は体細胞を雌化し、卵巣形成に必須である (canalization to female)。生殖細胞の多少はこの細胞間の関係に影響し性転換を引き起こすと判明した。AMH系は支持細胞でこの関係を制御していると理解される [7, 8, 13].

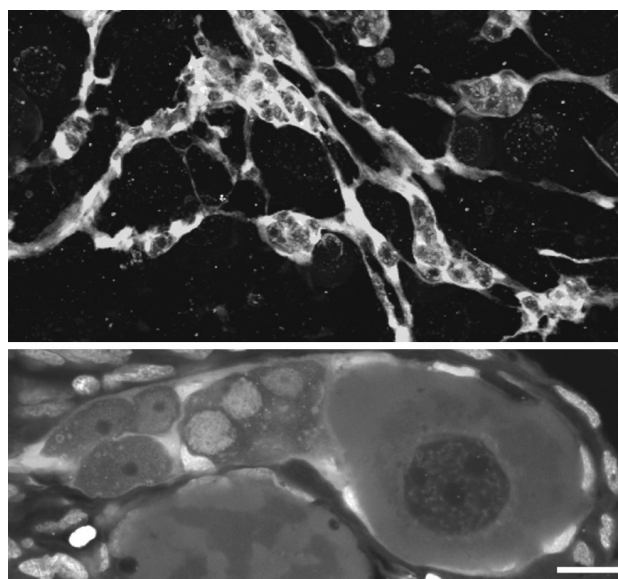


図3 卵巣表層に存在する *sox9b* 発現細胞のネットワーク (ovarian cord) 生殖細胞が集合して膨らんでいる箇所が germinal cradle 「生殖細胞のゆりかご」と呼ばれる生殖幹細胞のニッチ構造。下段は germinal cradle の拡大像 [10].

弱していると結論された [11]. すなわち *sox9b* は支持細胞の細胞外基質を適切に制御しつつ, 生殖細胞の維持に関わっていることになる. 哺乳類でも *sox8* との協調によるこの生殖細胞維持機能が報告されており [12], この *Sox9* の機能は進化的に保存されていると予想される.

一方, 機能的 *sox9b* 遺伝子数を変化させても雄化には全く影響を示さなかったことから *sox9b* は雄化には関与しないと結論された. むしろ *sox9b* 変異体では哺乳類とは逆の雄への性転換が認められる. 前述の生殖細胞が増加する *hotei* 変異体と *sox9b* 変異体とを交配して hetero 複合変異体を作製すると, 生殖細胞数が回復して性転換がみられなかったことから, *sox9b* 変異体の雄への性転換は, 前段に示したような生殖細胞が少なくなることによる 2 次的影響であると結論された [11].

sox9b 変異体の解析は, ゆりかご領域での制御がおかしくなると, 生殖と性の両方に影響がでる典型的な例を示したといえよう. 生殖細胞は配偶子になるだけの受動的細胞ではない. ゆりかご領域で生殖細胞は, 性の制御と一体となって内分泌を含めた生殖のさまざまな局面を制御している. 哺乳類では表れてこない生殖細胞の機能や性の制御がメダカの解析を通じて明らかになりつつある.

謝辞

この研究は主として森永千佳子, 黒川紘美, 中村修平, 小林佳代, 斉藤大助, 西村俊也, 木下千恵, 渡我部育子, 米満雅子の諸氏の貢献によるものです. また大阪大学 近藤寿人, 慶応大学 谷口善仁, 国立遺伝研究所 豊田 敦の諸先生には変異体単離でお世話になりました. ここに改めて感謝の意を記します.

引用文献

1. Merchant H (1975) Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev Biol* 44, 1-21.
2. Merchant-Larios H, Centeno B (1981) Morphogenesis of the ovary from the sterile W/W^r mouse. In: *Advances in the morphology of cells and tissues*. Alan R. Liss Inc. New York, pp. 383-392.
3. Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, Korach KS. (1999) Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science* 286, 2328-2331.
4. Dierich A, Chambon P, Mark M (2000) Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127, 4277-4291.
5. Kurokawa H, Saito D, Nakamura S, Katoh-Fukui Y, Ohta K, Aoki Y, Baba T, Morohashi K, Tanaka M (2007) Germ cells are essential for sexual dimorphism in the medaka gonad. *Proc Acad Natl Sci USA* 104, 16958-16963.
6. Nakamura S, Kurokawa H, Asakawa S, Shimizu N, Tanaka M (2009) Two distinct types of theca cells in the medaka gonad: Germ cell-dependent maintenance of *cyp19a1*-expressing cells. *Dev Dyn* 238, 2652-2657.
7. Morinaga C, Saito D, Nakamura S, Sasaki T, Asakawa S, Shimizu N, Mitani H, Furutani-Seiki M, Tanaka M (Corresponding Author), Kondoh H (2007) The *hotei* mutation of medaka in the anti-Mullerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. *Proc Acad Natl Sci USA* 104, 9691-9696.
8. Saito D, Tanaka M (2009) Comparative aspects of gonadal differentiation in medaka: a conserved role of developing oocytes in sexual canalization. *Sex Dev* 3, 99-107.
9. Tanaka M, Saito D, Morinaga C, Kurokawa H (2008) Cross talk between germ cells and gonadal somatic cells is critical for sex differentiation of the gonads in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Dev Growth Differ* 50, 273-278.
10. Nakamura S, Kobayashi K, Nishimura T, Higashijima S, Tanaka M (2010) Identification of germline stem cells in the ovary of teleost medaka. *Science* 328, 1561-1563.
11. Nakamura S, Watanabe I, Nishimura T, Toyoda A, Taniguchi Y, Tanaka M (2012) Analysis of medaka *sox9* orthologue reveals a conserved role in germ cell maintenance. *PLoS ONE* 7, e29982.
12. Barrionuevo F, Georg I, Scherthan H, Lecureuil C, Guilou F, Wegner M, Scherer G (2009) Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of *Sox9* but fails in the combined absence of *Sox9* and *Sox8*. *Dev Biol* 327, 301-312.
13. Nakamura S, Watanabe I, Nishimura T, Picard J-Y, Toyoda A, Taniguchi Y, di Clemente N, Tanaka M (2012) Hyperproliferation of mitotically active germ cells due to defective anti-Müllerian hormone signaling mediates sex reversal in medaka. *Development* 139, 2283-2287.