

# MAMLD1：胎生期精巣におけるステロイドホルモン産生の新規調節因子

宮戸 真美<sup>1)</sup>，宮戸 健二<sup>2)</sup>，緒方 勤<sup>1,3)</sup>，深見 真紀<sup>1)</sup>

- 1) 国立研究開発法人国立成育医療研究センター分子内分泌研究部  
2) 国立研究開発法人国立成育医療研究センター生殖・細胞医療研究部  
3) 浜松医科大学小児科

## はじめに

*MAMLD1* (Masterminded-like domain containing 1) は、男性性分化疾患 (46,XY disorders of sex development: DSD)，特に尿道下裂の責任遺伝子である [1]。 *MAMLD1* 遺伝子異常の尿道下裂は、胎生期精巣でのテストステロン産生量の減少により引き起こされる [1, 2]。本稿では、 *Mamld1* 遺伝子欠損マウスの解析から明らかになった胎生期精巣でのテストステロン産生における *MAMLD1* の機能について概説する。

## ヒト *MAMLD1* 遺伝子とマウス *Mamld1* 遺伝子

ヒト X 染色体から単離された *MAMLD1* は、46,XY DSD の責任遺伝子である [1]。現在までに、尿道下裂患者において、 *MAMLD1* 遺伝子のナンセンス変異、ミスセンス変異やスプライス変異など複数の機能喪失変異が同定されている [1, 3-5]。マウス相同遺伝子 *Mamld1* は、ヒト *MAMLD1* 遺伝子と同様に X 染色体上に存在する。

これまでに、次のことが明らかになっている。第 1 に、ヒト *MAMLD1* およびマウス *Mamld1* 翻訳領域の上流には、ステロイドホルモン産生に関わる遺伝子群の発現を調節する NR5A1 の結合配列が存在し、NR5A1 タンパク質はこの配列に結合してレポーター遺伝子の転写を活性化する [6]。第 2 に、胎生期のマウス精巣において、 *Mamld1* はライディッヒ細胞とセルトリ細胞に強く発現しており、NR5A1 タンパク質と共発現している [1]。第 3 に、マウスライディッヒ腫瘍細胞 (MLTC1) を用いた *Mamld1* 遺伝子の発現抑制により、ステロイドホ

ルモン産生酵素 *Cyp17a1* 遺伝子の発現量は低下し [7]、テストステロンを含むステロイド代謝産物の産生量は減少する [6, 7]。これらのことから、 *MAMLD1* は NR5A1 の調節下において、ステロイドホルモン産生酵素である *CYP17A1/Cyp17a1* 遺伝子の発現調節を介してテストステロン産生に関与し、 *MAMLD1* 変異はテストステロン産生障害に起因する 46,XY DSD を引き起こすと推測されている。

しかし、 *MAMLD1* 変異が尿道下裂を招く機序は不明であり、 *MAMLD1* の生体内における機能は分かっていない。そこで、胎生期精巣のテストステロン産生における *MAMLD1* の機能を明らかにするために、胎生期の野生型マウス精巣における *Mamld1* 遺伝子の発現解析と、 *Mamld1* 遺伝子欠損マウスを用いた分子学的解析および表現型解析を行った [8]。

## 胎生期の野生型マウス精巣における *Mamld1* 遺伝子の発現

*Mamld1* 遺伝子は胎生中期から胎生後期のマウス精巣で発現しており、その発現量は経時的に増加していた (図 1)。胎生期のマウス精巣において、テストステロン産生は胎生 13.5 日に開始され、その産生量は胎生 14.5 日以降増加することが知られている [9]。したがって、

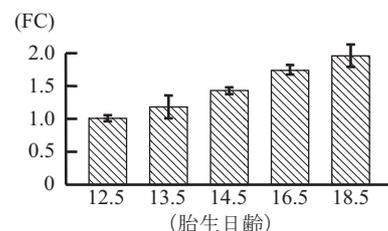


図 1 胎生期の野生型マウス精巣における *Mamld1* 遺伝子発現  
*Mamld1* 遺伝子の発現量は、胎生中期から経時的に増加した。胎生 12.5 日を 1.0 とした相対発現量を示す。FC: Fold Change.

連絡先：宮戸真美，国立研究開発法人国立成育医療研究センター分子内分泌研究部  
〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1  
TEL：03-5494-7025  
FAX：03-5494-7026  
E-mail：miyado-m@ncchd.go.jp

表1 産仔数と産仔の遺伝子型

Female +/- (n=46) x Male +/Y (n=9)				
Female +/+ 85 (25.0%)	Female +/- 84 (24.7%)	Female -/- n/o	Male +/Y 85 (25.0%)	Male -/Y 86 (25.3%)
Female +/- (n=49) x Male -/Y (n=14)				
Female +/+ n/o	Female +/- 82 (23.0%)	Female -/- 94 (26.4%)	Male +/Y 96 (27.0%)	Male -/Y 84 (23.6%)
Female +/+ (n=12) x Male +/Y (n=6)				
Female +/+ 39 (40.2%)	Female +/- n/o	Female -/- n/o	Male +/Y 58 (59.8%)	Male -/Y n/o
Female +/+ (n=24) x Male -/Y (n=5)				
Female +/+ n/o	Female +/- 106 (54.4%)	Female -/- n/o	Male +/Y 89 (45.6%)	Male -/Y n/o

*Mamld 1* 遺伝子の欠損マウスはメンデルの法則に従って生まれた。

n/o: 得られない。

*Mamld 1* 遺伝子の発現量の増加は、胎生期のマウス精巣において報告されているテストステロン産生量の増加と一致している。また、*Mamld 1* 遺伝子は外生殖器原基では発現が認められないこと、胎生期のマウス精巣ではテストステロン産生に関与する細胞（セルトリとライディッヒ細胞）で発現していること、さらに *MAMLD 1* 遺伝子はヒト胎児精巣で発現していることが明らかになっている [1, 4]。これまでの結果から、*MAMLD 1* は胎生期の精巣においてテストステロン産生に関与していることが強く示唆される。

### *Mamld 1* 遺伝子欠損マウスの作製

生体内における *MAMLD 1* の機能を明らかにするために、*Mamld 1* の翻訳開始点を含むエキソン 3 の領域をネオマイシン耐性遺伝子で置き換え、*Mamld 1* 遺伝子欠損マウスの作製を試みた。得られたマウスの精巣では *Mamld 1* 遺伝子の転写産物および *MAMLD 1* タンパク質が検出されず、目的の *Mamld 1* 遺伝子欠損マウスが作製された [8]。

### *Mamld 1* 遺伝子欠損マウスの妊孕性

一般的に常染色体上にある遺伝子の欠損マウスでは、ヘテロ欠損型同士の交配により、すべての遺伝子型の仔を得ることができる。しかし、X染色体上に存在する *Mamld 1* 遺伝子の欠損マウスでは、一度の交配により、すべての遺伝子型の仔を得ることはできない。また、得られる仔の遺伝子型は、オスでは野生型 (+/Y) と通常のホモ欠損型に相当するヘミ欠損型 (-/Y) の2種類であり、メスでは常染色体上の遺伝子が欠損した場合

と同様に、野生型 (+/+), ヘテロ欠損型 (+/-), ホモ欠損型 (-/-) の3種類である。

そこで、*Mamld 1* 遺伝子の欠損マウスの交配実験を行い、得られた産仔数と産仔の遺伝子型を調べた。メス(母)がヘテロ欠損型の場合、産仔の遺伝子型の割合はそれぞれ25%前後であり、メス(母)が野生型の場合、産仔の遺伝子型の割合はそれぞれ50%前後であった(表1)。オス(父)の遺伝子型が異なっても、この割合は変化しなかった。*Mamld 1* 遺伝子の欠損マウスはメンデルの法則に従って生まれたことから、*Mamld 1* 遺伝子のヘミ欠損オスおよびヘテロ欠損メスマウスの妊孕性は、正常であることが明らかになった。

### *Mamld 1* 遺伝子欠損オスマウスの外生殖器所見

胎生期および出生当日において、*Mamld 1* 遺伝子欠損オスマウスの外生殖器の形態を調べた。*MAMLD 1* 変異陽性男性が尿道下裂を示すヒトと異なり [1, 4], 出生当日の *Mamld 1* 遺伝子欠損マウスに尿道下裂は認められなかった(図2)。また、胎生期において、*Mamld 1* 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの外生殖器は同等の形態を示した。

次に、胎生期の男性ホルモンに依存して伸長することが知られている肛門性器間距離(anogenital distance)を測定した。出生当日における *Mamld 1* 遺伝子欠損オスマウスの肛門性器間距離は、野生型マウスと比べて違いがなかった(野生型:  $1.32 \pm 0.02$  mm,  $n=10$ ; *Mamld 1* 欠損:  $1.33 \pm 0.02$  mm,  $n=10$ ) (図2)。

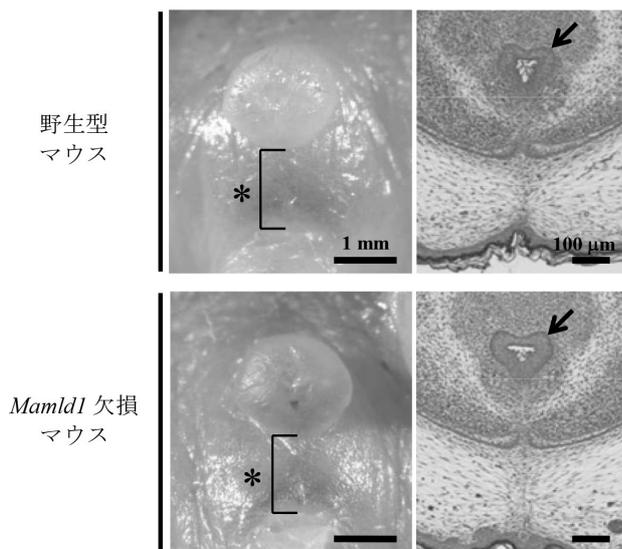


図2 出生当日の外生殖器  
*Mamld1* 遺伝子欠損マウスは尿道下裂を示さなかった。肛門性器間距離 (\*) は両群間で違いがなかった。矢印: 尿道。

### *Mamld1* 遺伝子欠損オスマウスの内生殖器所見

胎生期および出生当日において、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの精巣の形態を調べた。組織学的な解析により、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの精巣には正常な精細管が観察された (図3)。免疫組織化学による解析の結果、胎生期の *Mamld1* 遺伝子欠損マウスの精巣は、野生型マウスと比べて違いがなく、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞、生殖細胞は正常に発生・分化していることが明らかになった。また、野生型マウスと同様に、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスにおいて精巣下降が認められ、出生当日の精巣重量は両群間で違いがなかった (野生型:  $1.35 \pm 0.08$  mg,  $n=10$ ; *Mamld1* 欠損:  $1.46 \pm 0.08$  mg,  $n=10$ )。

次に、胎生18.5日の精巣を用いて、ステロイド代謝産物含有量を測定した。胎生期の *Mamld1* 遺伝子欠損マウスにおける精巣内のテストステロンとその他のステロイド代謝産物の含有量は、野生型マウスと比べてほぼ同

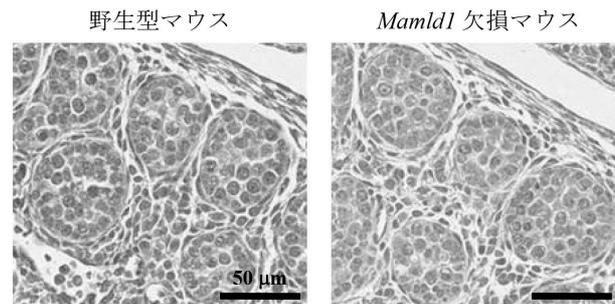


図3 胎生14.5日のマウス精巣  
 野生型マウスと同様に、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの精巣で精細管が認められた。

等の値を示した (表2)。

### 胎生期のマウス精巣における遺伝子発現

胎生期のマウス精巣を用いて遺伝子発現解析を行った結果、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの精巣において、ライディッヒ細胞特異的に発現する遺伝子 (*Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1*) の発現量が有意に低下していた (図4)。しかし、セルトリ細胞特異的に発現している *Amh*, *Sox9* 遺伝子、ライディッヒ細胞とセルトリ細胞に発現している *Nr5a1*, *Gata4* 遺伝子の発現量は、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスと野生型マウスで違いがなかった (図4)。さらに、ライディッヒ細胞と生殖細胞と管周細胞に発現している *Ar* 遺伝子、生殖細胞特異的に発現している *Ddx4* 遺伝子の発現量は両群間で違いがなかった。このことから、MAMLD1は、胎生期の精巣においてライディッヒ細胞特異的に発現する遺伝子の発現制御に関与していると推測される。

### MAMLD1変異陽性男性と *Mamld1* 遺伝子欠損オスマウスにおける表現型の相違

これまでの解析から、MAMLD1変異陽性男性は尿道下裂を示すが、*Mamld1* 遺伝子欠損オスマウスは尿道下

表2 精巣内のステロイド代謝産物含有量 (胎生18.5日,  $n=4$ )

	野生型マウス	<i>Mamld1</i> 欠損マウス
Pregnenolone (pg/two testes)	$15.4 \pm 1.4$	$17.9 \pm 4.0$
Progesterone (pg/two testes)	$15.0 \pm 1.7$	$16.5 \pm 4.6$
17-OH pregnenolone (pg/two testes)	$15.4 \pm 1.3$	$15.2 \pm 2.9$
17-OH progesterone (pg/two testes)	$13.5 \pm 2.5$	$10.4 \pm 1.7$
Androstenedione (ng/two testes)	$0.51 \pm 0.07$	$0.44 \pm 0.15$
Testosterone (ng/two testes)	$2.38 \pm 0.31$	$2.31 \pm 0.30$

値は平均±標準誤差で示す。

ステロイド代謝産物含有量は、両群間でほぼ同等であった。

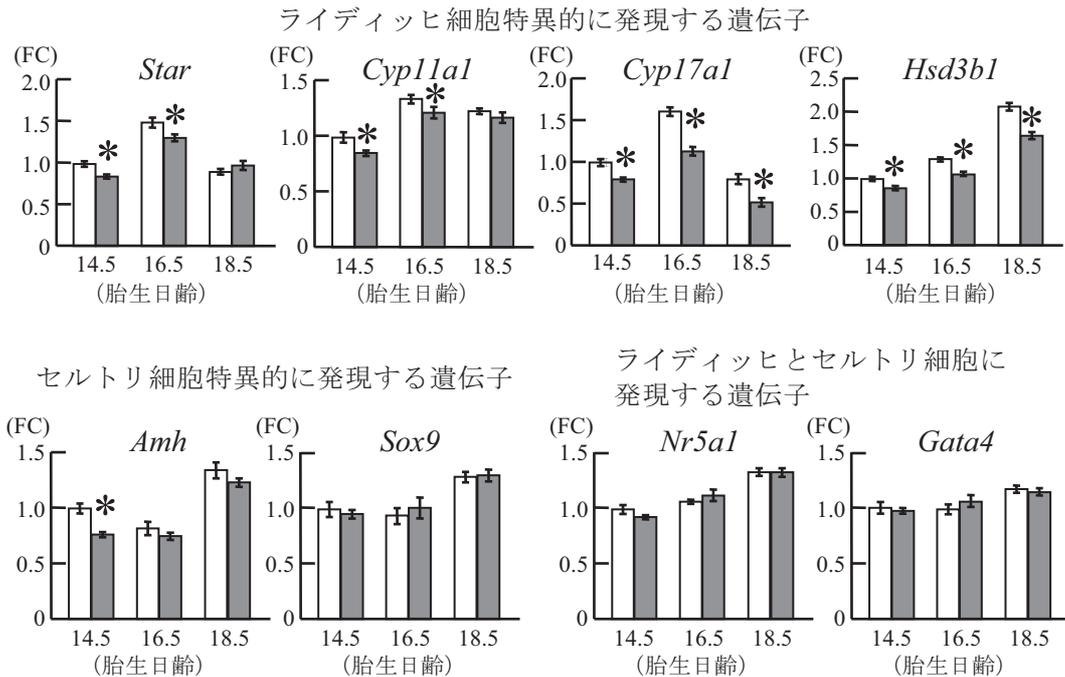


図4 胎生期のマウス精巣における遺伝子発現  
*Mamld1* 遺伝子欠損マウスにおいて、ライディッヒ細胞特異的に発現する遺伝子の発現量が有意に低下していた。胎生14.5日の野生型を1.0とした相対発現量を示す。FC: Fold Change, \*:  $p < 0.05$ 。白色棒: 野生型マウス, 灰色棒: *Mamld1* 遺伝子欠損マウス。

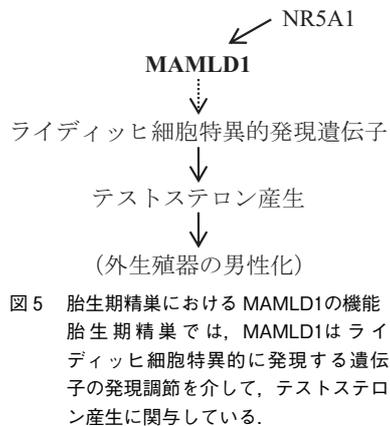


図5 胎生期精巣におけるMAMLD1の機能  
 胎生期精巣では、MAMLD1はライディッヒ細胞特異的に発現する遺伝子の発現調節を介して、テストステロン産生に関与している。

路を經由してテストステロンが産生され、マウスでは主に $\Delta 4$ 経路を經由してテストステロンが産生される。このように、ヒトとマウスでは、ステロイドホルモン産生の主要な経路が異なる。また、動物種により、酵素活性に必要なコファクターが異なることも考えられる。

以上の成績から、胎生期精巣では、MAMLD1はNR5A1の調節下において *CYP17A1/Cyp17a1* 遺伝子などのライディッヒ細胞特異的に発現する遺伝子の発現調節を介して、テストステロン産生に関与し、外生殖器の男性化に寄与している(図5)と推測される。なお、ヒトとマウスの表現型の違いは、MAMLD1には種特異的作用があることを示唆する。

### おわりに

これまでの解析から、MAMLD1の胎生期精巣における機能が明らかになった。胎生期精巣では、MAMLD1はライディッヒ細胞特異的に発現する遺伝子の発現調節を介して、テストステロン産生に関与していると推測される。今後、出生後の *Mamld1* 遺伝子欠損マウスを用いた解析により、胎生期精巣のみならず、出生後の精巣および卵巣におけるMAMLD1の機能が解明されると期待される。

裂を示さず、ヒトとマウスでは *MAMLD1/Mamld1* 遺伝子異常の表現型に違いがあることが明らかになった。この違いがみられる理由として、尿道形成期におけるヒトとマウスの違いが挙げられる [10]。ヒトの尿道形成期は妊娠初期の数週間であり、尿道形成期と精巣内テストステロン量のピークは一致することが報告されている。一方、マウスの尿道形成期は妊娠後期の数日間であり、尿道形成期と精巣内テストステロン量のピークは一致しない。このことから、ヒトとマウスでは、尿道形成期に必要なテストステロン量が異なると推測される。次に、胎生期精巣でのテストステロン産生におけるヒトとマウスの違いが挙げられる [10]。ヒトでは主に $\Delta 5$ 経

## 引用文献

1. Fukami M, Wada Y, Miyabayashi K, Nishino I, Hasegawa T, Nordenskjöld A, Camerino G, Kretz C, Buj-Bello A, Laporte J, Yamada G, Morohashi K, Ogata T (2006) CXorf6 is a causative gene for hypospadias. *Nat Genet* 38, 1369-1371.
2. Yamada G, Satoh Y, Baskin LS, Cunha GR (2003) Cellular and molecular mechanisms of development of the external genitalia. *Differentiation* 71, 445-460.
3. Kalfa N, Liu B, Klein O, Audran F, Wang MH, Mei C, Sultan C, Baskin LS (2008) Mutations of CXorf6 are associated with a range of severities of hypospadias. *Eur J Endocrinol* 159, 453-458.
4. Ogata T, Laporte J, Fukami M (2009) MAMLD1 (CXorf6) : a new gene involved in hypospadias. *Horm Res* 71, 245-252.
5. Igarashi M, Wada Y, Kojima Y, Miyado M, Nakamura M, Muroya K, Mizuno K, Hayashi Y, Nonomura K, Kohri K, Ogata T, Fukami M (2015) Novel Splice Site Mutation in MAMLD1 in a Patient with Hypospadias. *Sex Dev*, in press.
6. Fukami M, Wada Y, Okada M, Kato F, Katsumata N, Baba T, Morohashi K, Laporte J, Kitagawa M, Ogata T (2008) Mastermind-like domain-containing 1 (MAMLD1 or CXorf6) transactivates the Hes3 promoter, augments testosterone production, and contains the SF1 target sequence. *J Biol Chem* 283, 5525-5532.
7. Nakamura M, Fukami M, Sugawa F, Miyado M, Nonomura K, Ogata T (2011) *Mamld1* knockdown reduces testosterone production and *Cyp17a1* expression in mouse Leydig tumor cells. *PLoS One* 6, e19123.
8. Miyado M, Nakamura M, Miyado K, Morohashi K, Sano S, Nagata E, Fukami M, Ogata T (2012) *Mamld1* deficiency significantly reduces mRNA expression levels of multiple genes expressed in mouse fetal Leydig cells but permits normal genital and reproductive development. *Endocrinology* 153, 6033-6040.
9. O'Shaughnessy PJ, Baker P, Sohnius U, Haavisto AM, Charlton HM, Huhtaniemi I (1998) Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology* 139, 1141-1146.
10. Scott HM, Mason JI, Sharpe RM (2009) Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. *Endocr Rev* 30, 883-925.