

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 水上 拓郎

---

哺乳類の性分化は、Y 染色体上の精巣決定遺伝子 Sry から誘導される Sox9 や、M33 などの一連の遺伝子発現により制御されるが、これらは、DNA 鎖およびクロマチンの高次構造を制御していると推測されており、未分化生殖腺から精巣・卵巣への性分化過程においては、ヒストンのアセチル化や DNA メチル化などエピジェネティックレベルでの遺伝子発現調節機構が関与している可能性が強く示唆されていた。そこで、ヒストンの脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤である Trichostatin A を用い、人為的にヒストンのアセチル化パターンの変化を誘導し、生殖腺の発生過程におけるエピジェネティック制御の解析を行った。また、Dnmt の標的阻害剤である 5-azacytidine を器官培養系に用い、人為的に DNA のメチル化パターンを変化させ、その影響を調べた。

Trichostatin A を、生殖腺の器官培養系に添加した結果、0.1  $\mu$ M 添加精巣培養片では、精巣のサイズの減少が認められ、1  $\mu$ M 条件下では、部分的に精巣索形成が阻害されていた。MIS は、精巣索内のセルトリ細胞に強く認められる事からも、セルトリ細胞の分化は正常に誘導されていた。3 $\beta$ -Hsd の遺伝子発現解析から、ライディッヒ細胞の分化は正常である事が示唆された。胎生期の生殖細胞特異的マーカーである hsp86 の局在を調べると、1  $\mu$ M 添加精巣培養片において、生殖細胞数は有意に減少し、約半数の生殖細胞が精巣索外に存在していた。これらの生殖細胞の減数分裂像は認められなかった。以上の事から、TSA は、生殖細胞の発生・分化に影響を与え、また、セルトリ細胞の分化を抑制して精巣索の形成を阻害するものと考えられた。卵巣分化過程において、生殖腺サイズの減少は 1  $\mu$ M 添加で認められ、生殖細胞数の減少が認められた。以上より、トリコスタチン A によって誘導されたヒストンのアセチル化パターンの変化は生殖細胞の成長、増殖、分化に関与することが示唆された。

性分化過程における一連の遺伝子カスケードにおける DNA のメチル化の関与を統括的に理解するため、マウス未分化生殖腺の性分化における脱メチル化剤 (5-Azacytidine (AZC)) の影響を検討した。その結果、50  $\mu$ M の AZC 添加精巣培養片においては、正常な精巣索形成が完全に阻害される事を明らかにした。これらの 50  $\mu$ M 添加精巣培養片において laminin-1 は、正常に産生されていた。然し、laminin-1 の分布には大きな異なり、精巣組織内で断片化して存在していることが明らかとなり、断片化した laminin-1 の分布が精巣索形

成に抑制的に働いたものと考えられる。また、Sox9 の whole mount *in situ* hybridization(WISH)法による解析によって、セルトリ細胞自体は正常に分化・誘導されていることが明らかとなった。

Mfge8、 $3\beta$ -Hsd の WISH による解析によって、AZC は、ライディッヒ細胞などの分化に全く影響を与えなかったが、精巣でのライディッヒ細胞は不規則的な分布を示し精巣索-間質領域の正常な形態形成が阻害されることが示唆された。

精巣の形態形成には中腎からの細胞の移動が関与していると考えられている。そこで、AZC の効果が、中腎を介しているか否かを明らかにするため、18~30ts の生殖腺原基から中腎を除去し生殖腺のみ AZC 存在下で培養した。その結果、18ts より 24ts までのステージの間の生殖腺において、同様に精巣索-間質領域の正常な形態形成が阻害され、Sox9 や、 $3\beta$ -Hsd の遺伝子発現パターン解析からも、セルトリ細胞・ライディッヒ細胞の分化は正常に誘導されるが、その分布には異常が認められた。また 25ts 以降は、AZC は、精巣索形成を阻害することは無く、Sox9 や、 $3\beta$ -Hsd の遺伝子発現パターン解析からも、セルトリ細胞・ライディッヒ細胞の分化・分布は正常であった。以上の結果は、精巣への性分化過程の後期 (25ts 以降) の遺伝子カスケードに、精巣索-間質領域の形態形成に関与する事を示している。そこで、24ts 以降に発現し、間質形成に関わると考えられる細胞外基質関連の遺伝子の検索を行った結果、Type II コラーゲンに属する Col9a3 の遺伝子発現が完全に抑制されている事が明らかとなった。Col9a3 は、Sox9 の直接的な標的遺伝子と考えられ、Col9a3 の遺伝子発現に関して、DNA のメチル化が関与している事が示唆された。

この結果は、新規の知見および概念を含み、農学学術上に貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。