

〔別紙 2〕

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 平松 竜司

性分化は、雄性化シグナルと雌性化シグナルのバランスの上、未分化生殖原基から精巣／卵巣が分化する、「可塑性」を持つ機構である。そのため、性分化異常症は性転換から外性器異常まで広範に渡り、また高頻度で発生しており、医学・獣医学的、また社会的に極めて大きな問題である。哺乳類の性分化は、Y染色体上の精巣決定遺伝子 *Sry* により、遺伝的に厳密に制御されている。マウスにおいて、*Sry* は胎齢 11.0 日から 12.0 日まで、一過性に、生殖腺の中央部から両端部へという、時間的・空間的に特徴的なパターンを示しながら発現し、未分化生殖腺を精巣へと分化誘導する。この *Sry* の発現を引き金として、*Sox9*、*Fgf9*、*Dhh*、*Mis* など多くの精巣特異的遺伝子の発現が誘導され、また、生殖腺体腔上皮の増殖、中腎細胞の移入、血管の形成、グリコーゲン顆粒の蓄積、精巣索の形成など様々な精巣特異的な形態変化が一気に進んでいく。しかしながら、*Sry* が同定されてから既に 20 年近くが経過している現在においても、性分化初期過程のメカニズムについては、未だ多くが明らかとされていない。発生過程において「遺伝子がいつ・どこで発現することにより正常な発生を誘導するか。」は最も重要な問題の一つであり、*Sry* 発現の時間・空間的パターンがどう精巣分化に関わるかに着目することで、性分化初期過程が時間的・空間的にどのように進行していくかを明らかにすることは、性分化過程の解明に大きくつながる。そこで本研究は、新規の *in vitro* 実験系として、熱による *Sry* 発現誘導系、および分割組織もしくはそれらの再構築による器官培養系を開発し、性分化初期過程のメカニズムについて時間的および空間的に検討したものである。

第 1 章では、*Sry* がいつ発現することが精巣分化誘導に必要なかという時間的問題を検討した。まず、熱ショック蛋白 *Hsp70.3* をプロモーターに用いた、*Hsp70.3-Sry* トランスジェニック (*SryTg*) マウスを作出し、*Sry* 解析のための新規の *in vitro* の実験系を確立した。この実験系は熱処理により、*Sry* の発現および性転換 (XX 精巣) の誘導を人為的に制御できる実験系であり、この系を用いることで、様々な発生ステージで *Sry* を誘導し、それぞれのステージで精巣分化が誘導できるかを検討した。その結果、性分化初期の 12-14ts (tail somite stage; 胎齢 11.0-11.2 日) でしか *Sry* は XX 精巣を誘導できず、それ以降は卵精巣ないし卵巣へと分化したことから、*Sry* が XX 未分化生殖腺を精巣へ分化誘導できるステージ (臨界期) は 12-14ts、すなわち性分化初期の 6 時

間に限られていることを明らかにした。さらに、*Wnt4* 遺伝子を 1 アレル欠損させると、臨界期以降における *Sry* 発現でも精巣分化を誘導できることから、この臨界期は *Wnt4* により決定されることを明らかにした。以上のことは、XX で *Wnt4* の発現が 15ts より上昇することとも一致しており、XY での *Sry* による精巣分化の開始から 6 時間後には、XX においても *Wnt4* により卵巣分化が開始することを明確に示すものである。

第 2 章では、*Sry* が中央から両端へ発現するという空間的パターンに着目し、生殖原基の分割培養法および再構築培養法を用いて、精巣分化が空間的にどのように進行するかを検討した。その結果、胎齢 11.0 日～11.2 日において、生殖腺の中央部は両端部に比べて有意に精巣分化能が高いこと、再構築培養により、中央部が両端部の精巣分化能を高めることが明らかとなった。これらの結果は、精巣の分化は、生殖腺中央部から開始し、生殖腺全体へと広がって行くことを示している。さらに、中央部から前/後部へ広がる精巣分化パターンを制御する因子を検討した結果、FGF9 添加により前部と後部の精巣分化誘導能が中央部と同等のレベルに回復する一方、FGF シグナル阻害により、中央部から前/後部への誘導能の広がりが抑制された。これらの結果から、中央部から分泌された Fgf9 が、前/後部の精巣分化誘導能を高めることにより、生殖腺全体が精巣分化へと進行することが明らかとなった。

以上の結果から、マウスの性分化過程は、卵巣分化因子である *Wnt4* が発現する数時間前には精巣決定因子 *Sry* が中央部に発現し、*Fgf9* を介して生殖腺全体を精巣分化へと進行させていくという、時間的空間的な性分化メカニズムが示された。ヒトや家畜における性分化異常症の発症機序は、20%程度しか解明されていないが、この結果は、遺伝子の機能ドメインだけではなく、その発現制御領域の解析が発症機序の解明に大きくつながることを強く示唆するものである。また、転写因子と液性因子が時間的空間的に、互いに相互作用を奏でながら発生の方向性を決定していくという、発生のダイナミクスを示す、明確なモデルであるとも考えられる。これらの研究成果は、獣医学学術上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（獣医学）の学位論文として価値のあるものと認めた。