西森克彦

動物の生殖を制御する遺伝子 ノックアウトテクノロジーによる新しい展開

オキシトシンは哺乳動物の生殖に必須のホルモンとされてきたが、オキシトシン遺伝子欠損の雌マウスでは、ミルク分泌不全のみが観察された。また TGF- β 類縁の GDF-9 遺伝子欠損の雌マウスは不妊であり、卵胞の発達が異常であったことから、GDF-9 は卵母細胞性の、卵胞成育とその機能制御に働く因子と思われる。これらの結果に加え、ノックアウト法により得られた興味深い遺伝子解析結果の中から、生殖に関係したものについて解説する。

Genes Governing Mammalian Reproductive System
*Katsuhiko NISHIMORI, 東北大学農学部

発生工学の進歩により、動物胚に外来の遺伝子を導入し、そのまま発生を続けさせることが可能となった。このトランスジェニック技術は、個体の発生分化に伴う細胞系譜を明らかにし、また発生、発癌に関わる遺伝子とタンパク質の機能を動物個体を用いて明らかにすることを実現した。この技術を基本に、embryonic stem (ES) cell における遺伝子の相同組換え (homologous recombination) の発見と効率的な濃縮法を含む応用技術の確立は、ジーンターゲティング技術を生み出した⁽¹⁾。筆者は、動物の生殖に関わる遺伝子の機能に興味を持って研究を進めているが、生殖のように動物個体における遺伝子の機能を対象とする研究には、今やジーンターゲティング法は必須の技術と言える。

Baylor 医科大学の Martin M. Matzuk 博士のグループは、この技術により、今までに主に哺乳動物の発生と分化、特にその生殖線の分化や生殖サイクルの維持、生殖行動などに関係した TGF- β スーパーファミリーのメンバーを中心とするいくつかの成長因子、ホルモンおよびそのレセプター遺伝子の機能を明らかにしてきた。筆者は博士の研究室において、乳汁分泌と生殖行動、および出産時の分娩開始に機能していると考えられてきた下垂体性ホルモンのオキシトシン (oxytocin)、および TGF- β スーパーファミリーに属する新規の成長制御因子で、卵巣卵母細胞においてのみ発現が確認されていた GDF-9 の遺伝子ノックアウトマウス作製プロジェクトに参加し、いくつかの興味深い結果を得ることができた。

本稿では、まず最初にジーンターゲティング法の概略を解説し、次に生殖機能に深い関わりを持った2つの遺伝子、オキシトシン遺伝子と GDF-9 遺伝子のジーンターゲティング法による機能解析結果について解説する。最後に、最近までにノックアウトマウス作製により明らかになったいくつかの生殖関連遺伝子の機能をまとめてみた。

ジーンターゲティング法

ジーンターゲティング法は急速に普及し、この方法による多数の遺伝子ノックアウトマウスの作製によって、動物個体における遺伝子本来の機能の解明や、ヒト遺伝病のモデル動物作製を目指した研究成果が続々と発表されるに至っている。他にも多くの解説が出ていると思われるが、図1にこのテクニックの概略を表わした。バクテリオフィージの DNA 切り出しシステムをこの技術に応用した Cre-loxP 法⁽²⁾の導入は、発生の特定の段階での分化ステージ特異的な目的遺伝子の欠失や、臓器・組

図 1 ■ ジーンターゲティング法によるミュータントマウス作製の要約

組織特異的な遺伝子の欠失、さらに正常動物個体を得た後でこれに外部から薬剤投与することで誘導される遺伝子欠失や、さらには遺伝子工学的に改変した遺伝子(exogenous gene)と元の遺伝子(endogenous gene)との交換をも可能にする一方、cM(センチモルガン)単位もの染色体の広大な領域の計画的な欠損をも可能にした⁽³⁾。ジーンターゲティング法による研究発表件数が、2001年には3,000件を越すと予想されている⁽⁴⁾ことも、このテクノロジーがきわめて強力な方法であることを示していると言えよう。

ノックアウトマウスの作出の基本的方法を図1に示した。この方法の突破口となった分化全能性(totipotent)を有するES細胞はマウス胚発生開始後約3.5日の胚盤胞(blastocyst)中のICM(inner cell mass; 内部細胞塊)から得られるが、実際には多くの純系マウス系統の中で、129 substrain系マウス胚のICMに由来する細胞株からのものが大半を占め⁽⁴⁾、他のstrainのマウスから分化全能性ES細胞株を得ることは難しい。

この技法確立の突破口となったもう一つの技術開発は、このES細胞株でごく低率($1/10^5 \sim 1/10^6$)で起こる哺乳類細胞での相同組換えを、効率的に濃縮する方法をCappechi らが見いだした⁽¹⁾ことによる。その原理は、ノックアウトベクター上で、相同組換えを起こさせるための領域の外側に置いたtoxicな遺伝子が、染色体へのランダムな遺伝子挿入が起きた場合のみ宿主細胞の染色体中に組み込まれ残存し、その細胞を死滅させてしまうことを利用している。

Cappechi らが報告した初期の方法では、HSV(単純ヘルペスウイルス)の tk (チミジンキナーゼ)遺伝子をこの目的のために使った。HSVの tk 遺伝子は、核酸アナログのganciclovirまたはFIAU(1-[2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosyl]-5-iodouracil)を細胞毒性のある物質に変換させ細胞を死滅させるが、体細胞由来の tk 遺伝子にはこの性質がないことを利用した選択法を用いたのである。現在もこの方法は依然有力であるが、その後、ジフテリア毒素遺伝子を使った方法⁽⁵⁾なども新たに開発され、併わせて用いられている。

この方法によって、細胞中の目的遺伝子とノックアウトコンストラクトDNAとが相同組換えにより交換したES細胞クローンだけを容易に濃縮することができ、対象遺伝子にもよるが、わずかに数十個のES細胞クローンを解析するだけで目的のクローンを選択することも可能である。しかし、129/SvEv由来のES細胞株でも、それぞれの樹立株ごとによって相同組換えの起こしやすさには差があるようであり、またES細胞の維持方法や細胞株自身の性質の差異によっても、胚盤胞に注入した後のES細胞の生殖系列への入りやすさにも大きな差がでることが知られている。さらにES細胞の種類によっては、胚盤胞よりもそれより早期の胚である桑葉胚や8細胞期に入れたほうがES細胞の生殖細胞への貢献が高率に起こるなど、細胞株によってもその性質は微妙に異なり、それに合わせた各ステップの至適化が重要である。

相同組換えを起こしたES細胞が、得られたキメラマウスの生殖細胞系列へ入れば、この実験の前半の大きな

山場を終えたことになる。得られたキメラマウスと野生型マウスを掛け合わせ、ES細胞に由来するF₁マウスの中からDNA解析により変異遺伝子を持つヘテロ接合体を選ぶ。一部の癌抑制遺伝子、たとえば*P53*⁽⁶⁾や*Rb*⁽⁷⁾などではF₁のヘテロ接合体マウスの追跡実験により重要な結果が得られることになるが、通常はこのF₁を掛け合わせて欠損遺伝子をホモ接合に持つF₂を得られれば後半の実験、つまり発現型の解析が始まる。

ジーンターゲティング法による2つの生殖関連遺伝子の機能解析

1. オキシトシン(oxytocin)遺伝子欠損マウスの作製

脳下垂体性ホルモンのオキシトシンは、哺乳動物の生殖に必須のホルモンとして理解されてきた。発見は古く、わずか9アミノ酸の活性ペプチドホルモンであるオキシトシンが合成され、その活性が確認されたのは1953年のことである⁽⁸⁾。また遺伝子については、Haraらによって報告されている⁽⁹⁾。オキシトシン前駆体遺伝子産物のmRNA長は約700bpあり、これより125アミノ酸の

ニューロフィジンとも呼ばれる前駆体タンパク質として合成された後、9アミノ酸の活性ペプチドにプロセッシングされ分泌される。

オキシトシンの生産場所は、脳内では視床下部の室傍核(PVN)と呼ばれる領域、および視神経交差上に位置する領域(SON)であり、合成分泌された後、下垂体に移動し下垂体後葉より血中に分泌される。保育活動時の授乳では、子どもの口唇による乳頭への刺激に反応して脳下垂体より血中に分泌され、OXT-R (oxytocin receptor)の発現している組織である乳腺の平滑筋に作用し、ミルク射出を誘導すること⁽¹⁰⁾が、また同じくOXT-Rを発現している子宮平滑筋(endometrium)に作用し、出産の際の子宮の収縮に作用していると考えられていた⁽¹⁰⁾。またオキシトシンは、これ以外にも様々な生殖関連組織の、たとえば雄精巣での発現⁽¹¹⁾や、雌卵巣の黄体で生殖周期に同期して発現すること⁽¹²⁾、また栄養外胚葉(trophoblast)に由来する胎児組織、たとえば胎盤⁽¹³⁾や羊膜⁽¹⁴⁾などでも発現することが知られており、精巣分化を含め、哺乳動物の雌雄両方において、生殖腺の分化や発達、制御に関する作用、多くの生殖行動、保育行動

図2 ■ ターゲティングベクターの構成と相同組換えを起こした遺伝子の検出原理 (A) および F₂ 仔マウスの遺伝子型のサザン解析結果 (B)

E: EcoRI, V: EcoRV, B: BamHI, N: NarI

における中枢神経系への作用と役割が報告されてきた。事実、OXT-Rは平滑筋だけでなく、脳内のLS(lateral septum), BA(basolateral amygdala), ACA(anterior cortical amygdala)といった領域で発現しており、しかもその分布は動物種ごとに異なり、またテストステロンなどのステロイドホルモンによっても発現が変動することも知られている⁽⁵¹⁾。

このオキシトシンの哺乳動物の生殖における機能を遺伝子欠損ミュータントによって明らかにするため、オキシトシン遺伝子欠損マウスを作製した⁽⁴³⁾。オキシトシンはその前駆体ペプチドのニューロフィジンをコードするオキシトシン遺伝子の第1エクソンにコードされているため、このエクソン1を欠失させればオキシトシンの合

成はできなくなる。作製したES細胞用のターゲティングベクターの構成と相同組換えを起こした遺伝子の検出原理を図2-Aに、また得られた相同組換えを起こしたES細胞に由来するF₂仔マウスの遺伝子型のサザン解析の結果を図2-Bに示した。

しかし、得られたオキシトシン遺伝子欠失の雄ヘテロ接合体、ホモ接合体マウスともに、予想に反して精巣の発達や生殖行動にはまったく異常はなく、生殖能力に関しても正常であった。一方、同様にオキシトシン遺伝子を欠損した雌ヘテロ接合体、ホモ接合体両マウスともに、やはり正常な出産を含む、正常な雌としての生殖行動と能力を示し、また卵巣の機能や構造に関してなんらの異常も見いだされなかった(図3)。

図3 ■ オキシトシン遺伝子欠損のホモ接合体雌の乳腺および卵巣と同じく雄の精巣の組織写真

A: 右, オキシトシン遺伝子(*oxt*)欠損ヘテロ接合体(+/-)の精巣, 左, *oxt* 欠損ホモ接合体(-/-)の精巣, B: *oxt* -/-マウス精巣精細管の組織像, C: *oxt* +/-マウス卵巣の組織像, D: *oxt* -/-マウス卵巣の組織像, E: *oxt* +/-マウス乳腺(授乳時)の組織像, F: *oxt* -/-マウス乳腺(授乳時)の組織像

このように、オキシトシン遺伝子欠損の雌マウスは正常な雌としての生殖行動と能力を示し、また保育行動や授乳行動に関しても異常はみられなかったが、ただ一点だけ正常マウスにはみられない異常をみせた。すなわち、例外なくすべての仔マウスは出産後24時間以内に死亡した。死亡した仔マウスを観察すると、消化器官に母乳がまったくみられず、脱水症状を呈していた。これに対し、出産直後からオキシトシン遺伝子欠損の母親マウスにオキシトシンペプチドを約2時間毎に連続的に注射すると、これらの仔マウスの死亡は防がれ、3週ほどの母親マウスへの連続注射によって離乳するまでの成長と生存が可能となった。

図3に *oxyt⁻/oxyt⁻* (オキシトシン遺伝子欠損のホモ接合体)雌の乳腺、および卵巣と同じく *oxyt⁻/oxyt⁻* 雄の精巣の組織学的な解析結果を示す。この結果は、組織学的には *oxyt⁻/oxyt⁻* の個体と野生型あるいはヘテロ欠損個体 *oxyt⁺/oxyt⁻* に関して雄、雌ともに明瞭な差のみられないことを示した。

これまでに、生殖機能においてオキシトシンが果たす作用について多くの研究報告がなされてきたにもかかわらず、オキシトシン遺伝子欠損マウスを用いた本研究は、オキシトシンが雌個体の保育活動時のミルク射出においてのみ必要不可欠な役割を担っているが、その他の生殖機能については、少なくともオキシトシン遺伝子がなくともまったく正常な生殖機能が維持されることを明らかにした⁽¹⁵⁾。乳腺平滑筋については、オキシトシンリガンドに対して、そこで発現がみられる OXT-R の意味を筆者らの結果から充分理解できるが、子宮内膜や脳内で発現がみられる OXT-R については、*oxyt⁻/oxyt⁻* マウスが正常な生殖行動を示したことや、出産になんらの遅れもみせなかったことから、むしろ今回の実験に限っていえば、マウスの生殖行動に関しても、また出産に関しても、オキシトシンはなんら機能を果たしていないといえる。陣痛開始剤として産科領域で臨床的に用いられているオキシトシンは、ときに激しい子宮収縮作用を示すため、いくつかの死亡事故を含めた医療事故をひき起こしていることが現在問題となっているが、今回の研究結果は哺乳動物の生殖におけるオキシトシンと OXT-R の関係を再考させるものであるといえる。

2. GDF-9 遺伝子欠損マウスの作製

生殖細胞は、動物の発生初期に全能性を持った始原生殖細胞 (primordial germ cell) として、恐らくは原始外胚葉から分化発生し、独自の細胞系譜をたどり、精巣では精原細胞へ、また卵巣では卵母細胞へと分化する。し

かし、同じ始原生殖細胞に由来する生殖細胞の分化でありながら、生殖細胞が卵巣のなかで卵母細胞・卵子へ成熟するのに必要な因子と、精巣のなかで精原細胞・精子へ分化成熟するのに必要な因子は著しく異なっている。もちろん、これら哺乳動物の生殖細胞の分化、成熟にはこれまでの多くの内分泌学研究により明らかになっているように、テストステロンやエストラジオール、プロゲステロンなどのステロイドホルモンと、それらの制御因子とも考えられる生殖腺刺激ホルモンの FSH (卵胞刺激ホルモン; follicular stimulating hormone) および LH (黄体形成ホルモン; leuteinizing hormone) の持つ影響はきわめて大きい。しかし一方、最近のジーンターゲティングを用いた研究により、雄の精巣形成に必須と思われる FSH が実は雄の生殖能力獲得には必ずしも必須でないこと (表2-9)⁽⁸⁷⁾、新規の TGF- β スーパーファミリーメンバーである BMP-8b が精子形成に必要であること (表2-7)⁽⁴⁹⁾、など生殖細胞の分化に関わる遺伝子について、新しい発見が相次いでもたらされている。GDF-9 (growth and differentiation factor-9) もこれらと同様、ごく最近になりその存在が明らかになった卵母細胞成熟に必須の成長因子である。

McPherron と Lee は、TGF- β スーパーファミリーに属するタンパク質の成熟領域 (前駆体全長の約 1/3 を占める C 末側領域で、分泌後プロセシングを受けて切り出される活性型タンパク部分) に共通するアミノ酸配列を元に作製した縮重プライマーを用い、マウスゲノム DNA から PCR でいくつかの新規 TGF- β スーパーファミリーメンバーをクローニングし、これらのファクターに GDF (growth and differentiation factor)-X という一連の名前をつけた⁽¹⁶⁾。GDF-9 はこれらの 1 つで、DNA から予想されたアミノ酸配列は、TGF- β スーパーファミリーメンバーどうして保存性が高いことで知られる成熟領域どうしの比較でも、BMP (bone morphogenetic protein)-4、BMP-2 およびそのショウジョウバエのホモログである DPP に対してそれぞれ 34, 33, 32% と低い相同性をみせたものの、他の TGF- β スーパーファミリーメンバーに対してはさらに低い相同性しか示さず、新しい TGF- β スーパーファミリーのメンバーであるものと考えられた⁽¹⁶⁾。

gdf9 遺伝子の転写物は、マウスの場合で原始卵胞を除く一次卵胞から排卵に至る各段階の卵母細胞においてすべての段階で発現しているが、受精後 1.5 日胚で発現が検出されなくなることが報告されている⁽¹⁷⁾。筆者らは、この *gdf9* 遺伝子の予想成熟領域を欠損したマウスをジーンターゲティングにより作製した。マウス *gdf9* 遺伝

図 4 ■哺乳動物卵巣における卵胞の発達と GDF-9 が作用すると考えられるポイント

子を持たないホモ接合体の雄マウスはまったく異常はなかったが、GDF-9 タンパク質を持たない *gdf9*^{-/-} ホモ接合体マウスは誕生後 1 年以上を経てもまったく妊娠せず、不妊であった。このホモ接合体雌マウスの卵巣の病理学的解析では、原始卵胞は形成されているものの、その後の卵母細胞分化が著しく異常になり、一次卵胞から正常な成熟卵胞に至る通常の卵胞の発達はまったく観察されず(図 4)、卵胞は異常な発達の後、変性してしまう。もちろん排卵サイクルを持つこともなかった。

哺乳動物の卵発生はマウスの場合、まず 7 日胚で原始外胚葉付近に生じた始原生殖細胞が生殖腺の原基である生殖隆起に向かって移動し、14 日胚にかけて増殖を続けるが、その後卵巣中で卵母細胞となった生殖細胞は第一次減数分裂の途中で休止期に入り、そのまま生殖可能日齢になるまでその状態が続く。成獣になると、再び卵母細胞の分化と発達は再開される。哺乳類では卵母細胞は、stroma cell と呼ばれる顆粒膜細胞が卵母細胞を取り囲んで形成される卵胞を構成し、排卵に至る(図 4)。卵胞では顆粒膜細胞と卵母細胞が互いに密接に影響し合いながら卵母細胞の成熟と、顆粒膜細胞の増殖、分化が起こっていることが知られており、細胞間のコミュニケーションのモデルとしてもきわめて興味深い系である。卵母細胞が顆粒膜細胞のエストラジオール産生を増大させ、またプロゲステロン産生を低下させる因子を分泌していること⁽⁵²⁾、卵母細胞を取り除いた排卵直前の卵胞では、排卵後に必要な粘着性のヒアルロン酸の産生が止まること⁽⁵³⁾、また培養顆粒膜細胞の増殖は卵母細胞を取り除くと著しく低下すること⁽⁵⁴⁾ など、顆粒膜細胞が卵母細胞

胞の分化成熟を促すだけでなく卵母細胞もまた顆粒膜細胞の増殖と分化を制御しているという観察は以前から報告されていた。GDF-9 は、前述したような現象のいくつかに関与している卵母細胞由来の成長因子であると考えられ、顆粒膜細胞の増殖と分化の制御などに必要な成長制御因子であると予想される⁽³⁷⁾。

ジーンターゲティング法による生殖関連遺伝子の機能解明

現在までに、ポジショナルクローニングや多くのトランスジェニック実験、あるいは ES 細胞によるジーンターゲティング実験により、生殖機能を支え、また生殖機能に大きな影響を与えているいくつかの遺伝子の存在が明らかとなってきた。これらの興味深い遺伝子のうち、今回は誌面の都合上、ジーンターゲティング実験によるものだけを選び、表にまとめてみることを試みた。都合上、転写制御因子類(表 1)、TGF- β やそのレセプターなどの細胞成長因子/レセプター類(表 2)とそれ以外(表 3)に分類した。この表にとり上げた遺伝子以外にも、たとえば *sry*⁽¹⁸⁾ やアンドロゲンレセプター遺伝子⁽¹⁹⁾、*dax-1*⁽²⁰⁾ など、性決定や生殖腺の分化に関わる重要な遺伝子は他にも多いが、突然変異動物を用いた遺伝学的研究による報告や、得られた遺伝子の解析が遺伝子の大量発現によって行なわれたもの(トランスジェニック実験)、あるいはヒトの遺伝病の解析によって明らかになった遺伝子のケースは表からは省き、いくつか重要なものについては本文で解説した。

生殖とこれに関わる遺伝子群は、有性生殖を行なうすべての生物にとって、次の世代を再生産し生物本来の目的ともいえる種の維持のために機能している、きわめて重要なシステムを構築していることは議論の余地がない。高等動物のなかでも、特に性の決定機構は種毎に大きな差があることが知られている。両生類や爬虫類、魚類およびそれらより下等な動物では性染色体が明瞭に分化していない場合も多く、また温度などの環境要因によって雌雄が決まったり、いったん決定された性がその後の環境要因などの変動などによって変化し、二次的に雌雄の逆転が起こる種があるなど、性決定機構に関しては

特に種間の差が大きいことが知られている。これに対して哺乳動物は、雌雄性染色体(XY 染色体)が明瞭に分化している動物種である。

配偶子の形成、受精といった基本的な生殖機能を含め、雌雄の決定から出産した新生動物の保育に至るまで、この哺乳動物の生殖システム維持のために働いている様々な遺伝子を、試みに以下のように分類してみた。もちろん、1つの遺伝子が見かけ上複数の機能を持つことは希ではない。

まず、性の決定から生殖腺の成熟に至る遺伝子として、① 性染色体に依存した第一次的な性の決定を担って

表 1 ■ 転写因子の遺伝子破壊により得られた、生殖に関係した表現型

破壊された遺伝子	主な結果・表現型	文献
1 プログステロンレセプター遺伝子 (核内レセプター)	ホモ接合体の雌の不妊、卵巣、子宮、乳腺の発達不全、黄体未形成。雌は生殖行動をとらない。雄はまったく異常がない	(21)
2 エストロゲンレセプター遺伝子 (核内レセプター)	ホモ接合体の雌、雄ともに不妊、雌では子宮と卵巣が未成熟。雄では精巣発達障害、精子数減少	(22), (23)
3 <i>Sf-1/Ftz-F1</i> (リガンド不明型核内レセプター)	ホモ接合体で泌尿・生殖器官が形成されない、副腎が形成されない	(24), (25)
4 <i>WT-1</i> (癌抑制遺伝子)	ホモ接合体で泌尿生殖器が形成されず、発生途中で死亡する	(26)
5 <i>hoxa-10</i>	雄、雌ともに生殖能力低下 (程度は個体により異なる)	(27)
6 <i>hoxa-11/hoxd-11</i> 二重変異	輸精管が副睾丸に形質転換する異常	(28)

表 2 ■ 増殖因子、増殖因子受容体の遺伝子破壊により得られた、生殖に関係した表現型

破壊された遺伝子	主な結果・表現型	文献
1 <i>MIS</i> (ミューラー管退化因子)	雄における子宮器官の残存、生殖器官奇形による雄の繁殖率低下。雌はほぼ正常	(29)
2 α -インヒビン	ホモ接合体の雄、雌とも不妊。顆粒膜細胞(雌)およびセルトリ細胞(雄)腫	(30~32)
3 アクチビン- β A	ホモ接合体は正常に発生、成長し出産するが出産後 24 時間以内に死亡(授乳、保育障害?)	(33)
4 アクチビン- β B	ホモ接合体の雌の生殖能力に重大な欠陥。出産直前の仔マウスの死亡、出産の遅延、保育障害	(34), (35)
5 アクチビンレセプター type II	ホモ接合体の雌、不妊。雄では生殖能力の開始が遅れる	(36)
6 <i>gdf9</i>	ホモ接合体の雌不妊。卵巣で卵胞成熟停止、排卵なし	(37)
7 BMP-8b	ホモ接合体の雄では生殖細胞の増殖が減衰、停止し最終的に不妊になる	(38)
8 IGF-1 (インスリン様成長因子)	生殖腺刺激ホルモン分泌が低下、雌雄ともに不妊	(39)
9 FSH (卵胞刺激ホルモン)	ホモ接合体の雌は卵胞形成がブロックされ不妊。雄は精巣が野生型の約半分の重量、精子形成は正常	(40)
10 グリコプロテインホルモン α -サブユニット (FSH, LH および TSH の欠損)	ホモ接合体で生殖腺機能低下、甲状腺機能低下。雌雄ともに不妊	(41)
11 <i>LIF</i>	ホモ接合体の雌は不妊(胚の着床障害)	(42)
12 オキシトシン	ホモ接合体の雌、乳汁射出起こらず	(43)

表 3 ■ その他の遺伝子破壊により得られた、生殖に関係した表現型

破壊された遺伝子	主な結果・表現型	文献
1 <i>c-mos</i> (プロトオンコジーン)	ホモ接合体雌において繁殖率の低下、卵巣性テラトーマの発生	(44), (45)
2 α -ラクトアルブミン	ホモ接合体の雄、雌保育障害、乳汁の粘度がきわめて高く、仔マウスがミルクを吸えない	(46)
3 アンギオテンシン変換酵素	ホモ接合体の雄の精子運動性異常による生殖能低下	(47)
4 <i>bcl-2</i> (癌抑制遺伝子)	ホモ接合体の雌卵巣の原始卵胞に形態異常	(48)
5 プロスタグランジン合成酵素 I	雌、雄ともにホモ接合体の場合、子どもの死産率が上がる	(49)
6 カルメジン (精巣特異的に発現しているシャペロン的一种)	ホモ接合体で雄のみ不妊、精子の透明体への付着が起こらない	(50)

いる遺伝子、⑤ 生殖輸管系といわれる、生殖器官と腎臓および副腎を含む一群の組織の分化と発達を支える遺伝子群、⑥ 性決定遺伝子の下流に位置し、雄あるいは雌の生殖腺において働き、主にステロイドホルモンに依存した二次的な生殖器官の分化発達をコントロールしている遺伝子群、が挙げられる。次に、個体の生殖能力が成熟した後では、④ 配偶子の形成過程とその成熟に関わり、また雌における成熟卵の周期的な放出（排卵）を支えている遺伝子群、⑦ 受精のシステムや受精卵の子宮への着床をコントロールし、また胚由来の栄養外胚葉に由来し、胚への栄養供給組織である胎盤の発達と機能維持に働いている、母体内での胚発生と胎児の成長を支える遺伝子群、⑧ 出産に関わり、陣痛の開始や子宮平滑筋の収縮などをコントロールしている遺伝子群、そして⑨ 出産後の母乳生産の誘導と放出に関わる遺伝子群、などに分けて考えることができる。さらに、⑩ 複雑な生殖行動や産まれた子供に対する保育行動を高次の神経系のレベルでコントロールしている、生殖行動に関係した遺伝子群を考える必要があり、哺乳動物の生殖においてはきわめて多くの遺伝子群が、この複雑なシステム維持のために協調的に働いていることが理解されよう。

これらの遺伝子のなかには内分泌学(endocrinology)分野の研究者によって、以前からタンパク質やペプチドの存在が知られ、その研究の進んでいたオキシトシンや、性ステロイドホルモンの合成系遺伝子群とその核内レセプター遺伝子、グリコプロテインホルモンと呼ばれる生殖線刺激ホルモンの LH や FSH とそのレセプターの遺伝子などがある一方、近年のトランスジェニック実験やジーンターゲット動物の作製により、期せずして生殖系における機能が明らかとなったものも多い。

表1に示したのは、転写因子のなかで生殖に関わっていることが明らかになったものである。これにはステロイド性ホルモンの核内レセプター遺伝子、およびそのファミリーに属し結合する因子（リガンド）の不明な、いわゆる orphan receptor（みなしレセプター）に属するものが多い。表にはとり上げなかったが、アンドロゲン（雄性ホルモン）レセプター遺伝子の自然突然変異は *tfm* (testicular feminization) と呼ばれ⁽¹⁹⁾、外見上はまったく雌型の二次性徴を示す個体をもたらすことが知られている。

プロゲステロン(表1-1)とエストロゲンレセプター(表1-2)遺伝子破壊は、興味深い結果を示した。エストロゲンレセプター遺伝子欠損では雄雌ともに生殖能力を失う^(22,23)のに対し、プロゲステロンレセプター遺伝子欠損の場合は、雄ではまったく影響が現われず、雌のみ不妊

となり卵巣に数々の障害が現われることが観察されている⁽²¹⁾。特に興味をひくのは、プロゲステロンレセプター欠損の雌マウスにおいて生殖行動がまったくみられなくなる点であり⁽²¹⁾、転写因子でありながら④の生殖行動にも関わる遺伝子としてその機構の解明が待たれる。

今回表には挙げなかったが、*sry*⁽¹⁸⁾ 遺伝子は哺乳類の雄型の性決定遺伝子であり、同じく表には挙げなかった *sry* 関連遺伝子の *SOX9* も性決定に影響を与える遺伝子であると推定されており、*sry* は④、*SOX9* は④、⑤の両者にまたがって分類される遺伝子であると考えられる。*SOX9* は常染色体にコードされる遺伝子で変異遺伝子がヘテロ接合で存在すると、性染色体が XY 型にも関わらず、100%ではないが、生殖腺型が高率で逆転する(女性化する)遺伝病、campomelic dysplasia (CD) の原因遺伝子と考えられている⁽⁶⁵⁾。

核内レセプターファミリーに属する *SF-1* (表1-3) 遺伝子欠損では副腎と生殖腺が欠損し、生後間もなく、コルチコステロンホルモンの低下により死亡する⁽²⁴⁾。表には挙げなかったが、同じく核内レセプターファミリーに属する *DAX-1*⁽²⁰⁾ は X 染色体にコードされ、この遺伝子欠損は副腎の皮質の分化が起らず、また生殖器の分化が性染色体型と逆転する遺伝病、dosage-sensitive sex reversal (DSS) と adrenal hypoplasia congenita (AHC) をもたらすと考えられている。しかし、まだターゲットングの報告はない。

WT-1(表1-4)は Wilms tumor という、癌泌尿生殖器の形成不全を伴う小児性癌の原因遺伝子で、転写因子をコードしている。このターゲットングはホモ接合体で、腎臓と生殖器の形成不全を起こし胎児期に死亡した⁽²⁶⁾。これらはいずれも生殖器官を含む泌尿生殖器の分化と発達に関わると考えられる遺伝子であり、⑤に分類されるといえる。これらの遺伝子欠損は生殖能力の欠損を含む重篤な障害をもたらす、*sry* を除いては完全欠損の場合はいずれも致死となる。

次に、分泌性因子のホルモン・成長因子とそのレセプター遺伝子のターゲットング結果を表2に示した。表2を一瞥するとわかるように、TGF- β スーパーファミリーに属する成長因子のなかには、動物の生殖に関して重要な機能を果たしているものが多い。 α -インヒビン(表2-3)欠損マウスでは、100%の確率で stroma cell tumor を発生する。 α -インヒビンは、発生学的には同じ細胞に由来する生殖線の stroma cell の、雄のセルトリと雌卵巣の顆粒膜両細胞に作用する、初めて見つかった分泌性癌抑制遺伝子である⁽³¹⁾。また MIS (müllerian duct inhibitory substance) (表2-2)はその存在は古くから

知られており、雄セルトリ細胞より分泌されて雌の子宮と外生殖器の一部の原器であるミュラー管の成長を、雄の場合に限り阻害し退縮痕跡化することが知られていたが、近年同じく TGF- β スーパーファミリーに属する成長因子の一つであることが明らかとなり、この遺伝子を欠損した雄マウスは子宮様の構造を体内に残し、その物理的立体的障害により、高率で不妊となる⁽²⁹⁾。これに対し、本稿で解説した GDF-9(表 2-6)⁽³⁷⁾ と精子形成に必要であることが明らかとなった BMP-8 b(表 2-7)⁽³⁸⁾ は同じく TGF- β スーパーファミリーに属するタンパク質の遺伝子であるものの、いずれもその存在は最近になり初めて明らかになった。

グリコプロテインホルモンの FSH は、雄雌生殖線の発達と配偶子の形成、および雌における排卵サイクルの維持に必要と考えられていた生殖線刺激ホルモンであるが、これがマウスにおいて少なくとも精巣と精子形成には必須ではないという報告(表 2-9)は予想を覆すものである⁽⁴⁰⁾。グリコプロテインホルモンの α -サブユニット(表 2-10)は FSH, LH, TSH の 3 種のグリコプロテインホルモンに共通するサブユニットであるため、その表現系はより明確であり、雄雌ともに不妊となることが確認されている⁽⁴¹⁾。LIF(表 2-11)は、leukemia inhibitory factor と呼ばれる成長因子で、ES 細胞を分化させずに増殖させるために必要であることが判明し、ES 細胞技術を確立させた点でも重要な因子である⁽⁴²⁾。

表 3 では表 1、表 2 に分類されなかったものを挙げてみたが、母乳成分である α -ラクトアルブミン(表 3-2)⁽⁴⁶⁾ や子宮収縮作用のあるプロスタグランジンの合成酵素 I(表 3-5)⁽⁴⁹⁾ のように、もともと機能が推定されていたものの以外は、むしろターゲティングマウスを作製して予想外に生殖における作用が明らかとなったものが多い。

*

以上、各生殖に関係した遺伝子の興味深い機能を駆け足で解説するという無謀な試みではあったが、生殖に関した分子遺伝学・分子生物学のホットな領域をある程度は網羅できたものと信ずる。

文献

- 1) S.L. Mansour, K.R. Thomas & M.R. Capecchi : *Nature*, **336**, 348 (1988).
- 2) H. Gu, J.D. Marth, P.C. Orban, H. Mossmann & K. Rajewsky : *Science*, **265**, 103 (1994).
- 3) R. Ramirez-Solis, P. Liu & A. Bradley : *Nature*, **378**, 720 (1995).
- 4) E.M. Simpson, C.C. Linder, E.E. Sargent, M.Y. Davisson, L.E. Mobraaten & J.J. Sharp : *Nature Genet.*, **16**, 19

- (1997).
- 5) T. Yagi, Y. Ikawa, K. Yoshida, Y. Shigetani, N. Takeda, I. Mabuchi, T. Yamamoto & S. Aizawa : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9918 (1990).
- 6) L.A. Donehower, M. Harvey, B.L. Slagle, M.J. McArthur, C.A. Montgomery, J.S. Butel & A. Bradley : *Nature*, **356**, 215 (1992).
- 7) E.Y. Lee, C.Y. Chang, N. Hu, Y.C. Wang, C.C. Lai, K. Herrup, W.H. Lee & A. Bradley : *Nature*, **359**, 2884 (1992).
- 8) V. Du Vigneaud, H.C. Lawler & E.A. Popenoe : *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4880 (1953).
- 9) Y. Hara, J. Battey & H. Gainer : *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **8**, 319 (1990).
- 10) H. Gainer & S. Wray : in "The Physiology of Reproduction", ed. by E. Knobil and J.D. Neill, Raven Press, Ltd., New York, 1994, p. 1099.
- 11) N.C. Foo, D.A. Carter, D. Murphy & R. Ivell : *Endocrinology*, **128**, 2118 (1991).
- 12) D.C. Wathes & R.W. Swann : *Nature*, **297**, 225 (1982).
- 13) D.L. Lefebvre, A. Giaid & H.H. Zingg : *Endocrinology*, **130**, 1185 (1992).
- 14) R. Chibbar, F.D. Miller & B.F. Mitchell : *J. Clin. Invest.*, **91**, 185 (1993).
- 15) K. Nishimori, L.J. Young, Q. Guo, Z. Wang, T.R. Insel & M.M. Matzuk : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11699 (1996).
- 16) A.C. McPherron & S.J. Lee : *J. Biol. Chem.*, **268**, 3444 (1993).
- 17) S.A. McGrath, F.E. Aurora & S.J. Lee : *Mol. Endocrinol.*, **9**, 131 (1995).
- 18) P. Koopman, J. Gubbay, N. Vivian, P. Goodfellow & R. Lovell-Badge : *Nature*, **351**, 117 (1991).
- 19) W.W. He, M.V. Kumar & D.J. Tindall : *Nucleic Acids Res.*, **19**, 2373 (1991).
- 20) E. Zanaria *et al.* : *Nature*, **372**, 635 (1994).
- 21) J.P. Lydon, F.J. Demayo, C.P. Funk, S.K. Mani, A.R. Hughes, C.A. Montgomery, G. Shyamala, O.M. Conneely & B.W. O'Malley : *Genes Dev.*, **9**, 2266 (1995).
- 22) J.S. Lubahn Moyers, T.S. Goldings, J.F. Couse, K.S. Korach & O. Smithies : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11162 (1993).
- 23) K.S. Korach : *Science*, **266**, 1524 (1994).
- 24) X. Luo, Y. Ikeda & K.L. Parker : *Cell*, **77**, 481 (1994).
- 25) Y. Ikeda, X. Luo, R. Abbud, J.H. Nilson & K.L. Parker : *Mol. Endocrinol.*, **9**, 478 (1995).
- 26) J.A. Kreidberg, H. Sariola, J.M. Loring, M. Maeda, J. Pelletir, D. Housman & R. Jaenisch : *Cell*, **74**, 679 (1993).
- 27) I. Satonaka, G. Benson & R. Mass : *Nature*, **374**, 460 (1995).
- 28) A.P. Davis, D.P. Witte, H.M. Hsieh-Li, S.S. Potter & M. R. Capecchi : *Nature*, **375**, 791 (1995).
- 29) M.M. Matzuk, M.J. Finegold, J.P. Mather, L. Krummen, H. Lu & A. Bradley : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8817 (1994).
- 30) R.R. Behringer, M.J. Finegold & R.L. Cate : *Cell*, **79**, 415 (1994).
- 31) M.M. Matzuk, M.J. Finegold, J.-G.J. Su, A.J.W. Hsueh & A. Bradley : *Nature*, **360**, 313 (1992).
- 32) M.M. Matzuk, T.R. Kumer, W. Shou, K.A. Coerver, A. Lau, R.R. Behringer & M.J. Finegold : *Rec. Progr. Horm. Res.*, **51**, 123 (1996).

- 33) M.M. Matzuk, T.R. Kumar, A. Vassalli, J.R. Bickenbach, D.R. Roop, R. Jaenisch & A. Bradley : *Nature*, **374**, 354 (1995).
- 34) A. Vassalli, M.M. Matzuk, H.A.R. Gardener, K.-F. Lee & A. Bradley : *Genes Dev.*, **8**, 414 (1994).
- 35) H. Schrewe, M. Gendron-Maguire, M.L. Harbison & T. Gridley : *Mech. Dev.*, **47**, 43 (1994).
- 36) M.M. Matzuk, T.R. Kumer & A. Bradley : *Nature*, **374**, 356 (1995).
- 37) J. Dong, D.F. Albertini, K. Nishimori, T.R. Kumar, N. Lu & M.M. Matzuk : *Nature*, **383**, 531 (1996).
- 38) G.Q. Zhao, K. Deng, P.A. Labosky, L. Liaw & B.L. Hogan : *Genes Dev.*, **10**, 1657 (1996).
- 39) J. Baker, J.-P. Liu, E.J. Robertson & A. Efstratiadis : *Cell*, **75**, 73 (1993).
- 40) T.R. Kumar, Y. Wang, N. Lu & M.M. Matzuk : *Nature Genet.*, **15**, 201 (1997).
- 41) S.K. Kendall, J.L. Saunders, L. Jin, R.V. Lloyd, L.M. Glode, J.M. Nett, R.A. Kevi, J.H. Nilson & S.A. Camper : *Mol. Endocrinol.*, **5**, 2025 (1991).
- 42) C.L. Stewart, P. Kasper, L.J. Brunet, H. Bhatt, I. Gadi, F. Kontgen & S.J. Abbondanzo : *Nature*, **359**, 76 (1992).
- 43) K. Nishimori, L.J. Young, Q. Guo, Z. Wang, T.R. Insel & M.M. Matzuk : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11699 (1996).
- 44) W.H. Colledge, M.B. Carlton, G.B. Udy & M.J. Evans : *Nature*, **370**, 65 (1994).
- 45) N. Hashimoto, N. Watanabe, Y. Furuta, H. Tamemoto, N. Sagata, M. Yokoyama, K. Okaaki, M. Nagayoshi, N. Takeda, Y. Ikawa & S. Aizawa : *Nature*, **70**, 68 (1994).
- 46) M.G. Stinnakre, J.L. Vilotte, S. Soulier & J.C. Mercier : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6544 (1994).
- 47) J.H. Kregel, S.W.M. John, L.L. Langenbach, J.B. Hodgins, J.R. Hagaman, E.S. Bachman, J.C. Jennette, D.A. O'Brien & O. Smithies : *Nature*, **375**, 146 (1995).
- 48) V.S. Ratts, J.A. Flaws, R. Kolp, C.M. Sorenson & J.L. Tilly : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1322 (1995).
- 49) R. Langenbach, S.G. Morham, H.F. Tian, C.D. Loftin, B.I. Ghanayem, P.C. Chulada, J.F. Mahler, C.A. Lee, E. H. Goulding, K.D. Kluckman, H.S. Kim & O. Smithies : *Cell*, **83**, 483 (1995).
- 50) M. Ikawa, I. Wada, K. Kominami, D. Watanabe, K. Toshimori, Y. Nishimune & M. Okabe : *Nature*, **387**, 607 (1997).
- 51) T.R. Insel, L. Young, D.M. Witt & D. Crews : *J. Neuroendocrinol.*, **5**, 619 (1993).
- 52) B.C. Vanderhyden, E.E. Telfer, J.N. Cohen & P. Morley : *Endocrinology*, **133**, 423 (1993).
- 53) R. Buccione, B.C. Vanderhyden, P.J. Caron & J.J. Eppig : *Dev. Biol.*, **138**, 16 (1990).
- 54) B.C. Vanderhyden, E.E. Telfer & J.J. Eppig : *Biol. Reprod.*, **46**, 1196 (1992).
- 55) F.J. Cameron, R.M. Hageman, C. Cooke-Yarborough, C. Kwok, L.L. Goodwin, D.O. Sillence & A.H. Sinclair : *Hum. Mol. Genet.*, **51**, 625 (1996).

お知らせ

第6回腸内フローラシンポジウム

「腸内フローラの分子生態学」

—培養によらない微生物の検出・同定法—

日 時：平成9年10月30日(木) 10:00~17:30

場 所：ヤクルトホール(新橋)

主 催：財団法人ヤクルト・バイオサイエンス研究財団

後 援：科学技術庁

一般公開(入場無料・同時通訳付)

プログラム：はじめに・光岡知足(東大名誉教授, ヤクルト・バイオサイエンス研究財団)／培養前にできる微生物の検出・同定法・K.-H. Schleifer (Technische Universität München)／16S rRNA 配列を利用した腸内フローラの解析・松本隆広(ヤクルト中研)／16S rRNA を用いた嫌気性球菌の分類同定法・江崎孝行(岐阜大)／16S rDNA を用いたルーメン細菌の系統解析・田島 清(STAFF 研究所)／16S rRNA 塩基配列による *Eubacterium aerofaciens* group の分類学的新展開・影山亜紀子(理研)／動物の腸管

内における Bacteroidaceae の分子生物学的手法を用いた同定法・遠間有希子(東大)／デジタル画像分析鏡検法による腸内フローラの定量的測定・M.H.F. Wilkinson (University of Groningen)／16S rRNA の塩基配列を利用した発酵乳製品中の *Lactobacillus* および *Bifidobacterium* の菌種同定・渡辺幸一(ヤクルト中研)／リボタイピング法およびバルスフィールドゲル電気泳動法を用いたヒト腸内乳酸菌構成の検索・木村勝紀(明乳中研)／総合討論(座長：小柳津広志, 辨野義己, 伊藤喜久治)

問合せ：〒105 東京都港区東新橋 1-1-19

(財)ヤクルト・バイオサイエンス研究財団

シンポジウム事務局(荒木, 永島)

Tel. 03-3574-8986, Fax. 03-3574-7269