

# 生殖腺の性分化—精巣と卵巣の構築を支える役者達

諸橋憲一郎

岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所

性の分化が最も顕著に認められるのは生殖腺（精巣と卵巣）や付属生殖器官であるが、実は性の分化は体全体に見ることが出来る。各種組織の機能や脳の性分化に依存した性行動などはその一例である。このような個体全体におよぶ性分化とはいかにして作り出されるものであろうか？一般に個体の性は受精時に決まる。哺乳類では受精卵の性染色体の構成が XY であれば雄、XX であれば雌となるが、このステップを遺伝的性決定と呼ぶ。動物種を広く眺めると異型の性染色体を有する動物種ばかりでなく、性染色体の存在が不明とされる多くの動物種も存在するが、これらの動物種においても基本的には遺伝的性が性決定の基本であると考えて良いと推測される。遺伝的性決定の後に進行するのが生殖腺の性分化である。生殖腺は性ホルモンの作用を通じ、脳の性分化を含む個体の性分化を支配しているため、極めて重要であると考えられる。

## 1, 生殖腺の性分化

まず、脊椎動物の生殖腺の分化過程について概説する。生殖腺や腎臓、更にそれらに付属する組織は泌尿生殖器官と呼ばれ、全ての組織が体節中胚葉と側板中胚葉の間の中間中胚葉を起源とする。あまり知られていないことであるが、副腎皮質も中間中胚葉より発生する（1）（図1A）。中間中胚葉からは頭部側より前腎が、次いで尾部側へ中腎と後腎が分化するが、哺乳類では前腎の形成は不明瞭で中腎より上部の構造はすぐに消失する。この時期の構造上の特徴は頭部側より尾部側へ1本の管が通っていることで、この管が後に中腎管（Wolffian duct）と呼ばれる管である。体腔が生じる頃には腎領域（おそらく腎実質細胞と側板中胚葉由来の細胞）から泌尿生殖隆起が（図1B）、引き続き泌尿生殖隆起から生殖堤が生じる。生殖堤は将来の生殖腺を形成することになる。中腎では中腎管の他に中腎傍管（Müllerian duct）が形成され（図1F）、その後それぞれ雄と雌の付属生殖器官へと分化する。この時期の生殖堤は中腎より腹腔内に大きく迫り出してくるため、中腎領域と生殖腺領域が区別可能となる（図1F）。次いで、生殖腺領域には性差が現れ、精巣と卵巣の形成が進む。精巣の表面は白膜に被われ、内部には精巣柵が発達する。精巣柵内部では始源生殖細胞がセルトリ細胞に取り囲まれており、精巣柵外の間質に男性ホルモン（アンドロジェン）を産生するライディッヒ細胞が分化してくるのもこの時期である（図1G）。一方、この時期の卵巣には大きな変化は認められず、卵巣の発達は出生直前に始まることになる（図1H）。

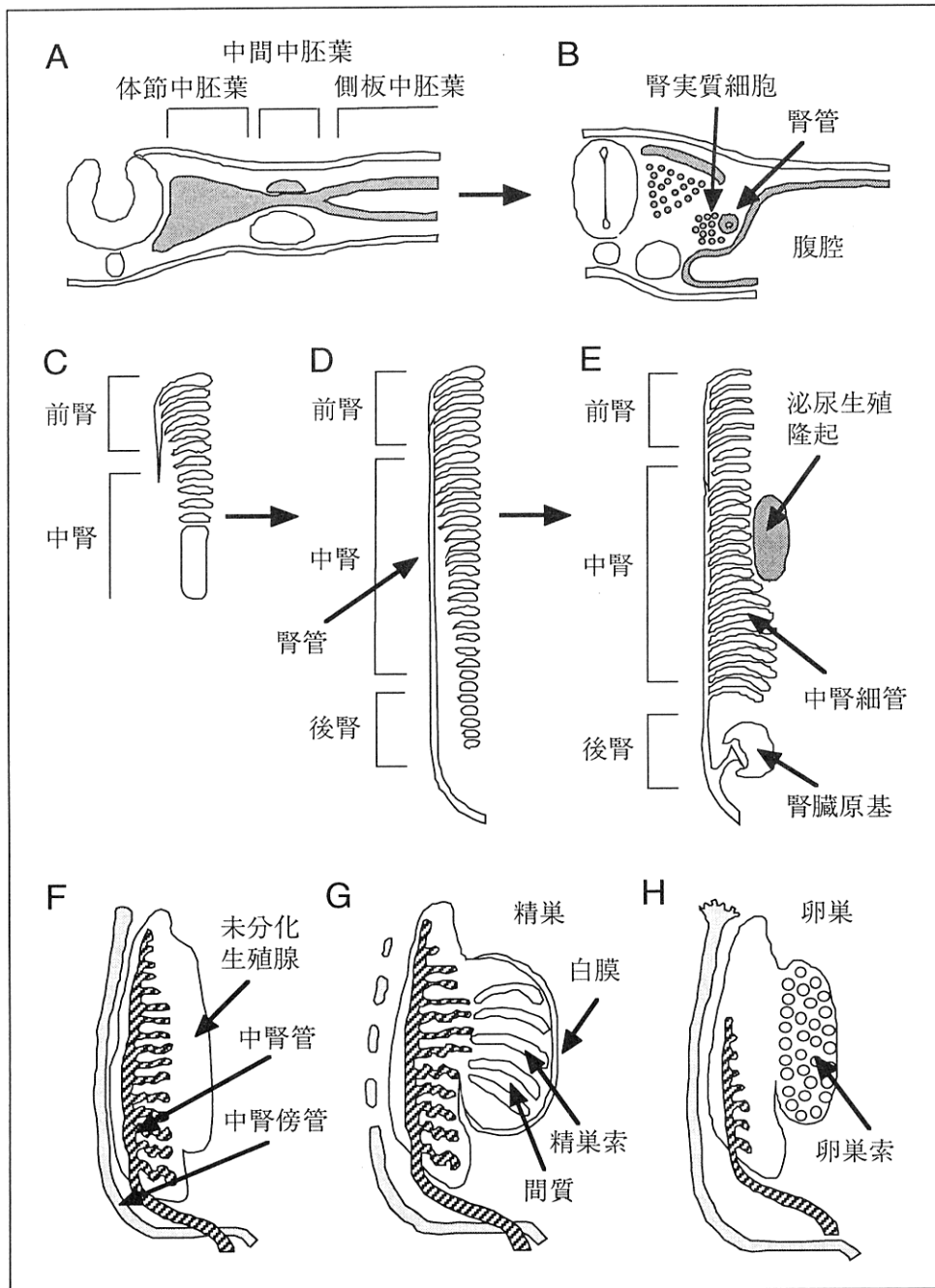


図1, 生殖腺の発生

生殖腺の原基は体節中胚葉と側板中胚葉の間に分化する中間中胚葉であることが知られている(A)。中間中胚葉領域は腎管が頭部側より形成され、その回りに腎実質細胞が存在する(B, C, D)。その後、実質細胞領域では中腎細管が形成され、一部は腎管と融合する(C, D, E)。ほぼ同じ時期に腹腔に面した中腎領域では、泌尿生殖隆起の形成が始まっており(E)、次第に増大する。この頃には中腎の側方に沿って中腎傍管が、やはり頭部側より形成される(F)。この時期の生殖隆起には性差がなく、未分化生殖と呼ばれるが(F)、すぐに性差が現れる(G, H)。

## 2, 生殖腺の分化を支える転写因子

遺伝的性決定から生殖腺の性決定を経て個体の性が確立することは既に述べてきた通りであるが、それでは遺伝的性がいかなるメカニズムのもとに生殖腺の性決定を支配しているのであろうか。1990年以降、生殖腺の分化に異常をきたす疾患の原因遺伝子の解明から *SRY* (2), *WT-1* (3), *SOX-9* (4), *DAX-1* (5) などの DNA 結合因子が性腺の分化には不可欠であることが明らかにされてきた。一方、ノックアウトマウスの解析からも *WT-1* (6), *Ad4BP/SF-1* (7, 8), *Emx-2* (9), *M33* (10) や *Lhx-9* (11) などの多くの転写因子の関与が示されている (表1)。これらの研究は、このような因子が生殖腺の構築に不可欠であることを示したが、これら因子の機能を明らかにするものではなかった。すなわち、これらの転写因子がどのような遺伝子の制御を通じ、更にはこれらの転写因子の発現がどのような機構のもとに制御されることで、生殖腺の分化を支えるのであろうかといった点に明確な答えは得られていないのである。ここではこれまでの報告をもとに各々の因子に関する情報を整理するとともに、最近明らかにされつつある転写制御の機構についてまとめてみたい。

遺伝子の名前	遺伝子の変異によって生じる泌尿生殖器系の異常	染色体
<i>SRY</i>	精巢の卵巣化	Y
<i>WT-1</i>	泌尿生殖器系全般の形成異常	11
<i>SOX-9</i>	生殖腺の形成異常	17
<i>Ad4BP/SF-1</i>	生殖腺と副腎の形成異常	9
<i>DAX-1</i>	生殖腺と副腎の形成異常	X
<i>EMX-2</i>	生殖腺と腎臓の形成異常	10
<i>DMRT-1</i>	生殖腺の形成不全, 機能異常	9
<i>LHX-9</i>	生殖腺の形成異常	1
<i>M33</i>	精巢の卵巣化	11
<i>FGF9</i>	精巢の卵巣化	13
<i>WNT4</i>	卵巣の精巢化	1

表1 上記の遺伝子異常は多くの場合複数の組織に形成異常をもたらすが、表には泌尿生殖関連の組織に付いてのみ記した。

### (1) *SRY*

性染色体上に存在する偽常染色体領域における組み替え位置のミスマッチにより、XY 個体に卵巣の形成や XX 個体に精巢の形成を誘起する疾患が知られていた。これらの患者にみられる性染色体上の組み替え領域を絞り込むことで、Y 染色体上に *SRY* 遺伝子が同定された。*SRY* の精巢決定因子としての機能は、*Sry* をトランスジーンとして有する XX のトランスジェニックマウスが精巢を分化させたことで証明された。マウスでは *Sry* は胎齢 11.5 日をピークに前後

およそ2日に渡って、生殖隆起の一部の細胞に発現する。後にこれらの細胞はセルトリ細胞へと分化することが分かってきた。SRYはHMG boxを有し塩基配列特異的にDNAに結合するが、転写調節活性を有するかは不明である。

### (2) WT-1

WT-1は泌尿生殖器に関連する部位に腫瘍の形成や、組織形成異常を呈するWilms' tumorの原因遺伝子として単離された。WT-1の発現はPax2と同様に既に中間中胚葉に認められることから、本遺伝子の変異により泌尿生殖器に異常が誘導されることは理解され得ることである。また、性分化後の精巣ではセルトリ細胞には検出されるがライデッヒ細胞には検出されない。WT-1の機能については今だ不明な点が多いが、一つにはZnフィンガー構造で塩基配列特異的に結合することで標的遺伝子の転写調節を行っていると考えられている。これまでに本因子がPax-2, TGF  $\beta$ やinhibin- $\alpha$ などの遺伝子発現を抑制すること、またミューラー管阻害因子(MIS)遺伝子の転写を活性化することが報告されている。興味深いことには、MIS遺伝子の活性化の際にはAd4BP/SF-1との間での協調的な機能発現が必要である。

### (3) SOX-9

SRYのHMG boxに類似性を示す一群のタンパク質をSOX (SRY-related HMG box)と総称する。このうちの一つ、SOX-9の変異が骨格系の異常とXY個体において生殖腺の性分化異常をきたすことが明かにされた。骨格系の異常はSOX-9による2型コラーゲン遺伝子の転写調節の異常が原因であると説明されている。性腺の分化過程におけるSOX-9の発現は泌尿生殖隆起に認められ、早い時期にその発現量には性差が現れる。他の因子に比べその性差が極めて明瞭であることから、Sry以外に本因子も生殖腺の性決定に関与する因子であると考えられている。発現分布にも特徴がありSOX-9はセルトリ細胞には発現するがライデッヒ細胞には発現が認められない。これまでに性腺の分化過程におけるSOX-9の機能については、MIS遺伝子の転写調節を行っていることが明らかにされている。この場合にもAd4BP/SF-1との協調作用が報告されている。

### (4) DAX-1

副腎低形成と下垂体性の性腺低形成を伴う疾患の原因遺伝子としてDAX-1が同定された。また本遺伝子は、遺伝子重複でXY個体に性分化異常を招く疾患の原因遺伝子(DSS; Dosage-sensitive sex reversal)の候補遺伝子としても考えられている。DSSとの関係は必ずしも明確ではないが、Dax-1を過剰発現させたマウスでは精巣の形成が抑制されるとの結果は、DAX-1がDSSの原因遺伝子であることを強く示唆するものであった(12)。DAX-1にはN末側に繰り返し配列が、そしてC末側には核内受容体に特徴的な2量体形成部位とリガンド結合部位が存在する。DAX-1の発現様式も特徴的であり、性分化以前の胎仔生

殖腺では雌で高く雄で低いといった性差を示すが、後にその差は逆転する。精巣における発現部位はセルトリ細胞とライデッヒ細胞であるが、セルトリ細胞における発現強度は精細管によって異なり、精子形成のステージに依存して増減する。卵巣における発現も *Ad4BP/SF-1* と類似する部分も多いが、黄体には検出されないし、卵胞内の顆粒層細胞は *DAX-1* の発現が不均一である (13)。

#### (5) *Ad4BP/SF-1*

*Ad4BP/SF-1* はステロイドホルモン産生に不可欠な *P450* 遺伝子の転写制御因子として同定された (14)。本因子は DNA 結合領域に Zn フィンガードメインを持つ核内受容体型転写因子であるが、そのリガンドは未だ不明である。この因子によってステロイドホルモン産生に必須な *P450* 遺伝子に加え *3 $\beta$ -HSD*, *StAR*, *MIS* 遺伝子など数多くの遺伝子が制御されることが明らかになってきた。本因子は精巣においてはセルトリ細胞とライデッヒ細胞、卵巣では卵胞膜細胞と顆粒層細胞、黄体、副腎では皮質に発現する。これらは全て中間中胚葉に由来する組織であるが、胎齢 10.5 日前後の泌尿生殖原基には *Ad4BP/SF-1* 陽性の細胞が検出される。この時点では *Ad4BP/SF-1* の発現は雌雄の間で差は認められない。しかしながら生殖腺原基の構造に性差が認められる頃には、*Ad4BP/SF-1* の発現にも性差が現われ、雄での発現が雌での発現より高くなる。

#### (6) その他の因子

以上に述べた因子以外に遺伝子破壊マウスの表現型から、その因子の生殖腺形成における重要性が明らかになったものも多い。*Emx2*, *M33*, *Lhx-9* や *DMRT-1* などがそれである。これらの因子はその構造上の特徴から遺伝子の発現調節を行っているものと考えられるが、いずれの場合においてもその標的遺伝子は不明である。発現様式が詳しく調べられているものもあり、特に *Emx2* の生殖腺における発現が雌に高く雄に低い点や、*Lhx-9* が間質に発現する点は注目すべきであろう。

### 3, 生殖腺の分化を支える細胞増殖因子

*BMP/TGF $\beta$* , *FGF*, *hedgehog*, *Wnt* などの細胞増殖因子はほとんど全ての組織形成過程で機能すると考えられる。これらは全て分泌性の蛋白質で標的細胞表面のレセプターを介して細胞内にシグナルを伝える。いずれのシグナルも最終的には転写因子の活性を調節することで遺伝子発現を制御する。これまで泌尿生殖系では特に腎臓の発生過程における細胞増殖因子の機能が詳細に調べられてきた。実際には生殖腺においても多く細胞増殖因子の発現が認められることから、細胞増殖因子の寄与が推測されていた。事実、最近になって生殖腺の発生過程においても *Wnt4* (15) と *FGF9* (16) の重要性が、遺伝子破壊マウスの表現型から明らかになった。これらの遺伝子破壊マウスでは生殖腺の性分化が揺らぐ結果となっている。先にも述べたように哺乳類の場合は精巣の分化

が卵巣の分化に先んじて進む。さて、*Wnt4* と *FGF9* 遺伝子破壊マウスの表現型であるが、前者では XX 個体の卵巣が精巣化し、後者では XY 個体の精巣が卵巣化しているとの報告がなされた。ただし、個体によってその程度は異なり、*FGF9* 遺伝子破壊マウスでは XY 個体で精巣を分化させるものから卵巣を分化させるものまで多岐に渡る。通常、胎仔精巣と卵巣は胎齢 12.5 日前後には形態的に識別することが可能となるが、このころから各種マーカー遺伝子の発現に性差が認められるようになる。例えば、*MIS* の発現がセルトリ細胞に、そしてステロイドホルモンの産生に必要な *P450* や *3βHSD* などの発現がライディッヒ細胞に検出できる。一方、卵巣においてもこれらの遺伝子は発現するが、それは出生前後のことであり、この時期の卵巣には認められない。ところが *Wnt4* 遺伝子破壊の胎仔卵巣では *MIS* や *3βHSD* の発現が検出され、逆に *FGF9* 遺伝子破壊の胎仔精巣では *MIS* や *P450* 遺伝子の発現が野生型に比べ顕著に低下していることが分かった。これらの結果は *Wnt4* や *FGF9* の発現に性差が有ることを示唆するものであるが、実際に胎仔生殖腺におけるこれらの因子の発現には性差が認められ、*Wnt4* では卵巣における発現が、*FGF9* では精巣における発現が高かったのである。

#### 4. 生殖腺の分化を考える上での今後の視点

それでは *Wnt4* や *FGF9* の発現の消失がいかにしてこのような異常を招くのであろうか？この問いには、細胞増殖因子からのシグナルがどのようなメカニズムのもとに転写因子の発現や活性調節に至るかを解き明かすことで答えなければならない。現在のところ *Wnt4* と *FGF9* からの転写調節は図 3 のように考えることが可能である。*FGF* 遺伝子破壊マウスでは雄生殖腺から *Sox9* の発現が著しく低下、もしくは消失していることが明らかにされている。このことは *FGF9* が *Sox9* の遺伝子発現を正に調節していることを示すのもであり、注目すべき点である。事実、軟骨における *Sox9* 遺伝子の転写が *FGF* によって活性化されるとの報告があることから (17)、生殖腺においても同様の制御機構が働いているものと推測出来る。この様に考えることで、セルトリ細胞では *MIS* 遺伝子の転写が *Sox9* によって調節されていることと、*FGF9* 遺伝子破壊マウスにおいて *Sox9* の発現が消失することが矛盾なく説明できる。一方、*Ad4BP/SF-1* については *Erk* によりリン酸化されることで転写活性が上昇することが知られている (18)。*Ad4BP/SF-1* はセルトリ細胞のみならずステロイドホルモンを産生するライディッヒ細胞にもその発現が認められ、*P450* や *3βHSD* 遺伝子の転写を活性化している。*FGF9* 遺伝子破壊マウスの胎仔精巣では *P450<sub>scc</sub>* の発現が顕著に低下していることから、*FGF9* からのシグナルは *Sox9* 遺伝子の転写活性化のみならず、*Ad4BP/SF-1* のリン酸化を通じて機能するものと推測することも可能ではなかろうか。

一方、*Wnt4* の機能はどのように考えればよいのであろうか？性分化前後の生殖腺における *Wnt4* の発現は雌の方が高いことと、*Wnt4* 遺伝子破壊マウスの胎

仔卵巣では MIS や 3 $\beta$ HSD が発現していることは既に述べた通りである。この表現型から正常胎仔卵巣における Wnt4 の機能は MIS や 3 $\beta$ HSD の発現を抑制していると推測される。しかしながら一般に Wnt シグナルは $\beta$ -catenin の安定化を介して標的遺伝子の転写を活性化するものと理解されていることを考えれば、Wnt4 遺伝子破壊マウスの表現型との間に矛盾が生じることとなる。この矛盾を合理的に説明しうる一つの可能性は、Wnt4 が抑制性の転写因子の発現を活性化するというものである。既に述べたように、生殖腺で発現する転写因子のうちで抑制活性を示すものは Dax-1 であることから、Wnt4 は Dax-1 遺伝子の転写を活性化すると推測される。このことは Dax-1 の発現が性分化前後の雌生殖腺に多いことから支持されるが、実際に Dax-1 遺伝子の転写が $\beta$ -catenin によって上昇することが明らかにされつつある。

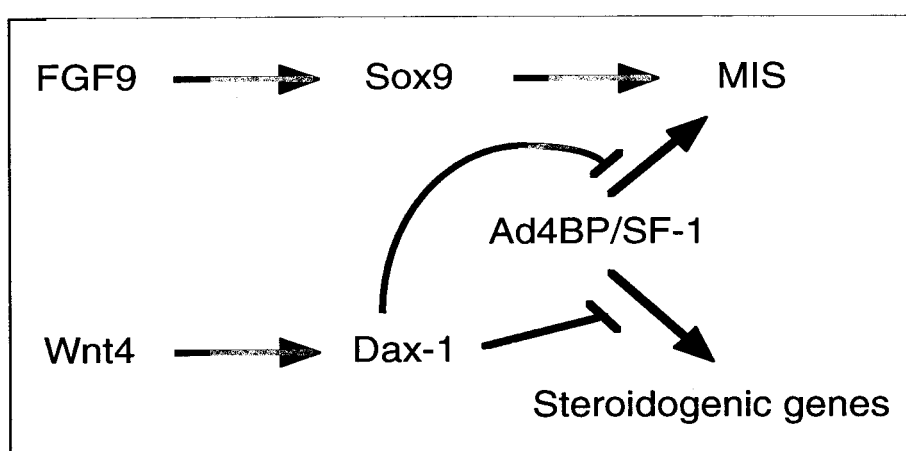


図2, 生殖腺の分化過程での細胞増殖因子による遺伝子発現調節

FGF9 と Wnt4 遺伝子破壊マウスの表現型はこれらの因子がそれぞれ Sox9 と Dax-1 遺伝子の転写を正に調節することを示すものであった。セルトリ細胞では Sox9 が Ad4BP/SF-1 とともにミューラー管阻害因子(MIS)遺伝子の転写を活性化する。FGF9 は雄胎仔生殖腺で発現するため、卵巣で MIS 遺伝子の活性化はおこらない。一方、雌胎仔生殖腺に多く発現する Wnt4 によって活性化された Dax-1 は、Ad4BP/SF-1 の転写活性に対し抑制的に働くことで、卵巣における MIS とステロイドホルモン産生に関与する P450 などの遺伝子(Steroidogenic genes)の転写を抑える。

おわりに

生殖腺形成過程での細胞増殖因子の機能が転写調節へとつながってきた。今後この方向での研究が盛んになることで、生殖腺分化を支える分子メカニズムの詳細が明らかになってゆくものと期待される。一方、このような問題とは別に重要でありながら解決の糸口がつかめない問題も残されている。一つには生殖堤の形成に対する側板中胚葉由来の細胞の関与である。泌尿生殖腺が中間中胚葉由来であることは既に述べた通りであるが、腹腔に面した生殖堤の表層に位置する細胞は、側板中胚葉由来であると考えの方が妥当である。セルトリ細胞が生殖堤表層の細胞に由来するとの報告もあり、表層の細胞と内部の実質細胞

の関係は興味深いところである。同様に中腎からも生殖堤へ細胞の移動があり、一部の間質細胞を形成することが明らかにされている。このような細胞の関与はこれまであまり注目されてこなかったが、今後に残された問題の一つであると思われる。また、本稿では哺乳類を中心に述べてきたために、生殖腺の性分化過程における性ステロイドの議論を省略した。哺乳類を除く動物種では程度の差はあるものの、性ステロイドによる性転換が報告されている。*SRY* 以外の基本となる遺伝子は、多くの動物種で同定されてきたことから、哺乳類のみが特殊な遺伝的性決定メカニズムを獲得したとは考え難い。従って、生殖腺の性分化前後に発現している性ホルモン受容体を通じて、性ホルモンが何らかの機能を果たしていると考えの方が妥当であろう？ 本稿では十分には議論し得なかったが、「性の分化」を遺伝的性決定から生殖腺の性決定を経た、個体全体の性決定として捕らえることが、今後の研究では欠かせない視点である。

#### 参考文献

- 1, Morohashi K. The ontogenesis of the steroidogenic tissues. *Genes to Cells* 2, 95-106 (1997)
- 2, Sinclair AH, Berta P, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346, 240-244. (1990)
- 3, Call KM, Glaser T, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60, 509-520. (1990)
- 4, Wagner T, Wirth J, et al. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the *SRY*-related gene *SOX9*. *Cell* 79, 1111-1120. (1994)
- 5, Zanaria E, Muscatelli F, et al. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 372, 635-641 (1994)
- 6, Kreidberg JA, Sariola H, et al. *WT-1* is required for early kidney development. *Cell* 74, 679-691 (1993)
- 7, Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77, 481-490. (1994)
- 8, Shinoda K, Lei H, et al. Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the *ftz-F1* disrupted mice. *Dev. Dynam.* 204, 22-29 (1995)
- 9, Miyamoto N, Yoshida M, et al.: Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development* 124, 1653-1664 (1997)
- 10, Katoh-Fukui Y, Tsuchiya R et al.: Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature* 393, 688-692.
- 11, Brik OS, Casiano DE, et al.: The IM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation. *Nature* 403, 909-913 (2000)
- 12, Swain A, Narvaez V, et al.: *Dax-1* antagonizes *Sry* action in mammalian sex determination. *Nature* 391, 761-767 (1998)
- 13, Kawabe K, Shikayama T, et al.: *Dax-1* as One of the Target Genes of Ad4BP/SF-1. *Mol. Endocrinol.* 13, 1267-1284 (1999)
- 14, Morohashi K, Omura T: Ad4BP/SF-1, a Transcription Factor, Essential for the Transcription of Steroidogenic Cytochrome P450 Genes and for the Establishment of the Reproductive Function. *FASEB J.* 10, 1569-1577 (1996)
- 15, Vainio S, Heikkila M, et al. Female development in mammals regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397, 405-409 (1999)
- 16, Colvin JS, Green RP, et al. Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell* 104, 875-889 (2001)
- 17, Murakami S, Kan M, et al. Up-regulation of the chondrogenic *sox9* gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1113-1118 (2000)
- 18, Hammer GD, Krylova I, et al. Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: Integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol Cell* 3, 51-526 (1999)