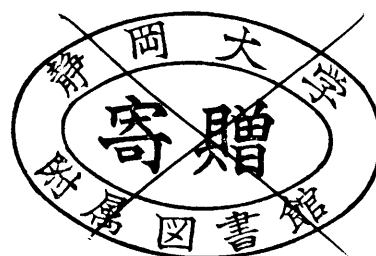


理工学研究科高材	GD
	K
0001507417 R	280
静岡大学附属図書館	

静岡大学 博士論文

マウスの始原生殖細胞欠損遺伝子
teratoma (*ter*) の発生遺伝学的解析



2001年5月

大学院理工学研究科
環境科学専攻

高林 秀次

目次

	頁
I. 要旨	・ ・ 1
II. 略語	・ ・ 3
III. 序論	・ ・ 5
IV. 材料と方法	・ ・ 11
V. 結果	・ ・ 27
—1. PGC と体細胞の“交換共培養系”を用いた <i>ter</i> 遺伝子の機能解析	・ ・ 27
—2. 胎仔生殖巣体細胞の培養上清 (CM) を用いた <i>ter</i> 遺伝子発現の解析	・ ・ 38
—3. cDNAサブトラクションライブラリーによる+/+精巣で特異的に発現する <i>ter</i> 関連遺伝子の探索	・ ・ 57
VI. 考察	・ ・ 69
VII. 謝辞	・ ・ 77
VIII. 参考文献	・ ・ 78

1. 要旨

始原生殖細胞 (PGC) は雌雄配偶子の起源細胞である。マウスの PGC は胎齢 7 日頃約 30 個のアルカリ性ホスファターゼ陽性細胞として胚体外中胚葉に出現し、9.5 日では後腸・腸間膜を移動し、11.5 日に生殖隆起へ達する。12.5 日で精巣と卵巣の性分化が始まり、この間 PGC は約 1 万個にまで増加する。PGC の移動、増殖、生存及び分化は周囲の体細胞から産生される種々の因子により制御される。しかし、PGC に関わるこれらの分子機構は今なお未解決である。

本研究では、マウスの *ter/ter* 雌雄に PGC 欠損を引き起こす第 18 番染色体に位置する劣性自然突然変異 *teratoma (ter)* に注目し、PGC の増殖と生存に関わる *ter* 遺伝子の機能を発生遺伝学的に解析した。

129/Sv-*+/ter* 系で発見された *ter* 遺伝子を LTXBJ 系へ戻し交配法で導入し樹立された *ter* コンジェニック系 LTXBJ-*+/ter* には、3 種の遺伝子型 (*+/+*、*+/ter* 及び *ter/ter*) が混在する。各遺伝子型は *ter* 遺伝子に連鎖するマイクロサテライト DNA の PCR 増幅産物の系統間多型から推定される。*+/+* 及び *+/ter* (以後 *+/-*) 型マウスは妊性をもつが、*ter/ter* 雌雄は PGC が増殖を開始する発生初期から PGC を欠損し、矮小生殖巣となる。*ter/ter* 胎仔精巣の体細胞と *+/-* PGC から作製した再構成精巣では生殖細胞が死滅したことから、*ter/ter* 体細胞の欠陥が PGC 欠損の原因と示唆された。これらの知見を元に行った本研究の成果をまとめた。

第 1 として、*ter/ter* PGC 自体の増殖能や生存能及び PGC 欠損を引き起こす *ter/ter* 体細胞と PGC との細胞間相互関係を明らかにするために、LTXBJ-*+/ter* 系 9.5 及び 11.5 日胚から分離した PGC と胎仔精巣の体細胞を *ter* 遺伝子型を組み換えてフィーダー細胞上で“交換共培養”した。その結果、*+/-* 体細胞と共培養した *ter/ter* PGC は *+/-* PGC と同様に正常に DNA を合成し、増殖し、生存したが、*ter/ter* 体細胞上では PGC は *ter* 遺伝子型によらず DNA 合成はしたもののアポトーシスを起こし、その数は減少した。どの培養系でも PGC は共培養されたセルトリ細胞と判定された体細胞と接触し、PGC の生存を支持する *+/-* 型体細胞の膜結合型因子が存在する可能性が示唆された。

第 2 として、胎仔生殖巣の体細胞は *ter* 遺伝子に関連した液性因子を産生するかを明らかにするため、LTXBJ-*+/ter* 系胎仔精巣及び卵巣の体細胞の培養上清 (CM) を、クローズドコロニー ICR マウス 9.5 及び 11.5 日胎仔の PGC と体細胞の“混合培養系”に添加した。その結果、由来によらず *+/-* 型 CM (20%) は PGC 数を増加させ、*ter/ter*

型 CM は PGC のアポトーシスを引き起こした。いずれの CM も PGC の DNA 合成を阻害しなかった。+/- 型 CM は *ter/ter* 型 CM には無い PGC の生存を支持する成分を含んでいた。CM を産生する体細胞の種類や増殖速度には *ter* 遺伝子型による差は無かった。次に、体細胞や PGC に対する既知の増殖因子と *ter* 遺伝子との関係を明らかにするために、LTXBJ-+/*ter* 系胎仔、幼若仔及び成体マウスの精巣における増殖因子 SCF、TGF β 1、bFGF、IL-4、OSM 及び NRG β またそれらの受容体 c-Kit と gp130 の発現を免疫組織学的及び RT-PCR 法により解析した。その結果、+/+ 及び *ter/ter* 精巣いずれに於いてもこれら因子の発現パターンや mRNA 量にも違いはないことから、*ter* 遺伝子はこれら増殖因子とは独立に作用している可能性が示された。

第 3 として、*ter* 遺伝子及びその関連遺伝子を同定するために、12.5 日胎仔及び生後 7 日幼若仔の+/+ 精巣 cDNA から *ter/ter* 精巣 cDNA を差し引いた cDNA サブトラクションライブラリーを作製し、塩基配列を決定した。更に、マクロアレイにより+/+ 精巣で強く発現している遺伝子を調べた結果、*ter* 関連の候補遺伝子が複数同定された。

本研究から得られた主な結論は、(1) +/- 胎仔生殖巣の体細胞は *ter* 遺伝子座にコードされた膜結合型と液性型の成分からなる新規 PGC 増殖因子 (TERF と命名) を産生し、PGC の生存を支持する。(2) *ter/ter* 体細胞は、その因子を欠くため PGC のアポトーシスを抑制することができずに死滅させるものの、種々の既知の増殖因子は産生する。(3) *ter/ter* PGC 自体は正常な増殖能や生存能を所持し、体細胞との細胞間相互作用を行う。本研究は *ter* 遺伝子座の遺伝子がマウスの発生初期から PGC のアポトーシスを抑える役割を担っていることを初めて明らかにしたものである。

II. 略語

ActR:	activin receptor ; アクチビン受容体
AP:	alkaline phosphatase ; アルカリ性ホスファターゼ
B6:	C57BL/ 6J
Bax:	Bcl-2- associated X protein
bFGF:	basic fibroblast growth factor ; 塩基性繊維芽細胞増殖因子
BMP:	bone morphogenetic protein ; 骨形成因子
bp:	base pairs ; 塩基対
BrdU:	5-bromo-2'-deoxyuridine ; ブロモデオキシウリジン
BRL:	buffalo rat liver ; バッファローラット肝臓
BSA	bovine serum albumin ; ウシ血清アルブミン
cm:	centimorgan ; センチモルガン
CM:	conditioned medium ; 培養上清
DAB:	3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride ; 3-3'ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリド
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle medium ; ダルベッコ改変イーグル培地
dNTP:	deoxyribonucleoside triphosphates
EDTA:	ethylenediamine tetraacetic acid
ESM:	embryonic stem cell medium ; 胚性幹細胞用培地
EST:	expressed sequence tag ; 発現タグ配列
FBS:	fetal bovine serum ; 牛胎仔血清
FRSK:	forskolin ; フォルスコリン
Gas6:	growth arrest-specific gene 6
GAPDH:	glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
<i>Grl1</i> :	glucocorticoid receptor-1 ; グルココルチコイド受容体1
H-E-A:	hematoxylin-eosin-alcian blue ; ヘマトキシリン-エオシン-アルシアンブルー
HMC:	Hoffman modulation contrast ; ホフマンモジュレーションコンストラクト
IL-4:	interleukin-4 ; インターロイキン4
IL-11:	interleukin-11 ; インターロイキン11
JAK:	Janus kinase
kDa:	kilodalton
Kif5b:	kinesin family member 5B
LIF:	leukemia inhibitory factor ; 白血病抑制因子
MEM	minimum essential medium
Mvh:	mouse vasa homologue

Nr3c1:	nuclear receptor 3 group c number 1
NRG β :	Neuregulin β ; ニューレグリン
OS-CM:	ovarian somatic cells conditioned medium ; 卵巣体細胞培養上清
OSM:	oncostatin M ; オンコスタチンM
PACAP:	pituitary adenylate cyclase activating polypeptide ; 下垂体アデニル酸活性化ポリペプチド
PBS:	phosphate buffered saline
PCR:	polymerase chain reaction
PGC:	primordial germ cell ; 始原生殖細胞
PI3K:	phosphatidylinositol 3 kinase
PLC γ :	phospholipase C γ
RA:	retinoic acid ; レチノイン酸
RRM:	RNA recognition motif
RT-PCR:	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SCF:	stem cell factor ; 幹細胞因子
sky:	c-Sea related protein kinase for tyrosine
<i>Sl</i> :	<i>Steel</i>
SSLP:	simple sequence length polymorphism
STAT:	signal transducer and activator of transcription family
T β R:	transforming growth factor β receptor ; トランスフォーミング増殖因子受容体
TdT:	terminal deoxynucleotidyl transferase ; ターミナルデオキシトランスフェラーゼ
<i>ter</i> :	teratoma ; テラトーマ
TERF:	TER Factor
TGF β 1:	transforming growth factor β 1 ; トランスフォーミング増殖因子 β 1
TNF α :	tumor necrosis factor α ; 腫瘍壊死因子 α
TS-CM:	testicular somatic cells conditioned medium ; 精巣体細胞培養上清
TUNEL:	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling
W:	dominant white spotting
WT1:	Wilms' tumor 1 ; ウィルムス腫瘍

III. 序論

生殖細胞は雌雄配偶子に分化し、体細胞とは異なり、遺伝情報を次世代に伝達する細胞である。生殖細胞の研究にはショウジョウバエ、アフリカツメガエル、ニワトリ及びマウスが広く用いられてきた。生殖細胞の発生過程にはこれら生物種において多くの共通点がある。その代表的な過程には生殖細胞の形成或いは出現、移動、増殖、生存及び配偶子への分化がある。特にショウジョウバエにおいてこの発生過程に関わる因子の研究が進んでいる。ショウジョウバエの生殖細胞形成機構に関しては卵母細胞後極の極細胞質（或いは生殖質）を含む領域が受精後、核の進入により極細胞を形成し、これが後に生殖細胞へと分化することが知られている (Campos-Ortega and Hartenstein, 1985)。即ち、生殖細胞になりうる細胞質領域は卵形成期に既に決定されている。極細胞中には生殖細胞形成過程を制御する母性因子が局在する (Illmensee and Mahowald, 1974)。oskar、vasa 及び tudor 遺伝子の産物が極細胞質中に存在し、極細胞の形成に重要な働きをしている (Ephrussi and Lehmann, 1992)。しかし、極細胞が正常に形成されても、極細胞の分化に関わる因子がなければ生殖細胞は形成されない。この分化を制御する因子として nanos 遺伝子産物が同定されている (Kobayashi *et al.*, 1996)。また、Nanos 蛋白質は極細胞の生殖巣への移動も制御している (Kobayashi *et al.*, 1996)。一方、マウスではショウジョウバエやアフリカツメガエルにみられる生殖質に類似するものは確認されていない。マウスにおいて生殖細胞の前駆細胞である始原生殖細胞 (PGC) は受精後 6 日頃の卵筒期の原始外胚葉の上端部に位置する細胞から分化する (Yoshimizu *et al.*, 2001)。これらの細胞は胚体外外胚葉からの BMP4 及び BMP8B のシグナルにより体細胞とは異なる PGC へと分化することが運命づけられる (Lawson and Hage, 1994; Lawson *et al.*, 1999; Ying *et al.*, 2000)。その後、PGC は胎齢 7.25 日頃の胚体外中胚葉域に数個のアルカリ性ホスファターゼ (AP) の陽性細胞集団として検出される (Ginsburg *et al.*, 1990)。出現部位から移動を開始した直後の PGC は胎齢 8.5 日では約 100 個程度が尿嚢基部に分布し、平均して 16 時間に 1 回の分裂を繰り返し、胎齢 9.5 日から 10.5 日では後腸・腸間膜を通過して移動しながら増殖し、胎齢 11.5 日で生殖隆起に到達し、胎齢 12.5 日には生殖巣の性分化が起こり、胎齢 13.5 日には約 25,000 個にまで増える (Tam and Snow, 1981)。その後、PGC は増殖を止め、雄の精巣では有糸分裂の休止期に入り、生後 7 日頃に有糸分裂を再開する。PGC から分化した精原細胞が生殖幹細胞として分裂を繰り返し、その一部は精子形成過程を経て精子へと分化する。雌の卵巣では PGC から分

化した卵原細胞が増殖を停止し、第一減数分裂期に入り、生後、卵形成過程を経て卵へと分化する。マウスの PGC の移動、増殖、生存及びアポトーシスといった PGC の発生過程を調節する分子機構については近年多くの知見が得られており、これら発生過程には生殖細胞とその環境をなす周囲体細胞（精巣ではセルトリ細胞及び卵巣では卵細胞）との相互作用が重要であるが、発生初期の PGC- 体細胞の相互作用はまだ十分に解明されていない。

マウスの胎齢 8.5-11.5 日胚から単離した移動及び増殖期にある PGC を STO 細胞 (Donovan *et al.*, 1986)、TM4 細胞 (De Felici and Dolci, 1991)、SI/ SI4- m220 細胞 (Matsui *et al.*, 1991) 及び ST2 細胞 (Uchida *et al.*, 1995) など適当なフィーダー細胞上で培養すると数日間は増殖し、生存する。これらのフィーダー上では、胎齢 9.5 日の後腸・腸間膜から単離した PGC は 3 日間、胎齢 11.5 日の生殖隆起から単離した PGC では 1 日間、それぞれ増殖し、以後増殖を停止する。このことは生体内における PGC の発生段階による増殖サイクルが培養系で再現されることを示す。

このような PGC の培養系を用いて解析された PGC の発生過程に関わる増殖因子等を表 1 にまとめた。これらのうち生殖巣で発現が確認されているものがいくつか明らかになっており、その代表的なものに幹細胞因子 (SCF) がある。SCF は PGC の生存を助ける増殖因子で PGC のアポトーシスを抑えている (De Felici and Dolci, 1991; Dolci *et al.*, 1991 ; Godin *et al.*, 1991; Matsui *et al.*, 1991; Pesce *et al.*, 1993)。SCF は第 10 番染色体の Steel (*Sl*) 遺伝子座にコードされ、PGC の周囲の体細胞から分泌される。これに対する受容体は第 5 番染色体の dominant white spotting (*W*) 遺伝子座にコードされている c-kit というレセプター型チロシンキナーゼで、PGC において発現している (Geissler *et al.*, 1988; Copeland *et al.*, 1990; Matsui *et al.*, 1990)。*Sl* 及び *W* の突然変異マウスはそれぞれ生殖細胞を欠損する。この事実はこれらが生殖細胞の生存にとって必須であることを示している。しかし、これら変異マウスは生殖細胞欠損とともに血球系、色素細胞等にも異常が見られる。

現在までに多数の因子が報告されているが、これら因子を培養系に添加しても PGC の長期間の生存は維持できない。また、これら因子の機能を欠損させたノックアウトマウス及び突然変異マウスの中に PGC 欠損を引き起こさせるものは SCF だけであり、生殖細胞のみに働く因子は報告されていない。

私が本研究で着目した teratoma (*ter*) は PGC 欠損をおこす突然変異遺伝子である (Noguchi and Noguchi, 1985)。この *ter* 遺伝子の機能を解析することは PGC の増殖及び生存の機構の解明に役立つと考えられる。*ter* 遺伝子は、精巣性テラトーマ高発

表1：増殖因子及びそのレセプター

マウスにおいて遺伝子がマップされている因子についてはその染色体番号を示している。

因子	マウス 染色体	受容体と シグナル伝達因子	PGCへの効果	参考文献
SCF	10番	c-kit PLC γ 、PI3K	生存	Dolci <i>et al.</i> ,1991
LIF	11番	LIFR+gp130 JAK、STAT3	生存	De Felici <i>et al.</i> , 1991
TGF β 1	7番	T β R- I, II SMAD	移動・ 増殖抑制	Godin <i>et al.</i> . 1991
bFGF	3番	FGFR PLC γ	増殖	Matsui <i>et al.</i> , 1992
TNF α	17番	TR55 PKC	増殖	Kawase <i>et al.</i> , 1991
IL-4	11番	IL4R $\alpha \gamma c$ JAK、STAT6	増殖	Cooke <i>et al.</i> , 1994
RA	-	RAR cAMP	増殖	Koshimizu <i>et al.</i> , 1995
PACAP	-	PACAPR cAMP	増殖	Pesce <i>et al.</i> , 1996
OSM	11番	OSMR+gp130 JAK、STAT3	生存	Cheng <i>et al.</i> , 1996
IL-11	7番	IL11R+gp130 JAK、STAT3	生存	Koshimizu <i>et al.</i> , 1996
Gas6	8番	sky PI3K	生存	Matsubara <i>et al.</i> , 1996
NRG β	-	ErbB3 PLC γ	生存	Toyoda-Ohno <i>et al.</i> , 1999
Activin	β A13番 β B1番	ActR- I, II	増殖抑制	Richards <i>et al.</i> , 1999

系統 129/Sv-+/ter (Stevens, 1973) から、雌雄の生殖細胞の欠損を引き起こすとともに、雄性の PGC を起源とする精巢性テラトーマの高発性に関する単一劣性突然変異遺伝子として見いだされた (Noguchi and Noguchi, 1985)。さらに、129/Sv-+/ter 系統から、C57BL/6J (B6) 及び LTXBJ 系統に ter 遺伝子を交配導入した ter コンジェニック系統 C57BL/6J-+/ter (B6-+/ter) 及び LTXBJ-+/ter が樹立されている (Noguchi et al., 1996)。ter コンジェニック系統において、+/+ 型及び+/ter 型生殖巣で生殖細胞は正常に増殖分化するが、ter/ter 型生殖巣は雌雄とも生殖細胞欠損が起きる。また、ter/ter 雄は精巢性テラトーマを自然発症しない。これにより、生殖細胞欠損と精巢性テラトーマの形成という二つの現象が分離され、ter 遺伝子が単一で ter/ter 胚における PGC 欠損を起こす遺伝子であることが明らかにされた。

ter 遺伝子は、第 18 番染色体上のグルココルチコイドレセプター 1 (*Gr11*) 遺伝子座の極近傍に位置する (B6-+/ter 系統においては組み換え率 2%) (Sakurai et al., 1994)。マウスでは染色体上にマップされた各種のマイクロサテライト DNA の PCR 増幅より生じる多型 simple sequence length polymorphism (SSLP) には系統間で多型が存在する (Dietrich et al., 1992)。*Gr11* 遺伝子のマイクロサテライト DNA (*D18Mit17*) の SSLP を用いると ter コンジェニック系統の胚や個体の+/+、+/ter 及び ter/ter 遺伝子型を数時間で判定でき、この方法が ter 遺伝子型の判定のついた胎仔を用いて、ter 遺伝子の機能を解析することを可能にした (Sakurai et al., 1995)。この方法を用いて、B6-+/ter 系の+/+ 及び+/ter 胚の PGC は、他の種々の近交系と同様に増殖し、胎齢 8.0 日では約 50 個あった PGC が胎齢 11.5 日では約 1,400 個に達する。一方、ter/ter 胚においては PGC の出現期の胎齢 7.0 日は正常であるが、胎齢 8.0 日で約 20 個と減少し、極少数しかない PGC は正常な移動経路を通り、胎齢 11.5 日で生殖隆起に到達する。性分化が起こり形態的に雌雄の生殖巣の区別が可能な胎齢 12.5 日まで PGC は僅かに残り、その数は約 100 個である。PGC は胎齢 13.5 日以降、精巢において出生前に完全に欠失し、精巢は矮小となり、ter/ter 雄マウスは不妊となる。雌では僅かに妊性を持つ (Sakurai et al., 1995; Noguchi et al., 1996)。この特徴は本研究で用いた LTXBJ-+/ter 系においても同様である (Noguchi et al., 1996)。ter 遺伝子は W 遺伝子より早い時期から働くことも示された (Sakurai et al., 1995)。

次に ter 遺伝子による PGC 欠損の機構を解明するため、Noguchi et al. (1995) は B6-+/ter の胎齢 8.0 日の PGC を含む部域を解離し、SI/SI4-m220 フィーダー細胞を用いた培養系で培養した結果、+/+ 及び+/ter 胚の PGC は培養 3 日間増殖するが、ter/ter 胚の PGC は増殖障害を示した。これにより、ter 遺伝子による PGC 増殖障害

が *in vitro* で再現された。既知の増殖因子 SCF、LIF、FRSK、TNF α 及び bFGF を添加しても *ter/ter* 胚の PGC 欠損は回復されなかった。

さらに Noguchi *et al.* (1997) はこのような *ter* 遺伝子による PGC 欠損は *ter/ter* マウスの全身的な血流を介した内分泌的な異常ではなく *ter/ter* 精巣の精細管内部に原因があることを LTXBJ-*+/ter* 系の胎仔精巣の移植実験で示した。そこで *ter* 変異体の PGC 欠損が PGC の周囲の体細胞により引き起こされるのかを解明するために分裂休止期前後の正常な (*+/+*) 胎齢 13.5 日の生殖細胞を自身の体細胞或いは *ter/ter* 体細胞で組み換えた再構成精巣を作出した。この結果、*ter/ter* 体細胞と *+/+* PGC とで作製した再構成精細管内では PGC は精原細胞として休止期から分裂再開はするものの、その後の精子形成過程において欠失した (Noguchi *et al.*, 1997)。このことから、*ter* 遺伝子による生殖細胞欠損は少なくとも精巣体細胞に原因があり、M 期には作用せず G1 期に障害を起こすことが示唆された。しかし、再構成精巣を作製するためには *ter/ter* PGC は少数しかとれないため、*ter/ter* PGC 自体の増殖能や生存能の解析は行われていなかった。また、*ter/ter* 精細管を構成するセルトリ細胞等の体細胞が PGC 欠損を引き起こす際の PGC と体細胞の相互作用、即ち、直接細胞間接触を要するか、或いは液性成分を介するか等、*ter* 遺伝子産物に関わる問題点は未解決であった。

本研究では、はじめに、少数の PGC の解析に適した PGC と体細胞の共培養系を用いて *ter/ter* PGC 自体は正常な生存能及び増殖能を持つか、また、*ter/ter* 体細胞が PGC と接触を介して作用するか否かを明らかにすることを目的とした。従来、PGC の培養は普通マウス系統の PGC とそれを含む周囲の体細胞を解離し、同時に適当なフィーダー細胞上にまいて種々の因子を添加してその効果を調べた報告がほとんどである。本研究では PGC と周囲体細胞を分離して、PGC と体細胞の *ter* 遺伝子型を組み換え、それぞれの PGC と体細胞を直接接触させて、膜結合型 SCF を産生する SI/SI4-m220 フィーダー細胞上で他の因子は加えずに培養した。これを“交換共培養”系と呼ぶ。

マウスでは胎齢 9.5 日の PGC は増殖期にあるため、数日間は培養可能であり、増殖能をみることができる (Godin *et al.*, 1991)、また、胎齢 11.5 日生殖隆起の PGC は 2、3 日後には休止期に入るため増殖能をみるには適さないが、*in vitro* では生存能をみることができる (Dolici *et al.*, 1993; Cheng *et al.*, 1994)。増殖因子には分泌型と膜結合型が知られているので、ここでは分泌型の効果を除くために、培養時間に注意した。単離した胎齢 9.5 日の *ter/ter* PGC を単離した胎齢 12.5 日 *+/+* 体細胞上で培養し、*ter/ter* PGC の生存能及び増殖能を解析した。次に単離した胎齢 11.5 日 *+/+* PGC を *+/+* 及び *ter/ter* 体細胞上で共培養し、さらに、逆の組み合わせで単離した胎齢 11.5

H *ter/ter* PGC を+/+ 及び *ter/ter* 体細胞上で培養し、各 *ter* 遺伝子型 PGC の生存能及び体細胞と PGC の接着の効果について解析した。

次に、生殖巣体細胞は *ter* 遺伝子に関連する液性因子を分泌しているのか、また、*ter/ter* 精巣体細胞は既知の PGC に対する増殖因子とどのような関係にあるかを解析した。まず、LTXBJ-+/*ter* 系胎仔生殖巣体細胞の培養上清 (CM) を得て、これを ICR マウスの増殖能の強い胎齢 9.5 日及び生殖隆起に移入した胎齢 11.5 日の PGC を含む部域の PGC 培養系に添加し、生殖巣体細胞が分泌する *ter* 遺伝子に関わる液性成分の効果解析した。既知の PGC に対する増殖因子について+/+ 及び *ter/ter* 精巣での発現を免疫染色または RT-PCR を用いて解析した。

最後に、*ter* 遺伝子或いは *ter* 遺伝子に関連する遺伝子の同定を目指し、+/+ 及び *ter/ter* 精巣から mRNA を抽出し、両者の cDNA を引き算して、cDNA サブトラクションライブラリーを作製した。

本論文では、生殖細胞と体細胞の相互作用及び *ter* 遺伝子に関連する PGC のアポトーシスを抑制する体細胞の産生する膜結合型及び分泌型の新規増殖因子 (TER factor (TERF) と命名) の可能性が示された。

IV. 材料と方法

IV-1. マウス

実験に使用したマウスは *ter* コンジェニック系 LTXBJ-*+/ter* 及びクローズドコロニー Slc:ICR を用いた。LTXBJ-*+/ter* 系は 129/Sv-*+/ter* 系統から LTXBJ 系統に *ter* 遺伝子を交配導入し、戻し交配を繰り返して樹立されたので (Noguchi *et al.*, 1996)、戻し交配が 25 世代以上進んだマウスを実験に用いた。LTXBJ-*+/ter* 系統の *ter* 遺伝子型を検定交配法と SSLP 法 (後述) により判定し、*+/ter* 同士の交配から *+/+*、*+/ter* 及び *ter/ter* 胎仔及び成体マウスを得た。Slc:ICR は日本エスエルシー株式会社から購入したものを適宜繁殖させて用いた。

マウスの胎齢は臍栓を確認した日の正午を胎齢 0.5 日とした。

IV-2. 溶液

溶液はすべて超純水 Nanopure II (Barnstead) を用いて調製した。培養用に用いた DMEM、ESM 及びダルベッコ PBS (-) は孔径 0.22 μm のミリポアフィルター (Millipore) を用いて、加圧濾過滅菌後使用した。

1. SSLP 反応液

1 検体分の組成は次の通りである。

1.25 mM dNTP 混合溶液	4.0 μl
$\times 10$ PCR 反応緩衝液	5.0 μl
<i>D18Mit17</i> (Research Genetics)	
フォワードプライマー	0.25 μl
リバースプライマー	0.25 μl
<i>Taq</i> DNA ポリメラーゼ (日本ジーン)	0.10 μl
超純水	15.00 μl

2. ブアン液 (Bouin's fixative)

飽和ピクリン酸水溶液	150 ml
ホルマリン	50 ml
酢酸	10 ml

3. 牛胎仔血清 (fetal bovine serum ; FBS)

FBS (Moregate) は 56°C で 30 分間、補体を非働化した後、分注し、-20°C で保存し、

使用した。

4. 高グルコースダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium ; DMEM)

pH は 7.38-7.40 に合わせた。1 l の組成は以下の通りである。

DMEM (Gibco)	13.50 g
HEPES (Sigma)	3.57 g
NaHCO ₃	3.70 g
ストレプトマイシン (明治製菓)	0.10 g
ペニシリン (明治製菓)	100 unit

5. DMEM (10)

SI/ SI4- m220 細胞の培養の際に用いた。この溶液の 100 ml の組成は次の通りである。

DMEM	90 ml
FBS	10 ml

6. 塩基溶液

100 ml の組成は以下の通りである。37°C に温めて溶解し、-20°C で保存した。

ヌクレオチド溶液からチミジンを除いたヌクレオチド溶液 (-T) を BrdU の取り込みに用いた。

アデノシン (Sigma)	0.080 g
シトシン (Sigma)	0.073 g
グアノシン (Sigma)	0.073 g
チミジン (Sigma)	0.085 g
ウリジン (Sigma)	0.024 g

7. 胚性幹細胞培地 (ESM) (10) * 及び ESM (20) **

CM 回収用の生殖巣の培養には ESM (20) を、PGC 培養には ESM (10) を用いた。

* は ESM (10) の組成を示し、** は ESM (20) の組成を示している。

DMEM	90.0 ml *
------	-----------

DMEM	80.0 ml **
FBS	10.0 ml *
FBS	20.0 ml **
10m M MEM非必須アミノ酸溶液 (Gibco)	0.5 ml
ヌクレオチド溶液	1.0 ml

8. ダルベッコ PBS (-)

胎仔の摘出、生殖巣のトリミング及びフィーダー細胞の洗浄の際に用いた。この溶液の1 lの組成は次の通りである。

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.9 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g

9. PBS

免疫染色の洗浄の際に用いた。1 lの組成は次の通りである。

NaCl	8.00 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	3.20 g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0.09 g

10. マイトマイシン C 溶液

フィーダー細胞の調製の際に用いた。以下の組成でストック液を作り、500 μl ずつ分注し、-20℃で保存した。DMEM(10)で最終濃度 5 μg/ml に希釈して使用した。

マイトマイシンC (Sigma)	2 mg
滅菌水	10 ml

IV -3. プライマー

SSLP 及び RT-PCR に用いたプライマーの配列を表 2 に示す。

IV -4. 抗体

培養細胞及び組織切片の免疫染色に用いた抗体を表 3 に示す。

表2：プライマー

遺伝子	Forwardプライマー (5'-3')	Reverseプライマー (5'-3')	PCR産物	参考文献
<i>D18Mit17 (Gr11)</i>	TCAGGCAGATTCCAAGCAG	CTGTGGGTAGCCCAAGTCAT	190-214bp	Sakurai <i>et al.</i> , (1996)
<i>GAPDH</i>	CGTGGAGTCTACTGGTGTCTTCACC	GATGGCATGGACTGTGGTCATGAGC	259bp	Wysolmerski <i>et al.</i> , (1995)
<i>SCF</i>	GAGCTCCAGAACAGCTAAACGGAGTCC	CGTCCACAATTACACCTCTTGAAATTCTCTCTC	816bp	Rossi <i>et al.</i> , (1993)
<i>LIF</i>	GGCAACCTCATGAACCAGATCA	GCAAAGCACATTGCTGAGGAGG	318bp	Wang <i>et al.</i> , (1996)
<i>TGFβ1</i>	CTCCACGTGGAAATCAACGGGATC	GCTGACCTTGCAGGAGCGCACAAAT	477bp	Szilvassy <i>et al.</i> , (1996)
<i>bFGF</i>	AAGCGGCTCTACTGCAAGAACG	TTCTGTCCAGGTCCCGTTTTGG	344bp	Leonard <i>et al.</i> , (1993)

表3；抗体

抗体	一次抗体 の希釈率	購入先 及び入手先	二次抗体	二次抗体の標識
抗4C9	100倍	Dr. T. Muramatsu	ラットIgG	ビオチン
抗BrdU	100倍	Amersham	マウスIgG	ペルオキシダーゼ
抗WT1	100倍	Dr. T. Akiyama	ラビットIgG	ビオチン
抗SCF	100倍	Santa Cruz (sc-1303)	ヤギIgG	ビオチン
抗LIF	50倍	Santa Cruz (sc-1336)	ヤギIgG	ビオチン
抗TGF β 1	100倍	Santa Cruz (sc-146)	ラビットIgG	ビオチン
抗bFGF	200倍	Santa Cruz (sc-79-G)	ヤギIgG	ビオチン
抗TNF α	50倍	Santa Cruz (sc-1351)	ヤギIgG	ビオチン
抗IL-4	100倍	Santa Cruz (sc-1260)	ヤギIgG	ビオチン
抗OSM	50倍	Santa Cruz (sc-5488)	ヤギIgG	ビオチン
抗NRG β	50倍	Santa Cruz (sc-1793)	ヤギIgG	ビオチン

二次抗体のマウスIgGはAmersham社から購入した。

残りのものはすべてVector社から購入した。

IV -5. *ter* 遺伝子型の決定

LTXBJ-+/*ter* 系統から得られた胎仔の *ter* 遺伝子型は検定交配により確認した (Noguchi *et al.*, 1996)。+/+ 及び+/*ter* 個体は雌雄ともに正常な生殖巣を持つが、*ter/ter* 個体は生殖細胞を欠損した矮小な不妊生殖巣を持つ (図 1、2)。胎仔生殖巣では+/-型と *ter/ter* 型で生殖巣に大きさの差は無いが、前者は多数の PGC が後者は極僅かな PGC を含む (図 3)。成体の *ter* 遺伝子型の検定には既知の+/*ter* 個体 (テスター) との検定交配を行い、得られた生後 2 ヶ月齢の個体の精巣及び卵巣で外部形態と組織学的観察から矮小で且つ生殖細胞を欠く生殖巣を持つ個体を *ter/ter* 型とし、その親を+/*ter* 型と判定した。

IV -6. *Grll* マイクロサテライト DNA の SSLP を用いた *ter* 遺伝子型の推定

ter 遺伝子座の近傍、約 2cM 以内に位置する *Grll* 遺伝子座は 129 系から *ter* 遺伝子と共に LTXBJ-+/*ter* 系に導入されたので、マイクロサテライト DNA マーカー、*D18 Mit 17* (Research Genetics) により増幅された PCR 産物は 129 系と LTXBJ 系では異なる SSLP の多型を示す (Sakurai *et al.*, 1994, 1995)。これに従って、耳片或いは胎仔の肝臓から DNA を抽出し、94°C で 20 秒、55°C で 20 秒、72°C で 40 秒のサイクルを 30 サイクル行った。図 4 に示すように、対照として用いた LTXBJ 系統及び 129/Sv-+/*ter* 系統の PCR 産物はそれぞれ 214bp/214bp 及び 190bp/190bp の単一バンドである (レーン 1、5)。LTXBJ-+/*ter* 系統で+/+、+/*ter* 及び *ter/ter* と判定されたマウスの PCR 産物のバンドはそれぞれ 214bp/214bp、214bp/190bp 及び 190bp/190bp であった (レーン 2-4)。そこで外観からでは *ter* 遺伝子型を推定できない胚の *ter* 遺伝子型はこれらのバンドパターンからそれぞれ+/+、+/*ter* 及び *ter/ter* と判定した。培養に用いた胎仔の遺伝子型の判定は後述の 6 時間の PGC と体細胞の“分離培養”の間に行った。

IV -7. 組織学的標本の作製

採取した生殖巣はブアン液で固定、パラフィン包埋による 6 μ m の連続切片とし、ヘマトキシリン-エオジン-アルシアンブルー三重染色 (H-E-A 染色) 又は後述の免疫組織化学染色を行った。

IV -8. フィーダー細胞の調製

Matsui *et al.* (1992) に従って、SI/ SI4-m220 細胞は PGC の培養用のフィーダー

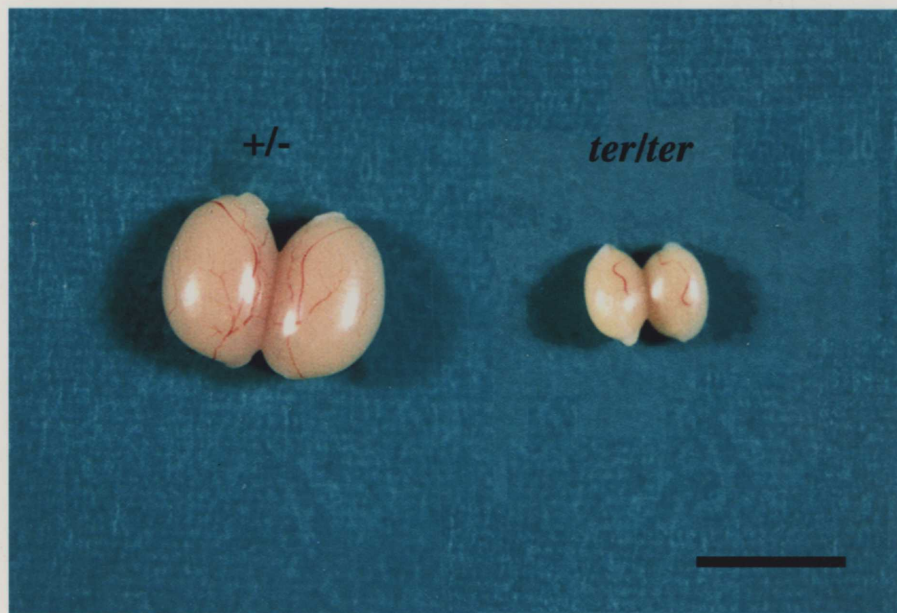


図1 ; LTXBJ- $+/ter$ 系統同腹マウスの成体精巣。
左は $+/-$ 型の正常な精巣、右は ter/ter 型の矮小精巣、
同腹の $+/-$ 型精巣に比べて小さい。下線は 10mm。

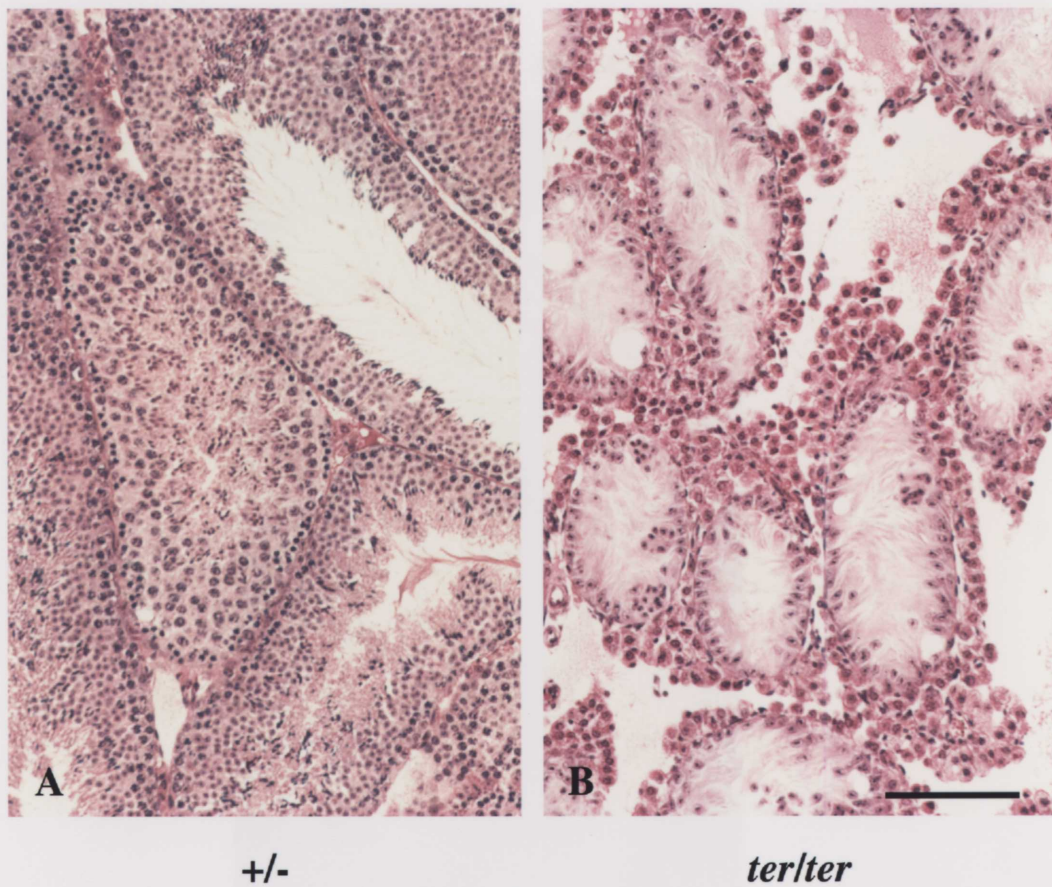


図2 ; LTXBJ-*+/ter*系統同腹マウスの成体精巣の組織切片像 (パラフィン切片、H-E-A染色)

(A) *+/-*型精巣、精細管壁より管の中央部に向かって、精原細胞から精母細胞、精細胞、精子へと分化していく正常な精子形成過程がみられる。(B) *ter/ter*型精巣、完全に生殖細胞を欠損したセルトリ細胞のみの精細管がみられる。下線は100 μ m。

+/+

ter/ter

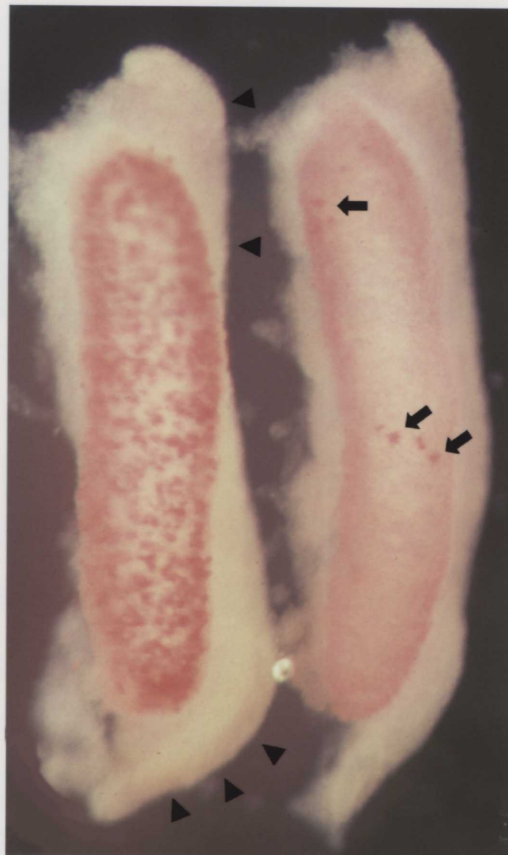
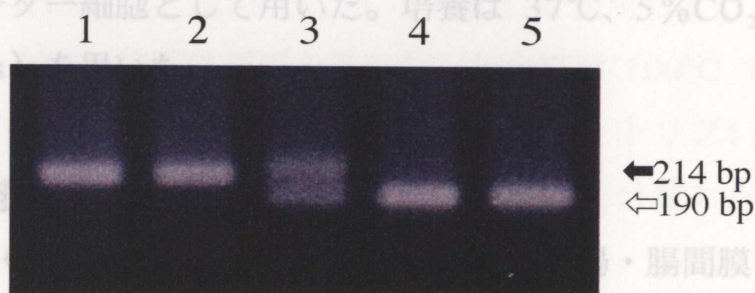


図3 ; LTXBJ-+/ter系統の胎齢 12.5日の精巣。アルカリ性ホスファターゼ活性染色により精巣内のPGCが赤色を呈している。左は+/+型精巣、多くのPGCが散在している。付随している中腎の中腎管内が僅かにアルカリ性ホスファターゼ活性陽性を示し、赤色を呈している (矢じり)。+/ter型精巣もこれに似ている。右はter/ter型精巣、ごく少数のPGCがみられる (矢印)。

細胞として用いた (Matsui *et al.*, 1992)。SI/ SI4-m220 細胞は Dr. D. Williams (Howard Hughes Medical Institute, Indiana University) 及び Dr. K. Zsebo (Connetics corporation) の好意により松居靖久先生 (大阪府立母子保健総合医療センター) を通じて分与された。SI/ SI4-m220 細胞は 10% FBS (Moregate) を含む DMEM (10) で培養した。シャーレは 0.1% (w/v) セラチン溶液 (Sigma) でプレコートしたものを用いた。コンフルエントになった細胞は 2 時間、5 μ g/ml マイトマイシン C (Sigma) で処理後、トリプシン-EDTA (Sigma) で細胞を剥がした。1 穴当たり 2.0×10^5 個になるように 4 穴プレート或いは 24 穴プレートにまいた。これらの細胞は 18 時間培養後、フィーダー細胞として用いた。培養は 37°C、5% CO₂-95% 空気の炭酸ガス培養器 (Heracus) で行った。



IV-9. PGC と体細胞

LTXBJ-+/ter 系 (LTXBJ 系統) の胎間膜 (胎齢 9.5 日)、生殖隆起 (胎齢 11.5 日)、精巣 (胎齢 12.5-14.5 日) 及び卵巣 (胎齢 14.5 日) をトリプシン-EDTA (Sigma) により 37°C、10-15 分間処理し、単一細胞に解離した。シャーレへの接着性の違いにより生殖細胞と体細胞を分離するため、解離した細胞は一胚ごとシャーレに播種し、ESM (10) で 6 時間、37°C 炭酸ガス培養器で培養した (これを“分離培養”と呼ぶ)。培養 6 時間後に浮遊している細胞を“PGC 分画”として回収し、シャーレに付着した細胞はトリプシン-EDTA で再び解離し、“体細胞分画”として回収した。PGC と体細胞の分離率は後述の AP 活性染色で検出した PGC 数により計算した。AP

図4; LTXBJ-+/ter 系統における +/+、+ /ter 及び ter/ter 型マウスの Gr11 プライマーを用いた PCR 増幅産物の SSCP 多型を示す電気泳動像。

LTXBJ-+/ter 系統の +/+ 型 (レーン 2) および ter/ter 型 (レーン 4) は、それぞれ LTXBJ 系統 (レーン 1) と 129/Sv-+/ter 系統 (レーン 5) と同じタイプの単一バンド (それぞれ 214bp および 190bp) を示す。LTXBJ-+/ter 系統の + /ter 型 (レーン 3) は、LTXBJ 系統と 129/Sv-+/ter 系統の F1 タイプのバンドパターンを示す。ここで用いた +/+, + /ter および ter/ter 型はあらかじめ交配検定で ter 遺伝子型が決定されている。よって、各胚の ter 遺伝子型は、LTXBJ 型、129 型およびヘテロ型バンドからそれぞれ +/+, + /ter 及び + /ter と判定する。

IV-10.

胎齢 9.5 日の LTXBJ 系統 (LTXBJ 系統) の胎間膜 (胎齢 9.5 日)、生殖隆起 (胎齢 11.5 日)、精巣 (胎齢 12.5-14.5 日) 及び卵巣 (胎齢 14.5 日) をトリプシン-EDTA (Sigma) により 37°C、10-15 分間処理し、単一細胞に解離した。シャーレへの接着性の違いにより生殖細胞と体細胞を分離するため、解離した細胞は一胚ごとシャーレに播種し、ESM (10) で 6 時間、37°C 炭酸ガス培養器で培養した (これを“分離培養”と呼ぶ)。培養 6 時間後に浮遊している細胞を“PGC 分画”として回収し、シャーレに付着した細胞はトリプシン-EDTA で再び解離し、“体細胞分画”として回収した。PGC と体細胞の分離率は後述の AP 活性染色で検出した PGC 数により計算した。AP

細胞として用いた (Matsui *et al.*, 1992)。SI/ SI4- m220 細胞は Dr. D. Williams (Howard Hughes Medical Institute, Indiana University) 及び Dr. K. Zscho (Connetics corporation) の好意により松居靖久先生 (大阪府立母子保健総合医療センター) を通じて分与された。SI/ SI4- m220 細胞は 10% FBS (Moregate) を含む DMEM (10) で培養した。シャーレは 0.1% (w/v) ゼラチン溶液 (Sigma) でプレコートしたものをを用いた。コンフルエントになった細胞は 2 時間、5 μ g/ml マイトマイシン C (Sigma) で処理後、トリプシン-EDTA (Sigma) で細胞を剥がした。1 穴当たり 2.0×10^5 個になるように 4 穴プレート或いは 24 穴プレートにまいた。それらの細胞は 18 時間培養後、フィーダー細胞として用いた。培養は 37°C、5% CO₂-95% 空気の炭酸ガス培養器 (Heracus) を用いた。

IV -9. PGC と体細胞の“分離培養”

LTXBJ- +/ter 系の +/ter 同士の交配から得た胚の後腸・腸間膜 (胎齢 9.5 日)、生殖隆起 (胎齢 11.5 日)、精巣 (胎齢 12.5- 14.5 日) 及び卵巣 (胎齢 14.5 日) をトリプシン-EDTA (Sigma) により 37°C、10-15 分間処理し、単一細胞に解離した。シャーレへの接着性の違いにより生殖細胞と体細胞を分離するため、解離した細胞は一胚ごとシャーレに播種し、ESM (10) で 6 時間、37°C 炭酸ガス培養器で培養した (これを“分離培養”と呼ぶ)。培養 6 時間後に浮遊している細胞を“PGC 分画”として回収し、シャーレに付着した細胞はトリプシン-EDTA で再び解離し、“体細胞分画”として回収した。PGC と体細胞の分離率は後述の AP 活性染色で検出した PGC 数により計算した。AP 陽性細胞と陰性細胞の率は後腸・腸間膜の“PGC 分画”においてはそれぞれ約 70 と 30%、生殖巣の“PGC 分画”においてはそれぞれ約 90 と 10% であり、AP 陰性の血球細胞や生殖巣体細胞の僅かな混入がみられた。“体細胞分画”は全て AP 陰性であった。回収したそれぞれの分画の生存率をトリパンブルーを用いた色素排除法により調べた結果、どちらもほぼ 100% であった。

IV -10. PGC と体細胞の“交換共培養”

胎齢 9.5 日の“PGC 分画”は 0.5 胚分、胎齢 12.5 日の“体細胞分画”は 0.25 胚分、胎齢 11.5 日の“PGC 分画”及び“体細胞分画”は 0.25 胚分になるようにそれぞれ、SI/ SI4- m220 フィーダー細胞上にまいた。それらの細胞は 20% FBS を含む ESM (20) で 12 時間、1 日或いは 3 日間炭酸ガス培養器で培養した。培地は毎日交換した。

IV - 11. 胎仔生殖巣体細胞 CM の調製

Kawase *et al.*(1996)が BRL 細胞の CM の調製に用いた方法を改変して用いた。

LTXBJ-+/ter 系の胎齢 13.5 日及び胎齢 14.5 日の胎仔精巣及び胎仔卵巣の“体細胞分画”を ESM(10)で 3 日間培養し、コンフルエントになった細胞の培養液をそれぞれ精巣体細胞培養上清 (TS-CM) 及び卵巣体細胞培養上清 (OS-CM) として回収した。ここで得られた TS-CM 及び OS-CM は体細胞の *ter* 遺伝子型からそれぞれに+/+, +/ter 及び *ter/ter* CM とし、同じ遺伝子型の CM はまとめた。集めた CM は 2,000 g で遠心によって混入した細胞や破片を除いた後、-80°C で保存した。このストックを 100%CM とし、必要に応じて ESM (10) で希釈して使用した。さらに実験に応じて CM に各種処理、熱変性及び限外濾過を施した。熱変性は 100°C で 5 分間煮沸し、蛋白質を変性させた。また、遠心型限外濾過フィルター[セントリプレップ 30 (Amicon)]により分子質量 30kDa 以上の分画と 30kDa 以下の分画に分離した。

IV - 12. ICR マウスの PGC の培養

PGC の初代培養は Matsui *et al.* (1991、1992) の方法に従って行った。

PGC の分布している部域を限定して得るため、ICR マウスの胎齢 9.5 日胚の後腸・腸間膜及び胎齢 11.5 日胚の生殖隆起を採取し、トリプシン処理により単一細胞に解離した。PGC を含む細胞懸濁液を 24 穴プレートのフィーダー細胞上に 0.5 胚相当 (胎齢 9.5 日) 或いは 0.25 胚相当 (胎齢 11.5 日) 播種し、1-3 日間、炭酸ガス培養器にて培養した。

IV - 13. AP 活性染色及び 4C9 抗体を用いた免疫染色による PGC の同定

培養した PGC は Matsui *et al.* (1991) の方法に従って、PGC の AP 活性を指標に同定した。培養後シャーレに付着した細胞を 90%アルコールで 20 分間、5°C で固定後、染色液 (25 mM Tris-maleate pH 9、8 mM MgCl₂、naphthol AS-MX phosphate (Sigma)、0.4 mg/ml、Fast Red TR salt (Sigma) 1 mg/ml) で染色した。赤褐色に呈色した特徴的な細胞膜 (AP 陽性細胞) を持つ細胞を PGC と判定し、ホフマンモジュレーションコントラスト (HMC) 付き倒立型顕微鏡 (オリンパス) を用いて PGC 数をカウントした。さらに、胎齢 9.5 日の後腸上皮及び胎齢 14.5 日以降の生殖巣体細胞は AP 陽性となるので、胎齢 15.5 日以前のマウスの PGC を同定できるラットモノクローナル抗 4C9 抗体の免疫染色を行った (Yoshinaga *et al.*, 1991; Kawase *et al.*,

1994)。4C9 抗体は村松喬先生（名古屋大学）より分与された。後述の方法により免疫染色を行い、4C9 反応陽性細胞質は黒色を呈した。さらに詳しく見るために AP 活性染色と 4C9 免疫染色との二重染色により、茶褐色を呈した AP/4C9 陽性細胞を PGC と判定した。上皮様 AP 陽性/4C9 陰性細胞は PGC とは判定しなかった。AP 陽性及び AP/4C9 陽性 PGC 数の集計には 2-3 回の実験を繰り返し、少なくとも 6 穴分の合計の平均と標準偏差を求めた。さらにその値は Student's *t* 検定を用いて評価した。*p* 値が 0.05 以下ならば有意な差があると判定した。

IV - 14. 免疫組織化学染色（免疫染色）

4%パラフォルムアルデヒドで固定した培養細胞及びブアン固定した精巣組織切片を PBS で洗浄後、0.3%過酸化水素 (H_2O_2) / メタノールで 20 分間処理して、内在性のペルオキシダーゼを失活させた。PBS で洗浄後、表 3 に示す各種抗体を 1%BSA を含む PBS 或いは 3%ラビット或いはヤギ正常血清を含む PBS で適当な濃度に希釈し、培養細胞は室温で 60 分間、組織切片は 4°C で 1 晩反応させた。PBS で洗浄後、表 3 に示したそれぞれの抗体に対する二次抗体を 3%正常血清を含む PBS で 200 倍に希釈し、45 分間反応させた。PBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ結合ビオチン-アビジン複合体 (Vector) (1:100 PBS) と 30 分間反応させた。最後にペルオキシダーゼの基質として 0.005% H_2O_2 及び 0.02% 3-3'ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリド (DAB) を含んだ DAB 溶液 (pH 7.5) で褐色に発色させた。培養細胞の染色は DAB 溶液にさらに 0.006% $CoCl_2$ を加えて、黒色に発色させた。組織切片においては DAB 発色後、ヘマトキシリンによる核染色を行った。Santa Cruz 社から購入した抗体においてはそれぞれの抗体のペプチド抗原 (Santa Cruz) と 4°C 一晩反応させ、反応させた抗体で免疫染色を行い、抗体の特異性を調べた。

IV - 15. PGC の BrdU の取り込み率の免疫染色による検出

PGC の細胞周期における合成期 (S 期) の細胞を検出するためチミジンのアナログである BrdU を用いた。1 日或いは 3 日間培養した PGC は固定する 1 時間前に、培養液からチミジンを除き、BrdU (1 μ l/ml) を含んだ ESM (20) に置き換えた。1 時間後、先に PGC を同定するため、AP 活性染色を行い、次に BrdU に対する前述の免疫染色を行った。細胞膜に AP 活性をもち、且つ BrdU を取り込んで黒色に染まった核を S 期にある PGC と判定した。AP/ BrdU 陽性細胞数を全 PGC 数で除した値を BrdU 取り込み率とした。

IV -16. PGC のアポトーシスの検出

アポトーシスを起こしている PGC は AP 活性染色により形態的に断片化を確認すると共に TACS™ *in situ* Apoptosis detection kit (Trevigen) を用いて TUNEL 法 (Gavrieli *et al.*, 1992) により検出した。方法を略記する。培養した PGC を固定後、プロテイナーゼ K 処理を室温で行った。H₂O₂ により内在性のペルオキシダーゼの不活化後、ターミナルデオキシトランスフェラーゼ (TdT) とビオチン化 dUTP を含む dNTP ミックスを 37°C で反応させ、断片化 DNA を標識した。黒色の核の断片を持つ AP 陽性の細胞をアポトーシスを起こした PGC と判定した。

IV -17. WT1 免疫染色によるセルトリ細胞の同定

精巣においてセルトリ細胞とその前駆細胞は核内に転写因子である Wilms' tumor 1 (WT1) を発現している (Pelletier *et al.*, 1991; Mundlos *et al.*, 1993)。培養系においても WT1 の抗体に対する免疫染色を用いることにより、セルトリ細胞を同定することができるので (Pelletier *et al.*, 1991; Kudoh *et al.*, 1995)、前述のように WT1 抗血清を用いて免疫染色を行い、WT1 陽性の黒色の核を持つ細胞をセルトリ細胞として検出した。WT1 抗血清は秋山徹先生 (東京大学) の好意により野崎正美先生 (大阪大学微生物病研究所) を通じて分与された。

IV -18. 精巣の免疫染色

LTXBJ-+/ter 系胎齢 14.5 日、生後 7 日齢及び約 1 ヶ月齢以上の精巣をブアン固定後、6 μm の切片を作成した。これらを生殖細胞の増殖因子として知られている SCF、LIF、TGFβ1、bFGF、TNFα、IL-4、OSM 及び NRGβ に対するポリクローナル抗体により前述した方法で免疫染色を行った。

IV -19. 全 RNA の抽出

全 RNA は RNA isolation kit (Stratagene) のプロトコールに従って抽出した。胎齢 12.5 日の 2 胚分及び生後 7 日の 0.5 匹分の+/+ 及び ter/ter 精巣に Solution D (Stratagene) を加えてホモジナイズし、2M 酢酸ナトリウム (pH 4.0) (Stratagene)、水飽和フェノール (Gibco) 及びクロロホルム-イソアミルアルコール (Stratagene) を順次加え、4°C で 10,000g、20 分間遠心する。上層の水層をチューブに移し、イソプロパノールを加え、-20°C に 1 時間おき、4°C で 10,000g、20 分間遠心した。上清を除

き、RNA の沈殿に再び Solution D とイソプロパノールを加え、混和し、-20°Cに 1 時間おき、4°Cで 10,000g、10 分間遠心し、RNA の沈殿を得た。

IV -20. RT-PCR

約 1 μ g の+/+ 及び *ter/ter* 精巢の全 RNA をオリゴ dT プライマーと SuperScript II 逆転写酵素 (Gibco) を用いて 60°Cで 1 時間反応させ、それぞれの 1 本鎖の cDNA を合成した。cDNA を増殖因子に対する特異的な配列のオリゴヌクレオチドプライマー (表 2) を用いて PCR 反応により増幅した。PCR 反応は 94°Cで 1 分間、60°Cで 1 分間、72°Cで 1 分間のサイクルを *GAPDH* の発現の検出には 28 サイクル、他の増殖因子の発現の検出には 38 サイクル行った。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により分離し、バンドを検出した。

IV -21. cDNA サブトラクションライブラリー

+/+ 及び *ter/ter* 精巢の全 RNA から SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) を用いて cDNA を合成した。約 200ng の全 RNA は制限酵素 *Rsa* I の切断領域 (GTAC) を持つプライマー SMART II オリゴヌクレオチドプライマー及び DNA 合成プライマーを用い、SuperScript II 逆転写酵素 (Gibco) により 42°Cで 1 時間反応させ、それぞれの 1 本鎖の cDNA を合成した。1 本鎖の cDNA を PCR プライマーを用いて PCR 反応させ、2 本鎖の cDNA を合成した。合成した胎齢 12.5 日及び 7 日齢の+/+ 型及び *ter/ter* 型 cDNA はそれぞれのステージで PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech) を用い、テスターとして+/+型 cDNA 及びドライバーとして *ter/ter* 型 cDNA を用いる組み合わせ (W-*ter*) 及びテスターとして *ter/ter* 型 cDNA 及びドライバーとして+/+型 cDNA を用いる組み合わせ (*ter*-W) の 2 種類、合計 4 種類のサブトラクションを行った (12.5/W-*ter*、12.5/*ter*-W、7/W-*ter*、7/*ter*-W)。ここで合成した cDNA はその配列に *Rsa* I の切断領域を持つので、37°Cで 3 時間、*Rsa* I を反応させ、突出末端を作らせた。テスターにはアダプター 1 及びアダプター 2R を T4 DNA リガーゼにより 16°Cで 1 晩ライゲーション反応させ、付加させた。テスター cDNA 及びドライバー cDNA を混合し、98°Cで 1 本鎖にして、その後 68°Cで 1 晩ハイブリダイゼーションを行った。ドライバーと相補的な配列を持つテスターは引き算され、ドライバーとハイブリッド形成しないテスターはアダプター配列を両末端に持つのでアダプター配列に特異的な PCR プライマー 1 により PCR で増幅される。これにより 12.5/W-*ter*、12.5/*ter*-W、7/W-*ter* 及び 7/*ter*-W のサブトラクシ

ョン cDNA プールを得た。

サブトラクション cDNA のクローニングは TA Cloning Kit (Invitrogen) を用いた。pCR II ベクターにサブトラクション cDNA をライゲーションし、cDNA を含んだベクターを大腸菌 (INV α F[']) に導入した。大腸菌は LB プレート上で 37°C、1 晩培養し、カラーセクション法にてインサートを含むプラスミドを持つ大腸菌のコロニーのみを回収し、サブトラクション cDNA クローンとした。サブトラクション cDNA クローンは 96 穴プレート 2 枚分を回収した。それぞれ 12.5/ W-*ter* 及び 7/ W-*ter* のクローンはマルチキャピラリー DNA シークエンサー MegaBACE 1000 (Amersham) を用いて塩基配列を決定した。

IV -22. ホモロジー検索

12.5/ W-*ter* 及び 7/ W-*ter* の cDNA ライブラリーの塩基配列を BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) によりホモロジー検索を行った。

IV -23. cDNA マクロアレイ

W-*ter* 及び *ter*-W のサブトラクション cDNA ライブラリーから得たクローンから精製した cDNA をナイロンメンブレン上に固定化した。1 枚のメンブレンには 96 穴プレート相当の cDNA を固定化した。さらに 1 穴分の cDNA について 9 点にドットした。このメンブレンを ³²P でラベルした W-*ter*cDNA プールとハイブリダイゼーションを行った。

V. 結果

V-1. PGC と体細胞の“交換共培養系”を用いた *ter* 遺伝子の機能解析

V-1-a) 胎齢 9.5 日+/+、+/ *ter* 及び *ter/ter* PGC と胎齢 12.5 日+/+ 精巢体細胞との“交換共培養”による *ter/ter*PGC の増殖能及び生存能の解析及び PGC- 体細胞相互作用の解析 (図 5 参照)

ter/ter 胚における PGC 欠損が胎仔精巢体細胞に何らかの欠陥があり引き起こされることは Noguchi *et al.* (1997) により再構成精巢法で示唆されたが、*ter/ter*PGC 自体の生存や増殖の能力に欠陥があるために起こるか否かは不明であった。そこで、第一の問題として、*ter/ter*PGC が+/+ 及び+/ *ter*PGC と同様に生存能及び増殖能を有するのかを解析するために、胎齢 9.5 日の各 *ter* 遺伝子型の後腸・腸間膜から PGC を単離し、胎齢 12.5 日の+/+ 精巢から単離した体細胞と SI/ SI4- m220 フィーダー細胞上で 3 日間共培養した。この“交換共培養”系では共培養した精巢体細胞の効果を明確にするために、フィーダー細胞が産生する膜結合型の SCF 以外の増殖因子は添加せず、毎日培地交換を行った。結果を図 6 及び図 7 に示した。

まず、培養細胞の形態的特徴をまとめると、培養 1 日後、+/+、+/ *ter* 又は *ter/ter*PGC は AP 陰性の精巢体細胞上に個々に分散したアメーバ状の形態を示し、生体内における移動期の形態をよく反映していた(図 6A)。培養 3 日後、いずれの *ter* 遺伝子型の PGC も増殖し、PGC は球形へと変化し、多くはコロニーを形成していた(図 6B-D)。PGC は AP 陽性 (図 6B、D) 及び 4C9 陽性 (図 6C、D) であった。これらの PGC の形態的な特徴は胎齢 12.5 日の精巢内の正常な PGC の特徴とよく似ていた (Sakurai *et al.*, 1995; Noguchi *et al.*, 1996)。一方、培養 3 日目の AP 陽性のコロニー (図 6B, D) 中に培養 1 日では見られない 4C9 陰性の上皮様の形態を示す細胞が見られた (図 6C)。これらの細胞は分化した精細管の周囲筋様細胞或いは胎齢 9.5 日の“PGC 分画”に混入している後腸上皮細胞であると考えられる。培養 3 日目でみられたこれらの細胞は PGC より AP の染色性が弱く形態的にも容易に区別できるが、AP/ 4C9 二重染色を行い AP 陽性の体細胞と PGC とを厳密に区別した (図 6D)。

培養系において PGC と共培養された精巢体細胞及びフィーダー細胞は相互作用し、PGC は増殖を続け、生存することが知られている (Matsui *et al.*, 1991)。そこで PGC と体細胞及びフィーダー細胞の関係を見るため、2 種類の方法を用いた。まず、各培養

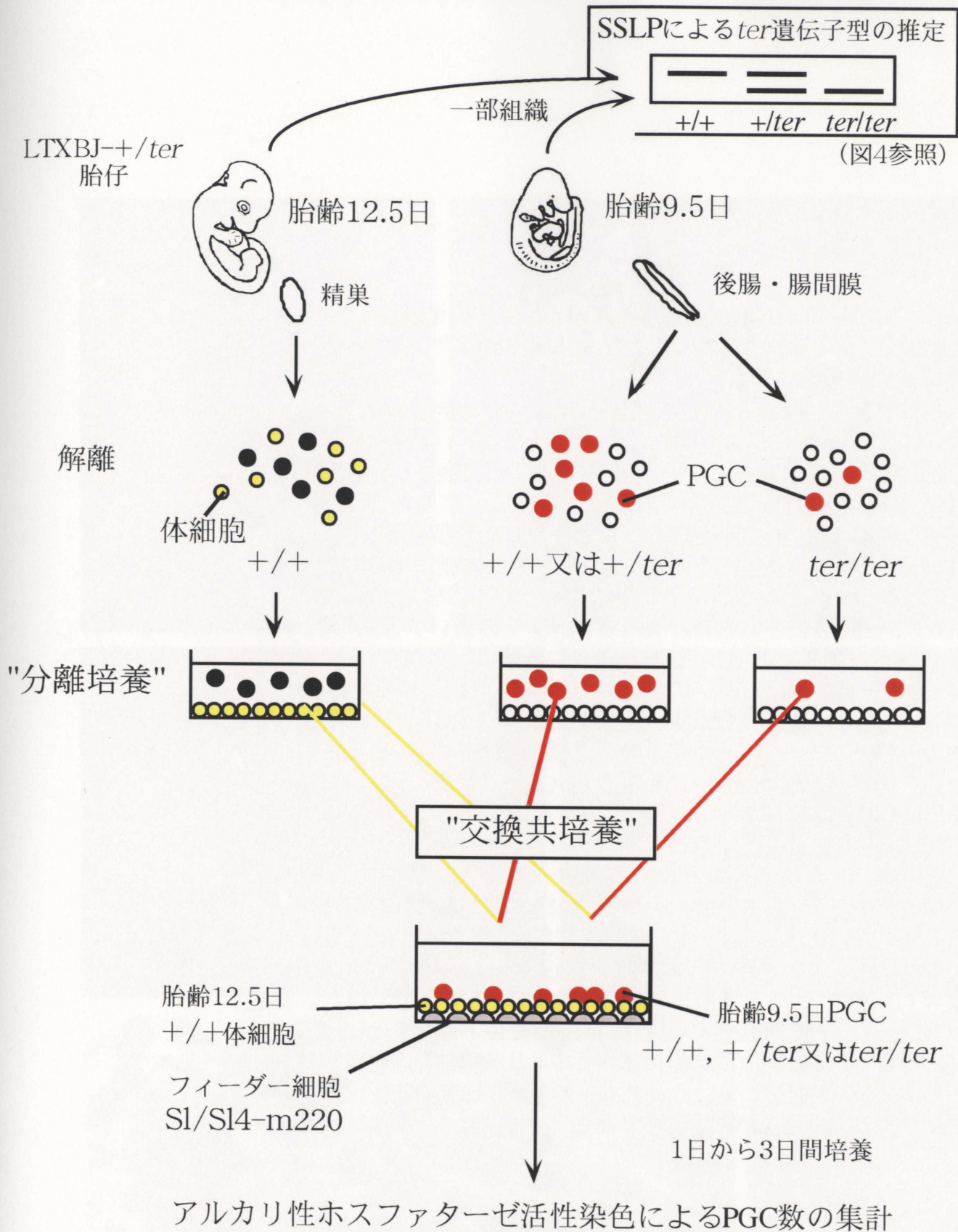


図5；胎齢9.5日の *ter/ter* PGCの生存能及び増殖能の”交換共培養”法を用いた解析。

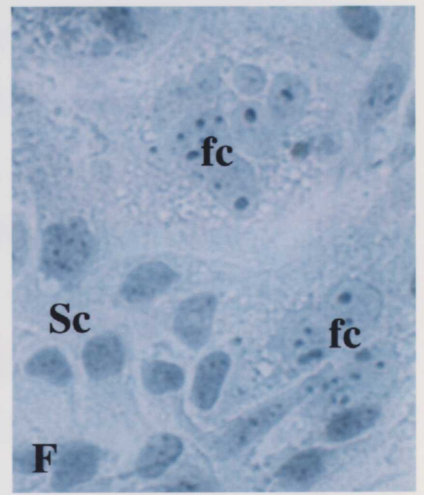
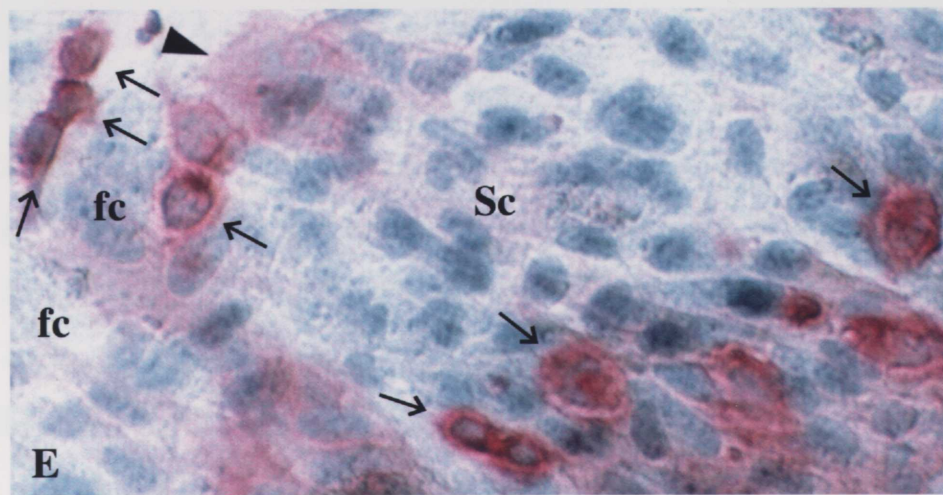
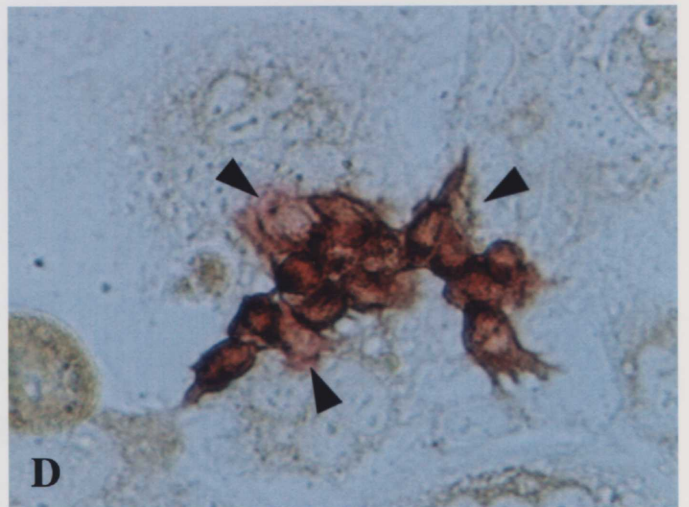
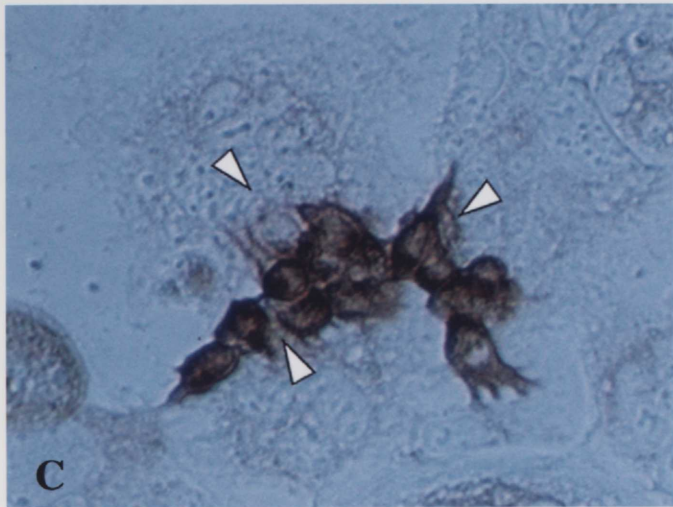
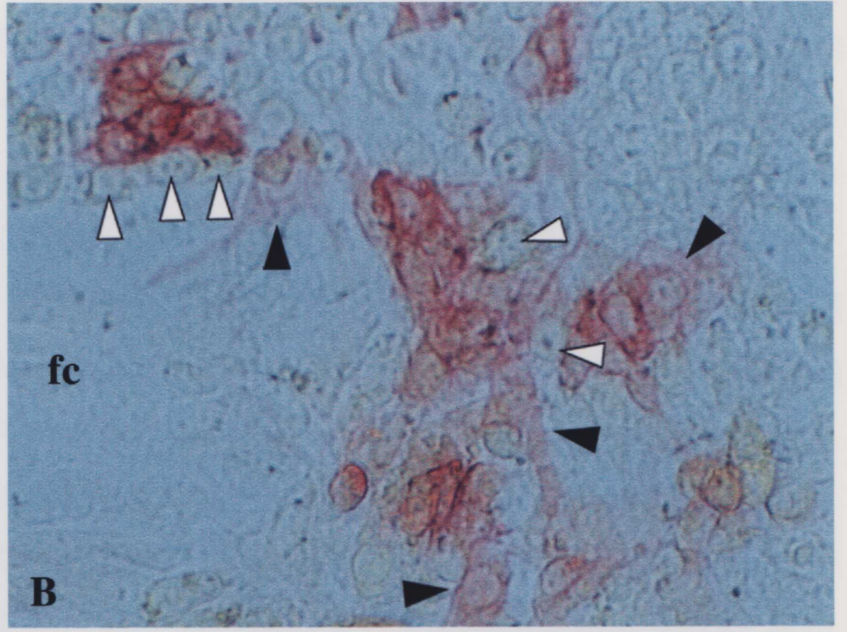
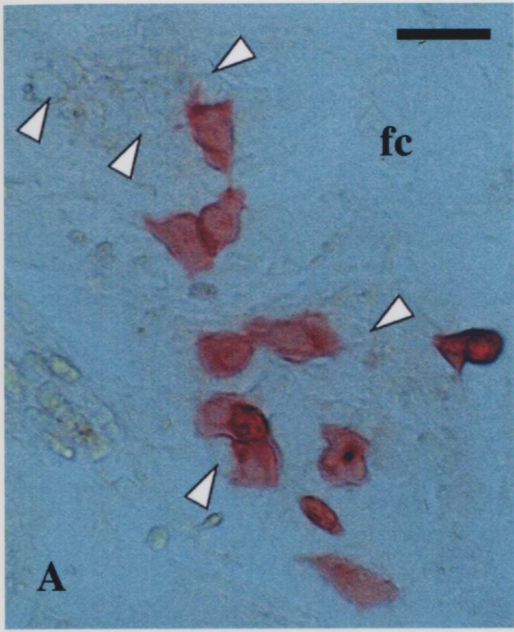
各遺伝子型の胎齢9.5日のPGCを含む後腸・腸間膜を解離し、分離培養により体細胞からPGCを単離し、それぞれを胎齢12.5日の単離した体細胞上で1日から3日間、共培養する。培養後アルカリ性ホスファターゼ活性染色或いは4C9免疫染色によりPGCを同定し、集計する。さらにWT1免疫染色によりセルトリ前駆細胞を同定し、PGCと体細胞の相互関係を調べる。

図6 ; LTXBJ-*+ / ter*系胎齢9.5日の各*ter*遺伝子型の単離されたPGCと胎齢12.5日の単離された $+ / +$ 型精巢体細胞との“交換共培養”後の培養顕微鏡像。

PGCはアルカリ性ホスファターゼ活性染色により赤色 (A、B、D) 或いは4C9免疫染色により褐色 (C、D) を呈している。セルトリ前駆細胞はWT1免疫染色により黒色の核を有する細胞として示される (E、F)。(A) 1日間培養された $+ / +$ 型PGC。アメーバ状で仮足を持つPGCは生体内の移動期のPGCと類似した形態を示している。PGCはフィーダー細胞 (fc) より共培養された体細胞 (白矢じり) 上に散在している。*ter* 遺伝子型間でPGCの形態に差はなかった。

(B) 3日間培養された*ter / ter*PGC。多くの濃いアルカリ性ホスファターゼ陽性のPGCが集まりコロニーをつくっている。PGCはフィーダー細胞 (fc) より共培養された体細胞 (白矢じり) とよく接触している。また、形態及び染色の強度ともにPGCとは異なるアルカリ性ホスファターゼ陽性の上皮様細胞がみられる (黒矢じり)。(C) 3日間培養された $+ / +$ 型PGCの4C9免疫染色。コロニーを形成しているPGCは全て4C9陽性である。体細胞は4C9陰性である (白矢じり)。(D) (C) のアルカリ性ホスファターゼ及び4C9二重染色。PGCはアルカリ性ホスファターゼ及び4C9陽性である。一部のアルカリ性ホスファターゼ陰性及び4C9陰性の体細胞が見られる (黒矢じり)。フィーダー細胞はどちらも陰性である。(E) アルカリ性ホスファターゼ及びWT1二重染色。 $+ / +$ PGCは培養3日後WT1陽性のセルトリ前駆細胞上 (矢印) で生存していた。赤色PGCを透してWT1陽性の黒い核を持つセルトリ細胞がみえる。

(F) PGCを含まない(E)の近接部。セルトリ前駆細胞はWT1陽性を示し、核が黒色を呈している。フィーダー細胞及び一部の小型の核を持つ精巢体細胞はWT1陰性である



細胞の焦点に着目し、ホフマンモジュレーションコントラスト (HMC) を用いて観察した。その結果、培養された PGC は大きな核を持つフィーダー細胞より小さな核を持つ精巢体細胞上或いは接触して多数存在していた (図 6A-D)。次に、共培養した胎齢 12.5 日体細胞がセルトリ細胞に分化していれば、それらの核のマーカである抗 WT1 抗血清 (Mundlos *et al.*, 1993; Kudoh *et al.*, 1995) に対する免疫染色により識別されることを期待して、培養体細胞における WT1 の発現パターンを調べた。その結果、多くの精巢体細胞はその核に WT1 陽性のシグナル (黒い核) を示し、セルトリ前駆細胞であることが確認された (図 6E, F)。そのようなシグナルは AP 陽性の上皮様細胞やフィーダー細胞には全く検出されなかった。また、AP 陽性の PGC は WT1 陰性であり、核に染色性を持たないが、PGC は黒色の核を持つ細胞上或いはその付近に局在していたので、赤色を呈する PGC の下に黒い核を持つセルトリ前駆細胞がみられる像がしばしば観察された (図 6E)。そこで、WT1 陽性細胞上とフィーダー細胞を含む WT1 陰性細胞上に分布する PGC の数を比較すると、WT1 陽性細胞の上の PGC が遙かに多い傾向が示された。これらのことから PGC はフィーダー細胞や他の体細胞よりむしろ共培養された WT1 陽性のセルトリ前駆細胞とよく接触し、相互作用していることが示唆された。

“交換共培養”後の各 PGC 数の変化を見るため PGC の *ter* 遺伝子型別に集計した結果を図 7 に示した。培養 1 日後、PGC 数は $+/+$ 、 $+/ter$ 及び ter/ter PGC でそれぞれ約 30、30 及び 10 個と遺伝子型による有意な差はみられなかったが、僅かに ter/ter PGC は少なかった。3 日後には、PGC はどれも約 500 個にまで増殖しており、遺伝子型による差はみられなかった。即ち、胎齢 9.5 日から単離された ter/ter PGC は胎齢 12.5 日の正常な体細胞上で $+/+$ 及び $+/ter$ PGC と同様に生存及び増殖し、PGC 数が増加した。このとき、胎齢 12.5 日の $+/+$ 精巢から単離した体細胞分画中には PGC の混入は認められなかった。しかし、胎齢 9.5 日の PGC 分画中には体細胞の混入がみられており、この体細胞が PGC の生存及び増殖を促進している可能性が考えられる。そこで、単離した胎齢 9.5 日 $+/+$ PGC を胎齢 12.5 日の体細胞を加えずにフィーダー細胞上で培養した。その結果、培養 3 日後、PGC 数は 100 個程度にしか増殖しなかった (図 7)。従って、 ter/ter PGC は $+/+$ 及び $+/ter$ PGC と同様に生存能及び増殖能を持ち、PGC の $+/+$ 型体細胞と共培養されると生存能を発現し増殖することが示された。また、精巢体細胞は PGC との細胞接触することによって PGC の生存と増殖を支持していることが明らかとなった (Takabayashi *et al.*, 2001)。

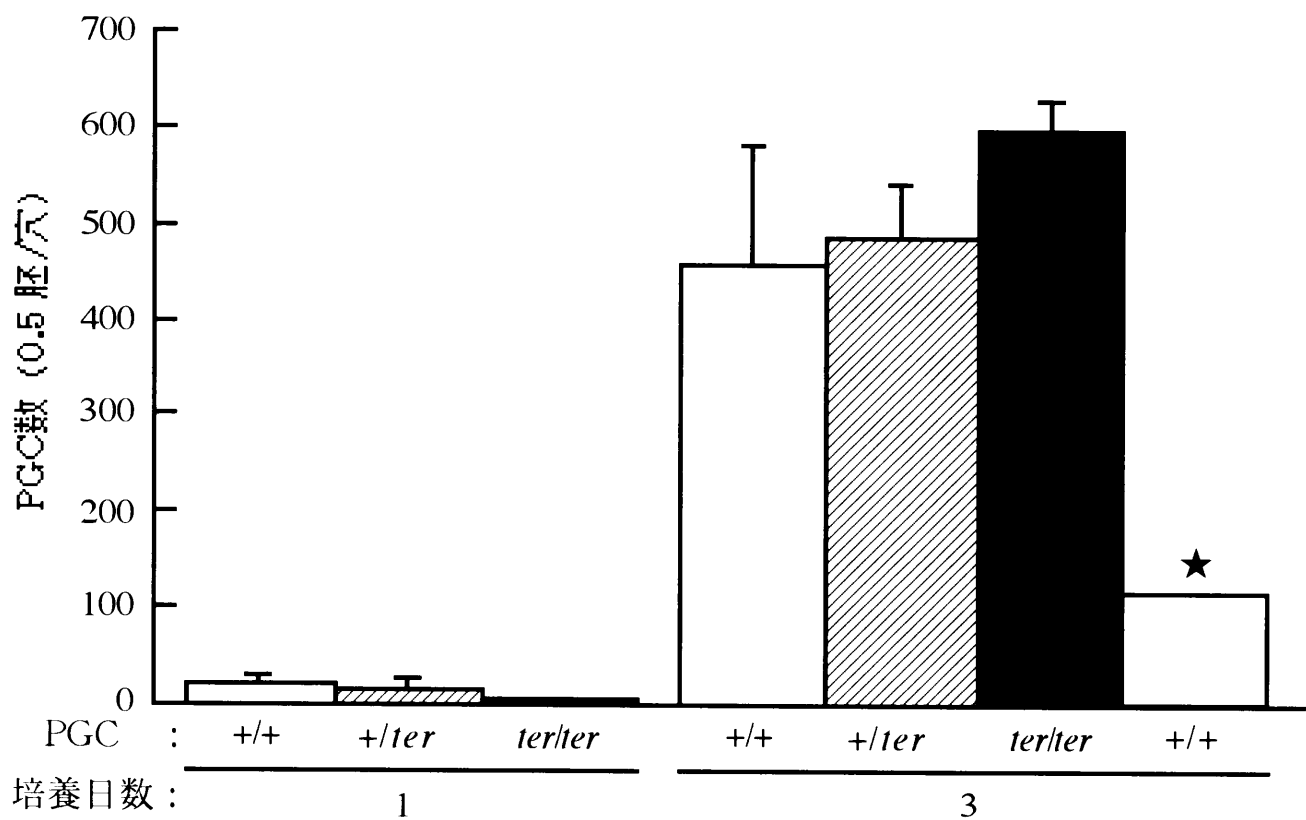


図7 ; LTXBJ-+/ter系胎齢12.5日の+/+型精巣体細胞上で“交換共培養”された胎齢9.5日の後腸から単離したPGC数の変化。縦軸は1穴当たり0.5胚相当のPGC数を示し、横軸は培養日数及びPGCのter遺伝子型を示している。星印(★)は精巣体細胞を加えずにフィーダー上で培養されたPGC数。

V-1-b) 生殖隆起から単離した胎齢 11.5 日+/+ 及び *ter/ter* PGC と体細胞の“交換共培養”による *ter/ter* 体細胞の作用と *ter/ter* PGC の生存能の解析 (図 8 参照)

正常な体細胞上で培養された生殖隆起へ移入後の *ter/ter* PGC は正常な生存能を発現するか、また、*ter/ter* 体細胞は *in vitro* において PGC にどのような作用をするか、これらを明らかにするため、胎齢 11.5 日+/+ 及び *ter/ter* 胎仔生殖隆起から単離した PGC と体細胞を *ter* 遺伝子型で組み換えて、フィーダー上に 0.25 胚当たりの数で各培養ウェルに播き、“交換共培養”を行った。その結果、+/+ 体細胞と共培養を開始された多数の+/+ PGC 及びより少ない数の *ter/ter* PGC は培養 12 時間及び 24 時間共によく似た形態を示し、移動能を著しく減じた球形の形態を示していた (図 9A)。これに対して、*ter/ter* 体細胞と共培養を開始した多数の+/+ PGC 及びより少ない *ter/ter* PGC も 2 種類の形態を示した。即ち、正常な球形の PGC と *in vitro* の PGC のアポトーシスに特徴的な細胞質の断片化を起こした AP 陽性のアポトーシス小体を示すものがみられた (図 9B、C)。そこで、これらはアポトーシス小体かを確認するため TUNEL 染色を行った。その結果、AP 陽性の種々の大きさの細胞質の断片に、やはり、種々の大きさの TUNEL 陽性の核断片が検出された (図 9D)。そこで“交換共培養”結果をアポトーシス小体ではない正常な PGC のみを数えて図 10 に示した。体細胞の遺伝子型を変えて“交換共培養”した 12 時間後の+/+ PGC の数は+/+ 体細胞上で 44.1 ± 14.4 個、*ter/ter* 体細胞上で 16.0 ± 5.0 個であった。さらに、培養 24 時間後、+/+ PGC 数は+/+ 及び *ter/ter* 体細胞上でそれぞれ 20.2 ± 6.5 個、 8.7 ± 7.3 個であった (図 10A)。+/+ 体細胞上で生存していた PGC が *ter/ter* 体細胞上ではアポトーシスを起こし、数が減少していた。PGC 数には共培養した体細胞の遺伝子型の違いにより有意な差がみられた。一方、*ter/ter* PGC の数は 12 時間後、+/+ 体細胞上で 25.5 ± 4.2 個、*ter/ter* 体細胞上で 1.5 ± 0.7 個であった。さらに、培養 24 時間後 *ter/ter* PGC 数は 12 時間後に比べ減少はしたが、+/+ 体細胞上で 14.0 ± 1.2 個と PGC は維持されていたのに対して、*ter/ter* 体細胞上では 0.5 ± 0.7 個で PGC はほとんど死滅していた (図 10B)。t 検定の結果、PGC 数には共培養した体細胞の遺伝子型の違いにより有意な差がみられた。ところで、*ter/ter* PGC 数は+/+ PGC 数に比べ 1 胚当たりの細胞数が少ないので、初めに播かれる数 (0.25 胚相当) に遺伝子型による差が生じる。そこで、+/+ 体細胞上で培養された各遺伝子型の PGC の 12 時間後の数を 100 とした相対値でグラフに示した (図 10C)。24 時間後、PGC 数の相対値はそれぞれ、+/+ PGC は 45.8%、*ter/ter* PGC は 54.9%であり、いずれの遺伝子型の PGC も胎齢の問題から PGC 数は減少するもの

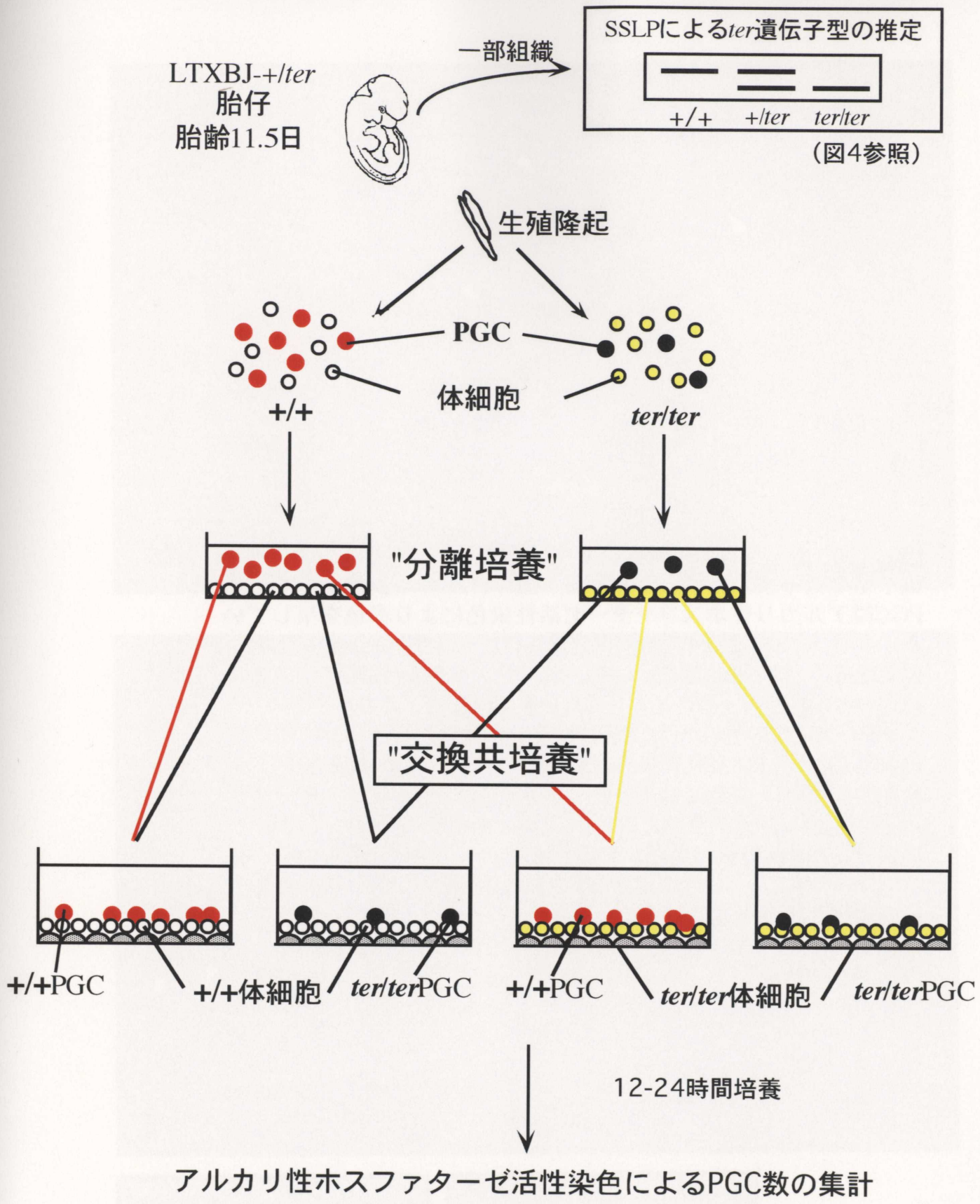


図8；“交換共培養”法を用いた胎齡11.5日+/+及びter/ter生殖隆起のPGCの生存能及び体細胞の効果の解析。

胎齡11.5日生殖隆起からPGCと体細胞を分離し、遺伝子型を組み換えてフィーダー上で12から24時間“交換共培養”を行う。培養後、アルカリ性ホスファターゼによりPGCを同定し、PGC数を比較する。

図9 ; LTXBJ-+/ter系の胎齢11.5日生殖巣のPGCと体細胞とのter遺伝子型を組み換えた“交換共培養”後のPGCの培養像。PGCはアルカリ性ホスファターゼ活性染色により赤色を呈している。(A) +/+体細胞上で12時間培養された+/+型PGC。PGCは移動能を減じ、球形の形態を示している。(B) ter/ter体細胞上で12時間培養された+/+型PGC。正常な形態のPGCとアルカリ性ホスファターゼ陽性の壊れかけた細胞(矢印)が見られる。(C) (B)の矢印で指示された細胞の拡大。アポトーシスに特徴的な細胞質の断片化(白矢印)を起こしている。(D)アルカリ性ホスファターゼ活性染色とTUNEL染色による二重染色像。細胞質の断片化(矢印)はTUNEL陽性の核(黒色)の断片を含み、これらがPGCのアポトーシス小体である。PGCは共培養された体細胞(白矢じり)上或いは接触して散在している。

下線は20 μ m (A, C, D) 及び50 μ m (B)

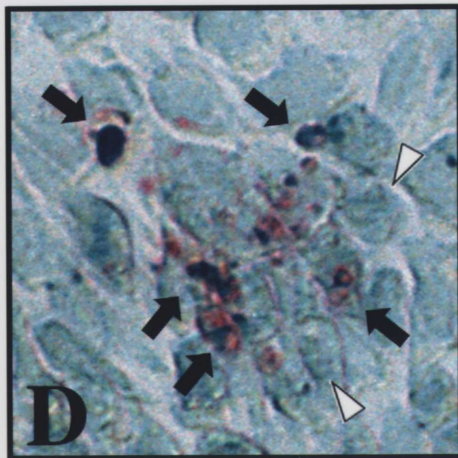
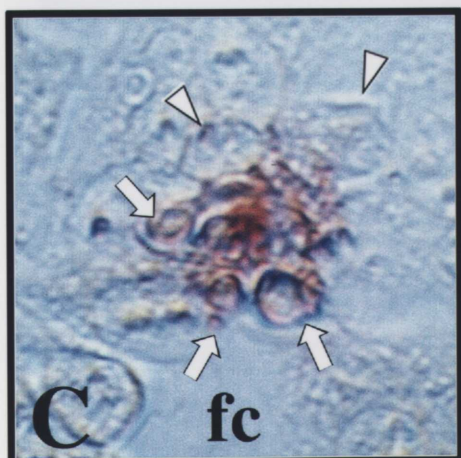
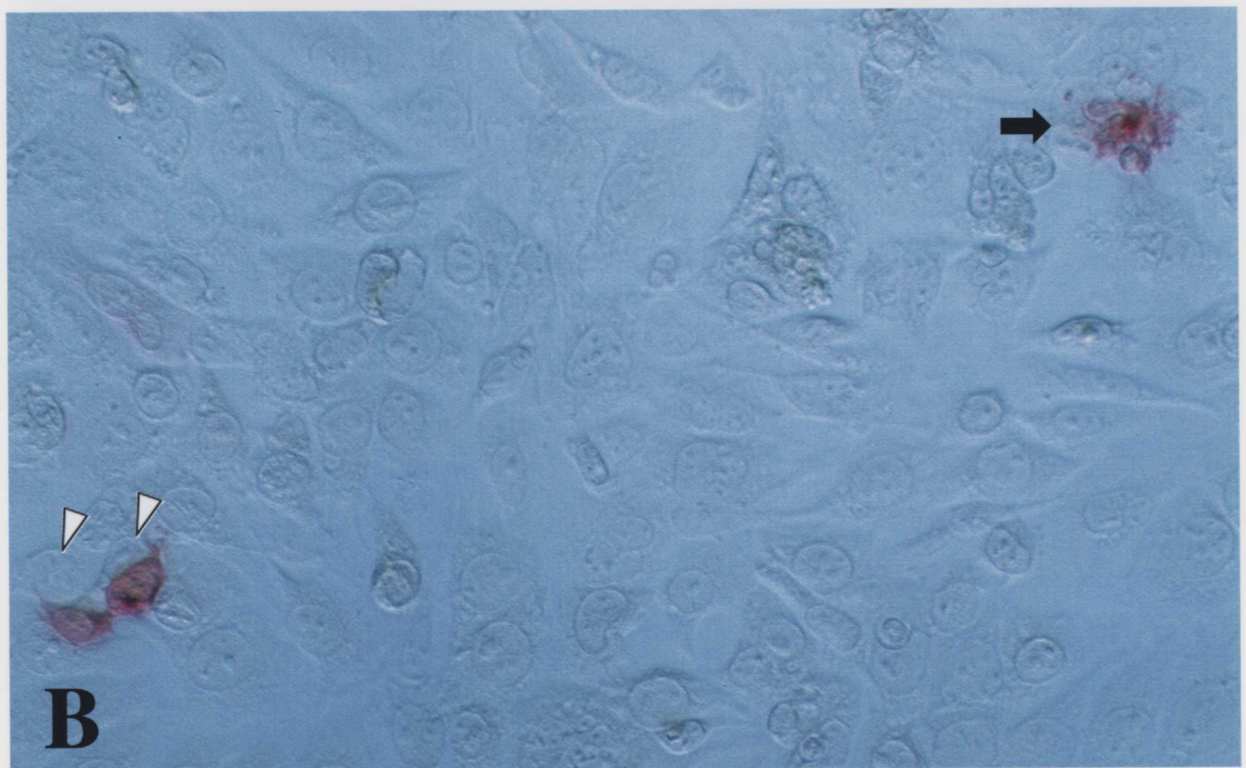
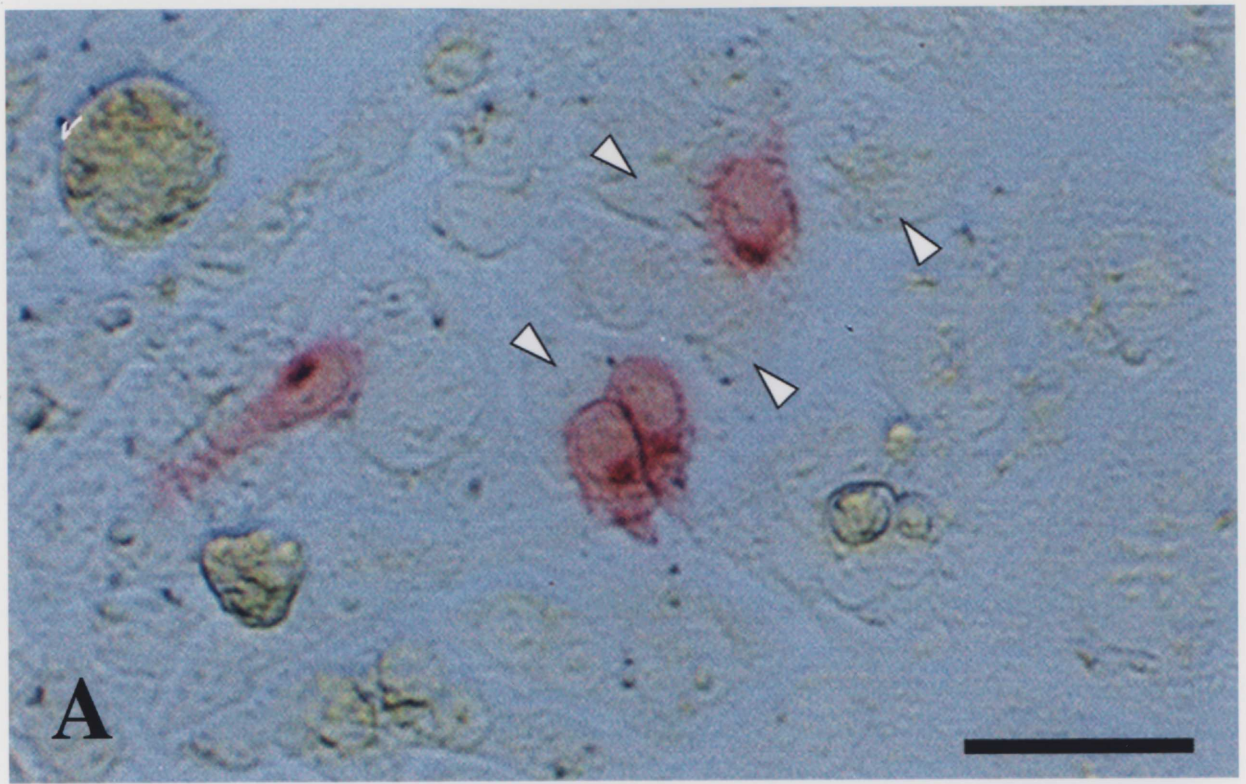
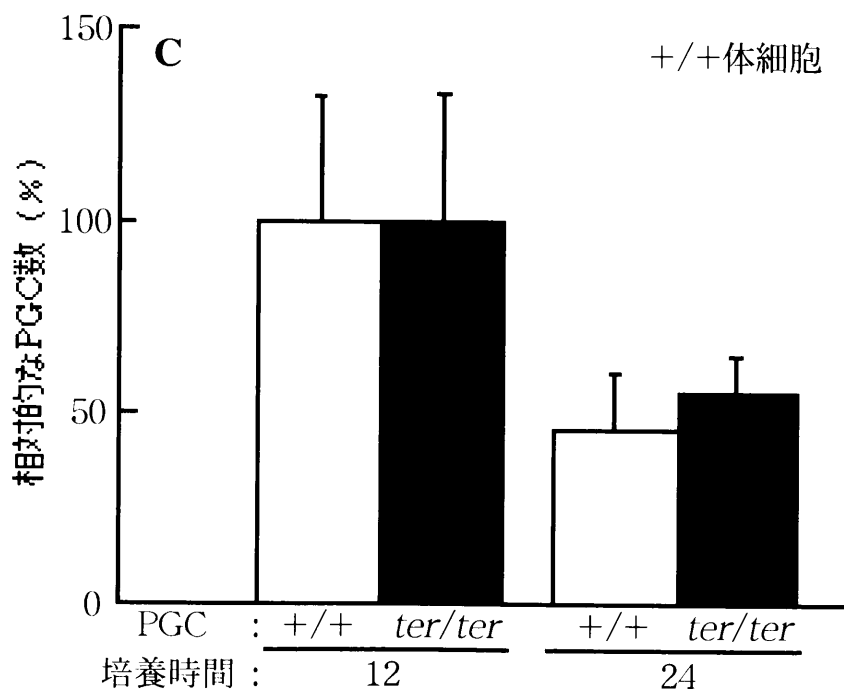
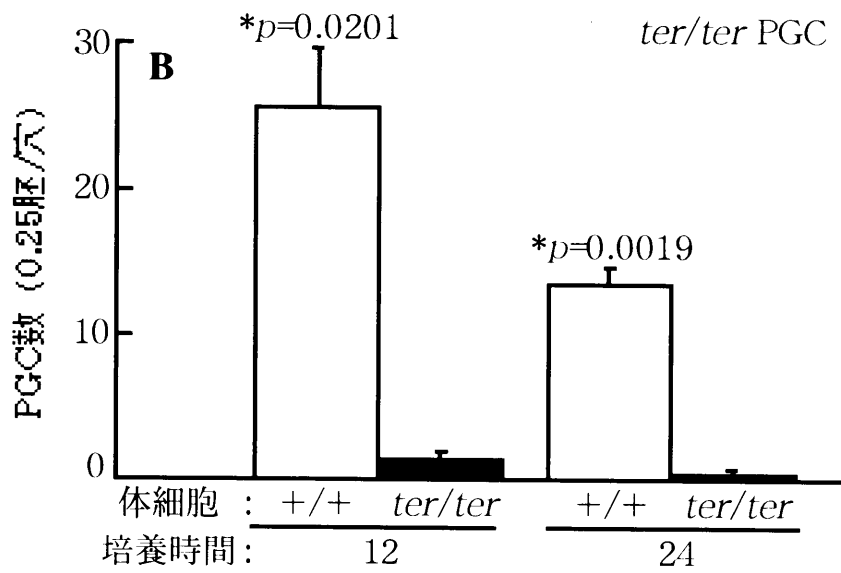
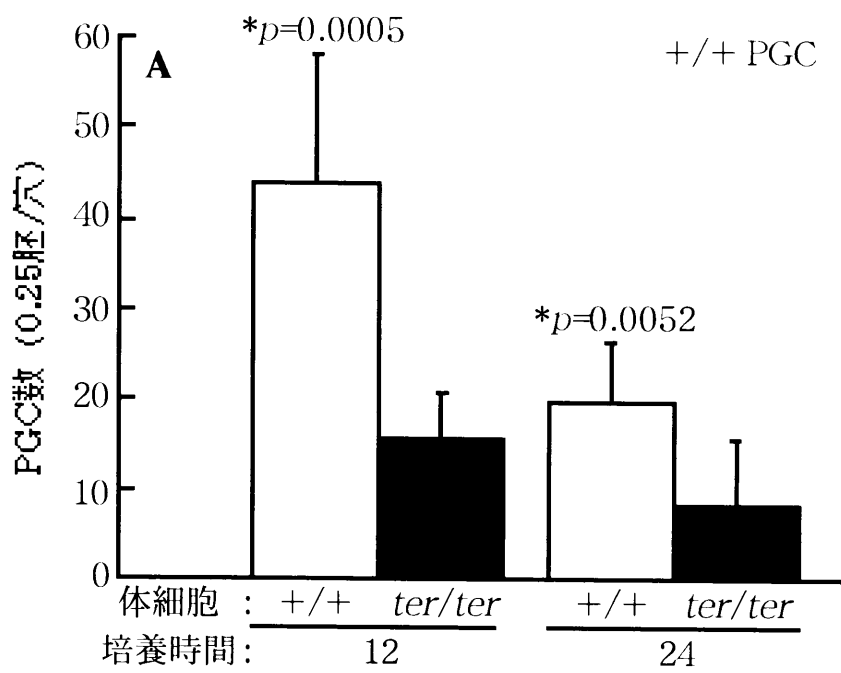


図10 ; LTXBJ- +/ *ter*系の胎齡11.5日生殖隆起から単離したPGCと体細胞を*ter*遺伝子型で“交換共培養”した後のPGC数の変化。
(A、B) 縦軸は1穴当たり0.25胚相当のPGC数を、横軸は培養時間及び体細胞の遺伝子型を示している。*は同期間内で有意な差があったことを示し、その*p*値を示している。(A) 各遺伝子型の体細胞上で共培養した+/+PGC。(B) 各遺伝子型の体細胞上で共培養した*ter/ter*PGC。(C) +/+体細胞上で共培養した各遺伝子型のPGC。縦軸は培養12時間のPGC数を100%とした場合の相対的なPGC数を、横軸は培養時間及びPGCの遺伝子型を示している。



の、PGCの生存は維持されており、遺伝子型の違いによる差がなかった。

ところで、これらの正常な PGC にもアポトーシスを起こした PGC も共培養された生殖隆起体細胞と接触してみえる場合が多く、同様な傾向は前述の胎齢 9.5 日 PGC でも見られたので、これらの培養細胞を WT1 染色し、セルトリ細胞或いはろ胞細胞と PGC の関係を調べた。全 PGC 数と WT1 陽性の体細胞上に存在する PGC 数を数えた結果、その割合は約 85% であり、PGC はフィーダー上に接着するよりむしろ共培養したセルトリ細胞様或いはろ胞細胞様体細胞と接触していた (表 4)。

これらのことをまとめると、胎齢 11.5 日の $+/+$ 及び ter/ter PGC は同程度に生存能を持ち、共培養した $+/+$ 体細胞に反応し、生存が維持された。一方、 ter/ter 体細胞は培養 12 時間にいずれの遺伝子型の PGC の生存を維持できずに PGC にアポトーシスによる細胞死をもたらした。

これらの PGC と体細胞の関係は共培養して 12 時間以内に引き起こされている細胞間接触を介した細胞間相互作用であると示唆された (Takabayashi *et al.*, 2001)。

表4：胎齡11.5日+/+生殖巣体細胞及びフィーダー細胞と共培養された胎齡11.5日+/+PGCの局在

	セルトリ細胞上*	フィーダー細胞上**
PGC数	263 ± 43 (85%)	44.5 ± 0.7 (15%)

セルトリ細胞上とフィーダー細胞上に局在するPGC数の間には有意な差があった ($p=0.01$)。

*；セルトリ細胞は WT1陽性の黒い核を有していた。

**；WT1陰性の生殖巣体細胞とフィーダー細胞を含む。

V-2. 胎仔生殖巣体細胞の培養上清 (CM) を用いた *ter* 遺伝子発現の解析

交換共培養の結果から+/+胎仔生殖巣体細胞は PGC との接触を介して PGC の生存及び増殖を支持していること及び、*ter/ter* 体細胞は PGC のアポトーシスを誘導することを明らかにした。しかしながら、“交換共培養”系では *ter/ter* 体細胞の膜に結合した何らかの因子が PGC のアポトーシスを誘導する可能性、或いは+/+体細胞に存在する因子を *ter/ter* 体細胞が欠くため接触する PGC がアポトーシスを起こすかは不明であった。また、体細胞は *ter* 遺伝子に関係する分泌性の因子を培地中に放出している可能性も考慮する余地がある。これらの点を解明すると共に、*ter* 遺伝子に関わる因子が既知の種々の PGC に対する増殖因子とどのような関係を持つのかを明らかにするため、既知の増殖因子やサイトカインの+/+及び *ter/ter* 精巣における発現を調べた (Takabayashi *et al.*, 印刷中)。

V-2-a) *ter* 遺伝子の生殖巣体細胞の培養上清 (CM) の調製 (図 11 参照)

ter コンジェニック系マウスの *ter/ter* 生殖巣は生殖細胞を欠損し、且つ+/-生殖巣の3分の1以下の大きさになる (図 1)。また、胎仔精巣では *ter* 遺伝子型による大きさの差は見られない (図 3)。*ter/ter* 生殖巣の体細胞自体に増殖能に差があるかは不明である。そこで、胎仔生殖巣体細胞を培養し、CM を得る前に培養系において *ter* 遺伝子型による体細胞の増殖の差があるか否かを調べた。LTXBJ-+/*ter* 系の胎齢 14.5 日の1胚分の生殖巣の PGC と体細胞を分離し、分離率と細胞数を遺伝子型ごとに比較した。“分離培養”によって分離した細胞を AP 染色後、血球計算盤によって各遺伝子型の細胞数を概算した。その結果を表 5 に示した。SSLP により推定された+/,+/,+/*ter* 及び *ter/ter* 精巣から単離された PGC 数は一個体当たりそれぞれ約 12,250 個、11,880 個及び 583 個であり、+/,+/,+/*ter* PGC 数と *ter/ter* PGC 数の間には有意な差があり ($p<0.01$)、*ter/ter* 胎仔においては生殖細胞欠損がみられた。このことから用いられた胚で *ter* 遺伝子座と *Grll* 遺伝子座で組み換えのないことが示された。“PGC 分画”における全細胞分の AP 陽性細胞数の割合は+/,+/,+/*ter* 及び *ter/ter* においてそれぞれ 63、66 及び 19%であり、いずれの遺伝子型の“PGC 分画”にもほぼ同数の AP 陰性の体細胞が混入していたが。これに対して、+/,+/,+/*ter* 及び *ter/ter* 体細胞分画における AP 陰性の体細胞数は 1.90×10^5 個、 1.80×10^5 個及び 1.84×10^5 個であり、

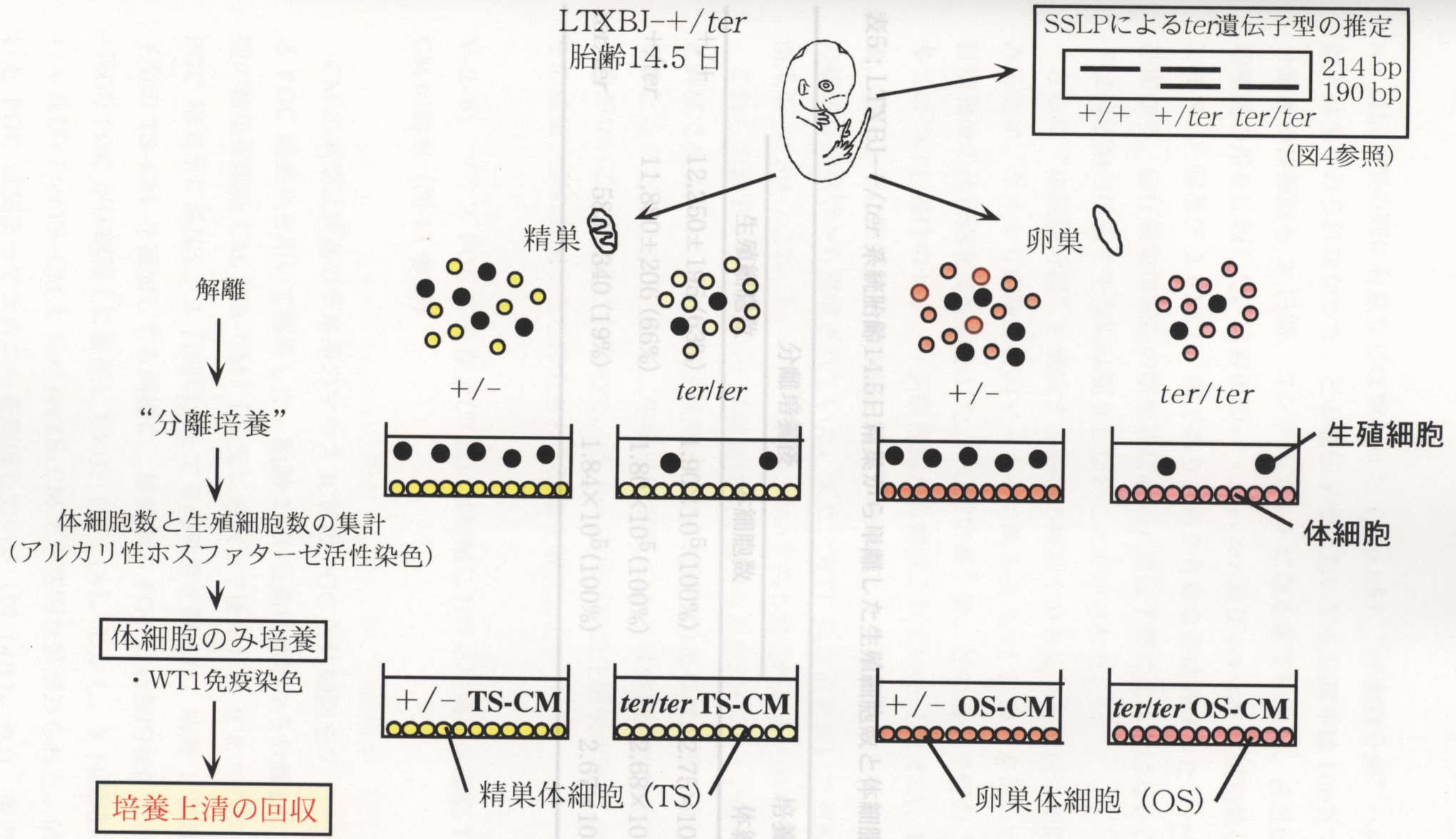


図11 ; LTXBJ-+/ter系の胎仔精巢体細胞培養上清 (TS-CM) 及び卵巢体細胞培養上清 (OS-CM) の調製。各遺伝子型の胎齢14.5日の精巢及び卵巢を解離し、“分離培養”により体細胞と生殖細胞を分け、細胞数を集計する。体細胞の培養上清 (CM) を回収する。体細胞はWT1免疫染色する。

表5 ; LTXBJ-*+/ter* 系統胎齡14.5日精巣から単離した生殖細胞数と体細胞数

	分離培養後		培養3日後 体細胞数
	生殖細胞数	体細胞数	
<i>+/+</i>	12,250 ± 195 (63%)	1.90 × 10 ⁵ (100%)	2.75 × 10 ⁵ (100%)
<i>+/ter</i>	11,880 ± 206 (66%)	1.80 × 10 ⁵ (100%)	2.68 × 10 ⁵ (100%)
<i>ter/ter</i>	583 ± 340 (19%)	1.84 × 10 ⁵ (100%)	2.67 × 10 ⁵ (100%)

ter 遺伝子型の間には有意な差は無かった ($p>0.05$)。“体細胞分画”への AP 陽性細胞の混入は全くみられなかった。どの遺伝子型においても分離率は 100%であった。さらに分離後の体細胞を 3 日間、コンフルエントになるまで培養し、各遺伝子型の体細胞の増殖能の差を比較した。培養後の+/+、+/*ter* 及び *ter/ter* 体細胞数は 2.75×10^5 個、 2.68×10^5 個及び 2.67×10^5 個であり、各々有意な差は無かった ($p>0.05$)。これらの結果から、胎仔精巣体細胞の増殖能には *ter* 遺伝子型による差はないこと及び *ter* 遺伝子は体細胞の増殖や生存には関与しないことが示された。

さらに“体細胞分画”を構成する細胞の種類や分布に *ter* 遺伝子型間で差がないかをみるため、セルトリ細胞の核内マーカーである抗 WT1 抗血清を用いて分離直後と 3-6 日培養後の体細胞を免疫染色した。“分離培養”後、どの遺伝子型の“体細胞分画”も多くは WT1 陽性のセルトリ前駆細胞から構成されていた (図 12A、B)。培養 3-6 日後、遺伝子型に関係なく“体細胞分画”は WT1 を発現するセルトリ細胞と WT1 陰性の繊維芽細胞等から構成されていた。また、WT1 抗血清を抜いた対照及び繊維芽細胞由来の SI/ SI4-m220 フィーダー細胞にはいずれも染色性はみられなかった。

これらの結果から、*ter/ter* 体細胞は増殖能でも形態的にも+/+ 或いは+/*ter* 体細胞と同様であり、*ter* 遺伝子は生殖巣体細胞の増殖や分化には影響を及ぼさないことが明らかとなった。このことから、生殖巣体細胞 CM には体細胞数の差による成分の濃度差等がないことが確認されたので、各 *ter* 遺伝子型の生殖巣体細胞 CM を回収して、その遺伝子型に起因すると考えられる効果を解析した。

V-2-b) マウス PGC の生存及び/ 或いは増殖における生殖巣体細胞 TS-CM 及び OS-CM の効果 (図 13 参照)

CM の効果は普通が多産系のマウス ICR の PGC と体細胞をフィーダー上で共培養する PGC 培養系を用いて解析した。胎齢 14.5 日胎仔精巣から分離した 3 種類の遺伝子型の精巣体細胞 CM (TS-CM) (20%に希釈して使用) を ICR マウスの胎齢 9.5 日の PGC 培養系に添加し、3 日間培養してその効果を調べた。培養 1 日後、いずれの遺伝子型の TS-CM を添加しても同様に、移動期の PGC に特徴的な仮足を延ばし、アメーバ状の PGC が体細胞上に散在していた (図 14A)。しかし、3 日間培養された PGC は+/+ 及び+/*ter*TS-CM と *ter/ter*TS-CM で形態的な差がみられた。前者では散在していた PGC は集まってコロニーを形成していた (図 14B)。他方、後者ではそれらに加え、

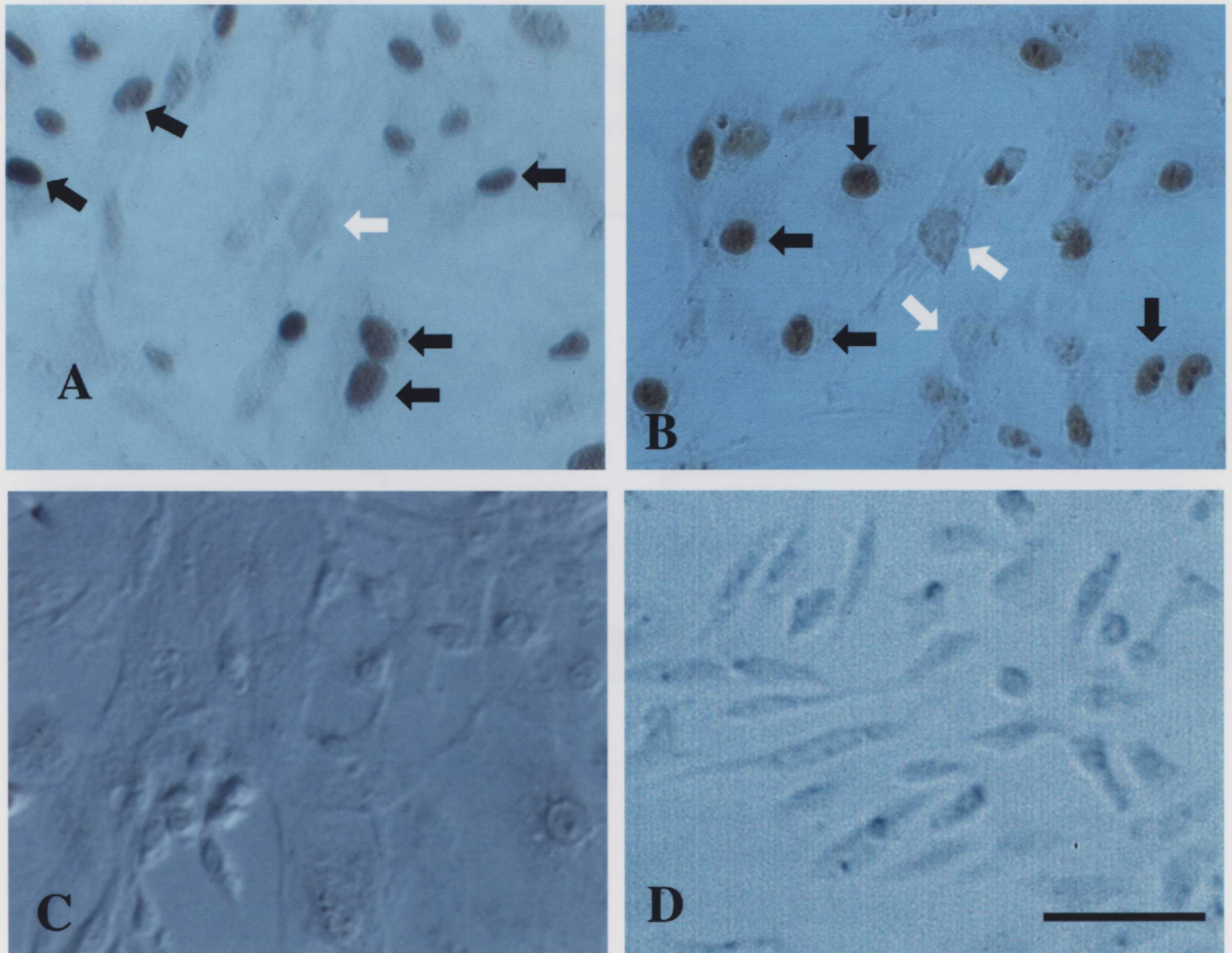


図 12 ; LTXBJ-+/ter系の胎齢 14.5日精巣“分離培養”後の WT1 免疫染色像。+/+型 (A、C) 及び *ter/ter*型 (B) 精単体細胞は全てアルカリ性ホスファターゼ陰性であった。多くの黒色を呈した核を有する WT1 陽性のセルトリ前駆細胞 (黒矢印) と WT1 陰性の核を持つ繊維芽細胞等 (白矢印) に A と B で差はない。対照の 1 次抗体 (抗 WT1 抗体) を抜いた染色像 (C) と SI/SI4-m220 フィーダー細胞の像 (D) はすべての WT1 陰性。下線は 50 μ m

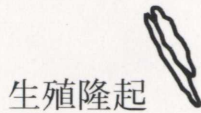
ICR系マウス

胎齡9.5日

胎齡11.5日



或いは



**+/- TS-CM, *ter/ter* TS-CM,
+/- OS-CM 或いは *ter/ter* OS-CM
の添加**

(図11参照)

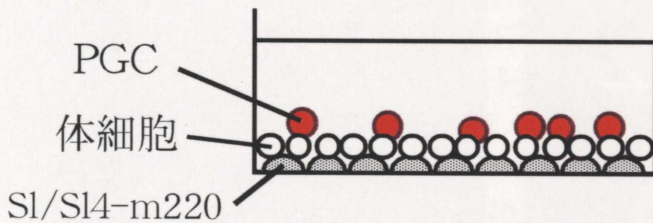
解離



PGC

体細胞

- 各種処理
- ・ CMの熱変性
 - ・ CMの分子量分画 (3万以上或いは3万以下)



- 1-3日間培養
アルカリ性ホスファターゼ染色
或いは4C9免疫染色
TUNEL法
BrdU免疫染色

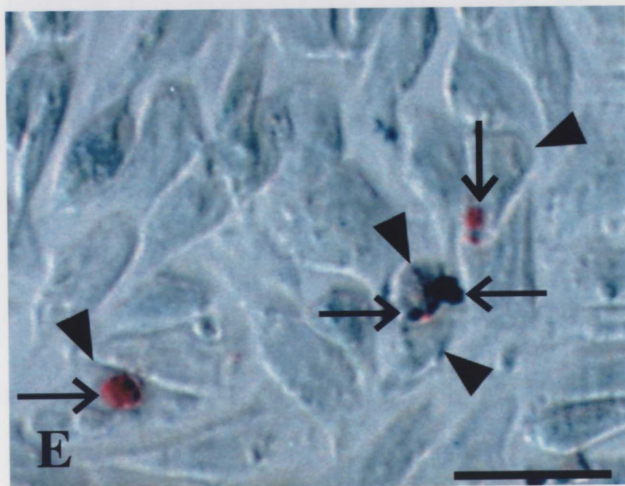
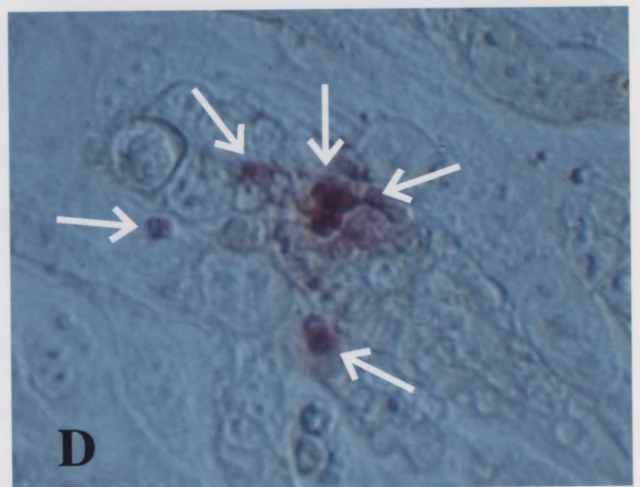
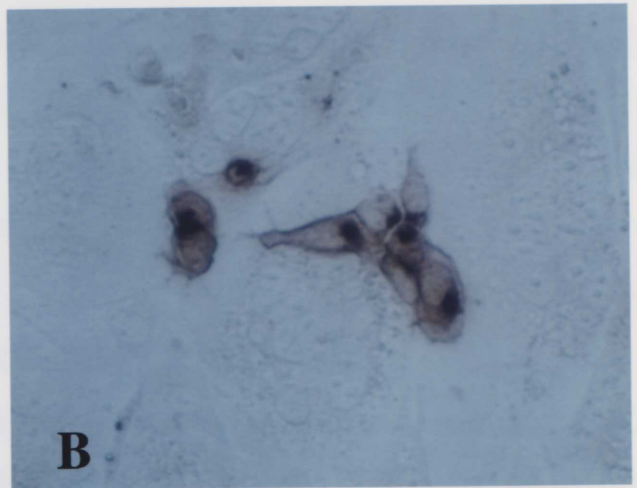
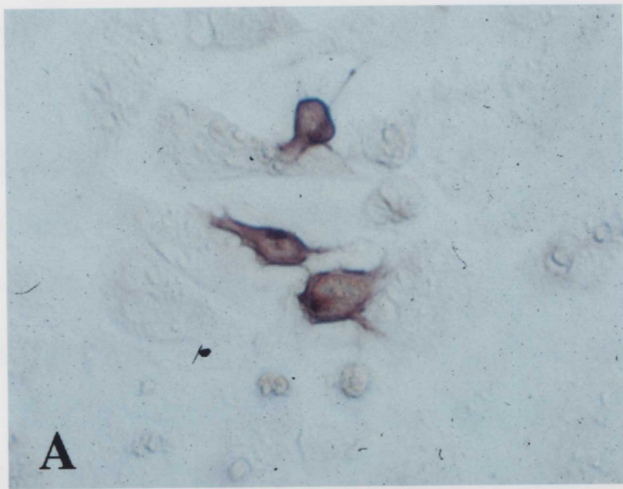
PGC数の集計、形態の観察

図13 ; ICR胚PGC及び体細胞“共培養系”を用いたPGCの増殖及び生存に対するLTXBJ-+/terのTS-CM及びOS-CMの効果の解析。胎齡9.5日或いは11.5日のPGC培養系へ各*ter*遺伝子型 (+/+, +/*ter* 或いは*ter/ter*) のTS-CM或いはOS-CMは無処理或いは各種処理後添加し、1日から3日間培養する。培養後アルカリ性ホスファターゼ或いは4C9免疫染色によりPGCを同定し、集計し効果を比較する。さらにTUNEL法及びBrdU免疫染色を行う。

図14 ; TS-CM (20%) で培養されたICR系胎齡9.5日 (A、B) 及び胎齡11.5日 (C-F) のPGC。

PGCは後腸或いは生殖隆起 (C-F) の体細胞と共にSl/Sl4-m220フィーダー上で培養した。培養後、4C9免疫染色 (A、B) 、アルカリ性ホスファターゼ染色 (C、D) 及びBrdU免疫染色/アルカリ性ホスファターゼ二重染色 (E、F) を行った。

(A) +/+TS-CMで1日培養後のPGC。移動期のPGCに特徴的な仮足を持つPGCが点在している。(B) +/+TS-CMで3日培養後のPGC。仮足を無くしつつある球形PGCがいくつか固まりコロニーを形成している。(C) +/+TS-CMで1日培養後のPGC。隣接したPGCが観察される。(D) *ter/ter*TS-CMで1日培養後のPGC。アポトーシスに特徴的なアポトーシス小体 (黒矢じり) の像が観察される。正常なPGCもみられた。下線は25 μ m



アポトーシス小体を示す PGC が多数出現した。これら PGC の特徴は *in vivo* の特徴とよく似ていた。次に、PGC が生殖隆起に定住する時期の胎齢 11.5 日の ICR マウス PGC の培養系に TS-CM (20%) を添加し、1 日間培養して効果を調べた。+/+ 及び +/terTS-CM を添加した培養系では PGC は球形を帯びていた (図 14C)。これに対して ter/terTS-CM を添加したものでは球形の PGC に加え、PGC のアポトーシスに特徴的な AP 陽性のアポトーシス小体を示している像が多数観察された (図 14D)。前述の 9.5 日 PGC 培養系でみられた像とよく似ていた。そこで ter/terCM で PGC のアポトーシスが起きたかを確認するため、培養後、TUNEL 染色を行った。その結果、典型的な TUNEL 陽性の核断片を含む PGC 細胞質断片が多数観察された (図 14E)。そこで、各 CM の効果を判定するため正常な形態を示す PGC 数を集計した (図 15)。PGC 数は対照として用いた CM 無添加の培地(対照培地)で 1 日間培養された PGC 数を 100% とした相対値で示した。胎齢 9.5 日 PGC では培養 1 日では、いずれの ter 遺伝子型 CM でも PGC 数に差はみられなかった。培養 3 日目、+/+ 及び +/ter TS-CM で培養された PGC は増殖し、1 日目の数に比べて 2 倍に増えていた。しかしながら、ter/ter TS-CM で培養された PGC は 1 日培養に比べ、僅かに増えているのみで、その数は対照培地と同じ程度であった (図 15A)。

ter 遺伝子による生殖細胞欠損は雌雄差がある (Noguchi *et al.* 1996)。ter コンジェニック系統において雄は生殖細胞を欠き不妊であるが、雌は少数の生殖細胞が残り、僅かに妊性がある。この雌雄差が卵巣の体細胞にあるかを確認する必要がある。そこで、胎仔卵巣体細胞の CM (OS-CM) が TS-CM と同様に ter 遺伝子型による PGC に対する効果の差を持つかを調べた。その結果、胎齢 9.5 日の PGC は培養 1-3 日後にはいずれの CM でも形態は TS-CM と同様に移動期に特徴的な形態から生殖巣に定住してコロニーを形成する時期に特徴的な形態に変化した。ter/terCM ではアポトーシスを起こしたものが多数みられた。正常な PGC 数を数えた結果(図 15B)、1 日後は PGC 数に遺伝子型による差はなかった。培養 3 日後、+/+ 及び +/ter OS-CM は対照培地と ter/ter OS-CM に比べて PGC 数を増加させた。この結果は TS-CM においても OS-CM においても PGC に対する効果に雌雄差はないことを示唆した。

同様に ICR 胎齢 11.5 日 PGC を各種 CM 中で 1 日培養した後、正常な PGC 数を数えた結果を図 16 に示す。TS-CM を 20%濃度で添加した場合 (図 16A)、+/+ 及び +/terTS-CM を添加した PGC は対照培地及び ter/ter TS-CM で培養された PGC に比べ約 1.5 倍に細胞数が増加しており、その差は有意であった ($p < 0.05$)。他方、ter/ter

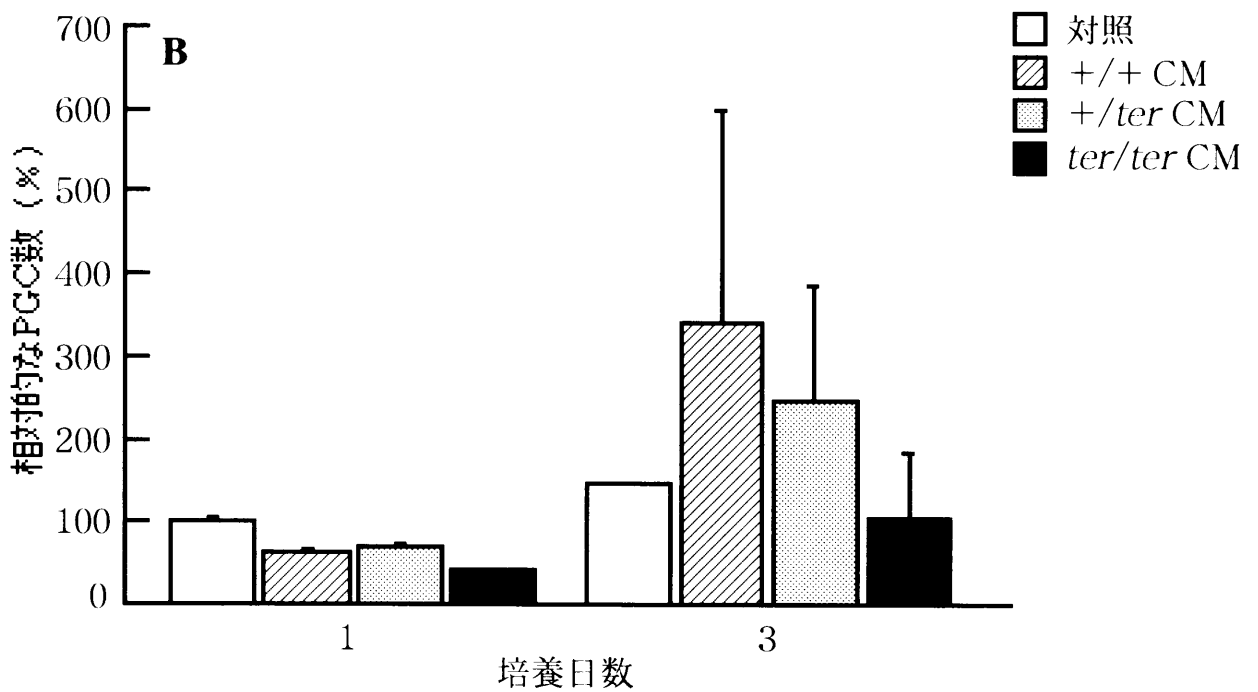
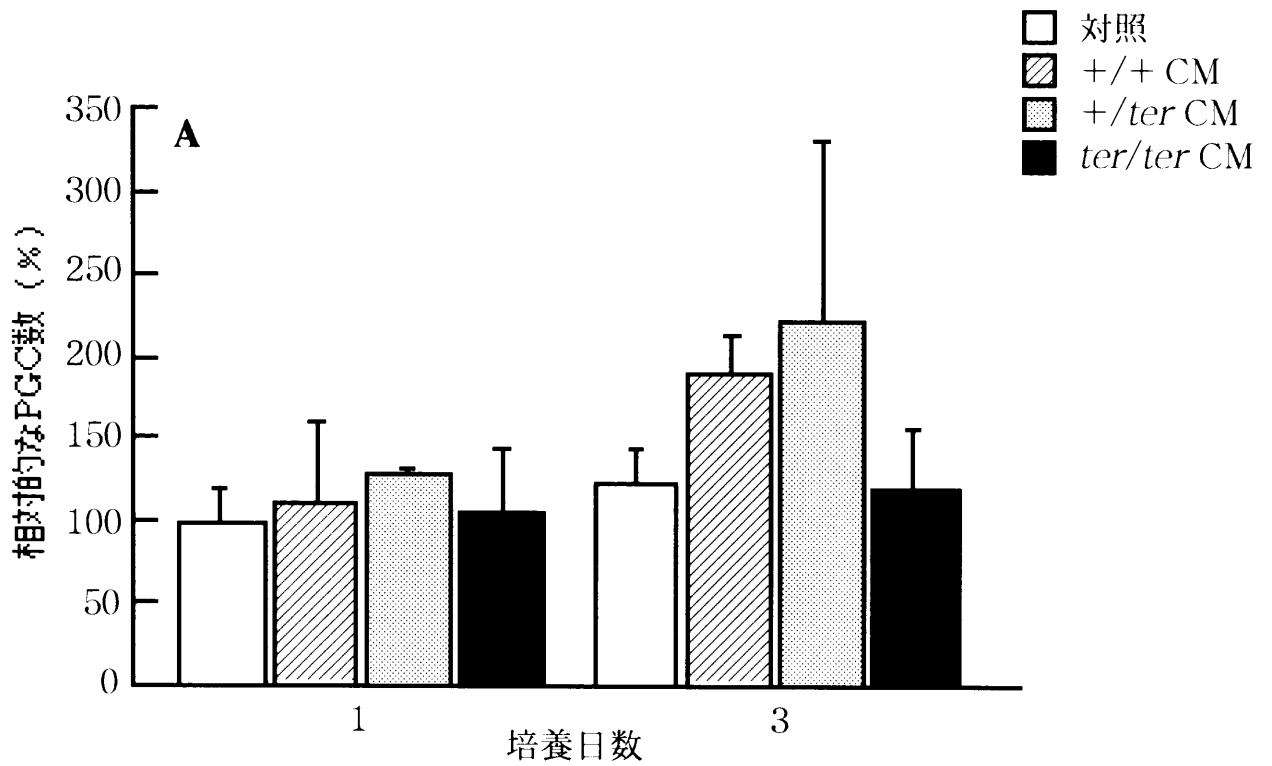
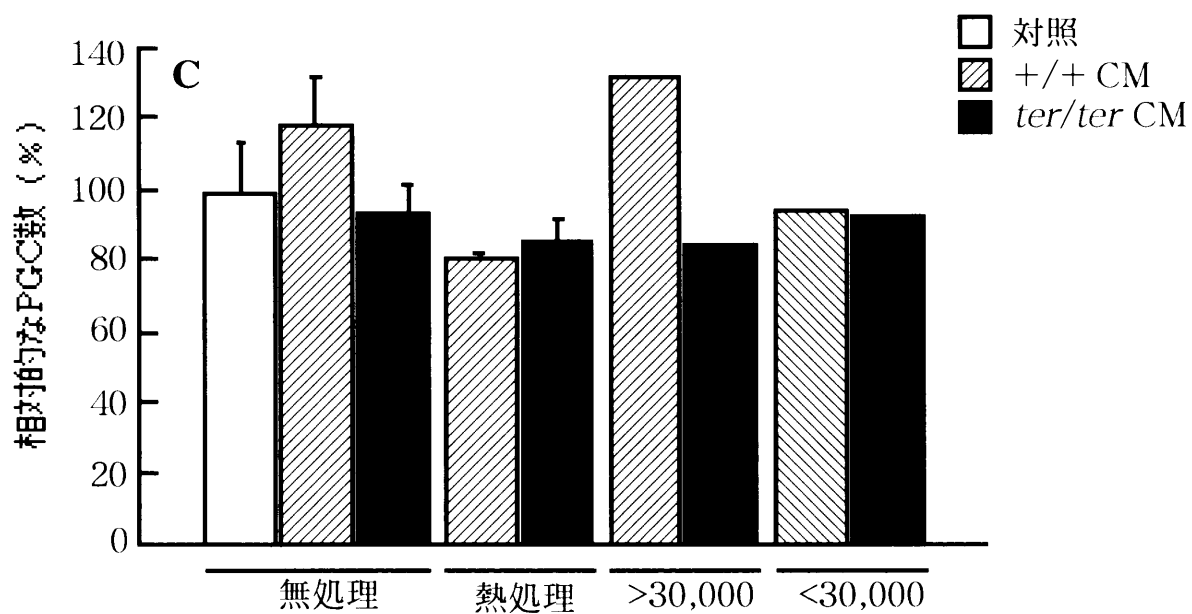
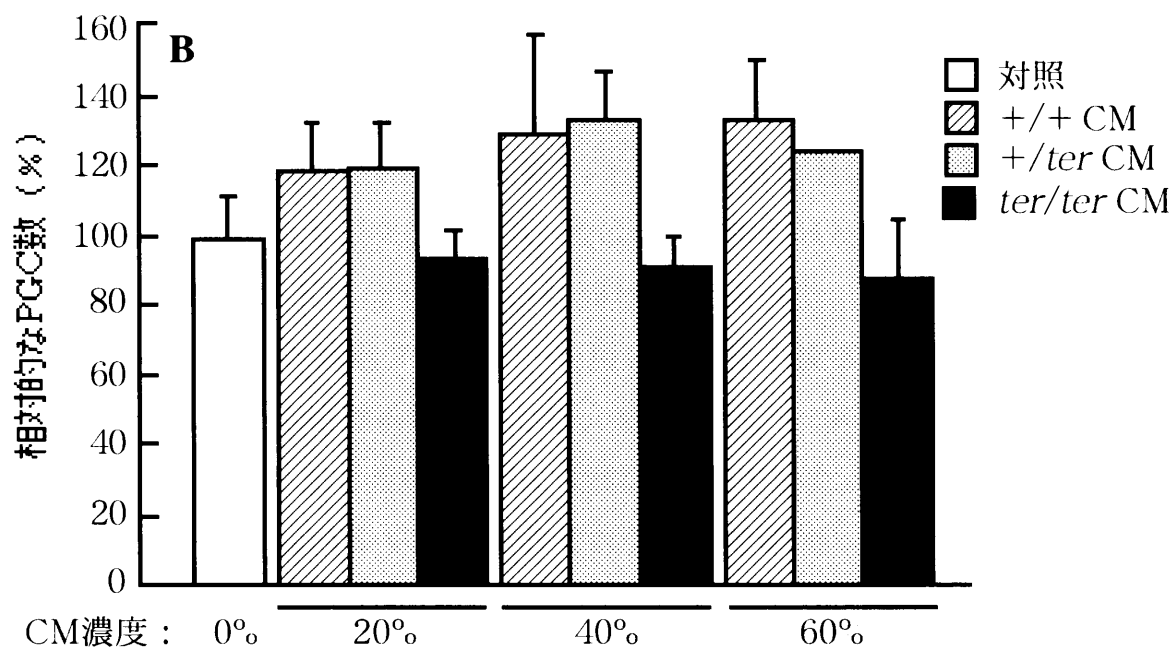
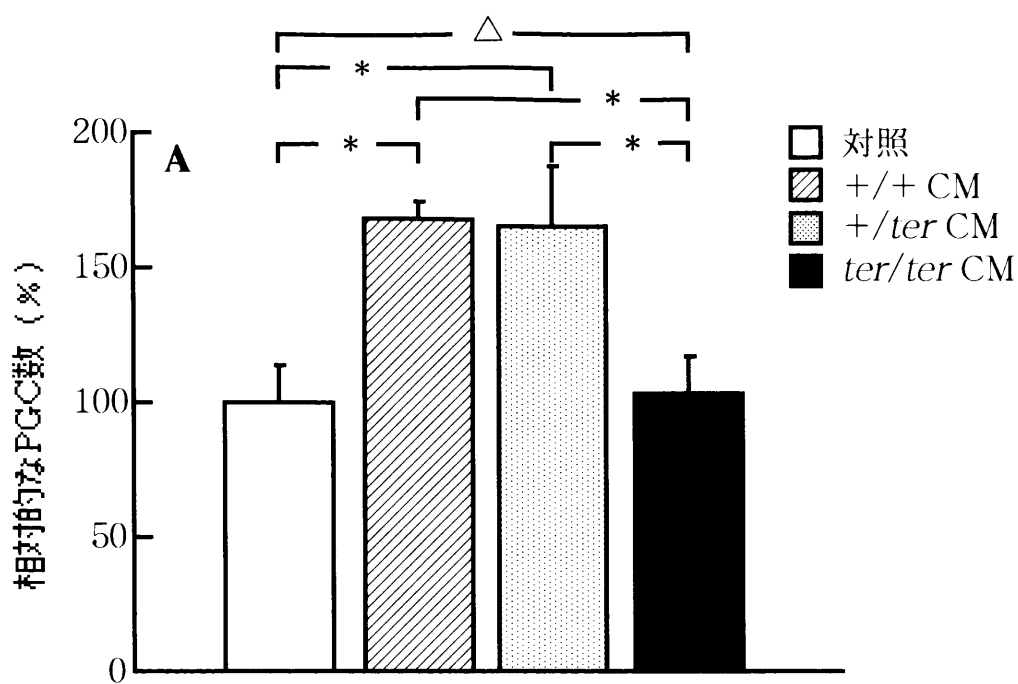


図15 ; TS-CM (A) 及びOS-CM (B) で1日及び3日培養後のICR系胎齢9.5日PGC数の変化。

各CMの濃度は20%とし、CM無添加を対照とした。縦軸は1日培養後の0.5胚相当の対照のPGC数を100%としたPGC数の相対値を示し、横軸は培養日数を示している。

図16 ; ICR系胎齡11.5日PGCの増殖に対するTS-CMの効果。CM無添加を対照とした。縦軸は対照の0.25胚相当のPGCの1日培養後の数を100%とした時の相対的なPGC数の変化を示している。それぞれ1日培養。(A) 20%の濃度で TS-CMを添加。(B) 0-60%と濃度を変えてTS-CMを添加。(C) TS-CMを各種処理をして添加。
*有意差あり、△有意差なし。



TS-CM と対照培地では PGC 数は変わらなかった。ICR 胎齢 11.5 日 PGC 培養系を用いて各種 CM の PGC に対する効果を見た結果、胎齢 9.5 日 PGC の場合と同様に、+/+ 及び +/terCM では対照培地に比べ PGC 数の増加があり、ter/terCM では対照培地程度に留まった。このことから、PGC の生存を支持する成分が+/+CM 及び+/terCM にはあるが、ter/terCM にはその成分を欠くため PGC のアポトーシスが救えない可能性が考えられる。そこで CM の濃度による効果を調べた。+/+ 及び+/terCM は濃度 40 及び 60% で PGC 数は 20% より僅かに増加を示したが、ter/terCM では PGC 数は対照より僅かに減少した (図 16B)。即ち、ter/terCM には+/+CM にある PGC を支持する成分が欠けていることが示唆された。

+/-CM 中に含まれる PGC の生存に効果がある成分が蛋白質性のものであるかを確認するために、100℃で 5 分間煮沸し、各 TS-CM を ICR 胎齢 11.5 日の PGC 培養系に添加しその効果を調べた。その結果、+/+TS-CM における PGC 数を増加させる効果が煮沸したことにより消失し、PGC 数は+/+TS-CM 及び ter/terTS-CM どちらにおいても対照培地以下になり、互いに同程度であった (図 16C)。さらに+/+ 及び ter/terTS-CM を限外濾過フィルターを用いて、分子量 3 万以上の分画と 3 万以下の分画にそれぞれ分けて培養系に添加した。その結果、+/+TS-CM の分子量 3 万以上の分画で PGC を培養したときのみ PGC 数は増加していた。+/+TS-CM の分子量 3 万以下の分画及び ter/terTS-CM のそれぞれの分画を添加した場合は PGC 数の増加は、対照培地と同程度だった (図 16C)。

これらの結果から+/+ 及び+/ter 胎仔生殖巣体細胞を培養して得られる CM 中には PGC の増殖或いは生存を助ける成分が含まれていることが明らかとなった。この成分は分子量 3 万以上の蛋白質性の液性因子であることも同時に明らかとなった。そして、ter/ter 体細胞はこの成分の産生を欠くことそれにより PGC のアポトーシスが抑えられないことが示唆された。

V-2-c) 培養された PGC の BrdU 取り込みに対する TS-CM の効果

+/+ 及び+/ter の TS-CM 中に含まれる液性因子が PGC の増殖を促進する因子なのか或いは生存を維持する因子なのかについて明らかとするために、細胞周期の DNA の合成期 (S 期) にある細胞への BrdU の取り込みに対する CM の効果を調べた。各遺伝子型の TS-CM を添加して胎齢 9.5 日及び胎齢 11.5 日の PGC を培養し、培養終了の 1 時間前にチミジンを除き BrdU を加えた培地に交換して、AP 染色及び BrdU 抗

体免疫染色の上重染色を行った。いずれの CM においても同様に AP 陽性 PGC、AP 陽性で且つ BrdU を取り込み黒い核を持つ PGC (AP/ BrdU 陽性 PGC) 及び AP 陰性で黒い核を持つ体細胞 (BrdU 陽性体細胞) がそれぞれ観察された (図 17A、B)。そこで AP/ BrdU 陽性 PGC 数を全 AP 陽性 PGC 数で割って BrdU を取り込んだ PGC 数の割合をまとめた (図 18)。その結果、胎齢 9.5 日 (図 18A) 及び胎齢 11.5 日 (図 18B) の PGC 培養系に +/+、+/*ter* 及び *ter/ter* いずれの TS-CM を添加しても PGC の BrdU の取り込みに差はなく約 30%であった。PGC の BrdU の取り込み率は既に他で報告されている率と等しかった (Dolci *et al.*, 1993; Kawase *et al.*, 1994)。このことから、+/+ 及び +/*ter* CM は PGC の DNA 合成 (S 期) を促進させて、PGC 数を増加させているのではなく、生存を維持する作用を持っており、その結果、PGC は増殖するため、数を増していたことが明らかになった。他方、*ter/ter* CM は PGC の S 期には影響しないが PGC の生存を維持できずアポトーシスが起きてしまい、細胞数が減少することが明らかとなった。これは *ter* 遺伝子の機能が PGC の S 期に関係しないことを意味する。

V-2-d) +/+ 及び *ter/ter* 精巣における増殖因子の発現

“交換共培養”と CM を用いた PGC 培養系の結果は生殖巣体細胞は *Sl* 遺伝子のように *ter* 遺伝子に関連した PGC の増殖因子を産生していることを示唆した。この *ter* 遺伝子に関連する増殖因子が SCF の様な既知の PGC 増殖因子とどのような関係にあるかを確認するため、*ter* コンジェニック系統の各遺伝子型精巣における増殖因子の発現を免疫染色と RT-PCR を用いて調べた。

免疫染色は胎齢 14.5 日の胎仔及び 1 ヶ月齢以上の成熟マウスの精巣を用いた (図 19、20)。各ステージの精巣は SSLP により遺伝子型を推定後、切片にしたものの一部を HE 染色し、生殖細胞の有無を確認した。さらに、胎仔については 4C9 抗体を用いて、PGC の有無を確認した (図 19A、B)。

SCF 蛋白質の発現はすべてのステージの +/+ 及び *ter/ter* 精巣において確認された。胎齢 14.5 日では、+/+ 及び *ter/ter* 精巣で SCF の発現の局在に差はみられなかった (図 19C、D)。成熟精巣ではセルトリ細胞の細胞質で発現が強かった。さらに +/+ 精巣の精母細胞の核においても発現がみられた (図 20A、B)。

TGF β 1 と bFGF の発現パターンは血球系の発現を除き、非常によく似ていた (図

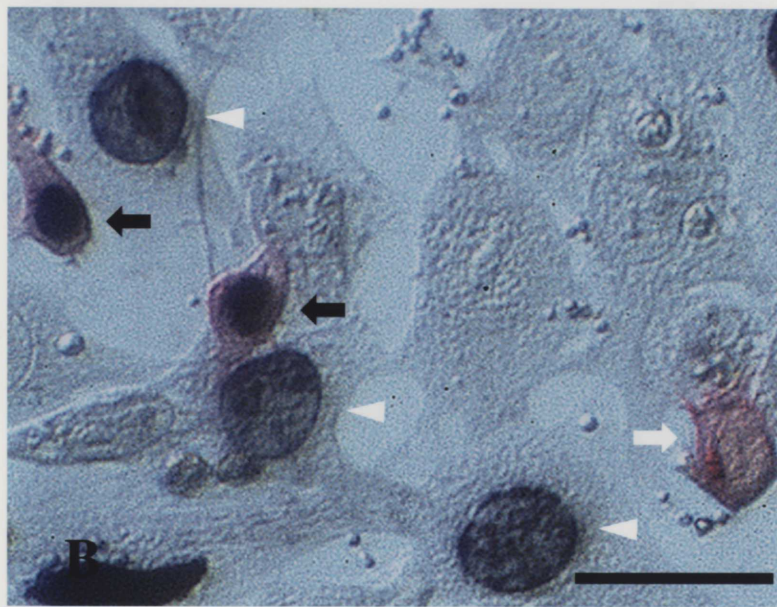
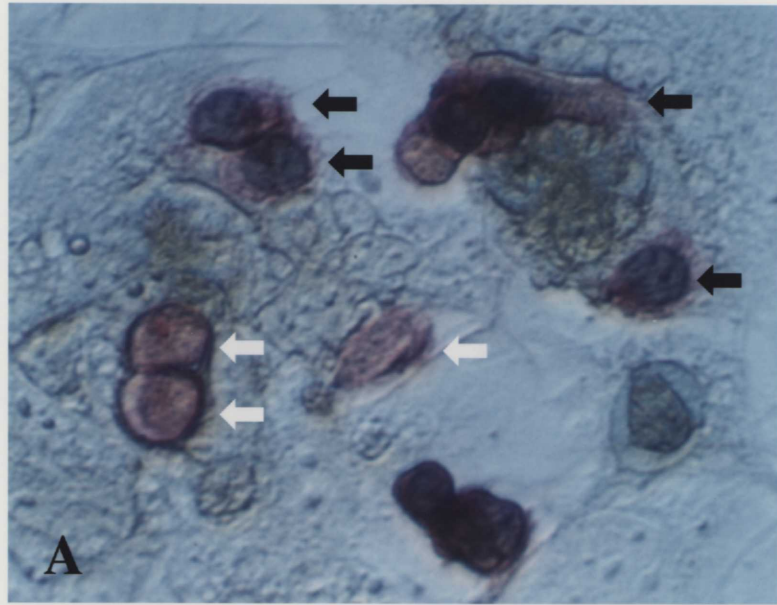


図 17 ; TS-CM 中で BrdU を取り込んだ ICR 胎齡 11.5 日 PGC の培養顕微鏡像。

+/+TS-CM (A) 及び *ter/ter*TS-CM (B) で 1 日培養後、BrdU を取り込んだ黒褐色の核を持つ赤色の PGC (黒矢印) と取り込んでいない PGC (白矢印) がみられる。共培養された体細胞中にも黒褐色の核を持つ細胞周期の S 期のもの (白矢じり) がみられる。下線は 25 μ m

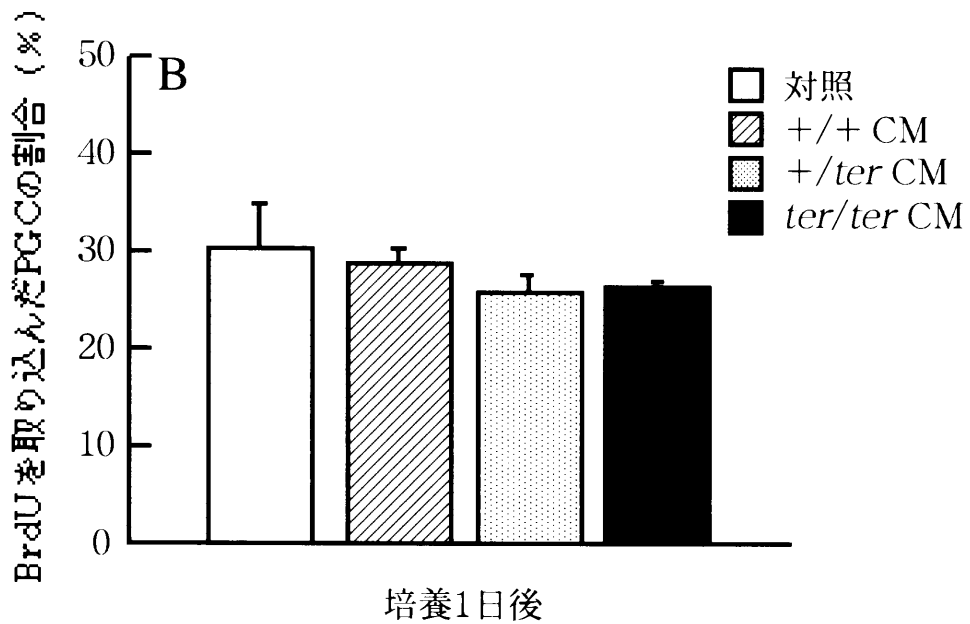
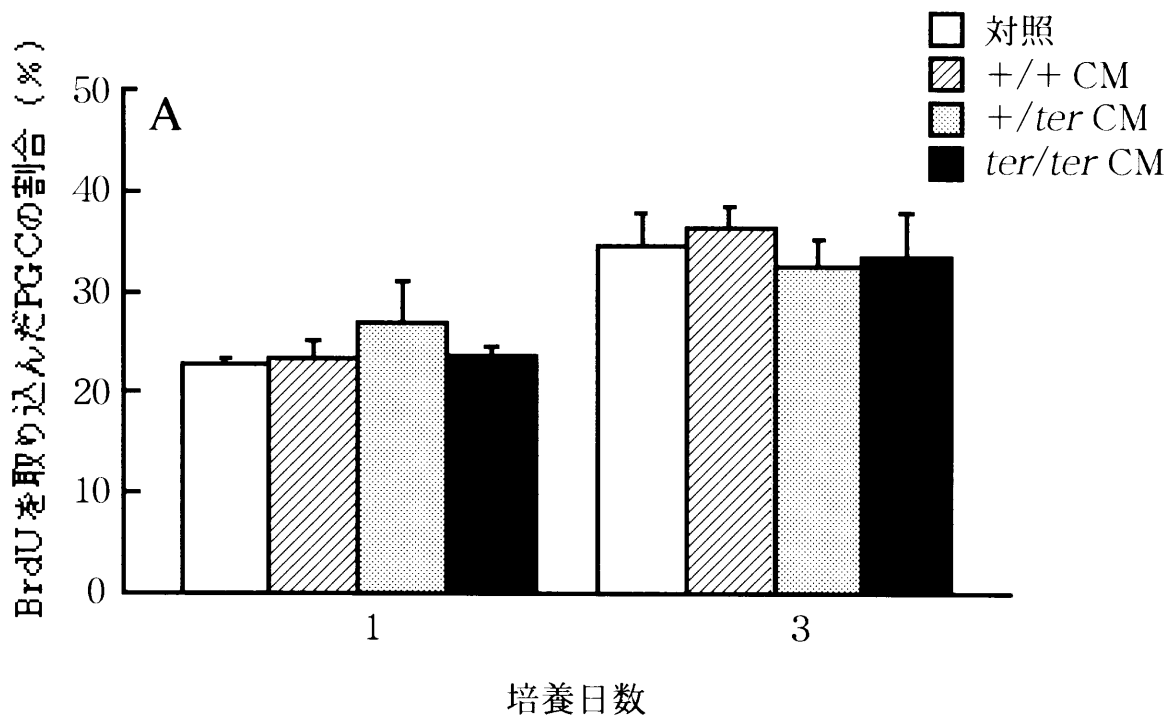


図18 ; ICR系の胎齡9.5日PGC (A) 及び11.5日PGC (B) の PGC培養系におけるBrdUの取り込みに対するTS-CM添加の効果。
縦軸は全アルカリ性ホスファターゼ陽性PGC数に対するBrdUを取り込んだPGCの割合 (%) を示している。

図19 ; LTXBJ-+/ter系胎齢14.5日の精巣における各種増殖因子に対する免疫染色像。+/+精巣 (A、C、E、G、I、K、M、O、Q) の精細管内には丸い大型の生殖細胞が多数みられる。一方、ter/ter精巣 (B、D、F、H、J、L、N、P、R) の精細管内にはごく僅かの生殖細胞が残っているのみである。また、精細管は+/+精巣に比べて細い。(A、B) 4C9免疫染色。+/+精巣では多数の4C9陽性の生殖細胞が精細管内に詰まっている (A) 。ter/ter精巣における生殖細胞の一部がアポトーシスをおこしており、4C9 陽性のアポトーシス小体 (矢印) が多数点在していた。また、僅かに残っている生殖細胞 (矢じり) の4C9染色性が薄れ始めている (B) 。4C9免疫染色により生殖細胞の有無を確認後、各種増殖因子 ; SCF (C、D) 、TGFβ1 (E、F) 、bFGF (G、H) 、OSM (I、J) 、LIF (K、L) 、IL-4 (M、N) 、NRGβ (O、P) 、TNFα (Q、R) に対する抗体を用いて免疫染色を行った。+/+精巣とter/ter精巣においてPGCに対する既知増殖因子の発現に差はみられない。

下線は50 μm

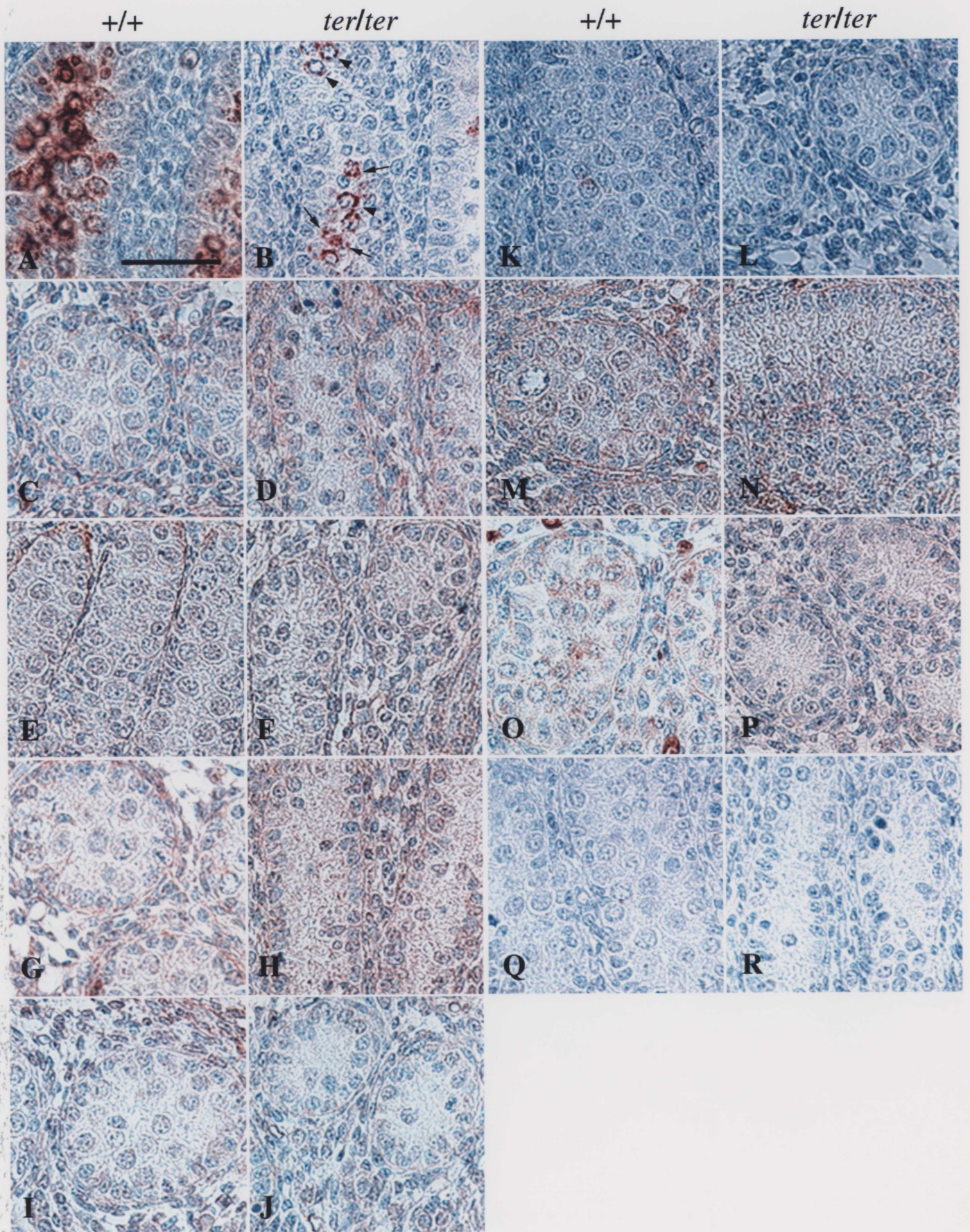
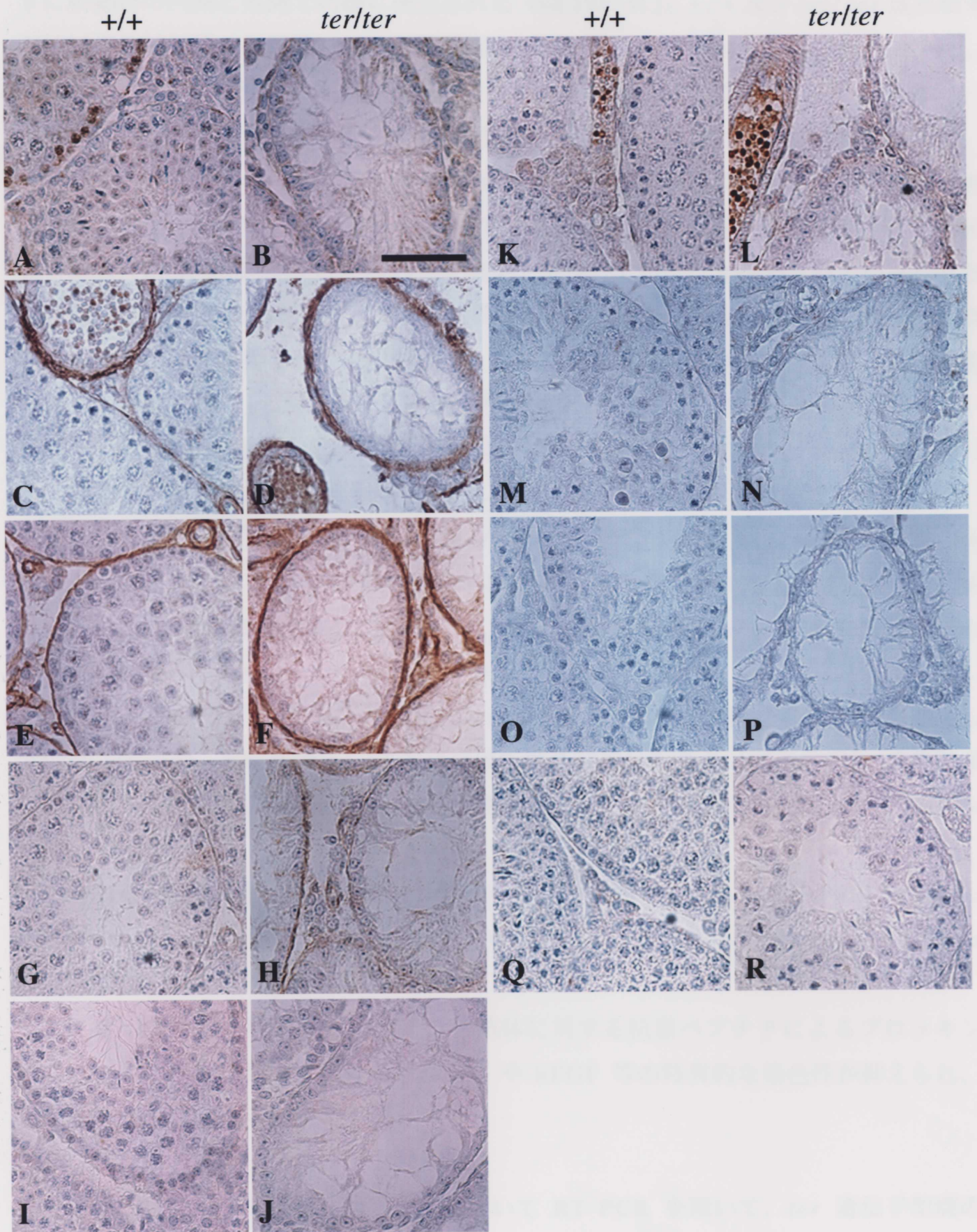


図20 ; LTXBJ- +/ *ter*系成熟精巣の各種増殖因子に対する免疫染色像。+/+ 精巣 (A、C、E、G、I、K、M、O、Q) の精細管内には精子形成過程の精原細胞、精母細胞及び精子がみられる。一方、*ter* / *ter* 精巣 (B、D、F、H、J、L、N、P、R) の精細管内には生殖細胞は全くなくセルトリ細胞のみがみられる。各種増殖因子 ; SCF (A、B)、TGF β 1 (C、D)、bFGF (E、F)、OSM (G、H)、LIF (I、J)、IL-4 (K、L)、NRG β (M、N) 及びTNF α (O、P) に対する抗体を用いて免疫染色を行った。+/+ 精巣と*ter* / *ter* 精巣においてPGCに対する既知増殖因子の発現に差はみられない。それぞれの抗体に対する抗原ペプチドを用いた対照 (Q、R)。抗SCF抗体 (Q) や抗TGF β 1抗体 (R) を用いた免疫染色でみられた染色性が抑えられている。下線は50 μ m



19E-H、図 20C-F)。胎齢 14.5 日においてはそれぞれの増殖因子は遺伝子型に関係せずに精細管の内側と外側で同様に検出された (図 19E-H)。+/+ 及び *ter/ter* 成熟精巣では同様に精細管の周囲筋様細胞と間質細胞で強いシグナルがみられた (図 20C-F)。TGF β 1 はさらに血管内の血球が強い陽性を示した (図 20C、D)。

OSM は+/+ 及び *ter/ter* 精巣で弱い発現を示していた (図 19I、J、図 20G、H)。胎齢 14.5 日ではどちらの遺伝子型も精細管内のセルトリ細胞の細胞質に僅かに強い発現がみられた (図 19I、J)。OSM は機能的にも構造的にも LIF と関連したサイトカインであり (Rose and Bruce, 1991)、生殖巣で発現していることが知られている。しかしながら、本研究の免疫染色では胎仔精巣及び成熟精巣いずれにおいても LIF 蛋白質の発現は検出できなかった (図 19K、L、図 20I、J)。それぞれのサイトカインは細胞表面上のレセプター gp130 を介して細胞内に情報を伝達する (Gearing *et al.*, 1992)。gp130 蛋白質の発現は生殖細胞及び体細胞の膜表面に局在していた。*ter/ter* 精巣においても強い発現がみられた (図示せず)。

IL-4 の発現は胎齢 14.5 日では IL-4 の強いシグナルが+/+ 及び *ter/ter* 精巣の体細胞の細胞質と+/+ 精巣の生殖細胞の細胞質において確認された (図 19M、N)。成熟精巣の血管内の細胞に強く確認された。弱い染色性が精細管の外側の間質細胞でみられた (図 20K、L)。

NRG β は胎齢 14.5 日の+/+ 及び *ter/ter* 精巣のセルトリ細胞と間質細胞で発現していた (図 19O、P)。しかし、その発現は生後 7 日では弱まり (図示せず)、成熟精巣における NRG β の発現はいずれの遺伝子型の精巣においてもみられなかった (図 20M、N)。

TNF α の発現は胎齢 14.5 日の生殖細胞で僅かに発現しているようだが非常に弱かった (図 19Q、R)。成熟精巣においてはどちらの遺伝子型の精巣でも発現していなかった (図 20O、P)。

これらの染色性の特異性はそれぞれの抗体に対する抗原ペプチドによるブロッキングの実験により確認した。その結果、SCF や bFGF 等の特異的な染色性が抑えられ、これら抗体の特異性が確認された。

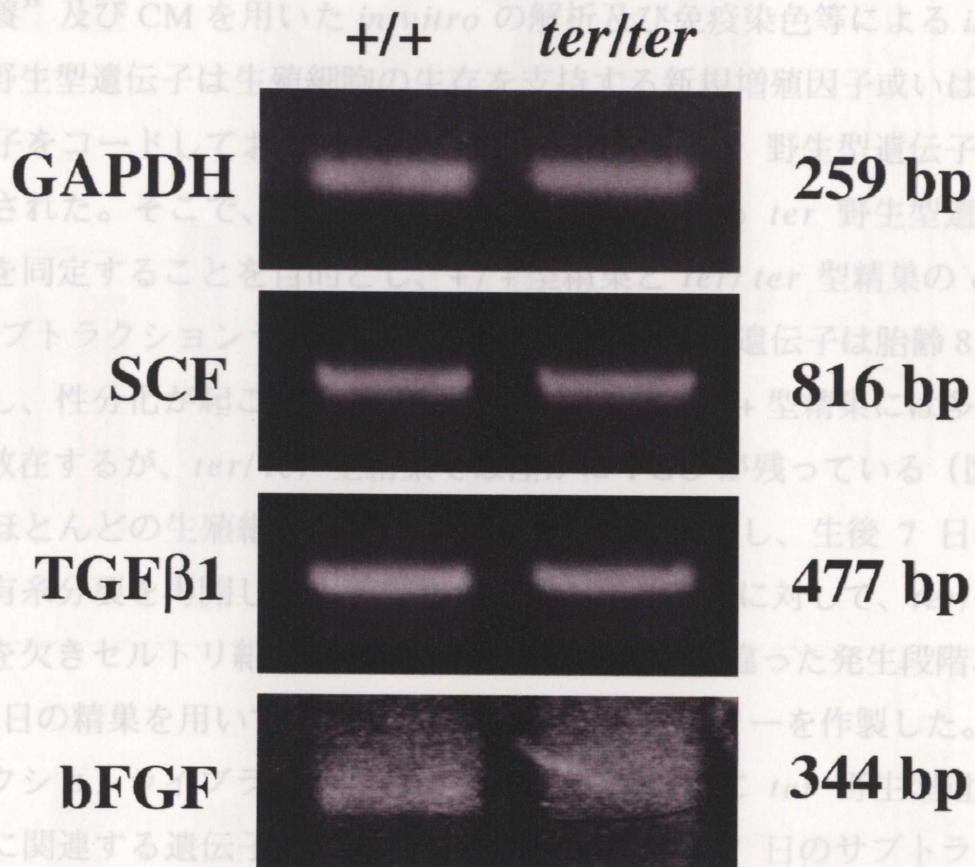
さらに、いくつかの重要な増殖因子について RT-PCR を用いて、*ter* 遺伝子型間の RNA レベルでの発現量を半定量的に比較した。PGC に対して特に重要な増殖因子 SCF、LIF、TGF β 1、bFGF 及び TNF α の mRNA の発現を生後 7 日及び胎齢 12.5 日の+/+ 及び *ter/ter* 精巣から抽出した cDNA を用いて調べた。陰性対照として cDNA の代わ

りに水を用いて PCR 反応を行い、PCR 産物がないことを確認した。SCF、TGF β 1 及び bFGF mRNA の発現は+/+ 及び *ter/ter* 精巣において同様に発現していた。その発現量にも差はなかった (図 21)。しかし、LIF と TNF α の mRNA の発現は+/+ 及び *ter/ter* 精巣にどちらにおいても検出できなかった。このことは、これら蛋白質が免疫染色で検出されなかったことと一致した。

これらの結果から *ter/ter* 精巣も+/+ 精巣と同様に既知の増殖因子を産生していることが明らかになった。即ち、*ter* 遺伝子はこれら既知の増殖因子ではなく、これら増殖因子と直接関係しない新規の増殖因子であることが示唆される。

V-3. cDNA サブトラクションライブラリーによる+/+精巣で特異的に発現する *ter* 関連遺伝子の探索 (図22 参照)

“交換共培養”及びCMを用いた *in vitro* の解析から、*ter* 野生型遺伝子は生殖細胞の生存を支持する新規増殖因子或いは増殖因子を調節する遺伝子をコードしていることが示唆された。そこで、その関連遺伝子を同定することを目的として、*ter* 野生型精巣の cDNA との間に cDNA サブトラクションライブラリーを用いて、*ter* 型精巣の cDNA との間で cDNA サブトラクションライブラリーの機能が発現し、性別決定後の PGC が散在するが、*ter* 型精巣においては有性生殖細胞内には生殖細胞を欠きセルトリ細胞及び生後 7 日の精巣を用いた cDNA サブトラクションライブラリー (7/W-*ter*) では主に *ter* 野生型遺伝子及び生殖細胞で特異的に働いている遺伝子の同定を目的とした。



12.5/W-*ter* 及び 7/W-*ter* サブトラクションライブラリーからそれぞれ 190 個及び 187 個の cDNA クローンが得られ、それらの塩基配列を決定した。塩基配列のホモロジーを検索し、ライブラリーから得た cDNA クロンの 13 個が既知の遺伝子と 22 個がマウスの EST とホモロジーを持っていることがわかった。さらにどちらともホモロジーがない未知の cDNA が 25 個あった。

次に W-*ter* で優先的に発現している遺伝子のスクリーニングをするために cDNA マクロアレイを行った。胎齢 12.5 日の 4 枚のメンブレン (12.5/W-*ter*-1、12.5/W-*ter*-2、12.5/*ter*-W-1 及び 12.5/*ter*-W-2) に対して ³²P でラベルした 12.5/W-*ter* サブトラクションライブラリーをハイブリダイゼーションさせた (図23)。さらにサブトラクシ

V-3. cDNA サブトラクシオンライブラリーによる+/+精巣で特異的に発現する *ter* 関連遺伝子の探索 (図 22 参照)

“交換共培養” 及び CM を用いた *in vitro* の解析及び免疫染色等による *in vivo* の解析から、*ter* 野生型遺伝子は生殖細胞の生存を支持する新規増殖因子或いは増殖因子を調節する遺伝子をコードしており、+/+ 生殖巣体細胞で *ter* 野生型遺伝子が働いていることが示唆された。そこで、+/+ 型体細胞で発現している *ter* 野生型遺伝子及びその関連遺伝子を同定することを目的とし、+/+ 型精巣と *ter/ter* 型精巣の cDNA との間で cDNA サブトラクシオンライブラリーを作製した。*ter* 遺伝子は胎齢 8.0 日からその機能が発現し、性分化が起こる胎齢 12.5 日においては+/+ 型精巣には多くの AP 陽性の PGC が散在するが、*ter/ter* 型精巣では僅かに PGC が残っている (図 3)。しかし、出生前にほとんどの生殖細胞がアポトーシスにより死滅し、生後 7 日の+/+ 型精巣においては有糸分裂を再開した生殖細胞が多数みられるのに対して、*ter/ter* 型精巣内は生殖細胞を欠きセルトリ細胞のみである。今回、2 つの違った発生段階、胎齢 12.5 日及び生後 7 日の精巣を用いてサブトラクシオンライブラリーを作製した。胎齢 12.5 日のサブトラクシオンライブラリー (12.5/W-*ter*) では主に *ter* 野生型遺伝子及びそのカスケードに関連する遺伝子の同定を目的とした。生後 7 日のサブトラクシオンライブラリー (7/W-*ter*) では主に *ter* 野生型遺伝子及び生殖細胞で特異的に働いている遺伝子の同定を目的とした。

12.5/W-*ter* 及び 7/W-*ter* サブトラクシオンライブラリーからそれぞれ 190 個及び 187 個の cDNA クローンが得られ、それらの塩基配列を決定した。塩基配列のホモロジーを検索した結果を表 6 及び 7 に示す。12.5/W-*ter* サブトラクシオンライブラリーから得た cDNA は 61 個が既知の遺伝子と 34 個がマウスの EST とホモロジーを持っていることがわかった。さらにどちらともホモロジーがない未知の cDNA が 13 個あった。また、7/W-*ter* サブトラクシオンライブラリー から得た cDNA は 69 個が既知の遺伝子と 22 個がマウスの EST とホモロジーを持っていることがわかった。さらにどちらともホモロジーがない未知の cDNA が 25 個あった。

次に W-*ter* で優先的に発現している遺伝子のスクリーニングをするために cDNA マクロアレイを行った。胎齢 12.5 日の 4 枚のメンブレン (12.5/W-*ter*-1、12.5/W-*ter*-2、12.5/*ter*-W-1 及び 12.5/*ter*-W-2) に対して ³²P でラベルした 12.5/W-*ter* サブトラクシオンライブラリーをハイブリダイゼーションさせた (図 23)。さらにサブトラクシ

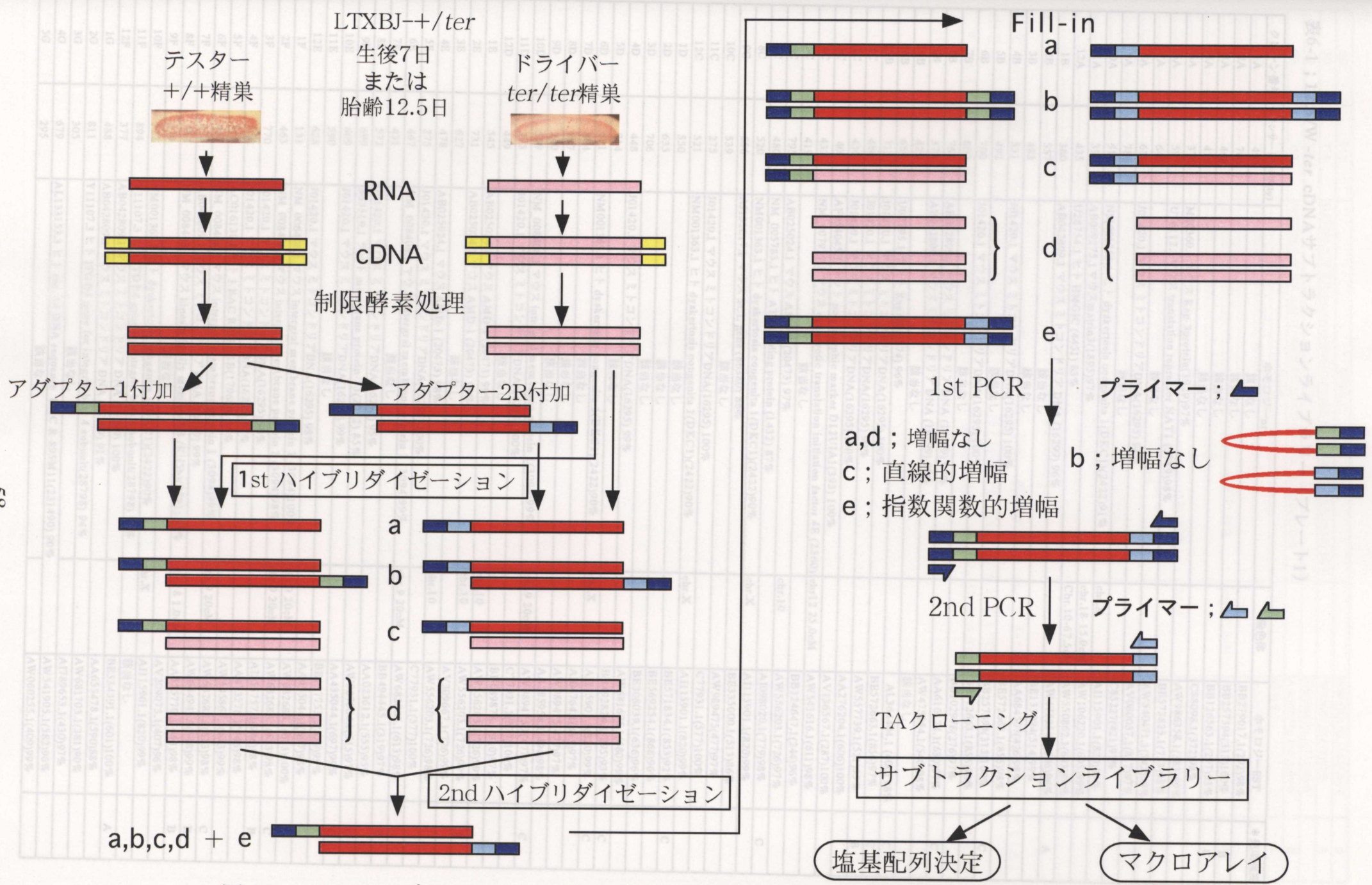


図 21 ; cDNA サブトラクションライブラリーを用いた *ter* 関連遺伝子の探索。
+/+ 精巣 cDNA から *ter/ter* 精巣 cDNA を引き算して *+/+* で特異的に発現している遺伝子を同定する。

表6-1 ; 12.5/W-ter cDNAサブトラクションライブラリー (プレート1)

クローン番号	インサートサイズ(bp)	ホモロジーnr	染色体	ホモロジーEST	*発現強度
1A	493	該当なし		BB279017.1(292)98%	
2A	706	該当なし		BB257394(313)100%	B
3A	468	該当なし		BB126563.1(297)93%	C
4A	410	該当なし		C88098.1(372)98%	
5A	376	M80360.1 マウス Rep-3protein(3929)97%		AW986358.1(383)99%	
6A	597	U76112.1 マウス translation repressor NAT1 (3789)98%		BE573825.1(753)98%	
7A	642	該当なし		AW540471.1(542)99%	
8A	619	J01420.1 マウス ミトコンドリアDNA(16295) 98%		AV080037.1(817)97%	
9A	786	該当なし		C85227(421)97%	
10A	519	NM001363.1 ヒト dyskertosis congenita 1(DKC1)(2422)91%	chr.X	AII15901.1(820)99%	
11A	393	AB009275.1 マウス matrin3(1895)97%	chr.18-15.0cM	AW106220.1(695)99%	
12A	435	U28754.1 ヒト HMGIC (4451) 83%	Chr.10-67.5cM	AW550862.1(643)99%	
1B	380	AB042809.1 マウス ミトコンドリア DNA (16299) 96%		AW475254.1(546)96%	A
2B	557	該当なし		BE135994(514)99%	
3B	483	該当なし		AA684507(426)98%	
4B	531	J01420.1 マウス ミトコンドリアDNA(16295) 100%		BE572663.1(856)98%	
5B	492	該当なし		BB257394(313)100%	C
6B	700	J01420.1 マウス ミトコンドリアDNA(16295) 100%		BE572663.1(856)98%	
7B	609	該当なし		BB102978(276)97%	
8B	768	AB042809.1 マウス ミトコンドリア DNA (16299) 97%		AA616174.1(630)97%	C
9B	373	AB042809.1 マウス ミトコンドリア DNA (16299) 98%		AW475254.1(546)98%	
10B	429	該当なし		該当なし	
11B	659	U07795.1 ラット Rap1B (1874) 96%		AL364404.1 (400) 98%	C
12B	713	J01420.1 マウス ミトコンドリアDNA(16295) 100%		BE572663.1(856)97%	C
1C	486	J01420.1 マウス ミトコンドリアDNA(16295) 99%		AW557739.1(521)99%	B
2C	430	J01420.1 マウス ミトコンドリアDNA(16295) 100%		AA276204.1(606)100%	
3C	40	AF054045.1 ラット polymorphic marker D12UIA1(395) 100%		AV136567.1(287)100%	
4C	432	NM_007917.1 マウス eukaryotic translation initiation factor 4E (2360)	chr12 25.0cM	AW541616.1(611)98%	
5C	419	該当なし		BB124647.1(244)96%	
6C	795	AB025024.1 マウス AMD-1 (20473) 97%	chr.10	AW556203.1(726)97%	
7C	480	NM_005783.1 ヒト ATP binding protein (1432) 87%		AI098020.1(779)98%	C
8C	520	NM001363.1 ヒト dyskertosis congenita 1(DKC1)(2422)90%	chr.X	AII15901.1(820)99%	
9C	656	AJ131017.1 マウス SCL gene (86380) 86%		BE335000.1(513)86%	
10C	539	該当なし		AW989475(477)97%	
11C	275	J01420.1 マウス ミトコンドリアDNA(16295) 100%		C77931.1(577)100%	
12C	521	NM001363.1 ヒト dyskertosis congenita 1(DKC1)(2422)90%	chr.X	AII15901.1(820)99%	
1D	550	該当なし		BE571834.1(853)92%	C
2D	635	該当なし		BE569254.1(868)96%	
3D	706	該当なし		BE308039.1(636)96%	
4D	448	J01420.1 マウス ミトコンドリアDNA(16295) 99%		AW681675.1(680)99%	
5D	714	該当なし		BB492824.1(295)93%	C
6D	521	NM001363.1 ヒト dyskertosis congenita 1(DKC1)(2422)90%	chr.X	AII15901.1(820)99%	C
7D	804	該当なし		AI04764.1(411)97%	
8D	807	該当なし		AW989475(477)97%	
9D	240	該当なし		AA285958.1(494)98%	
10D	559	NM_008408.1 マウス intergal membrane protein 1(3094)99%	chr.9 20cM	AW989475.1(477)97%	C
11D	275	J01420.1 マウス ミトコンドリアDNA(16295) 100%		C77931.1(577)100%	
12D	449	該当なし		BB089878.1(310)97%	
1E	545	AB025024.1 マウス AMD-1 (20473) 99%	chr.10	AW556203.1(726)99%	
2E	731	AB025024.1 マウス AMD-1 (20473) 99%	chr.10	AW556203.1(726)99%	B
3E	627	該当なし		AV309667.1(726)99%	
4E	478	AB025024.1 マウス AMD-1 (20473) 98%	chr.10	AW556203.1(726)98%	
5E	275	J01420.1 マウス ミトコンドリアDNA(16295) 100%		C77931.1(577)100%	
6E	467	NM_008408.1 マウス intergal membrane protein 1 (3094)99%	chr.9 20cM	AW682685.1(613)98%	
7E	431	該当なし		BB494445.1(319)97%	B
8E	572	J01420.1 マウス ミトコンドリアDNA(16295) 95%		AA023612.1(555)95%	
9E	699	S63519.1 ラット membrane protein-73(2012) 85%		AW987064.1(515)97%	C
10E	609	J01420.1 マウス ミトコンドリアDNA(16295) 99%		AA435044.1(697)99%	C
11E	590	該当なし		BE137753.1(529)99%	
12E	628	J01420.1 マウス ミトコンドリアDNA(16295) 98%		AA435044.1(697)98%	
1F	131	NM_008408.1 マウス intergal membrane protein 1 (3094)100%	chr.9 20cM	AW682685.1(613)100%	B
2F	463	NM_008408.1 マウス intergal membrane protein 1 (3094)98%	chr.9 20cM	AW682685.1(613)98%	C
3F	770	J01420.1 マウス ミトコンドリアDNA(16295) 98%		AI255757.1(946)98%	B
4F	568	J01420.1 マウス ミトコンドリアDNA(16295) 97%		AA473278.1(946)98%	
5F	266	AC016138.8 ヒト 3 BAC RP11-91B(179680) 85%		AW545867.1(643)99%	
6F	467	NM_008408.1 マウス intergal membrane protein 1 (3094)99%	chr.9 20cM	AW682685.1(613)98%	C
7F	373	AB042809.1 マウス ミトコンドリア DNA (16299) 99%		AW044941.1(548)99%	B
8F	782	NM_008448.1 マウス kinesin family member 5B (Kif5b)(3791) 97%	chr.18 1.0cM	AA555770.1(643)98%	B
9F	429	該当なし		AV209073.1(407)96%	
10F	522	NM001363.1 ヒト dyskertosis congenita 1(DKC1)(2422)90%	chr.X	AII15901.1(820)99%	
11F	894	Y11107.3 ヒト ITGB4 gene for integrin beta 4 subunit(28798) 91%		該当なし	
12F	377	AB042809.1 マウス ミトコンドリア DNA (16299) 100%		BE534391.1(601)100%	A
1G	488	AB042809.1 マウス ミトコンドリア DNA (16299) 91%		AA655478.1(590)88%	
2G	811	Y11107.3 ヒト ITGB4 gene for integrin beta 4 subunit(28798) 94%		AW681703.1(381)90%	
3G	305	該当なし		AI789653.1(430)97%	
4G	679	AL133153.3 ヒト chr. 14 DNA sequence BAC R-895M11(231490) 90%		AW541905.1(582)96%	
5G	295	該当なし		AW060255.1(409)99%	

6G	512	該当なし		AW490108.1(496)96%	B
7G	778	D45203.1 マウス pentylenetetrazol-related mRNA PTZ-17(1618) 93%		W83867.1(473)92%	A
8G	322	該当なし		BB556656.1(311)95%	
9G	787	M97701.1 マウス FBP1(1000)97%/M99279 マウス IL-3(1003)93%		AA562736.1(611)94%	B
10G	444	該当なし		該当なし	A
11G	469	AJ238278.1 ラット CRM1 protein(2099) 93%		AA549360.1(509)99%	
12G					
1H	435	NM011034.1 マウス proliferation-associated gene A (920) 99%	chr.4-47.0cM	AW549169.1(650)99%	A
2H	601	J01420.1 マウス ミトコンドリアDNA(16295) 98%		BE531941.1(452)97%	
3H	332	該当なし		C88098.1(372)99%	
4H	661	U29669.1 マウス MEK kinase (Mekk) intron sequence(206) 98%	chr.13	AA920050.1(378)98%	
5H	314	LO2897.1 ドッグ nonerthroid beta-spectrin (239) 93%		A1664026.1(413)100%	C
6H	371	AB042809.1 マウス ミトコンドリア DNA (16299) 99%		AW475254.1(546)99%	
7H	450	J01420.1 マウス ミトコンドリアDNA(16295) 82%		BE652269.1(656)82%	B
8H	786	AC006313.1 ヒト chr. 9, clone hRPK.465 F 21(186555) 85%		BE571834.1(853)99%	
9H	403	AC020972.3 マウス chr. 18 clone RP23-6P1 8(218100) 91%		AF093453.1(590)90%	B
10H	700	J01420.1 マウス ミトコンドリアDNA(16295) 87%		該当なし	
11H	1011	該当なし		AW682251.1(395)97%	
12H	683	該当なし		AW989475.1(477)97%	

ホモロジーnrはアクセス番号、種、相同性のある遺伝子名、配列の長さ (bp) 及び相同性 (%) を示している。
ホモロジーESTはアクセス番号、配列の長さ (bp) 及び相同性 (%) を示している。

* ; A-Cはマクロアレイによる胎齢12.5日ter / ter 精巣と比較した+/+ 精巣での発現の強度を示す。A>B>C

表6-2 ; 12.5/W-ter cDNAサブトラクションライブラリー (プレート2)

クローン番号	インサートサイズ(bp)	ホモロジーnr	染色体	ホモロジー EST	*発現強度
1A	460	NM004891.1 ヒト ribosomal protein L33-like (512) 82%		AA060132.1 (434) 96%	
2A	458	NM004891.1 ヒト ribosomal protein L33-like (512) 83%		AA060132.1 (434) 96%	B
3A	594	AJ131017.1 マウス SCL gene (86380) 85%		BE335000.1 (513) 86%	
4A	589	JO1420.1 マウス ミトコンドリアDNA (16295) 84%		AA435044.1 (697) 99%	B
5A	(576)	該当なし		AV294389.1 (275) 99%	B
6A	(623)	AL078630.1 マウス GABA B 受容体 1 (154614) 93%	chr.17	AW492077.1 (522) 100%	
7A	(951)	該当なし		該当なし	C
8A	(916)	AL031846.1 ヒト RP4-742C19 on Chr.22 (122748) 83%		AI021194.1 (642) 99%	C
9A	414	L15351.1 ハムスター α cardiac myosin heavy chain gene (32415) 89%		BB197892.1 (222) 89%	
10A	(672)	NM010441.1 マウス Hmgic (3382) 91%	Chr.10-67.5cM	AW550862.1 (643) 97%	
11A	(454)	NM007375.1 ヒト TAR DNA binding protein (2743) 96%		AI156113.1 (491) 98%	
12A	(427)	AC004854.1 ヒト PAC clone RP4-673M15 (98697) 93%		BE283263.1 (852)97%	
1B	220	AF013967.1 ラット Zis (2599) 95%	chr.3	BE634923.1 (489) 96%	
2B	376	JO1420.1 マウス ミトコンドリアDNA (16295) 100%		AW681675.1 (630) 100%	B
3B	(537)	AB025024.1 マウス AMD-1 (20473) 98%	chr.10	AW556203.1 (726) 98%	C
4B	311	JO1420.1 マウス ミトコンドリアDNA (16295) 96%		BE573439.1 (779) 96%	B
5B	539	NM010891.1 マウス Nedd5 (3170) 99%	un	AA042050.1 (620) 99%	
6B	460	該当なし		AW550651.1 (664) 97%	
7B	(617)	JO1420.1 マウス ミトコンドリアDNA (16295) 98%		AA435044.1 (697) 98%	
8B	430	Z22923.1 マウス alpha2 (IX)collagen (19479) 93%	chr.4-53.0cM	AW908796.1 (496) 92%	B
9B	464	AC004399 マウス ma03m031 (38588) 84%		AI891899.1 () 93%	
10B	632	M97701.1 マウス folate-binding protein (FBP1) (1000)97%	un	AA562736.1 (611) 96%	C
11B	674	M97701.1 マウス folate-binding protein (FBP1) (1000)97%	un	AA56736.1 (611) 95%	B
12B	(694)	NM009830.1 マウス cyclin E2 (1212) 93%	un	BE304094.1 (829) 98%	
1C	(343)	NM016389.1 ヒト HSPC068 (2801) 92%		AA553216.1 (503) 100%	A
2C	(631)	AL09773.6 ヒト 1000E10 (140207) 91%	Chr.1p12-13.3	該当なし	
3C	(593)	NM009577.1 マウス Zik1(3042) 99%	un	AW321385.1 (339) 98%	B
4C	(525)	NM007375.1 ヒト TAR DNA binding protein (2743) 94%		AA617490.1 (533) 99%	C
5C	(746)	JO1420.1 マウス ミトコンドリアDNA (16295) 84%		BE382170.1 (691) 86%	
6C	458	Z22923.1 マウス alpha2 (IX)collagen (19479) 93%	Chr.4-53.0cM	AW550651.1 (664) 99%	C
7C	(544)	AB025024.1 マウス AMD1 (20473) 98%	Chr.10	AW556203.1 (726) 98%	B
8C	306	JO1420.1 マウス ミトコンドリアDNA (16295) 97%		BE573439.1 (779) 97%	C
9C	544	NM013135.1 ラット RAS p21 proteinactivator (Rasa)(3117) 95%	Chr.13-47.0cM	AA645322.1 (502) 99%	C
10C	314	LO2897.1 ドッグ nonerthroid beta-spectrin (239) 93%		AI664026.1 (413) 100%	
11C	521	該当なし		該当なし	C
12C	443	該当なし		Z31265.1 (297) 98%	
1D	(467)	D50523.1 マウス T1-227 (3577) 100%		AI316828.1 (581) 99%	C
2D	(736)	AC005921.3 ヒト Chr.17 done hRPK1.22 (164679) 90%		BE627068.1 (554) 97%	
3D	(638)	NM014112.1 ヒト TRPS1 (10011) 91%	Chr8q24.12	AW985813.1 (457) 97%	
4D	546	AB041555.1 マウス brain cDNA clone NMcb-0169(2175) 98%		AW107833.1 (625) 98%	
5D	527	該当なし		該当なし	
6D	355	AF116268.1 マウス G-protein Xlalphas (2655) 99%		BE631903.1 (699) 99%	
7D	502	該当なし		BB479367.1 (280) 98%	
8D	(704)	AL031846.2 ヒト RP4-742C19 on Chr.22 (122748) 83%		AA238637.1 (577) 99%	
9D	340	U62136.2 ヒト enterocyte differentiation associated factor(1226)95%		AI287182.1 (459) 100%	
10D	(779)	NM013680.1 マウス t-complex protin 1(Tcp1) (1812) 96%	Chr.17-7.5cM	AW108395.1 (865) 97%	B
11D	(713)	該当なし		BE137753.1 (529) 99%	
12D	(706)	AF093677.1 マウス ATPase subunit 6 (840) 98%		AW540259.1 (601) 97%	C
1E	(616)	AB042809.1 マウス ミトコンドリアDNA (16299) 93%		AA616174.1 (630) 98%	
2E	564	NM003453.1 ヒト zinc finger protein 198 (5050) 91%	Chr.13q12	HH204514.1 (455) 96%	
3E	(640)	該当なし		BE569254.1 (868) 97%	
4E	(566)	AC006313.1 ヒト Chr.9 clone hRPK465121 (186555) 85%		BE571834.1 (853) 98%	
5E					
6E	(695)	該当なし		AA060132.1 (434) 96%	
7E	275	JO1420.1 マウス ミトコンドリアDNA (16295) 100%		C77931.1 (577) 100%	
8E	(779)	該当なし		BE137753.1 (529) 97%	
9E	417	S45812 ラット monoamine oxidase A (2104) 91%	chr.X-5.2cM	AI647326.1 (519) 99%	
10E	(785)	JO1420.1 マウス ミトコンドリアDNA (16295) 98%		AW106812.1 (751) 97%	
11E	(755)	該当なし		該当なし	B
12E	(616)	AB042809.1 マウス ミトコンドリアDNA (16299) 93%		AA616174.1 (630) 98%	
1F	(480)	該当なし		AW988585.1 (540) 100%	C
2F	(425)	該当なし		該当なし	C
3F	358	JO1420.1 マウス ミトコンドリアDNA (16295) 100%		BE308458.1 (660) 100%	C
4F	(436)	NM007564.1 マウス butyrate response factor 1(Brf1) (2659) 96%	un	BE635052.1 (543) 97%	
5F	(780)	U28754.1 ヒト HMGIC (4451) 82%	Chr.10-67.5cM	AW550862.1 (643) 97%	
6F	(588)	AJ131017.1 SCL gene (86380) 85%		AW541243.1 (595) 85%	C
7F	327	該当なし		該当なし	
8F	(762)	NM068408 マウス intergal membrane protein1 (3094) 99%	Chr.9-20.0cM	AW682685.1 (613) 98%	
9F	386	U07795.1 ラット Rap1B (1874) 97%	un	AL364404.1 (400) 100%	
10F	408	JO1420.1 マウス ミトコンドリアDNA (16295) 99%		AA638573.1 (491) 99%	
11F	(736)	該当なし		AA254647.1 (583) 98%	B
12F	(702)	NM011034.1 マウス proliferation-associated gene A (920) 97%	Chr.8-67.0cM	AI528351.1 (826) 97%	
1G	407	JO1420.1 マウス ミトコンドリアDNA (16295) 99%		AA63573.1 (491) 99%	B
2G	(680)	NM004891.1 ヒト ribosomal protein L33-like (512) 83%		AA060132.1 (434) 96%	C
3G	372	AB042809.1 マウス ミトコンドリアDNA (16299) 100%		AW475254.1 (546) 100%	C
4G	41	AB026436.1 ヒト dual sepecificity phosphatase MKP-5 (2051) 93%		該当なし	
5G	280	該当なし		該当なし	

6G	(732)	該当なし		BE137753.1 (529) 97%	
7G	(809)	該当なし		BE492824.1 (295) 95%	C
8G	(752)	NM007375.1 ヒト TAR DNA binding protein (2743) 93%		AA617490.1 (533) 99%	
9G	(769)	M58040.1 ラット transferrin 受容体 (3413) 92%	chr.16-21.2	AA656632.1 (362) 94%	C
10G	(767)	該当なし		AA254647.1 (583) 99%	
11G	526	該当なし		該当なし	C
12G	(688)	該当なし			
1H	(330)	NM009278.1 マウス Sjogren syndrome antigen (Ssb) (1961) 99%	Chr.2-41.0cM	BE377682.1 (645) 99%	
2H	(672)	JO1420.1 マウス ミトコンドリアDNA (16295) 98%		AI255757.1 (946) 98%	
3H	633	該当なし		該当なし	
4H	565	該当なし		該当なし	C
5H	(369)	該当なし		該当なし	
6H	405	JO1420.1 マウス ミトコンドリアDNA (16295) 99%		AA638573.1 (491) 99%	
7H	(655)	NM007604.1 マウス capping protein alpha 2(Cappa2) (1690) 97%	Chr.6-3.0cM	AU080139.1 (791) 96%	B
8H	(811)	NM011034.1 マウス prolifeラットion-associated gene A (920) 98%	chr.8-67.0cM	AI528351.1 (826) 98%	
9H	(722)	該当なし		BE137753.1 (529) 99%	
10H	(783)	該当なし		AW823864.1 (503) 99%	
11H	(710)	NM011034.1 マウス prolifeラットion-associated gene A (920) 98%	chr.8-67.0cM	AI528351.1 (826) 97%	C
12H	446	D80005.1 ヒト KIAA0183 (4905) 94%		BE627472.1 (545) 99%	

ホモロジーnrはアクセス番号、種、相同性のある遺伝子名、配列の長さ (bp) 及び相同性 (%) を示している。
ホモロジーESTはアクセス番号、配列の長さ (bp) 及び相同性 (%) を示している。

* ; A-Cはマクロアレイによる胎齢12.5日 *ter* / *ter* 精巣と比較した+/+精巣での発現の強度を示す。A>B>C

表7-1 ; 7/W-ter cDNAサブトラクションライブラリー (プレート1)

クローン番号	インサートサイズ (bp)	ホモロジー nr	染色体	ホモロジー EST	*発現強度
1A	446	該当なし		Z31265.1(297)99%	
2A	(726)	AB042809.1 マウス ミトコンドリア DNA (16299) 98%		AA60326.1(648)98%	
3A	(827)	AF093677.1 マウス ATPase subunit 6 (Atpase 6) (840) 95%		BE533018.1(291)95%	B
4A	427	AF267747.1 マウス p47-phox gene (180636) 100%		BB396248.1(303)93%	A
5A	157	AC011013.17 マウス chr. 11, clone RP23-218N2 (201728) 100%		AI482258.1(432)99%	C
6A	392	X96606.1 マウス ovary testis transcribed (OTT1) protein (2034) 92%	Chr.X 62.5cM	BE133175.1(467)93%	C
7A	(774)	該当なし		該当なし	
8A	35	該当なし		BE507033.1(312)100%	
9A	(989)	該当なし		BE455379.1(282)97%	
10A	458	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 98%		AA276204.1(606)99%	C
11A	682			AW555775.1(640)95%	A
12A	475	AF093677.1 マウス ATPase subunit 6 (Atpase 6) (840) 95%		BE336580.1(510)99%	C
1B	480	NM_011253.1 マウス RbmY1a1(1715) 97%		BB368968.1(288)97%	C
2B					
3B	896	該当なし		該当なし	C
4B	147	該当なし		BB105998.1(320)96%	
5B	457	該当なし		該当なし	A
6B	401	X93018.1 ハタリス N-myc2 gene(3292)86%		BB396248.1(303)93%	C
7B	572	NM_020075.1 ラット eukaryotic initiation factor 5 (eIF-5)(3504)97%		AA521666.1(627)97%	
8B	797	該当なし		AI529246.1(304)100%	B
9B	781	NM_017809.1 ヒト hypothetical protein FLJ20416(1813)85%		AW555775.1(640)97%	C
10B	411	該当なし		AI839623.1(482)97%	
11B	409	AI277046.1 マウス PsmA4 ; proteasome subunit C9(1958)98%		AW989749.1(463)99%	A
12B	680	AF093677.1 マウス ATPase subunit 6 (Atpase 6) (840) 99%		AW546420.1(611)99%	B
1C	630	該当なし		該当なし	C
2C	352	該当なし		BE635065.1(553)99%	B
3C	440	AB020836.1 マウス SSeCKS(6195)98%		AA657250.1(464)98%	C
4C	356	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 99%		AW681675.1(680)99%	
5C	801	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 95%		BE534165.1(418)95%	
6C	730	X93018.1 ハタリス N-myc2 gene(3292)86%		AI64551.1(507)97%	C
7C	450	U11054.1 マウス nuclear dual specificity kinase Sty (2572)99%		AI587885.1(471)88%	
8C	445	該当なし		Z31265.1(297)98%	C
9C	164	該当なし		該当なし	
10C	793	U36929.1 マウス Rbm mRNA(1590)97%	chr.Y	該当なし	C
11C	99	該当なし		該当なし	C
12C	118	AL078630.1 マウス genomic DNA sequence from clone 573K1(754)100%		BE306551.1(584)93%	
1D					
2D	219	該当なし		AW545461.1(409)97%	
3D	155	AJ400878.1 マウス Ascl3, Cegpl, D7H11orf14, D7H11orf15(234169)9	chr.7	BE137488.1(682)100%	B
4D	493	Y08948.1 マウス SIG41 mRNA(1208)96%		AL023042.1(456)97%	B
5D					C
6D	736	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 98%		AI255757.12(946)98%	C
7D	353	NM_005131.1 ヒト nuclear matrix protein p84(2092)95%		AW107452.1(520)99%	C
8D	391	該当なし		AI173560.1(594)99%	A
9D					C
10D	383	NM_014463.1 ヒト Lsm3 protein (LSM3)(579)90%		AW681668.1(454)99%	A
11D	707	AF132953.1 ヒト CGI-19 protein mRNA(707)85%		AW702079.1(614)98%	
12D	357	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 100%		AI663394.1(802)100%	
1E	500	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 99%		BE308458.1(660)99%	C
2E	1027	該当なし		該当なし	B
3E	440	AJ223812.1 ヒト mRNA for caldesmon, 3' UTR(1130)86%	chr.6-11.5	AW53160.1(682)100%	B
4E	551	X93018.1 ハタリス N-myc2 gene(3292)86%		AI64551.1(507)99%	C
5E	565	NM_020075.1 ラット eukaryotic initiation factor 5 (eIF-5)(3504)97%		AA521666.1(627)99%	
6E	179	該当なし		AW212226.1(602)(100%	
7E	791	AF241850.1 ヒト ret finger protein 2 (RFP2)(1415)87%	13q14.3	AA499724(529)99%	
8E	759	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 97%		AW549858.1(550)99%	
9E	801	AF093677.1 マウス ATPase subunit 6 (Atpase 6) (840) 97%		BE336580.1(510)97%	C
10E	780	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 98%		AW106812.1(751)98%	C
11E	353	NM_005131.1 ヒト nuclear matrix protein p84(2092)95%		AW107452.1(520)99%	
12E	624	U36929.1 マウス Rbm mRNA(1590)97%	chr.Y	該当なし	
1F	572	AB026436.1 ヒト dual specificity phosphatase MKP-5(2051)100%		該当なし	
2F	524	該当なし		該当なし	B
3F	41	AB026436.1 ヒト dual specificity phosphatase MKP-5(2051)97%		AW682238.1(429)91%	
4F	429	AF093677.1 マウス ATPase subunit 6 (Atpase 6) (840) 99%		AA414287.1(532)99%	
5F	565	NM_020075.1 ラット eukaryotic initiation factor 5 (eIF-5)(3504)98%		BE534540.1(697)98%	
6F	548	NM_011034.1 マウス proliferation-associated gene A (Paga)(920)98%	chr.8-67.0 cM	BE569274.1(766)	
7F	734	NM_008234.1 マウス helicase, lymphoid specific (Hells)(1851)99%	chr.19	AA065684.1(436)99%	C
8F	495	AB042809.1 マウス ミトコンドリア DNA (16299) 95%		C80299.1(577)95%	
9F	719	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 99%		BE531634.1(770)94%	C
10F	773	U76112.1 マウス translation repressor NAT1 (3789)97%		AW546428.1(603)97%	
11F	767	該当なし		AI645551.1(507)97%	C
12F	791	該当なし		該当なし	B
1G	425	NM_011966.1 マウス proteasome subunit alpha type 4(PsmA4)(875)94%	unknown	AW989749.1(463)94%	
2G	380	NM_011034.1 マウス Paga(920)99%	chr.8-67.0 cM	AW555830.1(613)99%	C
3G	282	該当なし		BE632059.1(532)99%	C
4G	664	AF052113.1 ヒト clone 23675 mRNA sequence(1670)97%		AA756172.1(452)97%	
5G	356	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 99%		AW681675.1(680)99%	C

6G	182	該当なし		該当なし	C
7G	252	該当なし		AW554009.1(535)99%	A
8G	351	AC005839.1 ヒト chr.17, clone hRPK.481 C_4(128323)88%		AW957275.1(479)99%	
9G	540	X63208.1 ウシ CI-SGDH mRNA for ubiquinone oxidoreductase complex(6641)82%		AA959962.1(560)99%	
10G	357	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 100%		AI663394.1(802)100%	B
11G	420	該当なし		AI614950.1(478)99%	A
12G	802	該当なし		該当なし	
1H	470	該当なし		AV211178.1(219)95%	
2H	783	該当なし		該当なし	
3H	152	AF110520.1 マウス MHC region NG27, NG28, RPS28...(216245)96%	chr.17	AU023404.1(588)97%	B
4H	634	NM_011253.1 マウス RbmY1a1(1715)99%	chr.Y	該当なし	C
5H	812	NM_009791.1 マウス calmodulin binding protein 1 (Calmbp1)(1967)96%	unknown	AU022135.1(584)94%	
6H	534	AF259074.1 マウス T-cell 受容体 α (72831)99%	chr.14	AW545807.1(615)99%	C
7H	153	NM_008770.1 マウス oligodendrocyte transmembrane protein (1301)100%	chr.3-12.6cM	AW487944.1(402)100%	C
8H	759	NM_016806.1 マウス heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1(1677)96%		AW543395.1(587)97%	
9H	717	該当なし		該当なし	
10H	44	AB026436.1 ヒト dual specificity phosphatase MKP-5(2051)100%		該当なし	
11H	774	NM_018770.1 マウス immunosuperfamily protein BI2 (1861)98%		AW229058.1(474)98%	
12H	802	X67268.1 マウス gas5 growth arrest specific gene(2723)92%		AW681997.1(678)90%	

ホモロジーnrはアクセス番号、種、相同性のある遺伝子名、配列の長さ (bp) 及び相同性 (%) を示している。
ホモロジーESTはアクセス番号、配列の長さ (bp) 及び相同性 (%) を示している。

* ; A-Cはマクロアレイによる生後7日 *ter* / *ter* 精巣と比較した+/+精巣での発現の強度を示す。A>B>C

表7-2 ; 7/W -ter cDNAサブトラクションライブラリー (プレート2)

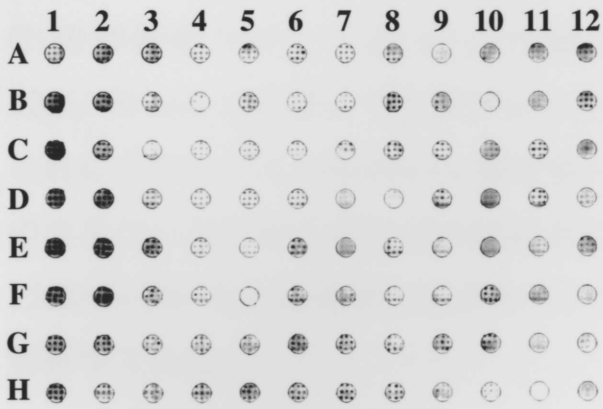
クローン番号	インサートサイズ(bp)	ホモロジーnr	染色体	ホモロジー EST	*発現強度
1A	507	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 97%		AA431874.1(573)98%	
2A	326	AC006571.12 ヒト clone hRPK.23 A_1(134896) 100%		該当なし	A
3A	576	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 97%		AU080037.1(817) 97%	
4A	470	AF132969.1 ヒト CGI-35 protein (1021) 89%		AA475109.1(547)99%	
5A	396	X06148.1 ラット ribosomal protein L5 (999) 96%		BE289480.1(812)99%	
6A	808	U35665.1 マウス cadherin 11 (Cdh11) gene (6313) 96%	Chr.8	L26747.1(338)93%	B
7A	646	該当なし		A1155637.1(513)95%	
8A	641	NM_011253.1 マウス RNA binding motif protein, (RbmY1a1)(1715) 97%	chr.Y	該当なし	A
9A	473	AB041589.1 マウス brain cDNA, clone MNCb-2643 (2034) 99%		BE197292.1(602)99%	
10A					
11A	963	該当なし		該当なし	
12A	425	NM_011253.1 マウス RNA binding motif protein, (RbmY1a1)(1715) 100%	chr.Y	該当なし	
1B	352	AJ006837.1 マウス U17 small nucleolar RNA host gene(383) 99%		A1788273.1(469)99%	B
2B	355	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 97%		AU046211.1(578)97%	
3B	571	NM_011253.1 マウス RbmY1a1 (1715) 99%		該当なし	B
4B	658	該当なし		該当なし	
5B	466	該当なし		該当なし	A
6B	251	X96603.1 マウス mRNA for Ott protein (548) 98%	chr.X	X93013.1(484)99%	A
7B	452	U11054.1 マウス nuclear dual specificity kinase Sty (2572) 99%		A1587885.1(471)89%	C
8B	401	該当なし		A1449254.1(384)98%	
9B	758	AB042809.1 マウス ミトコンドリア DNA (16299) 95%		C80299.1(577)95%	
10B	392	X93018.1 シマリス N-myc2 (3292) 86%		該当なし	C
11B	454	AC006956.15 マウス Chr. 19 BAC Clone 7d23 (132365) 98%		A1561811.1(523)99%	C
12B	405	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA (16295) 100%		A1303536.1(896)100%	
1C	180	AC006956.15 マウス Chr. 19 BAC Clone 7d23 (132365) 98%		A1561811.1(523)99%	B
2C	429	該当なし		A1452117.1(480)99%	
3C	615	X91656.1 マウス Srp20 gene (13121) 100%, NM_019550.1 マウス Ptb2 pending		AW681632.1(281)99%	B
4C	505	AC019026.12 マウス chr. 6 clone RP23-188E5 (157996) 97%		AL022828.1(509)98%	
5C	480	該当なし		BE448804.1(468)96%	
6C	749	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295)96%		BE199083.1(600)96%	
7C	564	該当なし		A1155637.1(513)98%	C
8C	430	AC012397.32 マウス chr. 6 clone ct7-369p18 (140187) 92%		AA683723.1(434)98%	B
9C	450	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295)99%		AW360743.1(661)99%	
10C	708	該当なし		該当なし	
11C	278	X96606.1 マウス mRNA for Ott protein (2034) 96%	chr.X	AA172626.1(479)100%	
12C	432	AJ131395.1 マウス mRNA for collagen type XIV(1171) 100%		AA645958.1(586)96%	C
1D	562	NM_011253.1 マウス RbmY1a1(1715) 92%	chr.Y	該当なし	B
2D	860	NM_011253.1 マウス RbmY1a1(1715) 91%	chr.Y	BB368968.1(288)89%	B
3D	391	X96606.1 マウス Ott protein (2034) 93%	chr.X	BE133175.1(467)94%	
4D	549	AF093677.1 マウス ATPase subunit 6 (Atpase6)(840)96%		A1195133.1(658)96%	
5D	230	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 99%		AW682146.1(322)99%	
6D	637	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 94%		AU080223.1(788)94%	
7D	466	該当なし		該当なし	
8D	212	該当なし		AW123898.1(438)100%	
9D	345	NM_011253.1 マウス RbmY1a1(1715) 97%	chr.Y	BB368968.1(288)97%	
10D	752	AC010139.4 ヒト clone RP11-194G10(161407) 85%		Z31301.1(165)81%	C
11D	739	X96606.1 マウス Ott protein (2034) 95%	chr.X	L26649.1(896)96%	
12D	432	NM_011253.1 マウス RbmY1a1(1715) 100%	chr.Y	BB368968.1(288)97%	C
1E	447	X60289.1 マウス mRNA for ribosomal protein S24 (551) 99%	unknown	AW555704.1(516)99%	
2E	698	L07096.1 マウス MiP ミトコンドリアゲノム (16303) 96%		AW045034.1(657)99%	
3E	133	AF097643.1 マウス heparin cofactor II gene (4893) 95%		AW907693.1(411)91%	B
4E	397	NM_011253.1 マウス RbmY1a1(1715) 98%	chr.Y	BB368968.1(288)98%	C
5E	472	NM_003401.1 ヒト XRCC4 (1582) 85%		AW321458.1(497)98%	C
6E	698	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 99%		A1528137.18527%	
7E	444	U07971.1 ラット L-arginine:glycine amidinotransferase		BE553699.1(444)99%	
8E	843	U14172.1 マウス p162 protein (5119) 97%		AW539765.1(523)95%	C
9E	759	AB042809.1 マウス ミトコンドリア DNA (16299) 95%		C80299.1(577)95%	
10E	235	AJ007715.1 マウス autoimmune regulator (Aire) gene (18616)96%		A1507228.1(455)97%	C
11E	554	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 99%		BE572663.1(856)98%	
12E	393	NM_008211.1 マウス H3 histone, family 3B (H3f3b)(1619) 98%		BE630129.1(602)98%	
1F	505	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 98%		AA646414.1(576)98%	
2F	55	AF144029.1 ヒト MDM2 gene(294) 100%		BE632322.1(203)100%	B
3F	736	該当なし		該当なし	A
4F					
5F	585	該当なし		該当なし	
6F	969	該当なし		該当なし	A
7F	696	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 99%		AA276204.1(606)99%	
8F	516	該当なし		Z31265.1(297)98%	
9F	269	該当なし		該当なし	
10F	853	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 99%		該当なし	
11F	814	NM_019683.1 マウス fetal globin inducing factor (1801) 98%		A1019337.1(385)99%	
12F	708	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 99%		AA435105.1(538)99%	
1G	666	該当なし		該当なし	
2G	740	NM_002519.1 ヒト nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus (NPAT) (5895)88%		BE625054.1(435)96%	B
3G	704	NM_008234.1 マウス helicase, lymphoid specific (Hells)(1851)97%	chr.19	BE635255.1(432)99%	A
4G	662	該当なし		該当なし	C
5G	703	該当なし		A1508311.1(556)97%	B

6G	222	該当なし		AW123898.1(438)99%	
7G	425	NM_013727.1 マウス 5-azacytidine induced gene 2 (Azi2)(2940)98%	unknown	AA789588.1(491)99%	C
8G	773	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 99%		AA616174.(630)98%	
9G	745	NM_007840.1 マウス DEAD box polypeptide 5 (Ddx5)	chr.11-63.0cM	A1097720.1(815)97%	
10G	764	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 98%		AU080223.1(788)98%	
11G	377	NM_008036.1 マウス FBJ osteosarcoma oncogene B (Fosb)(4145) 93%	chr.7-75cM	BE635333.1(532)93%	
12G	542	AF121217.1 rat pro-alpha-2(I) collagen (colla2) mRNA(4474)88%	chr.6-0.68cM	BE632799.1(383)95%	
1H	156	AJ131526.1 マウス TEF-5 gene (1262) 96%	chr.17	AA711010.1(183)100%	B
2H	721	NM_018859.1 マウス aldo-keto reductase(1675) 97%		BE370862.1(569)98%	
3H	652	M35052.1 Rat F-0-ATPase subunit b mRNA(1124) 92%		AW475753.1(768)94%	C
4H	403	X96606.1 マウス Ott protein (2034) 94%		BE133175.1(467)94%	C
5H	229	該当なし		該当なし	
6H	348	該当なし		BE635065.1(553)100%	
7H	760	該当なし		該当なし	B
8H	457	該当なし		BE197274.1(540)99%	C
9H	520	NM_019936.1 マウス CRIPT protein (CRIPT)(1139)97%		BE136223.1(653)98%	
10H	517	AF226873.1 マウス small GTP-binding protein RAB1A (2686) 98%		A1646998.1(516)99%	C
11H	710	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 99%		AW549858.1(550)99%	
12H	640	J01420.1 マウス ミトコンドリア DNA(16295) 96%		AA499860.1(553)97%	

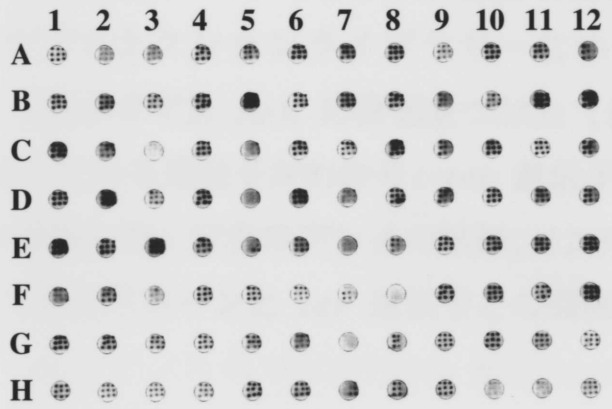
ホモロジー-nrはアクセス番号、種、相同性のある遺伝子名、配列の長さ (bp) 及び相同性 (%) を示している。
 ホモロジー-ESTはアクセス番号、配列の長さ (bp) 及び相同性 (%) を示している。

* ; A-Cはマクロアレイによる生後7日ter / ter 精巣と比較した+/+ 精巣での発現の強度を示す。A>B>C

plate I

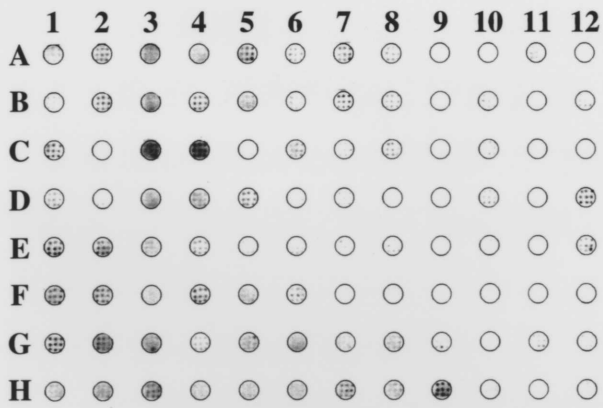


W-ter

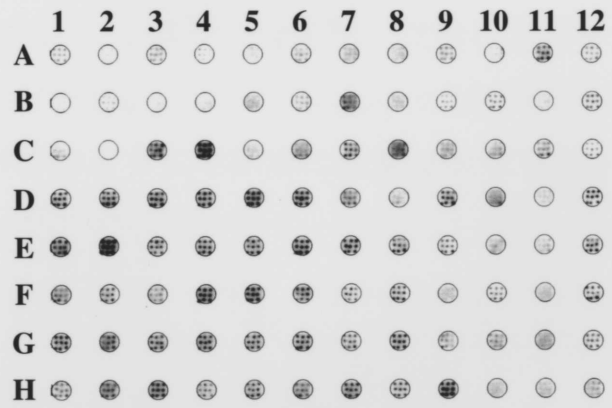


ter-W

plate II



W-ter



ter-W

図23 ; 胎齢12.5日のcDNAサブライブラリーのマクロアレイ。それぞれ、プレートの同じ座標の*W-ter*と*ter-W*を比較する。ドットが濃いものが強く発現していることを示している。

ヨンしていない胎齡 12.5 日+/+型及び *ter/ter* 精巢から得た cDNA について同様にマクロアレイを行った (図示せず)。その結果、W-*ter* に強いシグナルがみられるもの及び+/+型で強く発現しているものを探し、発現の差がみられたものを強度に応じて A-C の評価をつけた (表 6)。7/W-*ter* サブトラクションライブラリーについても 12.5/W-*ter* と同様にマクロアレイを行い (図示せず)、A-C の評価をつけた (表 7)。これにより、いくつかの+/+型で強く発現している遺伝子がわかり、*ter* 遺伝子及びそのカスケードにある遺伝子の候補遺伝子を探索した。マクロアレイの結果、12.5/1-2A、12.5/1-7G などは発現の差がみられた。これらクローンと *ter* 遺伝子との関係は現在解析中である。

VI. 考察

本研究では *in vivo* 及び *in vitro* の実験系を用いて、生殖細胞における *ter* 遺伝子の機能の一部を明らかにした。次に結果をまとめる。

1. *ter/ter* PGC の生存能及び増殖能は +/+ PGC と同様に正常であった。
2. +/- 胎仔精巢体細胞と共培養された 9.5 及び 11.5 日の PGC は *ter* 遺伝子型によらず体細胞との接触により DNA 合成し、生存したが、*ter/ter* 体細胞上では PGC は DNA 合成したが、アポトーシスを起こしていた。
3. +/- 胎仔生殖巢体細胞の培養上清 (CM) を ICR 系マウスの 9.5 及び 11.5 日胚の PGC と体細胞の共培養系に添加すると、PGC は DNA 合成し且つ、生存した。しかし、*ter/ter* CM では PGC は DNA 合成したもののアポトーシスが起きた。
4. PGC に効果がある CM 成分は分子量 3 万以上の蛋白質様の成分であり、PGC の生存因子として働く。
5. *ter/ter* 精巢は既知の PGC 増殖因子、SCF、bFGF、TGF β 1、OSM、IL-4 及び NRG β を *in vitro* 及び *in vivo* において +/+ 精巢と同様に発現していた。
6. +/+ と *ter/ter* 精巢との間で cDNA サブトラクションライブラリーを作製し、*ter* 関連遺伝子のプロファイルを得た。+/+ 精巢で優先的に発現している *ter* 遺伝子に関連する遺伝子が数種、見つかった。

これらの結果は生殖細胞の正常発生過程を知るうえで非常に重要な知見である。以下に、いくつかの点について順に考察していく。

VI-1. *ter* 遺伝子の機能発現

ter 変異マウスは *ter* ホモ型雄で生殖細胞が完全になくなり、不妊となる。生殖細胞の生存に影響を及ぼす突然変異は *ter* 以外にもいくつか知られている。その中には、Hertwig's anemia (*an*) (Russell *et al.*, 1985)、atrichosis (*at*) (Handel and Eppig, 1979)、germ cell deficient (*gcd*) (Pellas *et al.*, 1991)、Steel (*Sl*) (Bennett, 1956) 及び Dominant white spotting (*W*) (Mintz and Russell, 1957) がある。これら遺伝子は既にマウスにおいて染色体上の位置がわかっている。*an*、*at*、*gcd*、*W* 及び *Sl* 順に 4 番 (Russell *et al.*, 1985)、10 番 (Hummel and Chapman, 1971)、11 番 (Duncan *et al.*, 1995)、10 番 (Copeland *et al.*, 1990) 及び 5 番 (Geissler *et al.*, 1988) であり、*ter* の 18 番とは連関がない (Sakurai *et al.*, 1994)。また、発現時期は *ter* 遺伝子が最も早く胎齢 8.0 日から既に *ter/ter* 胎仔で PGC の減少が起こる (Sakurai *et al.*, 1995)。続

いて、胎齡 9.0 日頃に *Sl* 及び *W*、胎齡 11.0 日頃に *gcd*、胎齡 12.0 日頃に *an* が発現し、それぞれの変異マウスにおいて生殖細胞の減少が始まる (Mintz and Russell, 1957; McCoshen and McCallion, 1975; Russell *et al.*, 1985; Pellas *et al.*, 1991; Donovan, 1998)。これら遺伝子の同定や発現場所の解析は *Sl* 及び *W* 以外ではまだ明らかとなっていない。*Sl* 及び *W* 変異マウスの表現型は互いに酷似しており、ともに不妊、白斑及び貧血などを起こすことが知られている (Williams *et al.*, 1992)。その原因は *Sl* 変異マウスでは増殖因子 SCF、*W* 変異マウスではその受容体 *c-kit* の異常によって起こる (Geissler *et al.*, 1988)。生殖巣において、SCF は PGC の生存に必須であり、その発現場所は PGC の移動経路や生殖巣内の体細胞のセルトリ細胞である (Matsui *et al.*, 1990)。*Sl* 変異マウスは SCF を欠くために不妊となる (Mintz and Russell, 1957)。また、*W* 変異マウスは PGC で発現している SCF 受容体 *c-kit* を欠くために不妊となる。

Noguchi *et al.* (1997) は *ter* 変異マウスが PGC に異常がある *W* 様であるのか或いは体細胞に異常がある *Sl* 様であるのか再構成精巣を用いて *in vivo* で調べた。その結果、精巣体細胞が *ter/ter* 型の時に +/+ PGC が減少したことから、*ter* 遺伝子は少なくとも体細胞上で発現していることを明らかにした。しかしながら、再構成精巣の解析ではごく少数しかない *ter/ter* PGC の機能を解析する事ができなかった。そこで本研究では少数の PGC でも解析可能な“交換共培養”系を用いて *in vitro* で *ter* 遺伝子の発現の所在を調べた。その結果 +/+ 体細胞と共培養した *ter/ter* PGC は +/+ PGC と同様に増殖及び生存し、*ter/ter* 体細胞と共培養した PGC はアポトーシスを起こして減少した。即ち、*ter* 遺伝子は生殖巣体細胞及び移動経路で発現し、*ter/ter* PGC は正常な増殖能及び生存能があることが明らかとなった。*ter* 変異マウスは受容体に異常がある *W* マウスより増殖因子に異常がある *Sl* マウスに似た変異であることが推測された。

VI-2. PGC と体細胞の相互作用

増殖因子には分泌型のものと膜結合型のものがある。PGC の最も重要な増殖因子である前述の SCF は同じ遺伝子座からスプライシングの違いにより膜結合型と分泌型のものが産生される (Flanagan *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1992)。*Sl* 変異マウスの一種である *Sl^l* マウスは SCF の膜貫通部位と細胞内領域を欠くために膜結合型 SCF を生産できずに分泌型 SCF のみを産生する (Brannan *et al.*, 1991)。この変異マウスは致死の *Sl/Sl* マウスとは異なり、成体にまで成長可能であるが、*Sl/Sl* マウスと同様に生殖細胞をほぼ完全に欠損する (Flanagan *et al.*, 1991)。また、分泌型と膜結合型の SCF

の mRNA の比率は各種組織において異なっており、胎齢 13.0 日のマウス精巣から分離された直後のセルトリ細胞は培養 24 時間では優先的に膜結合型の SCF を産生している (Mauduit *et al.*, 1999)。PGC 培養系において用いられるフィーダー細胞 STO 及び SI/ SI4-m220 はそれぞれ分泌型及び膜結合型の SCF を産生している (Toksoz *et al.*, 1992)。PGC は膜結合型 SCF を産生する SI/ SI4-m220 フィーダー細胞上でより効果的に生存が支持されることが報告されている (Matsui *et al.*, 1991; Dolci *et al.*, 1993)。即ち、PGC にとっては膜結合型の SCF が必須であり、生体内において PGC は膜結合型の因子を産生する周囲体細胞と相互作用することにより PGC の発生過程を進行すると考えられる。

この PGC と生殖巣体細胞の相互作用に着目し、*ter* 遺伝子の機能を“交換共培養”系及び生殖巣体細胞の CM を用いて解析した結果、+/+ 体細胞及び+/+ CM は PGC の生存及び増殖を支持し、*ter/ter* 体細胞及び *ter/ter* CM は PGC のアポトーシスを抑制しなかった。体細胞及び CM は PGC に対して類似の効果を示したが、*ter/ter* と+/+ の PGC に対する効果は CM よりも体細胞との直接接触の方が 12 時間という短い培養期間で顕著な差がみられたことから、PGC と体細胞の直接の接触が重要であることが考えられる。さらに、PGC は共培養されたフィーダー細胞より WT1 陽性のセルトリ細胞上に局在していた。従って、ここで共培養した生殖巣体細胞は PGC との細胞間相互作用により PGC の生存を支持している。*ter* 遺伝子は *Sl* 遺伝子と同様に CM 中に溶け出す分泌型の因子と体細胞上に存在する膜結合型の因子の両方を産生する可能性が示唆され、これらのうち、多くの増殖因子と同様に膜結合型因子の方が PGC にとっては重要であることが明らかとなった。*ter/ter* 体細胞ではこの因子を全く欠くか、或いはこの因子が異常となり機能しなくなった可能性が考えられる。

VI-3. アポトーシスについて

本研究において、*ter/ter* 体細胞が PGC に対してどのような効果を示すかという問題の一部が明らかとなった。*ter/ter* 体細胞と共培養した PGC と *ter/ter* CM を添加した ICR マウスの PGC はアポトーシスを起こし、典型的な AP/ TUNEL 陽性の“アポトーシス小体”の像 (Arends and Wyllie, 1991; Fesus *et al.*, 1991) を示していた。アポトーシスによる PGC の細胞死は“交換共培養”の開始から 12 時間以内という短時間で誘導された。これは、即ち、PGC は *ter/ter* 体細胞との相互作用によっては生存できずに TUNEL 陽性のアポトーシスを起こし、PGC 数が減少したと考えられる。こ

の結果は *in vivo* において胎仔の *ter/ter* 精巣内で TUNEL 陽性のアポトーシスを起こした PGC が確認されていることと一致している (Noguchi *et al.*, 未発表)。それでは、*ter/ter* 体細胞が PGC の細胞周期のどの時期に作用し、PGC にアポトーシスを起こさせているのであろうか。培養系において隣接している二つの PGC が *ter/ter* 体細胞上で、或いは *ter/ter*CM を添加した培養系においてしばしば確認できた (図 9A 参照)。この像は *in vitro* における分裂直後の PGC の典型的なものであると考えられる。これは *ter/ter* 体細胞の影響を受けた PGC が M 期に入り、細胞分裂を完了することを意味する。これは *in vivo* の結果と一致する (Noguchi *et al.*, 1997)。Noguchi *et al.*, (未発表) は LTXBJ-+/ter の各 *ter* 遺伝子型個体の PGC の分裂頻度 (分裂している PGC 数/総 PGC 数) を集計した。その結果、胎齢 14.5 日頃から分裂休止期に入る+/+ 及び +/ter 精巣においては PGC の分裂頻度は胎齢 13.5 日をピークにして減り続け 16.5 日でほぼ 0% になった。一方、*ter/ter* 精巣においては極小数しかない PGC が分裂している像がみられたが、分裂頻度は胎齢 16.5 日でほぼ 100% になった。*ter/ter* 精巣において、PGC は M 期に入るが、その後、休止期 (G1 期) に留まらず死滅した。この死滅した PGC は TUNEL 陽性を示し、この過程がアポトーシスであることを示した。

さらに、胎齢 13.5 日 *ter/ter* 体細胞と+/+ 生殖細胞との再構成精巣では、分裂を再開した正常な M 期の分裂像が観察されている (Noguchi *et al.*, 1997)。即ち、*ter/ter* 体細胞は PGC の分裂を抑制しないで、その後の G1 期に障害を与えることが推測できる。本研究では、各 *ter* 遺伝子型 CM を添加しても PGC の BrdU の取り込みには差がなくどれも約 30% であった。即ち、*ter* 遺伝子による PGC への効果は S 期には関係していないことが明らかとなった。さらに、*ter* 遺伝子が生殖細胞の S 期に影響しないことは *in vitro* で胎齢 8.0 日-9.5 日の各 *ter/ter* 胚の PGC と周囲の体細胞を含む培養において BrdU の取り込みに差がないことから証明されている (Noguchi *et al.*, 1995)。これらの結果を合わせると、*ter* 遺伝子産物は PGC の細胞周期の S 期から M 期ではなく G1 期に影響を及ぼし、アポトーシスを抑制する体細胞因子であると推測される。

細胞周期の S 期には影響を及ぼさず、PGC のアポトーシスを抑制し、PGC の生存因子として働くことが知られている増殖因子には SCF 及び LIF が知られている (Matsui *et al.*, 1992; Pesce *et al.*, 1993)。最近、PGC 及び雌雄の生殖細胞における *c-kit/SCF* に関連したアポトーシスは癌抑制遺伝子として知られる p53 の産物である p53 蛋白質を介した系によって起こっていることが明らかとなった (Lee, 1998; Jordan *et al.*, 1999)。p53 蛋白質は DNA の損傷、増殖因子及び血清の除去によるストレスにさらされると安定化し、G1 期での細胞周期の停止やアポトーシスを起こすことが知られてい

る (Mercer *et al.*, 1990; Yonish-Rouach *et al.*, 1991; Shaw *et al.*, 1992)。p53 を介したアポトーシスはアデノウイルス E1B 遺伝子の産物である分子質量 19kDa の E1B19K で抑制され (Debbas and White, 1993)、Bax (Bcl-2-associated X protein) によって実行される (Miyashita and Reed, 1995)。E1B19k を一過的に発現させた PGC は培養系で生存が有意に促進され、アポトーシスが抑えられ (Watanabe *et al.*, 1997)、また、PGC 培養系への SCF の添加は Bax の発現を減少させることが報告されている (De Felici *et al.*, 1999)。ter 遺伝子とアポトーシスの関連因子、E1B19K、bcl-2、bax または p53 等との関係は今後、解決すべき課題である。

さらに *ter/ter* 卵巣においてはごく少数の生殖細胞が減数分裂期に入ることにより僅かに妊性が残る (Noguchi *et al.*, 1996)。しかし、*ter/ter* 精巣においては有糸分裂後、生殖細胞はアポトーシスによって死滅し、雄は不妊となる。本研究では、胎仔卵巣 CM でも精巣 CM と同様の効果を示したことから、卵巣及び精巣は同様に *ter* 遺伝子産物を産生しているが、減数分裂に入る雌の PGC には影響を与えないのかも知れない。

VI-4. 増殖因子について

多くの PGC 培養系では PGC は体細胞と共に解離され、フィーダー細胞上で SCF、LIF 及び bFGF などの種々の増殖因子を加えることにより数日間培養可能となる。本研究で用いた培養系では *ter* 体細胞の機能を調べるためにフィーダー細胞から分泌される膜結合型 SCF 以外の増殖因子は加えないで行った。しかし、PGC は本培養系においても生体内の形態を再現しており、また、増殖様式も他の研究者による報告と一致し、胎齢 9.5 日の PGC は 3 日間、胎齢 11.5 日の PGC は 1 日それぞれ生存可能であった。即ち、他の因子の無添加の培養系でもある程度は PGC の培養が可能である。

しかしながら、PGC の長期間の培養や多数の PGC を維持するためには増殖因子が必要であり、生体内においても PGC は表 1 に示すような種々の増殖因子の影響を受けている。本研究から *ter* 遺伝子は生殖巣体細胞で発現する PGC の増殖因子をコードしている可能性がある。現在知られている PGC に効果がある増殖因子の中で *ter* 遺伝子と同様に第 18 番染色体上にマップされているものはない。また、既知の増殖因子は全て生殖細胞以外の細胞の増殖や生存にも効果を示し、これら遺伝子の欠損マウスは *Sl* 変異マウスを除いては生殖細胞欠損を示さない。*ter* 遺伝子の変異マウスが生殖細胞にのみ異常がみられ、他の組織、例えば造血細胞などには異常がない点からもそれら因子と *ter* 遺伝子産物が異なっていることが推測される。Noguchi *et al.* (1995) は B6-

ter の *ter/ter*PGC と周囲の *ter/ter* 体細胞を含んだ培養系に PGC の増殖因子、SCF、LIF、TNF α (Kawase *et al.*, 1994) 及び FRSK (De Felici *et al.*, 1993) を添加しても、PGC の増殖は回復できなかった。また、本研究において、免疫染色及び RT-PCR を用いて既知の増殖因子の発現を *ter* 精巣において調べた結果、どの増殖因子においても遺伝子型の違いによる蛋白質及び mRNA の発現には差がなかった。さらに、CM を用いた培養系において、PGC は *ter/ter*CM でもある程度生存していたこの生存は既知の増殖因子による支持を受けたことを反映していると考えられる。

研究に用いた生殖細胞の増殖因子は生殖巣内の生殖細胞あるいは生殖巣体細胞に作用し、生殖細胞の生存、増殖及び分化を調節している。それら増殖因子によるシグナル伝達は生殖細胞のレセプターを介しておこる。レセプターは細胞外領域の構造上の共通性と細胞内領域の機能特性からいくつかのファミリーに分類されている。PGC には SCF、LIF 及び bFGF に対するレセプター c-kit、gp130 及び FGFR が存在することが報告されている (Cheng *et al.*, 1994 ; Resnick *et al.*, 1998)。また、sky 及び ErbB は c-kit と同様にチロシンキナーゼ型レセプターファミリーに属し、PGC でのこれらレセプターの発現から、そのリガンドである Gas6 及び NRG β が PGC の生存を支持することが明らかとなっている (Toyoda-Ohno *et al.* 1999)。*ter/ter*PGC が +/+ 体細胞に支持されて正常に増殖及び生存したことから *ter/ter*PGC には他の増殖因子の受容体と同様に *ter* 野生型遺伝子産物に対する受容体も正常に存在することが示唆される。実際、c-kit や gp130 の発現には遺伝子型による差はなかった。

これらの結果は *ter* 野生型遺伝子が PGC のアポトーシスを抑え生存を支持する新規の生殖細胞増殖因子そのものかあるいは未知の増殖因子の発現を調節する因子をコードしていると考えられ、この因子を TER Factor (TERF) と命名する。*ter/ter* 精巣は TERF を欠くため、PGC をアポトーシスから救えずに生殖細胞欠損が起こると考えられる。

VI-5. *ter* 遺伝子の候補遺伝子

ter 遺伝子を同定するために +/+ 精巣 mRNA と *ter/ter* 精巣 mRNA の間でサブトラクシオン cDNA ライブラリーを作製した。更に、+/+ 精巣で強く発現しているものをマクロアレイにより調べた。また、ライブラリーの cDNA 全ての塩基配列を決定し、ホモロジー検索を行った。その結果、ホモロジー検索によって、わかった既知の遺伝子のうちいくつかはすでにマウスにおいてマッピングさせているものもあった。既に

マッピングされている遺伝子の中で *ter* 遺伝子と同様に 18 番染色体上に位置している遺伝子は 12.5/1-11A ; *Matrin3* (Chr.18, 15.0cM ; Muramatsu *et al.*, 1998)、12.5/1-8F ; kinesin family member 5B (*Kif5b*) (Chr.18, 1.0cM ; Xia *et al.*, 1998) 及び 12.5/1-9H ; Chr.18 clone RP23-6P18 であった。Chr.18 clone RP23-6P18 はマクロアレイの結果から *W-ter* に強く発現しているため、詳しく調べる必要がある遺伝子の一つである。*Matrin3* 及び *Kif5b* は *ter* 遺伝子が 18 番染色体上の *Grll* (Chr.18, 20.0cM) の近傍 2cM 以内に位置している (Sakurai *et al.*, 1994) ことから、位置的に *ter* 遺伝子とは異なっているが、精巣における *Matrin3* の発現は興味深い。*Matrin3* は RNA を認識するモチーフ (RRM) を持つ RNA 結合蛋白質である (Matsushima *et al.*, 1996)。*Matrin3* と同様に RRM を持つ *Dazla* 及び *TIAR* は生殖細胞で発現しており、これらのノックアウトマウスは生殖細胞を欠損することが報告されている (Ruggiu *et al.*, 1997; Beck *et al.*, 1998)。生殖巣における *TIAR* 及び *Dazla* の機能はまだ明らかになっていないが、これら蛋白質は PGC の核で発現し、雌雄生殖細胞の生存と発生にとって重要である (Ruggiu *et al.*, 1997; Beck *et al.*, 1998)。*Matrin3* の生殖細胞での機能はまだ報告されていないので、今後、引き続き解析を行っている。*ter* 野生型遺伝子が生殖巣体細胞側で機能する RNA 結合蛋白質などをコードし、未知の増殖因子の発現を調節している可能性も考えられる。または新規の増殖因子自体をコードしていることも考えられる。どちらにしても、すでに知られている増殖因子以外に *ter* に関連した PGC の新規増殖因子の存在が示唆される。*ter* 遺伝子のコードしている蛋白質及びシグナル伝達の解析は生殖細胞の発生にとって重要である。

7/W-*ter* サブトラクションライブラリーでは生殖細胞に特異的に発現している遺伝子の単離も期待される。生殖細胞で発現している遺伝子に mouse vasa homolog (*Mvh*) がある (Fujiwara *et al.*, 1994)。*Mvh* 遺伝子の産物、MVH は別名 DEAD box polypeptide 4 (*Ddx4*) といい、DEAD box を持つ RNA ヘリカーゼである。MVH は生殖巣に移入後に生殖細胞において強い発現を示しており、*Mvh* 遺伝子のノックアウトマウスは生殖細胞欠損を起こす (Fujiwara *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 2000)。7/W-*ter* サブトラクションライブラリー中には *Ddx5* があった。*Ddx5* は MVH 同様に DEAD box を持つ RNA ヘリカーゼであり、その発現は雄の生殖細胞に限られていることが知られている (Lemaire and Heinlein, 1993)。*Ddx5* は第 11 番染色体上にマップされている (Davies *et al.*, 1989) ので、*ter* 遺伝子とは関係しない可能性が考えられるが、7/W-*ter* サブトラクションライブラリー中には生殖細胞特異的な遺伝子が含まれていることが分かり、このライブラリーは生殖細胞の発生に関わる遺伝子を単離するのに有効で

ある。

ter 野生型遺伝子は新規の生殖細胞増殖因子あるいは増殖因子を調節する因子をコードしている可能性があるが、サブトラクションライブラリーからは 既知の増殖因子は認められなかった。従って、マクロアレイによって発現の強かった EST やホモロジーの無い未知の遺伝子にその候補遺伝子があることが期待される。今回、ホモロジーのあった EST の中には精巣及び生殖隆起の cDNA ライブラリーから得られたものがあり、AV209073.1 及び Z31265.1 は成体精巣の cDNA 由来である。とくに Z31265.1 は 12.5/W-*ter* 及び 7/W-*ter* どちらにも発現がみられた。Z31265.1 や他のマクロアレイで発現が強かった EST クローンの生殖巣における発現を *in situ* ハイブリダイゼーションなどを用いて詳細に解析し、*ter* 遺伝子の候補遺伝子や *ter* 遺伝子のカスケードに関わる遺伝子を同定することが今後の課題である。

これらの解析の発展により PGC の発生機構がより明らかになると考えられる。

本研究の結論をまとめると、(1) +/- 胎仔生殖巣の体細胞は *ter* 遺伝子座にコードされた膜結合型と液性型の成分からなる新規 PGC 増殖因子 (TERF と命名) を産生し、PGC の生存を支持する。(2) *ter/ter* 体細胞は、その因子を欠くため PGC のアポトーシスを抑制することができずに死滅させるものの、種々の既知の増殖因子は産生する。(3) *ter/ter* PGC 自体は正常な増殖能や生存能を所持し、体細胞との細胞間相互作用を行う。本研究は *ter* 遺伝子座の遺伝子がマウスの発生初期から PGC のアポトーシスを抑える役割を担っていることを初めて明らかにしたものである。

VII. 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始丁寧な御指導を賜りました野口基子先生（静岡大学）並びに石川勝利先生（静岡大学）に深く感謝いたします。

助言を賜りました徳元俊伸先生（静岡大学）、塩尻信義先生（静岡大学）並びに野崎正美先生（大阪大学微生物病研究所）に感謝いたします。PGC の培養法を御教示頂きました桜井敬之先生（東海大学）、サブトラクションライブラリーの作製には野呂知加子先生（理化学研究所 BRC）並びに日下部守昭先生（理化学研究所）にお世話になりました深く感謝いたします。

貴重な抗 4C9 抗体を分与して下さった、村松喬先生（名古屋大学）、抗 WT1 抗血清を分与して下さった秋山徹先生（東京大学）、S1/ S14- m220 細胞を分与して下さった Dr. D. Williams (Howard Hughes Medical Institute, Indiana University)、Dr. K. Zsebo (Connetics Corporation) 並びに松居靖久先生（大阪府立母子保健総合医療センター）に感謝いたします。

本研究に御協力して下さった山下雅代さん、笹岡由美子さんその他研究室の皆様
に感謝します。

VIII. 参考文献

- Arends, M. J. and Wyllie, A. H. (1991) Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32, 223-254.
- Beck, A. R. P., Miller, I. J., Anderson, P. and Streuli, M. (1998) RNA-binding protein TIAR is essential for primordial germ cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2331-2336.
- Bennett, D. (1956) Developmental analysis of a mutation with pleiotropic effects in the mouse. *J. Morphol.* 98, 199-234.
- Brannan, C. I., Lyman, S. D., Williams, D. E., Eisenman, J., Anderson, D. M., Cosman, D., Bedell, M. A., Jenkins, N. A. and Copeland, N. G. (1991) Steel-Dickie mutation encodes a c-kit ligand lacking transmembrane and cytoplasmic domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4671-4674.
- Cheng, L., Gearing, D. P., White, L. S., Compton, D. L., Schooley, K. and Donovan, P. J. (1994) Role of leukemia inhibitory factor and its receptor in mouse primordial germ cell growth. *Development* 120, 3145-3153.
- Cooke, J. E., Heasman, J. and Wylie, C. C. (1996) The role of interleukin-4 in the regulation of mouse primordial germ cell numbers. *Dev. Biol.* 174, 14-21.
- Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Cho, B. C., Donovan, P. J., Jenkins, N. A., Cosman, D., Anderson, D., Lyman, S. D. and Williams, D. E. (1990) Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of *steel* alleles. *Cell* 63, 175-183.
- Davies, A. A., Moss, S. E., Crompton, M. R., Jones, T. A., Spurr, N. K., Sheer, D., Kozak, C. and Crompton, M. J. (1989) The gene coding for the p68 calcium-binding protein is localised to bands q32-q34 of human chromosome 5, and to

mouse chromosome 11. *Hum. Genet.* 82, 234-238.

De Felici, M., Carlo, A. D., Pesce, M., Iona, S., Farrace, M. G. and Piacentini, M. (1999) Bcl-2 and Bax regulation of apoptosis in germ cells during prenatal oogenesis in the mouse embryo. *Cell. Death. Differ.* 6, 908-915.

De Felici, M. and Dolci, S. (1991) Leukemia inhibitory factor sustains the survival of mouse primordial germ cells cultured on TM4 feeder layers. *Dev. Biol.* 147, 281-284.

De Felici, M., Dolci, S. and Pesce, M. (1993) Proliferation of mouse primordial germ cells *in vitro*: a key role for cAMP. *Dev. Biol.* 157, 277-280.

Debbas, M. and White, E. (1993) Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes. Dev.* 7, 546-554.

Dietrich, W., Katz, H., Lincoln, S. E., Shin, H.-S., Friedman, J., Dracopoli, N. and Lander, E. S. (1992) A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics* 131, 423-447.

Dolci, S., Pesce, M. and De Felici, M. (1993) Combined action of stem cell factor, leukemia inhibitory factor, and cAMP on *in vitro* proliferation of mouse primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* 35, 134-139.

Dolci, S., Williams, D. E., Ernst, M. K., Resnick, J. L., Brannan, C. I., Lock, L. F., Lyman, S. D., Boswell, H. S. and Donovan, P. J. (1991) Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature* 352, 809-811.

Donovan, P. J. (1998) The germ cell - the mother of all stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 1043-1050.

Donovan, P. J., Stott, D., Cairns, L. A., Heasman, J. and Wylie, C. (1986)

Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell* 44, 831-838.

Duncan, M. K., Lieman, J. and Chada, K. K. (1995) The germ cell deficient locus maps to mouse chromosome 11A2-3. *Mamm. Genome* 6, 697-699.

Ephrussi, A. and Lehmann, R. (1992) Induction of germ cell formation by oskar. *Nature* 358, 387-392.

Flanagan, J. G., Chan, D. C. and Leder, P. (1991) Transmembrane form of the *kit* ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the *Sld* mutant. *Cell* 64, 1025-1035.

Fujiwara, Y., Komiya, T., Kawabata, H., Sato, M., Fujimoto, H., Furusawa, M. and Noce, T. (1994) Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila vasa* and its specific expression in germ cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12258-12262.

Gearing, D. P., Comeau, M. R., Friend, D. J., Gimpel, S. D., Thut, C. J., McGourty, J., Brasher, K. K., King, J. A., Gillis, S., Mosley, B., Ziegler, S. F. and Cosman, D. (1992) The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 255, 1434-1437.

Geissler, E. N., Cheng, S. V., Gusella, J.F. and Housman, D.E. (1988) Genetic analysis of the dominant white-spotting (*W*) region on mouse chromosome 5: identification of cloned DNA markers near *W*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9635-9639.

Ginsburg, M., Snow, M. H. and McLaren, A. (1990) Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110, 521-528.

Godin, I., Deed, R., Cooke, J., Zsebo, K., Dexter, M. and Wylie, C. C. (1991)

Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 352, 807-809.

Godin, I. and Wylie, C. (1991) TGF- β 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development* 113, 1451-1457.

Handel, M. A. and Eppig, J. J. (1979) Sertoli cell differentiation in the testes of mice genetically deficient in germ cells. *Biol. Reprod.* 20, 1031-1038.

Hara, T., Tamura, K., de Miguel, M. P., Mukoyama, Y., Kim, H., Kogo, H., Donovan, P. J. and Miyajima, A. (1998) Distinct roles of oncostatin M and leukemia inhibitory factor in the development of primordial germ cells and sertoli cells in mice. *Dev. Biol.* 201, 144-153.

Huang, E. J., Nocka, K. H., Buck, J. and Besmer, P. (1992) Differential expression and processing of two cell associated forms of the kit-ligand: KL-1 and KL-2. *Mol. Biol. Cell* 3, 349-362.

Hummel, K. P. and Chapman, D. B. (1971) Atrichosis (*at*) appears to be closely linked with eyeblebs (*eb*). *Mouse News Lett.* 45, 29.

Illmensee, K. and Mahowald, A. P. (1974) Transplantation of posterior polar plasm in *Drosophila*. Induction of germ cells at the anterior pole of the egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1016-1020.

Jordan, S. A., Speed, R. M. and Jackson, I. J. (1999) Deficiency of Trp53 rescues the male fertility defects of *Kit*^{w-v} mice but has no effect on the survival of melanocytes and mast cells. *Dev. Biol.* 215, 78-90.

Kawase, E., Shirayoshi, Y., Hashimoto, K. and Nakatsuji, N. (1996) A combination of buffalo rat liver cell-conditioned medium, forskolin and

membrane-bound stem cell factor stimulates rapid proliferation of mouse primordial germ cells *in vitro* similar to that *in vivo*. *Develop. Growth Differ.* 38, 315-322.

Kawase, E., Yamamoto, H., Hashimoto, K. and Nakatsuji, N. (1994) Tumor necrosis factor- α (TNF- α) stimulates proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Dev. Biol.* 161, 91-95.

Kobayashi, S., Yamada, M., Asaoka, M. and Kitamura, T. (1996) Essential role of the posterior morphogen nanos for germline development in *Drosophila*. *Nature* 380, 708-711.

Koshimizu, U., Watanabe, M. and Nakatsuji, N. (1995) Retinoic acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells *in vitro*. *Dev. Biol.* 168, 683-685.

Kudoh, T., Ishidate, T., Moriyama, M., Toyoshima, K. and Akiyama, T. (1995) G1 phase arrest induced by Wilms tumor protein WT1 is abrogated by cyclin/CDK complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4517-4521.

Lawson, K. A., Dunn, N. R., Roelen, B. A., Zeinstra, L. M., Davis, A. M., Wright, C. V., Korving, J. P. and Hogan, B. L. (1999) Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes. Dev.* 13, 424-436.

Lawson, K. A. and Hage, W. J. (1994) Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found. Symp.* 182, 68-84.

Lee, J. M. (1998) Inhibition of p53-dependent apoptosis by the KIT tyrosine kinase: regulation of mitochondrial permeability transition and reactive oxygen species generation. *Oncogene* 17, 1653-1662.

Lemaire, L. and Heinlein, U. A. (1993) High-level expression in male germ cells of murine P68 RNA helicase mRNA. *Life. Sci.* 52, 917-926.

Leonard, S., Luthman, D., Logel, J., Luthman, J., Antle, C., Freedman, R. and Hoffer, B. (1993) Acidic and basic fibroblast growth factor mRNAs are increased in striatum following MPTP-induced dopamine neurofiber lesion: assay by quantitative PCR. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 18, 275-284.

Matsubara, N., Takahashi, Y., Nishina, Y., Mukouyama, Y., Yanagisawa, M., Watanabe, T., Nakano, T., Nomura, K., Arita, H., Nishimune, Y. Obinata, M. and Matsui, Y. (1996) A receptor tyrosine kinase, Sky, and its ligand Gas 6 are expressed in gonads and support primordial germ cell growth or survival in culture. *Dev. Biol.* 180, 499-510.

Matsui, Y., Toksoz, D., Nishikawa, S., Williams, D., Zsebo, K. and Hogan, B. L. (1991) Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 353, 750-752.

Matsui, Y., Zsebo, K. and Hogan, B. L. (1992) Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70, 841-847.

Matsui, Y., Zsebo, K. M. and Hogan, B. L. (1990) Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the *Sl* locus and the ligand for c-kit. *Nature* 347, 667-669.

Matsushima, Y., Nagabukuro, A., Matsuda, Y. and Kitagawa, Y. (1998) Cloning and genomic mapping of the mouse matrin 3 gene and its pseudogenes. *Cytogenet. Cell. Genet.* 81, 194-198.

Mauduit, C., Chatelain, G., Magre, S., Brun, G., Benahmed, M. and Michel, D. (1999) Regulation by pH of the alternative splicing of the stem cell factor pre mRNA in the testis. *J. Biol. Chem.* 274, 770-775.

- McCoshen, J. A. and McCallion, D. J. (1975) A study of the primordial germ cells during their migratory phase in Steel mutant mice. *Experientia* 31, 589-590.
- Mercer, W. E., Shields, M. T., Amin, M., Sauve, G. J., Appella, E., Romano, J.W. and Ullrich, S. J. (1990) Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6166-6170.
- Mintz, B. B. and Russell, E. S. (1957) Gene-induced embryological modification of primordial germ cells in mouse. *J. Exp. Zool.* 134, 207-237.
- Miyashita, T. and Reed, J. C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. *Cell* 80, 293-299.
- Mundlos, S., Pelletier, J., Darveau, A., Bachmann, M., Winterpacht, A. and Zabel, B. (1993) Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene *WT1* in embryonic and adult tissues. *Development* 119, 1329-1341.
- Noguchi, M., Niwa, K. and Takabayashi, S. (1997) A novel primordial germ cell growth factor, TER Factor, produced by mouse testicular somatic cells. *J. Reprod. Dev.* 43 supplement, 91-92 .
- Noguchi, M., Sakurai, T. and Iguchi, T. (1995) The *ter* mutation has harmful effect on the survival of mouse primordial germ cells (PGCs) *in vitro*. *Zool. Sci.* 13 supplement, 67.
- Noguchi, M., Watanabe, C., Kobayashi, T., Kuwashima, M., Sakurai, T., Katoh, H. and Moriwaki, K. (1996) The *ter* mutation responsible for germ cell deficiency but not testicular nor ovarian teratocarcinogenesis in *ter/ter* congenic mice. *Develop. Growth Differ.* 38, 59-69.
- Noguchi, T. and Noguchi, M. (1985) A recessive mutation (*ter*) causing germ cell

deficiency and a high incidence of congenital testicular teratomas in 129/Sv-ter mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 75, 385-392.

Pellas, T. C., Ramachandran, B., Duncan, M., Pan, S. S., Marone, M. and Chada, K. (1991) Germ-cell deficient (*gcd*), an insertional mutation manifested as infertility in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8787-8791.

Pelletier, J., Schalling, M., Buckler, A. J., Rogers, A., Haber, D. A. and Housman, D. (1991) Expression of the Wilms' tumor gene *WT1* in the murine urogenital system. *Genes Dev.* 5, 1345-1356.

Pesce, M., Canipari, R., Ferri, G. L., Siracusa, G. and De Felici, M. (1996) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates adenylate cyclase and promotes proliferation of mouse primordial germ cells. *Development* 122, 215-221.

Pesce, M., Farrace, M. G., Piacentini, M., Dolci, S. and De Felici, M. (1993) Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development* 118, 1089-1094.

Resnick, J. L., Bixler, L. S., Cheng, L. and Donovan, P. J. (1992) Long term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359, 550-551.

Resnick, J. L., Ortiz, M., Keller, J. R. and Donovan, P. J. (1998) Role of fibroblast growth factors and their receptors in mouse primordial germ cell growth. *Biol. Reprod.* 59, 1224-1229.

Richards, A. J., Enders, G. C. and Resnick, J. L. (1999) Activin and TGFbeta limit murine primordial germ cell proliferation. *Dev. Biol.* 207, 470-475.

Rose, T. M. and Bruce, A. G. (1991) Oncostatin M is a member of a cytokine

family that includes leukemia- inhibitory factor, granulocyte colony- stimulating factor, and interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8641-8645.

Rossi, P., Dolci, S., Albanesi, C., Grimaldi, P., Ricca, R. and Geremia, R. (1993) Follicle- stimulating hormone induction of steel factor (SLF) mRNA in mouse Sertoli cells and stimulation of DNA synthesis in spermatogonia by soluble SLF. *Dev. Biol.* 155, 68-74.

Ruggiu, M., Speed, R., Taggart, M., McKay, S. J., Kilanowski, F., Saunders, P., Dorin, J. and Cooke, H. J. (1997) The mouse Dazl gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* 389, 73-77.

Russell, E. S., McFarland, E. C. and Peters, H. (1985) Gametic and pleiotropic defects in mouse fetuses with Hertwig's macrocytic anemia. *Dev. Biol.* 110, 331-337.

Sakurai, T., Iguchi, T., Moriwaki, K. and Noguchi, M. (1995) The *ter* mutation first causes primordial germ cell deficiency in *ter/ter* mouse embryos at 8 days of gestation. *Develop. Growth Differ.* 37, 293-302.

Sakurai, T., Katoh, H., Moriwaki, K., Noguchi, T. and Noguchi, M. (1994) The *ter* primordial germ cell deficiency mutation maps near *Grl-1* on mouse chromosome 18. *Mamm. Genome* 5, 333-336.

Shaw, P., Bovey, R., Tardy, S., Sahli, R., Sordat, B. and Costa, J. (1992) Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor- derived cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4495-4499.

Stevens, L. C. (1973) A new inbred subline of mice (129-terSv) with a high incidence of spontaneous congenital testicular teratomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 50, 235-242.

Szilvassy, S. J., Weller, K. P., Lin, W., Sharma, A. K., Ho, A. S., Tsukamoto, A., Hoffman, R., Leiby, K. R. and Gearing, D. P. (1996) Leukemia inhibitory factor upregulates cytokine expression by a murine stromal cell line enabling the maintenance of highly enriched competitive repopulating stem cells. *Blood* 87, 4618-4628.

Takabayashi, S., Nozaki, M., Ishikawa, K. and Noguchi, M. (2001) The *ter/ter* gonadal somatic cells cause apoptosis in *ter/ter* primordial germ cells (PGCs) with normal survivability and proliferation ability in the mouse: Evidence from PGC-somatic cell "exchange-co-culture". *Zool. Sci.* 18, 695-704.

Takabayashi, S., Sasaoka, Y., Yamashita, M., Tokumoto, T., Ishikawa, K. and Noguchi, M. (2001) A novel growth factor supporting survival of murine primordial germ cells: Evidence from conditioned medium of *ter* fetal gonadal somatic cells. *Mol. Reprod. Develop.* (in press)

Tam, P. P. and Snow, M. H. L. (1981) Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 64, 133-147.

Tanaka, S. S., Toyooka, Y., Akasu, R., Katoh-Fukui, Y., Nakahara, Y., Suzuki, R., Yokoyama, M. and Noce, T. (2000) The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes. Dev.* 14, 841-853.

Toksoz, D., Zsebo, K. M., Smith, K. A., Hu, S., Brankow, D., Suggs, S. V., Martin, F. H. and Williams, D. A. (1992) Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7350-7354.

Toyoda-Ohno, H., Obinata, M. and Matsui, Y. (1999) Members of the ErbB receptor tyrosine kinases are involved in germ cell development in fetal mouse

gonads. *Dev. Biol.* 215, 399-406.

Uchida, M., Tokunaga, T., Niwa, K. and Imai, H. (1995) Effects of feeder cells and growth factors on the proliferation of mouse primordial germ cells. *Theriogenology* 44, 9-16.

Ying, Y., Liu, X. M., Marble, A., Lawson, K. A. and Zhao, G. Q. (2000) Requirement of *Bmp8b* for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol. Endocrinol.* 14, 1053-1063.

Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A. and Oren, M. (1991) Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352, 345-347.

Yoshimizu, T., Obinata, M. and Matsui, Y. (2001) Stage-specific tissue and cell interactions play key roles in mouse germ cell specification. *Development* 128, 481-490.

Wang, Z., Ren, S. G. and Melmed, S. (1996) Hypothalamic and pituitary leukemia inhibitory factor gene expression in vivo: a novel endotoxin-inducible neuro endocrine interface. *Endocrinology* 137, 2947-2953.

Watanabe, M., Shirayoshi, Y., Koshimizu, U., Hashimoto, S., Yonehara, S., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y. and Nakatsuji, N. (1997) Gene transfection of mouse primordial germ cells in vitro, analysis of their survival and growth control. *Exp. Cell. Res.* 230, 76-83.

Williams, D. E., de Vries, P., Namen, A. E., Widmer, M. B. and Lyman, S. D. (1992) The *Steel* factor. *Dev. Biol.* 151, 368-376.

Wysolmerski, J. J., McCaughern-Carucci, J. F., Daifotis, A. G., Broadus, A. E. and Philbrick, W. M. (1995) Overexpression of parathyroid hormone-related protein

or parathyroid hormone in transgenic mice impairs branching morphogenesis during mammary gland development. *Development* 121, 3539-3547.

Xia, C., Rahman, A., Yang, Z. and Goldstein, L. S. (1998) Chromosomal localization reveals three kinesin heavy chain genes in mouse. *Genomics* 52, 209-213.