

雄性生殖器の形成・発育の分子基盤と
疾患発症におけるその破綻

2013年 9月

埼玉大学大学院理工学研究科（博士後期課程）

理工学専攻（主指導教官 坂 井 貴 文）

宮 戸 真 美

要旨

外生殖器は生物にとって、効率的な交配による体内受精を成し遂げるために必須な器官である。生物が様々な環境に適応して種を維持する過程で、外生殖器の形態を多様化させてきたものと推測される。しかし、これまで外生殖器の発生過程における研究についての報告例は少ない。この約 15 年の間に、遺伝子改変マウスを用いた解析から、外生殖器の発生過程が分子レベルで解明されつつあるが、他の動物種との比較解析が行われておらず、マウスに限定された分子メカニズムである可能性を否定できていない。そのため、多様な形態をもつ雄性外生殖器の形態形成について、生物種を越えて共通して働く分子メカニズムを解明するためには、げっ歯目を用いた解析だけでは不十分である。したがって、げっ歯目以外の動物の外生殖器を解析することにより、初めて哺乳類の雄性外生殖器の形態形成におけるメカニズムの共通性を明らかにし、種特異的な部分を特定することが可能になると考えられる。

本研究では、哺乳類に共通した雄性生殖器の形成・発育の分子基盤と疾患発症におけるその破綻について解明することを目的とし、雄性外生殖器形成に関わる段階を男性ホルモン非依存的ステージと依存的ステージに分けて遺伝子発現解析および形態学的解析を試みた。前半では、マウスにおいてすでに関与が報告されている遺伝子群を手がかりにして、スunks外生殖器原基における遺伝子局在を検討し、後半では、ヒト先天性疾患から変異が同定された遺伝子の男性ホルモン産生における役割について、遺伝子改変マウスを用いて解析を行った。

マウス外生殖器原基の伸長過程で機能していることが報告されている *Fgf8* 遺伝子と、尿道形成過程で機能していることが報告されている *Shh* 遺伝子について、スunks外生殖器原基における発現領域を調べ、外生殖器原基の発生過程における細胞増殖因子群の役割について解析した。その結果、スunks外生殖器原基におけるこれら遺伝子

の発現様式とマウスで報告されている遺伝子の発現様式は極めて類似していることが明らかになった。このことから、マウスとスunksで共通した複数の遺伝子は、生物種を超えて外生殖器原基の形態形成を制御していることが推測される。続いて、成獣スunksの雄性外生殖器について形態学的に詳細な解析を行った。その結果、スunks雄性外生殖器の背側には骨格筋が存在すること、これまでスunksのように骨格筋が陰茎内を通っている生物種の報告はないこと、陰茎は角化した数多くのとげで覆われていることを見出した。外生殖器におけるこれら形態学的特徴から、その形成には男性ホルモンの関与が示唆される。

つぎに、男性ホルモンの雄性外生殖器における役割に着目して研究を行った。従来の研究から、胎生期において男性ホルモンは外生殖器原基の形態の雌雄差および尿道形成に関与することが推測されており、男性ホルモン産生量および分泌量の減少は外生殖器の女性化や尿道形成異常（尿道下裂）を引き起こすと考えられている。

Mastermind-like domain containing 1 (MAMLD1) は、ヒトにおいて尿道下裂責任遺伝子として発見された遺伝子である。*MAMLD1* 変異が尿道下裂を招く機序は不明であり、*MAMLD1* の生体内機能はわかっていない。我々は、胎生中期から後期のマウス胎仔精巣で *Mamld1* 遺伝子の mRNA 発現量が経時的に増加することを見出し、この発現量の上昇が男性ホルモン合成増加と一致することを明らかにした。そこで、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスを作製し、胎生期精巣のステロイドホルモン産生における *Mamld1* の役割の解明を試みた。その結果、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣において、ライディッヒ細胞特異的に発現する遺伝子（*Cyp17a1*、*Hsd3b1* など）の mRNA 発現量が有意に低下していることを明らかにした。しかし、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣の形態および胎仔精巣内のテストステロン量は野生型マウスと比べて違いがなく、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスは尿道下裂を示さなかった。ただし、これまでに培養細胞を用いたノックダウン実験の解析から、*Mamld1* 遺伝子の発現低下は男性ホルモン産生細胞にお

いてストステロン産生量の減少とホルモン産生関連酵素である *Cyp17a1* 遺伝子の発現量低下を招くことを明らかにしている。以上の結果を総合すると、**MAMLD1/Mamld1** は、マウスやヒトに共通して、胎生期精巣におけるライディッヒ細胞特異的に発現する遺伝子の発現調節を介して、ステロイドホルモン産生に関与することが推測される。

本研究により、男性ホルモン非依存的な時期では、**Fgf8** や **Shh** などのサイトカインがマウスおよびスunksの外生殖器原基の発生過程に共通して機能していることが示唆される。さらに、男性ホルモン依存的な時期では、**Mamld1** が胎生期精巣において男性ホルモン産生酵素遺伝子群の発現を制御することを見出し、男性ホルモン産生に関与する新たな分子機構が明らかになった。

【目次】

【目次】	1
【序論】	4
【第一章】 男性ホルモン非依存的ステージでの外生殖器形成メカニズムの解明...10	
- スンクス外生殖器原基の発生過程および成獣外生殖器形態の解析 -	
< 諸言 >	11
< 材料と方法 >	14
動物の飼育と交配	14
器官およびスンクス胚の採取	14
器官およびスンクス胚の処理	14
解剖学的解析	15
組織学的解析	15
免疫組織化学	16
電子顕微鏡解析	17
ジゴキシゲニン標識リボプローブの作製	17
ホールマウント <i>in situ</i> hybridization	18
< 結果 >	20
1. スンクス外生殖器原基の発生過程	20
2. スンクス雄性外生殖器の解剖学的解析	21
3. スンクス雄性外生殖器の組織学的解析	22
< 考察 >	24
【第二章】 男性ホルモン依存的ステージでの外生殖器形成メカニズムの解明.....29	
- <i>Maml1</i> 遺伝子欠損マウスの表現型解析 -	

< 諸言 >	30
< 材料と方法 >	32
<i>Maml1</i> 遺伝子欠損マウスの作製	32
動物の飼育と交配	32
器官およびマウス胚の採取	33
器官およびマウス胚の処理	33
解剖学的解析	34
組織学的解析	34
免疫組織化学	35
リアルタイム RT-PCR	36
ウエスタンブロット	37
胎仔精巣内のステロイド代謝産物含有量の測定	38
ジゴキシゲニン標識リボプローブの作製	38
ホールマウント <i>in situ</i> hybridization	39
統計学的解析	40
< 結果 >	41
1. <i>Maml1</i> 遺伝子のマウス胎仔精巣における発現解析	41
2. <i>Maml1</i> 遺伝子欠損雄マウスの作製	41
3. <i>Maml1</i> 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣における遺伝子発現およびタンパク質発現	42
4. <i>Maml1</i> 遺伝子欠損マウスの外生殖器の解析	42
5. <i>Maml1</i> 遺伝子欠損マウスの内生殖器の解析	43
6. 交配実験	43
< 考察 >	45

【総括】	51
【謝辞】	53
【参考文献】	54
【図】	67

【序論】

脊椎動物における性決定は、遺伝的性決定（受精時における性染色体の組み合わせに依存）と遺伝的支配を受けない環境による性決定（爬虫類の卵が置かれた温度に依存）に分けられる(1, 2)。遺伝的性決定をする動物種の中で、哺乳類の多くは雄ヘテロ型（XY 型）であり、ヒトでは男性が 46,XY、女性が 46,XX として、性染色体の配分により性が決定される(3)。ヒトの性腺は、男女に共通した未分化性腺として形成された後、性決定遺伝子として知られる Y 染色体上の *SRY* 遺伝子が発現するとき胎生期精巣へ、発現しないとき胎生期卵巣へと分化する(4)。それに対して、精管や外生殖器は、性腺の性分化から遅れて、胎生期精巣が形成された後、そこから分泌されるホルモンの有無に依存して分化する。すなわち、胎生期には雄にも雌にもウォルフ管とミュラー管と呼ばれる二組の生殖管が存在しており、その後の初期の性分化にともない雌雄特有の形態へと分化していく(5-7)。ミュラー管は、セルトリ細胞から分泌される抗ミュラー管ホルモンが存在するときには退縮し、存在しないときには子宮・卵管・膈上部へと分化する。一方、ウォルフ管は、ライディッヒ細胞から分泌される男性ホルモンの一つであるテストステロンに暴露されたときには精巣上体・輸精管・精嚢に分化し、暴露されないときには退縮してしまう。外生殖器も同様に男性ホルモンの影響を受け、男性ホルモンが機能するときには雄性外生殖器である陰茎および陰嚢に分化し、機能しないときには雌性外生殖器である陰核・陰唇へと分化する(8, 9)。以上のことから、哺乳類の外生殖器の性分化は、大きく二つのステージに分類される。一方は男性ホルモン非依存的ステージ、もう一方は男性ホルモン依存的ステージであり、内生殖器と同様に、外生殖器も発生段階はこの二つのステージに分けられる。

外生殖器は、四肢と同様に形態の多様性がある付属器官の一つに分類される(10)。外生殖器は、多くの生物種において次世代に遺伝子を伝えるという生殖メカニズムのた

めに極めて重要な器官である。また、哺乳類は、脊椎動物の中でも形態的に複雑な構造をした外生殖器を有しており、種を維持する過程で効率的に子宮内へ精子を運搬する道具として、外生殖器の形態を多様化させてきたと考えられている(11, 12)。結果として、外生殖器の形態の多様性は、種特異的な生殖戦略の一端を担っているとも考えられる。つまり、遺伝的にみた場合には近縁種であっても外生殖器の形態が異なった場合は、生殖行動が制限されてしまうことから、外生殖器の形態変化は種内変異から種分化への変遷にとって必要な過程であると推測される(13)。

最近の分子生物学、分子発生工学の飛躍的な進歩により、モデル動物を用いた遺伝子改変法であるエレクトロポレーションやウイルスベクターによる変異遺伝子の導入法が確立された。さらにノックアウトおよびトランスジェニックマウスを用いた解析から、器官形成を制御する分子メカニズムが数多く明らかにされてきた(14)。その結果、器官原基の発生はいくつかの過程に分けられることがわかってきた。まず、第一に器官の伸長を始めるという隆起開始の過程、第二にそれに引き続いて器官内での伸長反応が誘導される過程、第三に器官内での組織分化が起こる過程である。これらの過程には、形態形成に必要な相互作用、すなわち、上皮間葉相互作用が存在する。外生殖器原基の発生では、男性ホルモンに非依存的ステージとして隆起開始過程と伸長過程、男性ホルモン依存的ステージとして雌雄差が現れる過程が知られており、陰茎や陰核などの雌雄特有な形態の形成、尿道の形成は男性ホルモン依存的な過程に含まれる(8, 15, 16)。

本研究のテーマである外生殖器の研究は、外生殖器と四肢発生における共通点を出発点としている。今までの研究成果として、四肢や歯といった付属器官の発生過程で重要な因子として知られている *Fibroblast growth factor* (*Fgf*) 遺伝子群、*Sonic hedgehog* (*Shh*) 遺伝子、*Bone morphogenetic protein* (*Bmp*) 遺伝子群などが、マウス外生殖器原基にも発現しており、外生殖器形成に関与していることを見出している(17-19)。*Fgf8*

遺伝子は四肢形成初期から発現が認められ、四肢の原基である肢芽形成とともに外胚葉性頂堤（AER: apical ectodermal ridge）全域で強い発現がみられるようになり、やがて発現が消失する(20, 21)。このことから *Fgf8* 遺伝子は四肢形成のごく初期に、体幹からの伸長過程に機能していると考えられている(20, 21)。*Fgf10* 遺伝子は遺伝子発現解析に基づき(22)、脳、肺、および四肢の発達の調節因子として機能することが推測されている。1998 年に *Fgf10* 遺伝子欠損マウスが作製され、このマウスは肺が形成されないために出生時に死亡すること、四肢が完全に欠損していることが報告された(23, 24)。さらに、現在までに、*Fgf10* 遺伝子は四肢、肺はもちろん、前立腺、乳腺などの発生において重要な働きをしていることが報告されている(25, 26)。*Shh* 遺伝子は、ショウジョウバエの変異体により報告されたヘッジホッグ（Hedgehog）遺伝子の脊椎動物のホモログであり、分泌型タンパク質をコードする(27)。現在までに、*Shh* 遺伝子はヘンゼン結節、脊索、肢芽の極性化領域、脳の腹側の神経上皮、肺、歯、毛の原基上皮に発現し、それぞれの器官の形態形成において重要な因子であることが報告されている(28-31)。

マウス外生殖器原基の初期形成過程で発現している四つの遺伝子（*Fgf8*、*Fgf10*、*Shh*、*Bmp4*）を中心にして、主に研究が進められてきた(17-19)。また、これまでに生殖器原基の発生過程における機能を解析するため、遺伝学的手法やビーズ移植などによる実験発生学的手法を取り入れた生殖器原基の器官培養系が開発された(17-19)。その培養系および遺伝子欠損マウスを用いた解析から、遠位尿道板上皮（DUE: distal urethral epithelium）で発現している *Fgf8* 遺伝子は、外生殖器原基の間葉性遺伝子の発現を制御して、外生殖器原基の伸長過程に関与すること(17)、*Fgf10* 遺伝子欠損マウスや *Shh* シグナリングが破綻したマウスの外生殖器原基は尿道下裂を示すことから、*Fgf10* 遺伝子および *Shh* シグナリングは外生殖器の尿道形成過程において重要な役割を果たすことが報告されている(17, 18)。このようにマウスを用いた解析から、外生殖器形成の分子

メカニズムの一部が明らかになったとは言え、形態が多様である外生殖器の形態形成の分子メカニズムを解明するためには、マウスを用いた解析だけでは不十分である。そこで、複数の動物種での外生殖器の形態比較や発生過程における遺伝子の発現様式の相違について検討するために、進化的に最も原始的な哺乳類とされる食虫目に属するスunks(32-34)に注目した。スunksは今から約 30 年前に日本で実験動物化された食虫目では唯一の小型哺乳類である(35, 36)。このように系統学的に離れた位置に存在する動物種を用いて形態学的・分子生物学的な解析を行うことは、哺乳類の様々な器官が最終的に呈する形態や機能の種特異性の中に存在する共通メカニズムを理解する上で必要不可欠である。また、ヒト疾患の発症メカニズムが動物種としての特異性の部分が原因になっているのか、または動物種を越えて共通したメカニズムの破綻が原因になっているのかといった疑問についても新たな知見が得られる可能性がある。

ヒトに関して言えば、近年、停留精巣や尿道下裂などの先天奇形が増加しているという疫学的データが日本や欧米諸国から報告され、社会的問題となっている(37-39)。その中でも、尿道下裂は、外生殖器腹側の発育異常により正常な尿道が形成されない症状であり、出生男児の約 250 人に 1 人の割合で認められる頻度の高い性分化疾患である(38, 40)。尿道下裂患者の中で、特異的遺伝子診断がなされる症例はごく少数であり、本症の発症メカニズムには機能未知でかつ複雑なシグナル伝達経路の遺伝的因子が関わっていることが推測されている。

今までの研究から、正常な尿道形成は、胎生期において外生殖器原基の腹側に存在する尿道溝が、間葉の分化にともない深くなり、その後、陰茎内に取り込まれて管状の構造である尿道になるという特徴的な形態形成過程をとることが明らかになっている(8)。この尿道形成には、胎生期における細胞増殖因子群の形成制御シグナルの関与のほか、胎生期精巣で産生される男性ホルモン（主にテストステロン）が関与すると考えられている(8, 15, 16)。尿道形成への男性ホルモンの作用については、妊娠マウス

に抗男性ホルモン剤であるフルタミドを投与すると、外生殖器原基腹側の形成異常すなわち尿道下裂が引き起こされるという報告により示唆されている(41)。したがって、胎生期の男性ホルモン産生量および分泌量の減少は尿道下裂を引き起こす主要因として考えられている(42)。

従来、X 染色体長腕遠位部に、男性外生殖器異常の責任遺伝子が想定されていた(43)。*Mastermind-like domain containing 1* (*MAMLD1*) は、2006 年に現所属研究部においてヒトの尿道下裂責任遺伝子として発見された遺伝子であり(44)、男性外生殖器異常の責任遺伝子の存在が想定されていた領域である染色体 Xq28 に存在する。これまでの蛋白構造解析および *in vitro* 解析から、*MAMLD1* は Mastermind-like motif を有していること、*MAMLD1* 翻訳領域の上流には *NR5A1* (別名 *SF-1*、*AD4BP*) 結合配列が存在し(45)、*NR5A1* タンパク質がこの配列に結合してレポーター遺伝子を活性化することが明らかになっている(46)。また、マウス相同遺伝子 (*Mamld1*) はマウス胎仔精巣において、*NR5A1* と同一の細胞 (セルトリ細胞とライディッヒ細胞) で発現することが見出されている(44)。さらに、我々はマウスライディッヒ腫瘍細胞における内在性 *Mamld1* 遺伝子をノックダウンした結果、テストステロン産生量の減少とホルモン産生関連酵素である *Cyp17a1* 遺伝子の発現量低下を招くことを報告した(46, 47)。これらのことから、*MAMLD1/Mamld1* は *NR5A1/Nr5a1* の調節下において、ステロイド合成酵素遺伝子 *CYP17A1/Cyp17a1* の発現調節を介してテストステロン産生に関与しており、*MAMLD1* 変異はテストステロン産生障害に起因する 46,XY 性分化疾患を引き起こすことが推測される。しかしながら、*MAMLD1* 変異が尿道下裂を招く機序はこれまでわかっていない。

外生殖器原基の発生過程は、男性ホルモンに非依存的な隆起開始過程と伸長過程、男性ホルモン依存的な形態に雌雄差が発現する二つの過程に分けることができるが(8)、雄性外生殖器の最終的な形態は脊椎動物間で多様である(11, 12)。本研究では、雄性外

生殖器の形成・発育過程に着目し、外生殖器原基の発生過程における分子メカニズムと外生殖器形成異常の発症メカニズムを明らかにすることを目的として一連の研究を行った。本論文では、第一章において、男性ホルモン非依存的ステージでの外生殖器形成メカニズムを解明するために、スunks外生殖器原基の発生過程に関与する遺伝子の局在解析および成獣sunksの雄性外生殖器の形態学的解析を中心に行い、第二章では、男性ホルモン依存的ステージでの外生殖器形成メカニズムを解明するために、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスを用いて男性ホルモン産生経路における *Mamld1* の役割について解析を行った。

【第一章】

男性ホルモン非依存的ステージでの外生殖器形成メカニズムの解明

- スンクス外生殖器原基の発生過程および成獣外生殖器形態の解析 -

＜諸言＞

外生殖器は、付属器官の一つに分類され(10)、その形態は脊椎動物間において多種多様である(11, 12)。そのため、外生殖器の形態は、同種間における物理的な一種の“鍵と鍵穴”の関係に例えられるような雌雄選択の役割を担うことが知られている(13)。また、哺乳類は脊椎動物の中でも一般によく発達した外生殖器をもっており、これは交尾行動の少ない機会を利用して、効率的に精子を雌性生殖器内に運搬する手段として外生殖器の形態を進化させたことを意味している。哺乳類が生息する環境は多様であり、様々な環境に適応して種を維持する過程で、外生殖器の形態も多様化してきたものと推測されている。また、外生殖器は、陰茎内に尿道および海綿体構造などの哺乳類に共通した構造が存在する一方、陰茎内における骨の有無、白膜（海綿体を囲む結合組織）の厚みの違い、包皮の形成といった種特異的な形態的特徴を示す(8)。

このように外生殖器は、形態が多様化した器官であるだけでなく、動物種の絶え間ない繁殖において最も重要な効率的体内受精を成し遂げるために必要な器官である。現在、地球上に存在する動物のほとんどは種の保存に関する問題を抱えている。ヒトもそのような動物種の一つであり、外生殖器の形成異常はヒトの生殖能力低下の一因として考えられている(48)。ヒトにおける外生殖器の形成異常について、先天性疾患の一つである尿道下裂の発症頻度が年々増加していると報告されている(37-39)。最新の資料では、症状が軽度のものを含めると、出生男児の約 250 人に 1 人の割合で尿道下裂を発症していると考えられている(38)。このように出現頻度の高い先天性疾患でありながら、ヒトの外生殖器の形態形成過程における研究、特に分子レベルでの解析はこれまで報告例が少なく、外生殖器の形成異常発症の原因は不明のままである。

外生殖器の研究には、ヒトを実験対象として用いることは不可能であるが、倫理審査を通過した後、患者検体（血液など）を採取して遺伝子変異を同定することは可能

である。しかし、同定した遺伝子について機能解析を行うためには、実験動物を用いることも必要である。今まで実験動物として主に用いられているマウスは、げっ歯目に属しており、外生殖器の発生を解明するモデルとして解析されてきた(17-19, 49)。マウスでは胎生 10.5 日以降に体幹部より外生殖器原基の隆起が起こり、胎生 11.5～14.5 日まで外生殖器原基は著しく伸長し、その後、腹側には内胚葉性の尿道、背側には陰茎骨を形成する(8)。胎生 15.5 日まではマウス外生殖器形態に雌雄の差は生じていない(41)。外生殖器原基の器官培養系および遺伝子欠損マウスを用いた解析より、マウス外生殖器の形態形成過程における分子メカニズムの一部が徐々に明らかになってきた(17-19, 49, 50)。しかし、様々な点で、マウスとヒトの外生殖器は異なる特徴をもつため、外生殖器の形態形成を理解し、ヒトにおける疾患の原因を究明するためには、げっ歯目を用いた解析だけでは不十分である。そこで、本研究では、生物種間での外生殖器の形態形成メカニズムの相違について検討するために、進化的に最も原始的な哺乳類である食虫目を用いた解析を試みた。ウシ、ブタ、ヒツジといった大型動物も実験動物として利用可能であるが、多数の胎生期胚を必要とする本研究を推進するために、マウスと同等程度の大きさという特徴をもつ小型動物であるスunksを用いた。

スunksは食虫目に属しており、今から約 30 年前に実験動物化された日本発の実験動物であり(35, 36)、嘔吐の分子メカニズムを探る上でのモデル動物として研究されてきた(51)。食虫目は系統学的に最も原始的な哺乳類であると考えられており(32-34)、系統進化学的にマウスおよびヒトの祖先型としての形質を保持していることが推測される。このように系統学的に離れた位置に存在する動物種を用いて解析することは、哺乳類の形態の共通性および多様性を理解する上で必要である。以上の根拠から、本研究では、マウスと比較する対象としてスunksを用いて、生物種間での雄性外生殖器の形態の差異と共通性を解析した。具体的には、マウスにおいて解析が進んでいる遺伝子、特に細胞増殖因子に着目し、スunks外生殖器原基におけるそれらの遺伝子の

発現様式について検討した。男性ホルモン非依存的ステージでの、哺乳類の外生殖器原基の発生過程における種を超えた分子機構の共通性について解析を行った。

＜材料と方法＞

本研究で行った全ての動物実験は、熊本大学動物実験指針および（独）国立成育医療研究センター、実験動物委員会における動物実験に関する指針に準拠して実施し、事前の承認に基づいて（承認番号 A2007-001-C06）、動物に対しての苦痛を最小限に留めるように配慮された条件の下で行われた。

動物の飼育と交配

KAT 系統（名古屋大学教授 織田銑一先生により維持されていた繁殖コロニーから分与）のunksは、12 時間ごとの明暗周期、25℃の室温条件においてマウスとは異なる動物実験室で飼育し、餌は日本クレアより購入した CIEA-305 を用いた。また、交配には 8 週齢以上の雌雄個体を用いた。

器官およびunks胚の採取

8 週齢以上のunksを用いて、外生殖器の解剖学的、組織学的な解析を行った。外生殖器を含む外陰部領域を摘出後、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）にて洗浄を行い、解剖学的解析用、組織学的解析用および免疫組織化学用にそれぞれの処理を行った。unks胚の日齢は、雌雄を 2 時間または一晩交配させた後、交配翌日を胎生 0 日とした。unksの妊娠期間は約 30 日間であり、実験には胎生 14 日以降のunks胚を用いた。さらに、unks胚の発生ステージは、四肢発生の形態的な特徴に従って推定した(52)。各発生段階のunks胚を素早く摘出した後、PBS にて洗浄を行い、解剖学的解析用、組織学的解析用、免疫組織化学用、電子顕微鏡解析用および *in situ* hybridization 用に適したそれぞれの処理を行った。

器官およびunks胚の処理

解剖学的解析用の器官は、PBS による洗浄後、未固定条件下で作業を行った。組織学的解析用と免疫組織化学用の器官およびスunks胚は、PBS による洗浄後、4%パラホルムアルデヒド/PBS にて一晩固定した後、メタノールにて段階的に脱水処理を行った。脱水処理を行った後、半自動オープン式ティッシュプロセッサ（ライカ、TP1020）により、エタノール（室温、2 時間、3 回）、キシレン（室温、2 時間、3 回）、パラフィン（60℃、3 時間、2 回）へと液交換を行い、組織をパラフィン包埋装置（ライカ、EG1160）にてパラフィン（サクラファインテックジャパン）に包埋した。包埋した組織を 6 μm の切片にし、APS（アミノシラン）コートスライドガラス（松浪硝子工業）に貼付して組織切片を作製した。*In situ* hybridization 用のスunks胚は、PBS による洗浄後、4%パラホルムアルデヒド/PBS にて一晩固定し、メタノールにて段階的に脱水した。電子顕微鏡解析用のスunks胚は、PBS による洗浄後、グルタルアルデヒドとパラホルムアルデヒドの混合液にて前固定、オスミウムにて後固定を行い、エタノールにて段階的に脱水処理を行った。

解剖学的解析

実体顕微鏡（ライカ、MZ-FL III）で観察した後、デジタルカメラ（オリンパス、DP70）にて画像を撮影した。

組織学的解析

組織切片は、パラフィン除去と加水処理後、ヘマトキシリン・エオシン（H&E）染色およびマッソン・トリクローム（Masson's trichrome）染色（武藤化学薬品）を行った。H&E 染色は、ヘマトキシリンで細胞核を青藍色に染色、エオシンで細胞質をピンク色に対比染色することにより、顕微鏡による組織像の撮影を可能にした。また、Masson's trichrome 染色は、ヘマトキシリンで細胞核を濃紫赤色に染色、酸フクシンで

細胞質を赤色に染色、アニリン青で膠原線維を青色に染色することにより顕微鏡による組織像の撮影を可能にした。染色後の切片は、疎水化処理を行った後、疎水性封入剤（オイキット液）で封入して、正立顕微鏡（オリンパス、BX50）で観察した後、デジタルカメラ（オリンパス、DP70）にて画像を撮影した。

免疫組織化学

組織切片を用いて、つぎに示すような酵素抗体法にてタンパク質の局在を解析した。

骨格筋の検出：組織切片をパラフィン除去と加水処理、抗原賦活化処理（20 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K、37°C、15 分）を行い、内因性ペルオキシダーゼの失活処理（0.3% $\text{H}_2\text{O}_2/\text{PBS}$ 、室温、30 分）を行った後、2% Blocking 溶液（1096176、Roche）にてブロッキング処理（室温、60 分）を行った。その後、Mouse monoclonal anti-Myosin (Skeletal, Fast) 抗体（MY-32、Sigma、希釈倍率 1/400）を用いて一次抗体反応（室温、120 分）を行った。PBS による洗浄後、Goat anti-mouse IgG-HRP 抗体（sc-2005、Santa Cruz、希釈倍率 1/100）を用いて二次抗体反応（室温、60 分）を行った。PBS による洗浄後、DAB を基質液とし、酵素反応にてシグナルの検出（室温、15 分以内）を行った。

平滑筋の検出：組織切片をパラフィン除去と加水処理後、内因性ペルオキシダーゼの失活処理（3% $\text{H}_2\text{O}_2/\text{PBS}$ 、室温、5 分）を行った。PBS による洗浄後、ブロッキング処理をせず、Anti-human smooth muscle actin/HRP 抗体（1A4、DAKO、Ready-to-use で市販）を用いて抗体反応（室温、60 分）を行った。PBS による洗浄後、DAB を基質液とし、酵素反応にてシグナルの検出（室温、15 分以内）を行った。

シグナル検出後の切片はメチルグリーンでカウンター染色を行った。染色後の切片は、疎水化処理を行った後、疎水性封入剤（オイキット液）で封入して、正立顕微鏡（オリンパス、BX50）で観察した後、デジタルカメラ（オリンパス、DP70）にて画像を撮影した。

電子顕微鏡解析

スunksを安楽死させた後、スunks胚の性腺の形と大きさにより雌雄を判別した。続いて、外生殖器の形態をはっきりと観察するために、スunks胚から尾を取り除いた。エタノールにより脱水処理を施したスunks胚を、酢酸イソアミルにより一晩、4℃で置換した後、臨界点乾燥を行った。その後、スunks胚を銀ペーストでアルミニウムの試料台に付け、試料表面に金の薄膜を蒸着後、走査電子顕微鏡（日立、S-800）で観察、フィルムカメラにて画像を撮影した。

ジゴキシゲニン標識リボプローブの作製

成獣スunks脳を素早く採取した後、ISOGEN（ニッポンジーン）を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA から、遺伝子特異的プライマーと SuperScript III One Step RT-PCR Synthesis System with Platinum *Taq*（Invitrogen）を用いて、つぎに示す遺伝子に対して逆転写反応（50℃、30 分）を行い、DNA の単鎖化（94℃、2 分）を行った後、DNA の単鎖化（94℃、30 秒）、プライマーのアニーリング（*sFgf8* 60℃、30 秒：*sShh* 58℃、30 秒）、伸張反応（72℃、90 秒）を 36 サイクル行った後、最後に、伸張反応（72℃、5 分）を行い、cDNA 断片を増幅した。RT-PCR 反応に用いたプライマーはつぎのとおりである。

sFgf8 For: 5'-ACC TAC CAG CTC TAC AGC CGC ACC-3' (24 mer)

sFgf8 Rev: 5'-GCG TGG CAG GCG CTT CAT GAA GTG-3' (24 mer)

sShh For: 5'-CCG AAC GAT TTA AGG AAC TCA CC-3' (23 mer)

sShh Rev: 5'-CAC GGA GTT CTC TGC TTT CAC A-3' (22 mer)

その後、得られたそれぞれの cDNA 断片（*sFgf8* 384 bp、*sShh* 365 bp）を pGEM-T Easy vector（Promega）に組み込むための結合反応を行い、反応終了後の DNA 溶液を大腸

菌のコンピテント細胞 DH5 α 株に導入した後、アンピシリンを含む寒天培地上で培養して目的断片を含むプラスミドを選択した。目的のプラスミドを含む大腸菌を液体培地で培養した後、*sFgf8* を組み込んだプラスミドは *Nco* I (TOYOBO) で、*sShh* を組み込んだプラスミドは *Spe* I (TOYOBO) で制限酵素処理して鎖状にした。これを鋳型としてジゴキシゲニン (DIG) 標識を行うために、DIG RNA Labeling Mix (1277073、Roche) を用いて、T7 あるいは SP6 ポリメラーゼにより *in vitro* 転写を行い、*sFgf8* 遺伝子および *sShh* 遺伝子に対する DIG 標識 cRNA プローブを作製した。

ホルマウント *in situ* hybridization

ホルマウント *in situ* hybridization は、Wilkinson により確立された方法に従い行った(53)。メタノール中に保存していたスunks胚を、メタノール/PBT 液シリーズにて再水和を行い、過酸化水素処理 (6% H₂O₂/PBT、室温、60 分) を行った。PBT による洗浄後、プロテネース K 処理 (10 μ g/ml Proteinase K/PBT、室温、60 分) を行い、グリシン/PBT 液でプロテネース K の反応を停止した。PBT による洗浄後、再固定処理 (0.2% グルタルアルデヒド/4% パラホルムアルデヒド、室温、20 分) を行った。PBT による洗浄後、ハイブリダイゼーションバッファー (50% formamide、50 μ g/ml Yeast RNA、5xSSC、1% SDS、50 μ g/ml heparin) 中にてプレハイブリダイズ (70°C、60 分) した。その後、DIG 標識した cRNA プローブ (0.5 μ g/ml) の入ったハイブリダイゼーションバッファー中にてハイブリダイズ (70°C、一晚) を行った。ハイブリダイズを行った後、Solution 1 (50% formamide、5xSSC、1% SDS) にて洗浄 (70°C、20 分、3 回)、Solution 1 と Solution 2 (0.5 M NaCl、10 mM Tris-HCl、0.1% Tween-20) との 1:1 の混合液にて洗浄 (70°C、10 分)、Solution 2 にて洗浄 (室温、10 分) を行った。その後、10 μ g/ml RNase A/ Solution 2 処理 (37°C、30 分) を行い、Solution 2 にて洗浄 (室温、10 分)、Solution 3 (50% formamide、2xSSC) にて洗浄 (室温、10 分)、Solution 3 にて洗浄 (37°C、30

分、2回)を行った。続いて、TBST (0.1 M NaCl、0.2 M CaCl₂、25 mM Tris-HCl、0.1% Tween-20) にて洗浄 (室温、10 分、3 回) し、10% FBS/TBST でブロッキング処理 (4℃、60 分) を行った。スルクスエンプリオパウダーにより非特異吸着処理済みのアルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗 DIG 抗体 (1093274、Roche) を 1% FBS/TBST で約 2,500 倍に希釈して抗体反応 (4℃、一晚) を行った。翌日、TBST にて洗浄 (室温、5 時間、10 回近く液交換を行う)、NTMT (0.1 M NaCl、0.2 M MgCl₂、20 mM Tris-HCl、0.2% Tween-20) にて洗浄 (室温、10 分、3 回) を行い、BM パープルアルカリフォスファターゼ基質液 (1442074、Roche) を加え、遮光状態にて発色反応を行った。シグナル検出後、順次 PBT で洗浄を行い、発色反応を停止した。実体顕微鏡 (ライカ、MZ-FL III) で観察した後、デジタルカメラ (オリンパス、DP70) にて画像を撮影した。

<結果>

1. スンクス外生殖器原基の発生過程

最初に、スンクス外生殖器原基の発生過程について解析を行った。まず、胎生 14～18 日（マウスの胎生 10.5～12.0 日に対応）について検討した（Fig. 1）。外生殖器原基は、胎生 14 日において隆起しておらず（Fig. 1A、white arrowhead）、胎生 15 日において臍帯と尾の間にわずかな隆起が認められた（Fig. 1B、yellow square bracket）。また、胎生 15 日からスンクス外生殖器原基に遠位尿道板上皮（DUE: distal urethral epithelium）の構造が確認できた（Fig. 1B-D、yellow arrowhead）。胎生 16 日と胎生 18 日において、外生殖器原基は著しく伸長した（Fig. 1C、D、yellow square bracket）。ここで観察した胎生 18 日までは、外生殖器原基の形態における雌雄差は認められなかった。この時期、外生殖器原基の間葉は未分化状態であった（データ不掲載）。つぎに、胎生 20～22 日（マウスの胎生 13.5～14.5 日に対応）について検討した（Fig. 2）。胎生 20 日において、外生殖器原基の遠位側に形態の雌雄差は認められなかったが（Fig. 2A、B、white arrowhead）、雄の外生殖器原基の近位側では尿生殖ヒダ（urogenital fold）の癒着がみられ、雌の近位側で癒着はみられないという雌雄差が認められた（Fig. 2A、B、yellow arrowhead）。さらに、胎生 22 日において、雄の外生殖器原基の近位側ではすでに管状の構造である尿道が形成されており、雌では尿道は形成されていないという尿道形成における雌雄差が認められた（データ不掲載）。また、実長計測は行っていないが、取得画像解析の結果、雄の肛門性器間距離（AGD : anogenital distance）は雌に比べて長いことがわかった（Fig. 2C、D、yellow square bracket）。

マウス外生殖器の発生過程において、*Fgf8* 遺伝子は外生殖器原基の DUE に発現し、外生殖器原基の伸長を制御していることが報告されている(17)。そこで、スンクス外生殖器原基において *Fgf8* 遺伝子の発現解析を行った（Fig. 3）。その結果、原基の隆起が

みられない時期の腹側正中線上に *Fgf8* 遺伝子の発現が認められ (Fig. 3A、yellow arrowhead)、その後、外生殖器原基の伸長にともない、DUE に *Fgf8* 遺伝子の発現が認められた (Fig. 3B、C、yellow arrowhead)。胎生 20 日では、*Fgf8* 遺伝子の発現は外生殖器原基先端にわずかに観察された (Fig. 3D、yellow arrowhead)。これらの発現様式は、マウス外生殖器原基の伸長過程における *Fgf8* 遺伝子の発現様式と類似していた。つぎに、スunks外生殖器原基の尿道形成過程について調べた。今までの研究から、*Shh* 遺伝子はマウス外生殖器原基の尿道板上皮に発現し、尿道形成過程で機能していることが報告されている(18)。そこで、スunks外生殖器原基において *Shh* 遺伝子の発現領域を検討した (Fig. 4)。その結果、原基の隆起がみられない時期の腹側正中線上に *Shh* 遺伝子の発現が認められた (Fig. 4A、yellow arrowhead)。胎生 18 日および胎生 20 日では、外生殖器原基において近位から遠位の尿道板上皮に *Shh* 遺伝子の発現が観察された (Fig. 4B、C、yellow arrowheads)。胎生 22 日では、雄性外生殖器原基の遠位側において尿道板上皮に *Shh* 遺伝子の発現が確認された (Fig. 4D、yellow arrowheads)。しかし、近位側ではすでに尿道溝の取り込みが起こっており、管状の構造である尿道が形成されていたため、外側より *Shh* 遺伝子の発現を確認することはできなかった (Fig. 4D、black arrowhead)。そこで、胎生 22 日の雄性外生殖器原基の近位側における *in situ* hybridization による発現解析を行い、取り込まれた尿道上皮においても *Shh* 遺伝子が発現していることを確認した (データ不掲載)。これらの発現様式は、マウス外生殖器原基の伸長過程および尿道形成過程における *Shh* 遺伝子の発現様式と類似していた。

2. スunks雄性外生殖器の解剖学的解析

つぎに、スunks雄性外生殖器がどのように構成されているか形態を理解するために、解剖学的な解析を行った(54, 55)。成獣スunksの性差は、体長や体重および乳頭

の有無により明らかである(56)。しかし、一見すると成獣スunks外陰部領域の外観の性差ははっきりしない。それは、sunksの泌尿器と生殖器の外口と肛門は、雌雄ともに共通の皮膚のヒダに覆われているためであった。この開口部は、正中線上で吻尾方向に長い共通の裂隙に開いており、尿生殖肛門裂と呼ばれている(56)。

まず、性成熟したsunks雄性外生殖器の解剖学的な解析を行った。雄性外生殖器を尿生殖肛門裂より押し出し、外生殖器の先端を左側に向けた (Fig. 5A)。包皮 (prepuce) は、外生殖器の近位領域に観察された (Fig. 5A、white arrow)。雄性外生殖器は、尿生殖肛門裂の中において、ほぼ中央部分で折れ曲がった状態で収納されており、交配時に勃起することができる(56)。外生殖器の背側遠位には、尿道海綿体からつながる陰茎亀頭があった (Fig. 5A、white arrowhead)。

3.unks雄性外生殖器の組織学的解析

つぎに、外生殖器の切片化を行い、Masson's trichrome 染色による組織学的な解析を行った。解析の結果、外生殖器の遠位領域において、陰茎亀頭は粗な結合組織 (loose connective tissues) (白膜と比較すると粗である) として観察され、亀頭海綿体 (corpus cavernosum glandis) に接していた (Fig. 5B、white arrowhead)。近位領域は、外生殖器の背側に骨格筋 (Fig. 5D、yellow square)、中央部に陰茎海綿体 (Fig. 5D、black square)、その腹側に尿道 (Fig. 5D、yellow dash line) が存在した。また、尿道の両側に、陰茎背動脈 (arteria dorsalis penis) が観察された (Fig. 5D、black arrowhead)。さらなる観察を行ったところ、亀頭海綿体は血管構造が発達しており (Fig. 5E、yellow sharp)、陰茎は陰茎亀頭を除いて角化した数多くのとげ (spines) を持つ上皮に覆われていた (Fig. 5E、black arrow)。陰茎中央部にある陰茎海綿体は非常に厚い白膜に覆われていた (Fig. 5F、yellow double-headed arrow)。陰茎の腹側には、尿道海綿体に囲まれた重層円柱上皮よりなる尿道が存在した (Fig. 5G)。

Fast-myosin heavy chain に対する抗体を用いた免疫組織化学の結果、スunks外生殖器の背側に fast-myosin heavy chain 陽性の骨格筋が存在することを見出した (Fig. 6A、B)。この骨格筋は、坐骨結節の内側を起点とし、陰茎亀頭の後方の陰茎海綿体に停止することから、坐骨海綿体筋と言える (Fig. 6C-F)。坐骨海綿体筋は、背側と腹側から構成され、坐骨結節の中央部表面から部分的に重なって始まっていた (Fig. 6E、F、green arrowhead and black asterisk)。スunks外生殖器の背側に見出されたこの骨格筋を、起点部 (坐骨結節の内側)、停止部 (陰茎亀頭の後方の陰茎海綿体) およびその存在位置から、背側坐骨海綿体筋 (musculus ischiocavernosus dorsalis) と名付けた。背側坐骨海綿体筋は陰茎海綿体の背側部分に接しており (Fig. 6C、D、black arrowhead)、筋肉の繊維束は間葉の背側部分に位置し (Fig. 6G、black arrowhead)、陰茎海綿体の遠位末端に付着していた (Fig. 6H、yellow arrowhead)。また、坐骨結節に起始をもつもう一つの骨格筋を、腹側坐骨海綿体筋 (musculus ischiocavernosus ventralis) と名付けた (Fig. 6D-F、black asterisk)。

陰茎海綿体は、血管内皮に覆われている相互に連結した海綿体様空間の網構造からなり、平滑筋の束を含む小柱により区分されていた (Fig. 7A、B、black arrow)。さらに、尿道の両側に α -smooth muscle actin 陽性の平滑筋が一对存在することがわかった (Fig. 7C、D、black arrow)。

<考察>

本研究では、食虫目に属する小型実験動物であるスunksを用いて、外生殖器原基の発生過程における分子メカニズムについて検討した。マウス外生殖器原基の発生過程において、*Fgf8* 遺伝子は、外生殖器原基が隆起する直前の胎生 10.5 日から、著しい外生殖器原基の伸長が見られる胎生 14.0 日まで発現している(17)。この *Fgf8* 遺伝子が発現する領域は遠位尿道板上皮 (DUE: distal urethral epithelium) と呼ばれ、DUE を除去すると間葉性因子の発現が低下するとともに、外生殖器原基の伸長は著しく抑えられる(17)。したがって、マウス外生殖器原基の隆起開始過程および伸長過程において、DUE とその周辺の間葉との相互作用が重要であると考えられている。走査電子顕微鏡による胎生 14 日での外観の解析より、スunksの排泄腔膜 (cloacal membrane) は腹側正中線上に外見上ははっきり確認できなかった。一方、マウスの排泄腔膜ははっきりとした溝として確認できる(41)。このような外観上の違いは観察されたが、スunksにおいても腹側正中線上に *Fgf8* 遺伝子の発現領域が認められたことから、この領域は外生殖器原基の隆起点である可能性が高い。また、スunksの外生殖器原基において DUE の構造が確認できた。この DUE の構造は胎生 15 日から確認でき、*Fgf8* 遺伝子の発現がわずかに確認できる胎生 20 日まで観察された。このことから、マウスで報告されているように、スunksにおいても、*Fgf8* 遺伝子が外生殖器の伸長を制御していることが示唆される。

Shh 遺伝子は、マウス外生殖器原基において尿道板上皮に発現しており、尿道形成に関与している(18)。スunks雄性外生殖器原基の遠位側では、マウスと同様に尿道板上皮に *Shh* 遺伝子の発現が観察されたが、近位側ではすでに管状の構造である尿道が形成されていたために、外側より *Shh* 遺伝子の発現は観察されなかった (Fig. 4D、black arrowhead)。マウスの尿道は、胎生 16.5 日において包皮の融合により形成されるが(41、

49)、スunksの尿道形成は包皮の融合には依存しなかった。

このようにマウスとスunksでは、形態形成において異なる点が存在することが明らかになった。しかし、スunks外生殖器原基の発生過程は、その形態の変化を含め、未だ不明な点が多く残されている。今後は、まずスunks外生殖器原基の形態変化についての詳細な解析を行う必要がある。また、どのような因子がスunks外生殖器原基の隆起開始過程、伸長過程および尿道形成過程において機能しているかを調べる必要がある。外生殖器は男性ホルモン依存的に形態形成が起こる器官であることが知られているが(8, 49)、今回はその点について解析することができなかった。しかし、外生殖器の形態形成と男性ホルモンとの関連は切り離すことができず、マウスにおいても外生殖器原基の発生過程における男性ホルモンシグナルの分子作用機序の解明は始まったばかりである。我々は予備的な実験ではあるが、妊娠スunksに抗男性ホルモン剤であるフルタミドを投与することにより、外生殖器原基腹側の形成異常すなわち尿道下裂が誘導されることを見出している（データ未掲載）。このことは、他に報告されている動物と同様に、スunksにおいても尿道形成には男性ホルモンが関与していることを示唆する。また、フルタミド投与の時期による尿道下裂誘導の有無が確認されており、投与時期の詳細な検討を行うことで、スunksの尿道形成に男性ホルモンが必要な時期を特定することも可能となる。

さらに、スunksを用いて、異なる生物種間での雄性外生殖器の形態の相違について検討した。これまで外生殖器の発生過程における分子メカニズムの解析は、主にマウスを用いて行われてきた(17-19, 49)。しかし、マウスの雄性外生殖器をヒトと比べると、その最終形態は大きく異なる(8)。マウスとヒトにおいて、陰茎内に尿道および海綿体構造が存在するという哺乳類共通の構造が観察される一方で、マウスは陰茎内に骨の存在が報告されているが、ヒトの陰茎内に骨は存在しないという種特異的な構造

を有していることも知られている(8)。また、マウスやヒトの陰嚢は、陰茎の下方において体外に存在する。ウサギは、陰嚢が陰茎の上方に存在し、陰茎龟头部を持たず、陰茎表面にとげ(spines)が存在せず、陰茎の先端は花びらのつぼみのようにねじれて折り重なっている(データ未掲載)など、外生殖器を含む外陰部は種特異的な形態を呈している。したがって、哺乳類の成獣における雄性外生殖器の外部および内部形態の共通性と多様性がどのようにして形成されるのかを理解するためには、本研究で行ったように系統学的に離れた位置に存在する動物種を用いた解析が必要であると考えらる。

スunksは、食虫目の中で唯一実験動物化が成功した小型哺乳類であり(35, 36)、げっ歯目に属するマウスやラットとは異なる特有の性質を有している。その特有な性質から、これまで、嘔吐研究(51)、消化管運動研究(57, 58)、歯胚形成研究(59-62)において、ヒトのモデル動物として利用されてきた。このように、実験動物化されたことにより、スunksを用いたさまざまな研究報告がなされている。しかし、繁殖に必須な器官である外生殖器についての詳細な解析はほとんどなく、スunksの生殖システムと雄性外生殖器の外見上の形態に関して報告されているのみであった(56, 63)。これらの報告の中で、スunksの雄性外生殖器がどのような構造により構成されているのか、内部構造については記載されていない。さらに、スunks外生殖器の発生過程における形態形成についてはまったく報告がないのが現状である。そこで、スunks外生殖器がどのように構成されているのかを解析し、哺乳類の外生殖器の形態および発生過程の分子メカニズムに対する新たな知見を得るため、解剖学的、組織学的な解析および形態形成期における遺伝子発現の解析を行った(54, 55)。

その結果、スunks雄性外生殖器の背側に骨格筋の存在を見出した(54, 55)。このように外生殖器の背側に骨格筋が存在することは他の動物種では報告されておらず、今回の研究が初めての報告である。解剖学的な解析より、この骨格筋は坐骨結節の内側

に起始を持ち、陰茎亀頭の後方の陰茎海綿体に停止することが明らかになった。そこで、スunks外生殖器背側の骨格筋を「背側坐骨海綿体筋」と命名した。この背側坐骨海綿体筋は、交尾時まで雄性外生殖器を折りたたんで格納するのに働いていると思われる。この背側坐骨海綿体筋は、雄ではスunksの系統に依存せずに発達しているが、雌では系統によりほとんど観察されないか、あるいは発生が非常に乏しいことが明らかになった（データ不掲載）。この背側坐骨海綿体筋の形成で見られる性差は、外生殖器に存在する骨格筋が男性ホルモン依存的に形成されることを示唆している。さらに、もう一つ坐骨結節に起始を持ち、腹側より坐骨海綿体を取り巻く骨格筋が存在しており、こちらは「腹側坐骨海綿体筋」と命名した。これらの骨格筋は陰部神経支配である(64)。陰茎脚に付着する坐骨海綿体筋（スunksではおそらく腹側坐骨海綿体筋に相当する）は、ヒト、イヌ、ラットにおいてよく特徴づけられており、勃起と射精に関連していることが報告されている(65)。

陰茎後引筋（retractor penis muscle）の存在は、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ハイエナ、ラットなど多くの動物種において報告されている(66)。これらの動物で報告されている陰茎後引筋は、ラットでは陰嚢に広がっており、他の動物種では陰茎内部に位置しているが、すべて平滑筋性であることが報告されている。また、ヒトやマウスでは陰茎後引筋の存在は報告されていない。他の動物と比較すると、スunksにおいて、尿道両側に存在する α -smooth muscle actin 陽性の平滑筋が陰茎後引筋であると考えられる。

さらに、陰茎にとげを持つ動物が数多く報告されており(67, 68)、中でもスunksとネコで、このとげは交尾時における排卵誘発の刺激を与えることが示唆されている(63, 69, 70)。しかし、性周期にともない自然排卵するマウスやラットにおいても、陰茎にとげを持つことが報告されており(68)、異なる動物種においてこのとげは様々な役割を果たしていると推測される。ラットにおいてとげは、交配時における前者の雄の膣栓（plug）除去の役目を担うと考えられている(71)。また、このとげは男性ホルモン依存

的に発生することが知られている(69, 72)。ある種の霊長目において男性ホルモンの機能を阻害し、とげの低形成を引き起こすと陰茎の挿入時間が長くなるという結果が得られており(73)、とげは感覚フィードバックにおいて重要な役割を果たしていることが推測されている。

陰茎海綿体を覆う厚い白膜の存在は、交配に必要な陰茎の剛性に寄与すると考えられる。げっ歯目において、マウスは雌雄ともに、ラットは雄のみが、陰茎骨を持つことが報告されている(68, 74)。この陰茎骨の役割は、交配時に勃起する構造を強化するために必要であり、陰茎骨の形態変化は *Hoxa13* 遺伝子や *Hoxd13* 遺伝子欠損マウスにおいて不妊と関係することが知られている(75, 76)。しかし、スunksやヒトの外生殖器に陰茎骨は存在しない。スunksやヒトは、外生殖器を構成する成分の中で陰茎海綿体が厚い白膜で覆われ、白膜の構造が顕著であることから、陰茎海綿体が陰茎骨と同等の機能を持つことが推測される。また、陰茎骨の存在の有無から、外生殖器原基の間葉の分化が異なっていることが示唆される。これらの知見から、動物種により外生殖器の発生過程における間葉での分子メカニズムが異なっている可能性が推定され、将来の問題として残されている。

本研究の結果から、スunksの陰茎亀頭は、多くの哺乳類の外生殖器で報告されているように、尿道海綿体とつながっていることが明らかになった。陰茎亀頭は亀頭海綿体により囲まれており、厚い白膜で覆われていなかった。厚い白膜で覆われていないことは、陰茎亀頭の拡張につながり、外生殖器を雌の膣内に保持するための助けとなると考えられる。すでにハイエナで報告されているように(77)、スunksにおいても陰茎亀頭は、交配時の子宮内における固定機構 (locking system) として機能しているのではないかと推測される。さらに射精を促すための刺激が必要であり、陰茎亀頭は刺激を感知する感覚神経が集中しているのではないかと予想している。

【第二章】

男性ホルモン依存的ステージでの外生殖器形成メカニズムの解明

- *Mamld1* 遺伝子欠損マウスの表現型解析 -

<諸言>

胎生期における尿道形成には男性ホルモン（主にテストステロン）が関与することが知られている(8, 49)。したがって、男性ホルモン産生量および分泌量の減少は尿道下裂を含む男性外生殖器異常を引き起こすと考えられている(42)。

従来、X 染色体長腕遠位部にある筋疾患ミオチューブラーミオパチー（MTM: myotubular myopathy）責任遺伝子であるミオチューブラリン 1（*MTM1*: *MYOTUBULARIN 1*）遺伝子の近傍には、男性外生殖器異常発症責任遺伝子が想定されていた(43)。これは、*MTM1* 遺伝子内変異陽性患者が正常外生殖器を有し、*MTM1* 遺伝子を包含する微小欠失を有する 6 例の男性患者が尿道下裂を主体とする外生殖器異常を有することに基づいている(43)。さらに、生殖器異常をともなう MTM 患者 6 例の共通欠失領域から、新規遺伝子 *Mastermind-like domain containing 1*（*MAMLD1*、別名 *CXORF6*）が単離された。*MAMLD1* 遺伝子はヒトの染色体 Xq28 に存在し、尿道下裂を伴う 46,XY 性分化疾患責任遺伝子として発見され(44)、現在までにナンセンス変異を含む複数の機能喪失変異が同定されている(44, 78, 79)。

これまでの解析から、*MAMLD1* 翻訳領域の上流にはステロイドホルモン合成経路に関わる遺伝子群の発現を調節する *NR5A1*（別名 *SF-1*、*AD4BP*）の結合配列が存在しており(45)、*NR5A1* タンパク質がこの配列に結合してレポーター遺伝子を活性化することが見出されている(46)。また、マウス相同遺伝子（*Mamld1*）は、胎生期のマウス精巣における男性ホルモン産生に関与し、*NR5A1* の局在が認められるセルトリ細胞とライディッヒ細胞に発現している(44)。さらに、培養細胞を用いたノックダウン実験による解析から、*Mamld1* 遺伝子の発現低下は男性ホルモン産生細胞におけるテストステロン産生量の減少とホルモン産生関連酵素である *Cyp17a1* 遺伝子の発現量低下を招くことが報告されている(46, 47)。これらのことから、*MAMLD1/Mamld1* は *NR5A1/Nr5a1* の

調節下において、ステロイドホルモン合成酵素である *CYP17A1/Cyp17a1* 遺伝子の発現調節を介してテストステロン産生に関与し、*MAMLD1* 変異はテストステロン産生障害に起因する 46,XY 性分化疾患を引き起こすと推測されている。しかしながら、*MAMLD1* 変異が尿道下裂を招く機序は不明のままであり、症例からは *MAMLD1* の生体内における機能を突き止めることができない。そこで本研究では、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスを独自に作製し(80)、胎生期精巣のステロイドホルモン産生における *Mamld1* の役割について解析を行った。

＜材料と方法＞

本研究で行った全ての動物実験は、(独) 国立成育医療研究センター、実験動物委員会における動物実験に関する指針に準拠して実施し、事前の承認に基づいて（承認番号 A2008-001-C01）、動物に対しての苦痛を最小限に留めるように配慮された条件の下で行われた。

***Maml1* 遺伝子欠損マウスの作製**

Maml1 遺伝子欠損マウスは、標準的な遺伝子ターゲティングの手順に従い(81)、マクロジェン（ソウル、韓国）にて作製された(80)。*Maml1* の翻訳開始点を含み、翻訳領域の 3 分の 2 に領域に相当するエキソン 3 をネオマイシン（neo）耐性遺伝子に置き換えた。*Maml1* 遺伝子欠損マウスは遺伝的背景の C57BL6/N 系統への近交化を進め、解析には 9 世代目を使用した。また、マウス尾部よりゲノム DNA を抽出し、PCR により遺伝子型決定を行い、*Maml1* 遺伝子欠損マウスが産まれたことを確認した。PCR は KOD Dash（TOYOBO）を用いて、反応条件として DNA の単鎖化（94℃、5 分）を行った後、DNA の単鎖化（94℃、15 秒）、プライマーのアニーリングと伸張反応（67℃、15 秒）を 35 サイクル行った。PCR 反応に用いたプライマーはつぎのとおりである。

Maml1 For: 5'-TTT GCA ACT CCA GCA TCA TC-3' (20 mer)

Maml1 Rev: 5'-CCT AAC TCC TTC CCC TGG AC-3' (20 mer)

PGK-neo For: 5'-TGC TCC TGC CGA GAA AGT AT-3' (20 mer)

PGK-neo Rev: 5'-AAT ATC ACG GGT AGC CAA CG-3' (20 mer)

動物の飼育と交配

野生型および *Maml1* 遺伝子欠損マウスは、12 時間ごとの明暗周期、23℃の室温条件において飼育し、餌は日本クレアより購入した CE-2 を用いた。また、交配には 8

週齢以上の雌雄個体を用いた。

器官およびマウス胚の採取

雌雄を交配させ、プラグ（膣栓）が確認された日の正午を胎生 0.5 日とした。通常、野生型のマウスでは、胎生 19.0 日が分娩予定日となる。実験には胎生 12.5 日以降のマウス胚を用いた。マウス尾部よりゲノム DNA を抽出し、PCR により雌雄を判別した。PCR は KOD Dash (TOYOBO) を用いて、反応条件として DNA の単鎖化 (94℃、5 分) を行った後、DNA の単鎖化 (94℃、15 秒)、プライマーのアニーリングと伸張反応 (67℃、15 秒) を 35 サイクル行った。PCR 反応に用いたプライマーはつぎのとおりである。

Sry For: 5'-ATG GAG GGC CAT GTC AAG-3' (18 mer)

Sry Rev: 5'-GCC CAG TGG GGA TAT CAA-3' (18 mer)

各発生段階のマウス胚を素早く摘出した。摘出後、PBS にて洗浄を行い、解剖学的解析用、組織学的解析用、免疫組織化学用、リアルタイム RT-PCR 用、ウェスタンブロット用、ステロイド代謝産物含有量の測定用および *in situ* hybridization 用に適したそれぞれの処理を行った。

器官およびマウス胚の処理

解剖学的解析用の器官は、PBS による洗浄後、未固定条件下で作業を行った。組織学的解析用と免疫組織化学用の器官およびマウス胚は、PBS による洗浄後、4%パラホルムアルデヒド/PBS にて一晩固定し、メタノールにて段階的に脱水した。脱水処理を行った後、半自動オープン式ティッシュプロセッサ（ライカ、TP1020）により、エタノール（室温、2 時間、3 回）、キシレン（室温、2 時間、3 回）、パラフィン（60℃、3 時間、2 回）へと液交換を行い、組織をパラフィン包埋装置（ライカ、EG1160）にてパラフィン（サクラファインテックジャパン）に包埋した。包埋した組織を 6 μm の

切片にし、APS（アミノシラン）コートスライドガラス（松浪硝子工業）に貼付して組織切片を作製した。リアルタイム RT-PCR 用のマウス胚は、PBS による洗浄後、素早く RNAlater（Ambion）に入れ、浸透処理（4℃、一晚）を行った。その後、実験に使用するまで-20℃で保存した。ウェスタンブロット用の胎仔精巣は、PBS による洗浄後、素早くサンプルバッファー（0.1 M Tris-HCl、4% SDS、20% Glycerol、0.01% Bromophenol blue）に入れ、ビーズによる破碎処理（3,800 rpm、4℃、30 秒、2 回）を行った。その後、熱処理（96℃、10 分）、氷中にて急冷、遠心分離により得られた上清を分注し、実験に使用するまで-80℃で保存した。ステロイド代謝産物含有量の測定用の胎仔精巣は、PBS による洗浄後、液体窒素により素早く凍結し、測定するまで-80℃で保存した。*In situ* hybridization 用のマウス胚は、PBS による洗浄後、4%パラホルムアルデヒド/PBS にて一晚固定し、メタノールにて段階的に脱水処理を行った。

解剖学的解析

実体顕微鏡（ライカ、M205 C）で観察した後、デジタルカメラ（ライカ、DFC290）にて画像を撮影した。

組織学的解析

組織切片は、パラフィン除去と加水処理を行った後、ヘマトキシリン・エオシン（H&E）染色を行った H&E 染色は、ヘマトキシリンで細胞核を青藍色に染色、エオシンで細胞質をピンク色に対比染色することにより、顕微鏡による組織像の撮影を可能にした。染色後の切片は、疎水化処理を行った後、疎水性封入剤（オイキット液）で封入して、正立顕微鏡（ライカ、DM2500）で観察した後、デジタルカメラ（ライカ、DFC290）にて画像を撮影した。

免疫組織化学

組織切片を用いて、つぎに示すような酵素抗体法にてタンパク質の局在を解析した。

生殖細胞の検出：組織切片をパラフィン除去と加水処理、抗原賦活化処理（L.A.B. Solution、Polysciences, Inc.、室温、15 分）を行い、内因性ペルオキシダーゼの失活処理（0.3% H_2O_2 /PBS、室温、30 分）を行った後、2% Blocking 溶液（1096176、Roche）にてブロッキング処理（室温、60 分）を行った。その後、Rabbit polyclonal anti-DDX4 抗体（ab13840、Abcam、希釈倍率 1/200）を用いて一次抗体反応（室温、120 分）を行った。PBS による洗浄後、Goat anti-rabbit IgG-HRP 抗体（sc-2004、Santa Cruz、希釈倍率 1/800）を用いて二次抗体反応（室温、60 分）を行った。

セルトリ細胞の検出：組織切片をパラフィン除去と加水処理、抗原賦活化処理（L.A.B. Solution、Polysciences, Inc.、室温、15 分）を行い、内因性ペルオキシダーゼの失活処理（0.3% H_2O_2 /PBS、室温、30 分）を行った後、2% Blocking 溶液（1096176、Roche）にてブロッキング処理（室温、60 分）を行った。その後、Goat polyclonal anti-AMH 抗体（sc-6886、Santa Cruz、希釈倍率 1/50）を用いて一次抗体反応（室温、120 分）を行った。PBS による洗浄後、Donkey anti-goat IgG-HRP 抗体（sc-2020、Santa Cruz、希釈倍率 1/100）を用いて二次抗体反応（室温、60 分）を行った。

ライディッヒ細胞の検出：組織切片をパラフィン除去と加水処理を行った。その後の抗原賦活化処理は行わなかった。内因性ペルオキシダーゼの失活処理（0.3% H_2O_2 /PBS、室温、30 分）を行った後、2% Blocking 溶液（1096176、Roche）にてブロッキング処理（室温、60 分）を行った。その後、Rabbit polyclonal anti-HSD3B 抗体 ((82)、希釈倍率 1/2,000) を用いて一次抗体反応（室温、120 分）を行った。PBS による洗浄後、Goat anti-rabbit IgG-HRP 抗体（sc-2004、Santa Cruz、希釈倍率 1/800）を用いて二次抗体反応（室温、60 分）を行った。PBS による洗浄後、DAB を基質液とし、酵素反応にてシグナルの検出（室温、15 分以内）を行った。

シグナル検出後の切片はメチルグリーンでカウンター染色を行った。染色後の切片は、疎水化処理を行った後、疎水性封入剤（オイキット液）で封入して、正立顕微鏡（ライカ、DM2500）で観察した後、デジタルカメラ（ライカ、DFC290）にて画像を撮影した。

リアルタイム RT-PCR

RNAlater 処理を行った後、-20℃で保存していた各発生段階のマウス胚から胎仔精巢を取り出し、ISOGEN（ニッポンジーン）を用いて total RNA を抽出した。各発生段階について、3 個体分の精巢を 1 本のチューブにまとめたものをそれぞれ 5 本ずつ用意した。抽出した total RNA を High Capacity cDNA Reverse Transcription kit（Life Technologies）にて逆転写反応（37℃、120 分）を行うことにより cDNA を得た。リアルタイム PCR 反応は、TaqMan Gene Expression Master Mix（Life Technologies）を用い、ABI 7500 Fast real-time PCR system（Life Technologies）にて行った。内在性コントロールとして *Gapdh* 遺伝子の発現を検出した。用いたプローブとプライマー（TaqMan Gene Expression Assay、Life Technologies）はつぎのとおりである。

Gene name	Assay ID	Expression-positive cells in the fetal testis
<i>Maml1</i>	Mm01293665_m1	Sertoli cells and Leydig cells
<i>Amh</i>	Mm03023963_m1	Sertoli cells
<i>Ar</i>	Mm00442688_m1	Germ cells, Leydig cells, and peritubular cells
<i>Arx</i>	Mm00545903_m1	Interstitial cells excluding Leydig cells
<i>Cyp11a1</i>	Mm00490735_m1	Leydig cells
<i>Cyp17a1</i>	Mm00484040_m1	Leydig cells
<i>Ddx4</i>	Mm00802445_m1	Germ cells

<i>Dhh</i>	Mm01310203_m1	Sertoli cells
<i>Dlx5</i>	Mm01161781_m1	Leydig cells
<i>Dlx6</i>	Mm01166201_m1	Leydig cells
<i>Gata4</i>	Mm00484689_m1	Sertoli cells and Leydig cells
<i>Hsd17b3</i>	Mm00515131_m1	Sertoli cells (seminiferous tubules)
<i>Hsd3b1</i>	Mm01261921_mH	Leydig cells
<i>Insl3</i>	Mm01340353_m1	Leydig cells
<i>Nr5a1</i>	Mm00446826_m1	Sertoli cells and Leydig cells
<i>Ptch1</i>	Mm01306905_m1	Interstitial cells including Leydig cells
<i>Sox9</i>	Mm00448840_m1	Sertoli cells
<i>Star</i>	Mm00441558_m1	Leydig cells
<i>Gapdh</i>	4352339E	Ubiquitous

データ解析は、胎生 14.5 日 (*Maml1* 遺伝子の場合のみ胎生 12.5 日) の野生型マウス精巣における各目的遺伝子の mRNA 発現量を基準 (Fold Change = 1) とし、相対的な発現量を算出した。

ウエスタンブロット

サンプルバッファーに溶解して得られたマウス胎仔精巣の全タンパク質を 12% SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜 (Bio-Rad) に転写 (1.3 A、7 分) した。転写後の PVDF 膜を 0.1% スキムミルク/TBST (20 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、0.1% Tween-20) 溶液にてブロッキング処理 (室温、60 分) を行った。TBST による洗浄後、一次抗体反応 (室温、120 分) を行った。TBST による洗浄後、二次抗体反応 (室温、60 分) を行った。TBST による洗浄後、ECL Plus Western Blot Detection kit (GE Healthcare) と

Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) によりシグナルの検出を行った。
内在性コントロールとして ACTIN を検出した。使用した抗体はつぎのとおりである。
Rabbit polyclonal anti-MAMLD1 抗体 ((80)、希釈倍率 1/1,000)
Rabbit polyclonal anti-HSD3B 抗体 ((82)、希釈倍率 1/10,000)
Rabbit polyclonal anti-ACTIN 抗体 (A2066、Sigma、希釈倍率 1/2,000)
Goat polyclonal anti- CYP17A1 抗体 (sc-46081、Santa Cruz、希釈倍率 1/2,000)
Goat anti-rabbit IgG-HRP 抗体 (sc-2004、Santa Cruz、希釈倍率 1/2,000)
Donkey anti-goat IgG-HRP 抗体 (sc-2020、Santa Cruz、希釈倍率 1/2,000)

胎仔精巣内のステロイド代謝産物含有量の測定

-80℃で保存した胎仔精巣（胎生 18.5 日）を用いて、テストステロンおよび他のステロイド代謝産物の含有量を、LC-MS/MS 測定法（あすか製薬メディカル）にて測定した。

ジゴキシゲニン標識リボプローブの作製

マウス *Shh* cDNA クローンに相当する I.M.A.G.E.クローン (IMAGE:6516263、Invitrogen) を購入した。pCMV-SPORT6.1 vector に組み込まれているプラスミドを Pst I (TOYOBO) にて制限酵素処理を行い、*Shh* cDNA 断片を得た。制限酵素処理により得られた cDNA 断片 (*mShh* 1362 bp) を pBluescript II SK(-) vector (Stratagene) に組み込むための結合反応を行い、反応終了後の DNA 溶液を大腸菌のコンピテント細胞 JM109 株に導入した後、アンピシリンを含む寒天培地上で培養して目的断片を含むプラスミドを選択した。目的のプラスミドを含む大腸菌を液体培地で培養した後、得られたプラスミドは *Hind* III (TOYOBO) で制限酵素処理して鎖状にした。これを鋳型としてジゴキシゲニン (DIG) 標識を行うために、DIG RNA Labeling Mix (1277073、Roche)

を用いて、T7 あるいは T3 ポリメラーゼにより *in vitro* 転写を行い、*mShh* に対する DIG 標識 cRNA プローブを作製した。

ホルマウント *in situ* hybridization

ホルマウント *in situ* hybridization は、Wilkinson により確立された方法に従い行った(53)。メタノール中に保存していたマウス胚を、メタノール/PBT 液シリーズにて再水和を行い、過酸化水素処理 (6% H_2O_2 /PBT、室温、60 分) を行った。PBT による洗浄後、プロテナーゼ K 処理 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K/PBT、室温、60 分) を行い、グリシン/PBT 液でプロテナーゼ K の反応を停止した。PBT による洗浄後、再固定処理 (0.2% グルタルアルデヒド/4% パラホルムアルデヒド、室温、20 分) を行った。PBT による洗浄後、ハイブリダイゼーションバッファー (50% formamide、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Yeast RNA、5xSSC、1% SDS、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ heparin) 中にてプレハイブリダイズ (70°C、60 分) した。その後、DIG 標識した cRNA プローブ (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の入ったハイブリダイゼーションバッファー中にてハイブリダイズ (70°C、一晚) を行った。ハイブリダイズを行った後、Solution 1 (50% formamide、5xSSC、1% SDS) にて洗浄 (70°C、20 分、3 回)、Solution 1 と Solution 2 (0.5 M NaCl、10 mM Tris-HCl、0.1% Tween-20) との 1:1 の混合液にて洗浄 (70°C、10 分)、Solution 2 にて洗浄 (室温、10 分) を行った。その後、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A/ Solution 2 処理 (37°C、30 分) を行い、Solution 2 にて洗浄 (室温、10 分)、Solution 3 (50% formamide、2xSSC) にて洗浄 (室温、10 分)、Solution 3 にて洗浄 (37°C、30 分、2 回) を行った。続いて、TBST (0.1 M NaCl、0.2 M CaCl_2 、25 mM Tris-HCl、0.1% Tween-20) にて洗浄 (室温、10 分、3 回) し、10% FBS/TBST でブロッキング処理 (4°C、60 分) を行った。マウスエンブリオパウダーにより非特異吸着処理済みのアルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗 DIG 抗体 (1093274、Roche) を 1% FBS/TBST で約 2,500 倍に希釈して抗体反応 (4°C、一晚) を行った。翌日、TBST にて洗浄 (室温、5 時間、

10 回近く液交換を行う)、NTMT (0.1 M NaCl、0.2 M MgCl₂、20 mM Tris-HCl、0.2% Tween-20) にて洗浄 (室温、10 分、3 回) を行い、BM パープルアルカリフォスファターゼ基質液 (1442074、Roche) を加え、遮光状態にて発色反応を行った。シグナルを検出後、順次 PBT で洗浄を行い、発色反応を停止した。実体顕微鏡 (ライカ、M205 C) で観察した後、デジタルカメラ (ライカ、DFC290) にて画像を撮影した。

統計学的解析

データは平均値±標準誤差で表した。データの統計的処理は、Student の t 検定および ANOVA を行い、 $P<0.05$ の場合を統計的有意とした。

<結果>

1. *Maml1* 遺伝子のマウス胎仔精巣における発現解析

マウス胎仔精巣における *Maml1* 遺伝子の発現の有無を調べるために、リアルタイム RT-PCR 法を用いた発現解析を行った。性腺の精巣への分化が明らかになる胎生 12.5 日から、出生前日の胎生 18.5 日までのマウス胎仔精巣から抽出した total RNA を用いた。*Maml1* 遺伝子は、胎生中期（胎生 12.5 日）から胎生後期（胎生 18.5 日）のマウス胎仔精巣で発現していた（Fig. 8）。さらに、その発現量は経時的に増加していることが明らかになった。また、この発現量増加には有意差が認められた。

2. *Maml1* 遺伝子欠損雄マウスの作製

常法に従って、*Maml1* の翻訳開始点を含むエキソン 3 の領域をネオマイシン耐性遺伝子で置えた *Maml1* 遺伝子欠損マウスを作製した（Fig. 9A）。まず、遺伝子組み換えのためのベクターを作製するため、二つの遺伝子断片を PCR 法により増幅し、PGK プロモーターで発現が制御されるネオマイシン耐性遺伝子の両側に挿入した。マウスの胚盤胞由来の胚性幹細胞（以下、マウス ES 細胞）に *Maml1* ターゲティングベクターを電気穿孔法にて遺伝子導入した。相同組換えを起こしたマウス ES 細胞をサザンブロット法により選別し、マウスの胚盤胞に注入した。結果として、50%以上のキメラ率をもったキメラマウスが産まれたため、野生型マウスとの交配により、*Maml1* 変異アリルが次世代に伝わることを確認した。雌雄間での交配を行い、*Maml1* 遺伝子欠損マウスを作製した。この *Maml1* 遺伝子欠損雄マウスの精巣において、*Maml1* 遺伝子の mRNA および MAML1 タンパク質が検出されないことを確認した（Fig. 9B）。出生当日の *Maml1* 遺伝子欠損雄マウスは、外見上、異常は認められなかった。また、*Maml1* 遺伝子欠損雄マウスの体重は、野生型マウスと比べて違いがなかった（Table 1）。

3. *Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣における遺伝子発現およびタンパク質発現

胎仔精巣における遺伝子発現解析の結果、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣において、ライディッシュ細胞特異的に発現する遺伝子の mRNA 発現量が有意に低下していた (Fig. 10A)。詳しくみると、胎生 14.5 日、胎生 16.5 日、胎生 18.5 日では、*Cyp17a1* 遺伝子、*Hsd3b1* 遺伝子、*Insl3* 遺伝子の mRNA 発現量が低下しており、胎生 14.5 日、胎生 16.5 日では、*Star* 遺伝子、*Cyp11a1* 遺伝子の mRNA 発現量が低下していた。*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣におけるそれぞれの遺伝子の mRNA 発現量は、野生型マウスと比べて 65-80%であった。一方、解析した残りの遺伝子の mRNA 発現量は、胎生 14.5 日の *Hsd17b3* 遺伝子と *Amh* 遺伝子を除いて、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの胎仔精巣で違いがなかった。しかしながら、CYP17A1 および HSD3B タンパク質レベルは、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの胎仔精巣で違いがなく、胎生 16.5 日と胎生 18.5 日では胎生 14.5 日に比べて高かった (Fig. 10B)。

4. *Mamld1* 遺伝子欠損マウスの外生殖器の解析

胎生期および出生当日において、*Mamld1* 遺伝子欠損雄マウスの外生殖器の形態を観察したところ、外部形態は野生型マウスと区別できず、正常であることがわかった (Fig. 11、Table 1)。胎生 14.5 日では、野生型マウスと同様に、*Mamld1* 遺伝子欠損雄マウスの尿道上皮において *Shh* 遺伝子の発現が検出された (Fig. 11A、B)。胎生 16.5 日では、*Mamld1* 遺伝子欠損雄マウスの外生殖器原基の形態は、野生型マウスと同様の発生段階を呈しており、外生殖器原基の伸長および腹側正中で起こる尿道ヒダの融合は野生型と同様に、*Mamld1* 遺伝子欠損雄マウスにおいて正常に起きていることがわかった (Fig. 11C-F)。さらに、出生当日では、*Mamld1* 遺伝子欠損雄マウスの肛門性器間距離 (AGD : anogenital distance) および AGI (AGD index : 肛門性器間距離を体重で割った値) は、

野生型マウスと比べて違いがないことが明らかになった (Fig. 12A、B、Table 1)。また、出生当日での外生殖器の組織学的な解析により、野生型マウスと同様に、*Maml1* 遺伝子欠損雄マウスの外生殖器は正常な包皮の融合が起きていることが観察された (Fig. 12C-F)。

5. *Maml1* 遺伝子欠損マウスの内生殖器の解析

実体顕微鏡による観察の結果、胎生期および出生当日において、*Maml1* 遺伝子欠損雄マウスの内生殖器の形態は正常であることがわかった (Fig. 13、Table 1)。胎生 16.5 日では、正常な腹腔内の精巣下降とウォルフ管の発達およびミュラー管の退縮が観察された (Fig. 13A、B)。さらに、胎生 14.5 日および出生当日での組織学的な解析からも、*Maml1* 遺伝子欠損マウスと野生型マウス間での胎仔精巣には違いが認められなかった (Fig. 13C-F)。

免疫組織化学による解析の結果、胎生 14.5 日での *Maml1* 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの胎仔精巣において、セルトリ細胞 (AMH 陽性細胞)、ライディッヒ細胞 (HSD3B 陽性細胞)、生殖細胞 (DDX4 陽性細胞) の数には差が見られなかった (Fig. 14A-F)。また、出生当日の *Maml1* 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの精巣におけるライディッヒ細胞 (HSD3B 陽性細胞) の数には差が見られなかった (Fig. 14G、H)。さらに、出生当日の精巣重量および胎仔精巣内のテストステロン含有量とその他のステロイド代謝産物含有量は、*Maml1* 遺伝子欠損マウスと野生型マウスで違いはなかった (Table 1)。

6. 交配実験

交配実験を行うことにより、*Maml1* 遺伝子欠損雄マウスの生殖能力を解析した。通常、常染色体上にある遺伝子の欠損マウスは、ヘテロ同士の組み合わせにより、全て

の遺伝子型の仔を得ることが可能である。しかし、*Maml1* 遺伝子は X 染色体上に存在するため、一度の交配では全ての遺伝子型の仔を得ることはできない。また、得られる仔について、雄の遺伝子型は+/Y が野生型、-/Y がヘミ欠損型（通常ホモ欠損型に相当）である。雌の遺伝子型は、常染色体の遺伝子が欠損した場合と同じであり、+/+が野生型、+/-がヘテロ欠損型、-/-がホモ欠損型である。そこで、本実験では、野生型と *Maml1* 遺伝子ヘテロ欠損の雌マウス、野生型と *Maml1* 遺伝子ヘミ欠損の雄マウスをそれぞれ組み合わせて交配を行った。雌がヘテロ欠損型の場合、雄の遺伝子型に関係なく、得られた産仔は、それぞれの遺伝子型が 25%前後となり、正常なメンデル比を示した (Table 2)。さらに、野生型あるいは *Maml1* 遺伝子ヘミ欠損の雄マウスを野生型の雌マウスと交配させた結果から、平均産仔数に違いは認められないことが明らかになった (データ不掲載)。

<考察>

本研究では、男性ホルモン依存的ステージにおける *MAMLD1* 変異が尿道下裂を招く機序を明らかにするために、マウス相同遺伝子 (*Mamld1*) 欠損マウスを用いた解析から、胎生期精巣の男性ホルモン産生における *Mamld1* の役割について検討した。

マウス胎仔精巣における男性ホルモンの生合成は、胎生 13.5 日から行われており、胎生 14.5 日からその合成量が増加することが知られている(83, 84)。マウス胎仔精巣における *Mamld1* 遺伝子の mRNA 発現量の変化を調べた結果、*Mamld1* 遺伝子の発現上昇が認められること、さらにこの発現量の上昇は男性ホルモンの合成量の増加と時間的な一致が認められることが明らかになった(80)。これまでの報告から、*Mamld1* 遺伝子は外生殖器原基では発現が認められず(85)、男性ホルモンを合成している胎生 14.5 日のマウス胎仔精巣において、男性ホルモンの産生に関与する細胞（セルトリとライディッヒ細胞）で発現していること(44)、さらにヒト胎児精巣においても *MAMLD1* 遺伝子は発現していることが明らかになっている(44, 86)。これまでの結果と今回得られた結果を総合して考えると、*MAMLD1/Mamld1* は男性ホルモン産生へ関与していることが強く示唆される。

また、本研究から、野生型マウスの胎仔精巣と比べて、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣において、ライディッヒ細胞特異的に発現する遺伝子 (*Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1* と *Ins13*) の mRNA 発現量が有意に低下していることが明らかになった(80)。一方、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣において、ライディッヒ細胞以外の他の細胞（生殖細胞、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞を除く間質細胞、管周細胞）に発現する遺伝子、あるいはライディッヒ細胞と他の細胞の両方に発現する遺伝子については、野生型胎仔精巣と比べてそれらの遺伝子の mRNA 発現量に違いが認められなかった(80)。*Hsd17b3* 遺伝子は、成獣マウスの精巣においてライディッヒ細胞に発現するが、

マウス胎仔精巣においてはセルトリ細胞に発現することが知られている(87, 88)。つぎに、男性ホルモン産生酵素の遺伝子に着目し、*Mamld1* 遺伝子が欠損することによる遺伝子発現の制御が転写レベルだけであるのか、翻訳レベルにまで影響があるのかを検討するために、胎仔精巣におけるタンパク質の定量解析を行った。今回は、*CYP17A1* と *HSD3B* について解析を行った。その結果として、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣における *CYP17A1*、*HSD3B* のタンパク質の発現量は、野生型マウスと比べて違いが認められなかった(80)。このことから、*Mamld1* は、胎仔精巣のライディッヒ細胞特異的に発現する遺伝子の転写レベルでの発現制御には関与しているが、翻訳レベルまでは影響を与えないことが示唆される。転写レベルと翻訳レベルにおける差異については、後で考察する。

続いて、外生殖器の形態について検討したところ、*MAMLD1* 変異陽性男性が尿道下裂を示すヒトと異なり(44, 85)、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスでは尿道下裂を示さないことが明らかになった(80)。また、精巣の形態について、組織学的解析および免疫組織化学解析を行った結果、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの精巣は野生型マウスと比べて明らかな違いが認められなかった(80)。さらに、*Mamld1* 遺伝子欠損雄マウスが正常な妊孕性をもつことも明らかになった(80)。これらの結果から、*Mamld1* 遺伝子の欠損は、マウス胎仔ライディッヒ細胞特異的に発現する遺伝子について mRNA 発現レベルに影響を与えるが、生殖器と生殖機能には影響を与えずに、正常に発生させることが示唆される。

この概念を支持するようなタンパク質の発現レベルおよび表現型の結果と mRNA 発現レベルとの間における不一致については、これまでにいくつかの報告がある(89-91)。転写レベルでの発現量の変化とタンパク質レベルでの発現および存在量について解析が行われており、様々な可能性が検討されている。また、精巣、肝臓、脳ではほとんどすべての転写産物が検出されるものの、タンパク質として発現・存在するのはそ

の一部であり、転写レベルと翻訳レベルは別々の制御を受けることが報告されている(92, 93)。さらに、タンパク質の発現量の変化には転写レベルでの調節の他に、タンパク質分解系によるタンパク質の存在量の調節系が深く関わっており、転写産物の量が増減するステージと、タンパク質の蓄積量が増減するステージには時間的にずれがあることが報告されている(94)。そのため、*Maml1*においても、タンパク質分解系による分解を受けにくいこと、あるいはタンパク質の存在量が増減するステージは転写レベルでの変化が認められるステージよりも遅れていることが推測される。以上のことも含め、mRNA 発現レベルとタンパク質の発現レベルとの相関が乏しい理由について、現在では三つの可能性が提案されている(95)。第一に、まだ十分明確に定義されていない mRNA からタンパク質への翻訳に関する多くの複雑で様々な転写後のメカニズムが存在する可能性である。第二に、生体内における mRNA とタンパク質の半減期が本質的に違っている可能性である。第三に、リアルタイム RT-PCR に用いた内在性コントロール遺伝子よりも、最適な内在性コントロール遺伝子候補が他に存在するかもしれない、また、タンパク質の発現レベルの変動の幅が少ない場合、ウェスタンブロッティングでは定量の評価は難しいという実験手法に限界があるという可能性である。

これらの説明は、*Cyp17a1* mRNA、*Hsd3b1* mRNA 発現量が有意に減少しているにもかかわらず、CYP17A1、HSD3B のタンパク質が正常な発現量を示すという我々の結果にも該当するであろう。さらに、*Maml1* 遺伝子欠損および野生型マウスにおいて、CYP17A1、HSD3B のタンパク質レベルは、既報の精巣内テストステロン量の増加と同様に増加していることが確認された。これは、*Maml1* 遺伝子欠損雄マウスが正常な精巣機能を有していることに一致する。

これまでに、*MAMLD1* 変異陽性男性が尿道下裂を示すというヒトの表現型(44, 85)と *Maml1* 遺伝子欠損マウスは正常な尿道形成を示すというマウス表現型(80)には違いがあることが明らかになった。この点において、まず、尿道形成期におけるヒトと

マウスの違いが挙げられる。ヒトの尿道形成期は、妊娠初期の数週間（妊娠 12～15 週目）であり、尿道形成期と精巣内テストステロン量のピークは一致することが報告されている(96, 97)。一方、マウスの尿道形成期は、妊娠後期の数日（胎生 15.5～17.5 日）であり(41, 49)、尿道形成期と精巣内テストステロン量のピーク（胎生 18.5 日）は一致しない(83, 84)。このことから、ヒトとマウスでは、尿道形成期に必要なテストステロン量が異なると推測される。つぎに、テストステロン産生におけるヒトとマウスの違いである。ヒトは絨毛性ゴナドトロピン（hCG）刺激に依存し、主に $\Delta 5$ 経路を経由してテストステロンが産生され(97-100)、一方、マウスは絨毛性ゴナドトロピン刺激に依存せず、主に $\Delta 4$ 経路を経由してテストステロンが産生される(83, 97, 101)。このように、ヒトとマウスでは、ステロイドホルモン生合成の主要な経路が異なっていることが知られている(97)。また、動物種により、酵素活性に必要なコファクターが異なることが考えられる。したがって、詳細なメカニズムはまだ解明されていないが、胎生期雄性の性分化におけるこのような動物種の違いが、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスと *MAMLD1* 変異陽性男性との表現型の違いの根底にあると考えられる。

さらに、*Mamld1* 遺伝子欠損雄マウスにおけるライディッヒ細胞数が正常であった(80)という結果は、マウスライディッヒ腫瘍細胞において内在性 *Mamld1* 遺伝子をノックダウンした時に細胞増殖に影響を与えない(47)という結果と一致していたが、mRNA 発現レベルと精巣内ホルモン含有量の結果はマウス生体と培養細胞とは異なっていた(47, 80)。実際、培養細胞における *Mamld1* 遺伝子の発現低下は、主に *Cyp17a1* 遺伝子の発現に影響を与えて、テストステロン濃度や 17α -水酸化（ 17α -hydroxylation）以降の他のステロイド代謝産物濃度が減少している(47)。CYP17A1 酵素は 17α -水酸化酵素（ 17α -hydroxylase）活性と $17/20$ -リアーゼ（ $17/20$ -lyase）活性の両方を有するが(102)、*Mamld1* 遺伝子の発現を抑制しても $17/20$ -リアーゼ活性は保持されている(47)。マウスライディッヒ腫瘍細胞は、成獣ライディッヒの腫瘍細胞に由来しており、 $\Delta 4$ 経路と $\Delta 5$

経路において元来、17 α -水酸化酵素活性は著しく低い、17/20-リアーゼ活性は比較的良好に保存された細胞株である(103)。したがって、培養細胞実験では、このようなマウスライディヒ腫瘍細胞自体の特徴的な性質のために、*Mamld1* 遺伝子の発現抑制により、*Cyp17a1* 遺伝子発現の優先的な障害と 17 α -水酸化酵素活性の低下が顕著にあらわれたのかもしれない。また、*Mamld1* 遺伝子は胎仔精巣ではセルトリ細胞にも発現しており(44)、培養細胞実験では単一の細胞での機能を見ているために、精巣における他の細胞（セルトリ細胞や生殖細胞など）との相互作用まで見出すことは難しい。そのため、*Mamld1* 遺伝子欠損マウス生体において得られた mRNA 発現レベルおよび男性ホルモン産生量の結果と培養細胞において得られたそれらの結果には違いが生じたと示唆される。しかし、成獣ライディヒ由来の細胞において、*Mamld1* 遺伝子の発現抑制によりテストステロン産生量低下が見出されたことは(46, 47)、*MAMLD1* 変異陽性男性において出生後も性腺機能の低下が起きる可能性がある。我々は予備的な実験ではあるが、生後のマウス精巣において *Mamld1* 遺伝子が発現していること、成獣 *Mamld1* 遺伝子欠損マウスの精巣サイズと重量が減少していることを見出しており、*MAMLD1* 変異陽性男性が生後の性腺機能低下を招く可能性を支持する結果を得ている。そのため、今後も患者のフォローアップが必要である。

また、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣において、*Insl3* mRNA 発現量は減少し、*Amh* mRNA 発現量は正常であった(80)。これらの発現様式がヒトにおいても観察されると仮定すると、*MAMLD1* 変異陽性患者では停留精巣とミューラー管の退縮が起こることが推測される。実際、*MAMLD1* 変異陽性患者において、尿道下裂だけでなく、停留精巣を併発している症例を見出している(44)。さらに、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスを用いた交配実験の結果、正常なメンデル比（それぞれの遺伝子型が 25%前後）に一致して産仔が得られている(80)。そのため、*Mamld1* 遺伝子は中枢神経系での強い発現を含む広範な臓器に発現していることが報告されているが(44)、*Mamld1* が欠損することに

より生存能力に影響を与える可能性は低いと考えられる。

以上の結果より、*Mamld1* 遺伝子の欠損は外生殖器および生殖機能には影響を与えていないが、*Mamld1* 遺伝子はマウス胎仔ライディッヒ細胞特異的に発現する複数遺伝子の mRNA 発現レベルを制御することが示唆される。コレステロールからテストステロンへの合成経路は、ヒトとマウスでは異なっていることが知られており(97)、この経路において機能している補助因子が異なる可能性やまだ知られていないバイパス経路が存在する可能性もある。マウスにおいて一つの遺伝子を欠損させただけでは、ヒトと同様の表現型が得られないことは、男性ホルモン合成経路における未知のバイパス経路が存在し、それが胎生後期における性分化や雄性外生殖器の形成において重要な役割を果たしていることを示唆する。また、遺伝子欠損マウスの約 9 割では顕著な表現型が認められないことから(104, 105)、マウスではバイパス経路が動きだしやすいなどの特性があると推察される。

今後、MAMLD1/*Mamld1* の生物学的機能の解明のためには、遺伝子欠損マウスの解析の他に、ヒトで同定された変異型をノックインすることによっても解析する必要がある。

【総括】

本研究では、哺乳類に共通した雄性生殖器の形成・発育の分子基盤と疾患発症におけるその破綻について解明することを目的とし、雄性外生殖器形成に関わる段階を男性ホルモン非依存的と男性ホルモン依存的なステージに分けて、遺伝子発現解析および形態学的解析を試みた。外生殖器の形態は、脊椎動物間において様々な多様性がみられ、同種の雌雄間における物理的な一種の鍵と鍵穴の関係に例えられるような雌雄選択の役割を持っている。外生殖器は、このように形態の多様性が存在する器官であるだけでなく、生物にとって最も重要な種保存のための効果的な交配や体内受精を成し遂げるために必要な器官である。外生殖器原基の形成には、胎生期における細胞増殖因子群の形成制御シグナルの関与のほか、胎生期精巣由来の男性ホルモンが関与することが知られている。

本研究からは以下の点が明らかになった。はじめに、スンクス外生殖器原基における発現解析の結果、スンクス外生殖器原基における細胞増殖因子 (*Fgf8*, *Shh*) の発現様式は、マウス外生殖器原基におけるこれら遺伝子の発現様式と類似していることを見出した。これらの結果から、哺乳類外生殖器原基の外生殖器の伸長過程、尿道形成過程における分子メカニズムの共通性が示唆される。さらに、成獣スンクス外生殖器の形態解析の結果、スンクス雄性外生殖器の背側には骨格筋が存在すること、陰茎は角化した数多くのとげで覆われていることを見出し、哺乳類雄性外生殖器の形態に関する共通性および多様性を明らかにした。

近頃、スンクスゲノム解析プロジェクトが立ち上がった。今後、日本で初めて実験動物化されたスンクスのゲノム構造の解読とデータベースの構築を行うことにより、日本発のモデル動物の有用性を国際的に発信することができる。スンクスの多くの遺伝子配列が明らかになるにつれて、スンクスのモデル動物としての有用性がより高く

なると考えている。

つぎに、ヒトにおいて尿道下裂責任遺伝子として同定された **MAMLD1** の生体内機能について検討するため、マウス相同遺伝子 (*Mamld1*) 欠損マウスの解析を行った。その結果、*Mamld1* 遺伝子欠損雄マウスは尿道下裂を示さず、正常な妊孕性を有していることを見出した。また、*Mamld1* が胎仔精巣のライディッヒ細胞特異的にステロイドホルモン産生酵素遺伝子群の発現を制御する因子であることを明らかにした。

本研究から示唆される **MAMLD1/Mamld1** の男性ホルモン産生への関与は、実験動物モデルから得られる一つの知見としてだけでなく、ヒト内分泌疾患の発症機序解明へ結び付くと考えられる。また、我々は *Mamld1* 遺伝子が胎生期精巣のみでなく、成獣の精巣、卵巣、脳などの他のステロイドホルモン合成器官において発現していることを見出している。今後の課題として、これらの器官における *Mamld1* 遺伝子の役割についても解析する必要がある。また、ヒトで見つかった変異体を発現するノックインマウスを作製することにより、ヒトと同様の尿道下裂の症状を示すマウスが得られる可能性がある。

【謝辞】

本研究は、熊本大学生命資源研究・支援センター技術開発分野において山田 源教授（現和歌山県立医科大学遺伝制御学研究部教授）の御指導、および（独）国立成育医療研究センター研究所分子内分泌研究部において緒方 勤前部長（現浜松医科大学小児科学教授）、深見真紀部長の御指導のもと行われたものです。本研究を遂行するにあたり、山田 源教授、緒方 勤前部長および深見真紀部長には多大なる御支援、御助言を頂きました。ここに深く感謝申し上げます。

本稿を提出するにあたり、埼玉大学大学院理工学研究科生命科学部門生体制御学領域細胞制御学研究室の坂井貴文教授にご支援を頂きました。深く感謝申し上げます。

また、下記の先生方には本研究を遂行するうえで、実験に必要な材料の分与、御助言、御協力をいただきました。感謝申し上げます。

山村研一教授（熊本大学発生医学研究所器官構築部門）

織田銑一教授（岡山理科大学理学部動物学科）

鬼頭純三名誉教授（名古屋大学大学院医学系研究科）

諸橋憲一郎教授（九州大学大学院医学研究院分子生命科学系部門性差生物学講座）

これまで研究を共に行ってきた研究室および研究部の皆様には御助言、御協力を頂き、本稿を提出することが出来ました。心から感謝致します。

最後に、いつも全力で応援してくれている家族に感謝しています。

【参考文献】

1. **Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischau AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN** 1990 A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240-244
2. **Bull JJ, Vogt RC** 1979 Temperature-dependent sex determination in turtles. *Science* 206:1186-1188
3. **Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH, Borgaonkar DS, Wachtel SS, Miller OJ, Breg WR, Jones HW, Jr., Rary JM** 1977 Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:1245-1249
4. **Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R** 1991 Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 351:117-121
5. **Staack A, Donjacour AA, Brody J, Cunha GR, Carroll P** 2003 Mouse urogenital development: a practical approach. *Differentiation; research in biological diversity* 71:402-413
6. **Dyche WJ** 1979 A comparative study of the differentiation and involution of the Mullerian duct and Wolffian duct in the male and female fetal mouse. *Journal of morphology* 162:175-209
7. **Kobayashi A, Behringer RR** 2003 Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nature reviews Genetics* 4:969-980
8. **Yamada G, Satoh Y, Baskin LS, Cunha GR** 2003 Cellular and molecular mechanisms of development of the external genitalia. *Differentiation; research in*

biological diversity 71:445-460

9. **Wang MH, Baskin LS** 2008 Endocrine disruptors, genital development, and hypospadias. *Journal of andrology* 29:499-505
10. **Robledo RF, Rajan L, Li X, Lufkin T** 2002 The *Dlx5* and *Dlx6* homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. *Genes & development* 16:1089-1101
11. **Bakst MR** 1986 Embryonic development of the chicken external cloaca and phallus. *Scanning electron microscopy*:653-659
12. **Hildebrand M** 1995 *Analysis of Vertebrate Structure*, 4th ed John Wiley and Sons, New York:149-178
13. **Hosken DJ, Stockley P** 2004 Sexual selection and genital evolution. *Trends Ecol Evol* 19:87-93
14. **Pires-daSilva A, Sommer RJ** 2003 The evolution of signalling pathways in animal development. *Nature reviews Genetics* 4:39-49
15. **Yamada G, Suzuki K, Haraguchi R, Miyagawa S, Satoh Y, Kamimura M, Nakagata N, Kataoka H, Kuroiwa A, Chen Y** 2006 Molecular genetic cascades for external genitalia formation: an emerging organogenesis program. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 235:1738-1752
16. **Ogino Y, Miyagawa S, Katoh H, Prins GS, Iguchi T, Yamada G** 2011 Essential functions of androgen signaling emerged through the developmental analysis of vertebrate sex characteristics. *Evolution & development* 13:315-325
17. **Haraguchi R, Suzuki K, Murakami R, Sakai M, Kamikawa M, Kengaku M, Sekine K, Kawano H, Kato S, Ueno N, Yamada G** 2000 Molecular analysis of

- external genitalia formation: the role of *fibroblast growth factor (Fgf)* genes during genital tubercle formation. *Development* 127:2471-2479
18. **Haraguchi R, Mo R, Hui C, Motoyama J, Makino S, Shiroishi T, Gaffield W, Yamada G** 2001 Unique functions of Sonic hedgehog signaling during external genitalia development. *Development* 128:4241-4250
 19. **Suzuki K, Bachiller D, Chen YP, Kamikawa M, Ogi H, Haraguchi R, Ogino Y, Minami Y, Mishina Y, Ahn K, Crenshaw EB, 3rd, Yamada G** 2003 Regulation of outgrowth and apoptosis for the terminal appendage: external genitalia development by concerted actions of BMP signaling [corrected]. *Development* 130:6209-6220
 20. **Crossley PH, Martin GR** 1995 The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* 121:439-451
 21. **Moon AM, Capecchi MR** 2000 *Fgf8* is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nature genetics* 26:455-459
 22. **Beer HD, Florence C, Dammeier J, McGuire L, Werner S, Duan DR** 1997 Mouse fibroblast growth factor 10: cDNA cloning, protein characterization, and regulation of mRNA expression. *Oncogene* 15:2211-2218
 23. **Min H, Danilenko DM, Scully SA, Bolon B, Ring BD, Tarpley JE, DeRose M, Simonet WS** 1998 *Fgf-10* is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila branchless*. *Genes & development* 12:3156-3161
 24. **Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, Yamasaki M, Yoshizawa T, Sato T, Yagishita N, Matsui D, Koga Y, Itoh N, Kato S** 1999 *Fgf10* is essential for limb and lung formation. *Nature genetics* 21:138-141

25. **Thomson AA, Cunha GR** 1999 Prostatic growth and development are regulated by FGF10. *Development* 126:3693-3701
26. **Mailleux AA, Spencer-Dene B, Dillon C, Ndiaye D, Savona-Baron C, Itoh N, Kato S, Dickson C, Thiery JP, Bellusci S** 2002 Role of FGF10/FGFR2b signaling during mammary gland development in the mouse embryo. *Development* 129:53-60
27. **Pepicelli CV, Lewis PM, McMahon AP** 1998 Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Current biology : CB* 8:1083-1086
28. **Johnson RL, Tabin CJ** 1997 Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* 90:979-990
29. **Bellusci S, Furuta Y, Rush MG, Henderson R, Winnier G, Hogan BL** 1997 Involvement of Sonic hedgehog (*Shh*) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development* 124:53-63
30. **Litingtung Y, Lei L, Westphal H, Chiang C** 1998 Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nature genetics* 20:58-61
31. **Ingham PW, McMahon AP** 2001 Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & development* 15:3059-3087
32. **Colbert EH** 1958 *Evolution of the Vertebrates*. Wiley, New York
33. **Novacek MJ** 1992 Mammalian phylogeny: shaking the tree. *Nature* 356:121-125
34. **Kondo K** 1985 ed. *Suncus murinus*-Biology of the Laboratory Shrew.
35. **Oda S, Kondo K** 1976 Progress in domestication of *Suncus murinus* riukiuanus for experiments (In Japanese). *Honyu-rui Kagaku (Mammology)* 33:13-30
36. **Oda S, Kondo K** 1977 [Usefulness of wild insectivores as laboratory animals (author's transl)]. *Jikken Dobutsu* 26:273-280
37. **Baskin LS** 2004 Hypospadias. *Adv Exp Med Biol* 545:3-22

38. **Borer JH, Retik AB** 2006 Hypospadias. Campbell-Walsh Urology, 9th ed:3703-3704
39. **van der Zanden LF, van Rooij IA, Feitz WF, Franke B, Knoers NV, Roeleveld N** 2012 Aetiology of hypospadias: a systematic review of genes and environment. Human reproduction update 18:260-283
40. **Avellán L** 1975 The incidence of hypospadias in Sweden. Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery 9:129-139
41. **Suzuki K, Ogino Y, Murakami R, Satoh Y, Bachiller D, Yamada G** 2002 Embryonic development of mouse external genitalia: insights into a unique mode of organogenesis. Evolution & development 4:133-141
42. **Gray LE, Ostby J, Furr J, Wolf CJ, Lambright C, Parks L, Veeramachaneni DN, Wilson V, Price M, Hotchkiss A, Orlando E, Guillette L** 2001 Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. Human reproduction update 7:248-264
43. **Bartsch O, Kress W, Wagner A, Seemanova E** 1999 The novel contiguous gene syndrome of myotubular myopathy (MTM1), male hypogenitalism and deletion in Xq28:report of the first familial case. Cytogenetics and cell genetics 85:310-314
44. **Fukami M, Wada Y, Miyabayashi K, Nishino I, Hasegawa T, Nordenskjöld A, Camerino G, Kretz C, Buj-Bello A, Laporte J, Yamada G, Morohashi K, Ogata T** 2006 *CXorf6* is a causative gene for hypospadias. Nature genetics 38:1369-1371
45. **Lin L, Achermann JC** 2008 Steroidogenic factor-1 (*SF-1*, *Ad4BP*, *NR5A1*) and disorders of testis development. Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation 2:200-209
46. **Fukami M, Wada Y, Okada M, Kato F, Katsumata N, Baba T, Morohashi K,**

- Laporte J, Kitagawa M, Ogata T** 2008 Mastermind-like domain-containing 1 (*MAMLD1* or *CXorf6*) transactivates the *Hes3* promoter, augments testosterone production, and contains the SF1 target sequence. The Journal of biological chemistry 283:5525-5532
47. **Nakamura M, Fukami M, Sugawa F, Miyado M, Nonomura K, Ogata T** 2011 *Mamld1* knockdown reduces testosterone production and *Cyp17a1* expression in mouse Leydig tumor cells. PloS one 6:e19123
48. **Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM** 2001 Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. Human reproduction 16:972-978
49. **Miyagawa S, Satoh Y, Haraguchi R, Suzuki K, Iguchi T, Taketo MM, Nakagata N, Matsumoto T, Takeyama K, Kato S, Yamada G** 2009 Genetic interactions of the androgen and Wnt/beta-catenin pathways for the masculinization of external genitalia. Molecular endocrinology 23:871-880
50. **Miyagawa S, Matsumaru D, Murashima A, Omori A, Satoh Y, Haraguchi R, Motoyama J, Iguchi T, Nakagata N, Hui CC, Yamada G** 2011 The role of sonic hedgehog-Gli2 pathway in the masculinization of external genitalia. Endocrinology 152:2894-2903
51. **Ueno S, Matsuki N, Saito H** 1987 *Suncus murinus*: a new experimental model in emesis research. Life sciences 41:513-518
52. **Inouye M, Oda S, Shimamura K, Kameyama Y** 1985 *Suncus murinus*: Biology of the Laboratory Shrew, Ed by K Kondo, Japan Scientific Societies Press, Tokyo (In Japanese):pp 140-143
53. **Wilkinson D** 1992 *In situ* Hybridization; a Practical Approach. Oxford University

Press, London

54. **Kamikawa-Miyado M, Ogi H, Ogino Y, Katoh H, Suzuki K, Uemura M, Kitoh J, Oda S, Yamada G** 2005 The morphological and histological characters of the male external genitalia of the house musk shrew, *Suncus murinus*. Zoological science 22:463-468
55. **Miyado M, Ogi H, Oda S, Miyado K** 2011 *Suncus murinus*: Biology of Suncus, Ed by G Isomura, Japan Scientific Societies Press, Tokyo (In Japanese):pp 323-328
56. **Kitoh J, Ohta K, Yamashita K, Sugiura Y, Hirunagi K, Oda S, Yohoyama A** 1985 *Suncus murinus*: Biology of the Laboratory Shrew, Ed by K Kondo, Japan Scientific Societies Press, Tokyo (In Japanese):pp 140-143
57. **Tsutsui C, Kajihara K, Yanaka T, Sakata I, Itoh Z, Oda S, Sakai T** 2009 House musk shrew (*Suncus murinus*, order: Insectivora) as a new model animal for motilin study. Peptides 30:318-329
58. **Sakata I, Sakai T** 2010 Ghrelin cells in the gastrointestinal tract. International journal of peptides 2010
59. **Ogi H, Tabata MJ, Yamanaka A, Yasui K, Uemura M** 2002 Comparison of expression patterns of fibroblast growth factor 8, bone morphogenetic protein 4 and sonic hedgehog in jaw development of the house shrew, *Suncus murinus*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 48 Online Pub:OL289-296
60. **Jogahara T, Koyasu K, Oda S, Kawai T, Hanamura H** 2007 Quest for the cause of oligodontia in *Suncus murinus* (Soricomorpha, Soricidae): Morphological re-examination. Archives of oral biology 52:836-843
61. **Miyado M, Ogi H, Yamada G, Kitoh J, Jogahara T, Oda S, Sato I, Miyado K, Sunohara M** 2007 *Sonic hedgehog* expression during early tooth development in

- Suncus murinus*. Biochemical and biophysical research communications 363:269-275
62. **Miyado M, Ogi H, Jogahara T, Oda S, Miyado K** 2011 *Suncus murinus*: Biology of *Suncus*, Ed by G Isomura, Japan Scientific Societies Press, Tokyo (In Japanese):pp 359-365
 63. **Bedford JM, Mori T, Oda S** 1997 Ovulation induction and gamete transport in the female tract of the musk shrew, *Suncus murinus*. J Reprod Fertil 110:115-125
 64. **Isomura G** 1985 *Suncus murinus*: Biology of the Laboratory Shrew, Ed by K Kondo, Japan Scientific Societies Press, Tokyo (In Japanese):pp 311-323
 65. **Nanasaki Y, Sakuma Y** 2000 Perineal musculature and its innervation by spinal motoneurons in the male rabbit: effects of testosterone. J Nippon Med Sch 67:164-171
 66. **Bo Minelli L, Acone F, Zedda M, Sanna L** 1993 Further observations on the morphology and sensitive innervation of the retractor penis muscle in several species of ungulates. Ital J Anat Embryol 98:13-21
 67. **Taylor GT, Komitowski D, Weiss J** 1983 Light and scanning electron microscopic study of testosterone-restored penile papillae in castrated rats. Anat Rec 205:277-286
 68. **Murakami R** 1987 A histological study of the development of the penis of wild-type and androgen-insensitive mice. J Anat 153:223-231
 69. **Ninomiya H, Fukase T, Nakamura T** 1984 Scanning electron microscopy of celluloid replicas of the penile spines of the domestic cat. Jikken Dobutsu 33:525-528
 70. **Fortune JE, Eppig JJ, Rissman EF** 1992 Mating stimulates estradiol production by ovaries of the musk shrew (*Suncus murinus*). Biol Reprod 46:885-891
 71. **O'Hanlon JK, Sachs BD** 1986 Fertility of mating in rats (*Rattus norvegicus*): contributions of androgen-dependent morphology and actions of the penis. Journal of comparative psychology 100:178-187

72. **Whitsett JM, Ayer ML, Muse KE** 1980 Androgenic control of phallic papillae in hamsters: a quantitative analysis using the scanning electron microscope. *Biol Reprod* 23:669-676
73. **Dixon AF** 1991 Penile spines affect copulatory behaviour in a primate (*Callithrix jacchus*). *Physiol Behav* 49:557-562
74. **Glucksmann A, Ooka-Souda S, Miura-Yasugi E, Mizuno T** 1976 The effect of neonatal treatment of male mice with antiandrogens and of females with androgens on the development of the os penis and os clitoridis. *J Anat* 121:363-370
75. **Dollé P, Dierich A, LeMeur M, Schimmang T, Schuhbauer B, Chambon P, Duboule D** 1993 Disruption of the *Hoxd-13* gene induces localized heterochrony leading to mice with neotenic limbs. *Cell* 75:431-441
76. **Post LC, Innis JW** 1999 Infertility in adult hypodactyly mice is associated with hypoplasia of distal reproductive structures. *Biology of reproduction* 61:1402-1408
77. **Cunha GR, Wang Y, Place NJ, Liu W, Baskin L, Glickman SE** 2003 Urogenital system of the spotted hyena (*Crocuta crocuta Erxleben*): a functional histological study. *J Morphol* 256:205-218
78. **Kalfa N, Liu B, Klein O, Audran F, Wang MH, Mei C, Sultan C, Baskin LS** 2008 Mutations of *CXorf6* are associated with a range of severities of hypospadias. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 159:453-458
79. **Chen Y, Thai HT, Lundin J, Lagerstedt-Robinson K, Zhao S, Markljung E, Nordenskjöld A** 2010 Mutational study of the *MAMLD1*-gene in hypospadias. *European journal of medical genetics* 53:122-126
80. **Miyado M, Nakamura M, Miyado K, Morohashi K, Sano S, Nagata E, Fukami M,**

- Ogata T** 2012 *Mamld1* deficiency significantly reduces mRNA expression levels of multiple genes expressed in mouse fetal Leydig cells but permits normal genital and reproductive development. *Endocrinology* 153:6033-6040
81. **Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E** 1994 *Manipulating the Mouse Embryo; A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
 82. **Fatchiyah, Zubair M, Shima Y, Oka S, Ishihara S, Fukui-Katoh Y, Morohashi K** 2006 Differential gene dosage effects of Ad4BP/SF-1 on target tissue development. *Biochemical and biophysical research communications* 341:1036-1045
 83. **O'Shaughnessy PJ, Baker P, Sohnius U, Haavisto AM, Charlton HM, Huhtaniemi I** 1998 Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology* 139:1141-1146
 84. **O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H** 2006 The foetal Leydig cell--differentiation, function and regulation. *International journal of andrology* 29:90-95; discussion 105-108
 85. **Ogata T, Laporte J, Fukami M** 2009 *MAMLD1 (CXorf6)*: a new gene involved in hypospadias. *Hormone research* 71:245-252
 86. **O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Monteiro A, Cassie S, Bhattacharya S, Fowler PA** 2007 Developmental changes in human fetal testicular cell numbers and messenger ribonucleic acid levels during the second trimester. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92:4792-4801
 87. **Baker PJ, Sha JH, O'Shaughnessy PJ** 1997 Localisation and regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 mRNA during development in the mouse testis. *Molecular and cellular endocrinology* 133:127-133
 88. **O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Heikkilä M, Vainio S, McMahon AP** 2000

- Localization of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase isoform expression in the developing mouse testis--androstenedione is the major androgen secreted by fetal/neonatal leydig cells. *Endocrinology* 141:2631-2637
89. **Lehmann KP, Phillips S, Sar M, Foster PM, Gaido KW** 2004 Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di (n-butyl) phthalate. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 81:60-68
 90. **Thompson CJ, Ross SM, Hensley J, Liu K, Heinze SC, Young SS, Gaido KW** 2005 Differential steroidogenic gene expression in the fetal adrenal gland versus the testis and rapid and dynamic response of the fetal testis to di(n-butyl) phthalate. *Biology of reproduction* 73:908-917
 91. **Weisser J, Landreh L, Söder O, Svechnikov K** 2011 Steroidogenesis and steroidogenic gene expression in postnatal fetal rat Leydig cells. *Molecular and cellular endocrinology* 341:18-24
 92. **Mayer A, Mosler G, Just W, Pilgrim C, Reisert I** 2000 Developmental profile of *Sry* transcripts in mouse brain. *Neurogenetics* 3:25-30
 93. **Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, Kjems J** 2013 Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* 495:384-388
 94. **Thomas G, Luther H** 1981 Transcriptional and translational control of cytoplasmic proteins after serum stimulation of quiescent Swiss 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78:5712-5716
 95. **Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M** 2003 Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome biology* 4:117

96. **Hughes IA, Acerini CL** 2008 Factors controlling testis descent. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 159 Suppl 1:S75-82
97. **Scott HM, Mason JI, Sharpe RM** 2009 Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. *Endocrine reviews* 30:883-925
98. **Huhtaniemi IT, Korenbrot CC, Jaffe RB** 1977 HCG binding and stimulation of testosterone biosynthesis in the human fetal testis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 44:963-967
99. **Flück CE, Miller WL, Auchus RJ** 2003 The 17, 20-lyase activity of cytochrome p450c17 from human fetal testis favors the delta5 steroidogenic pathway. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88:3762-3766
100. **Fowler PA, Bhattacharya S, Gromoll J, Monteiro A, O'Shaughnessy PJ** 2009 Maternal smoking and developmental changes in luteinizing hormone (LH) and the LH receptor in the fetal testis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94:4688-4695
101. **Baker PJ, O'Shaughnessy PJ** 2001 Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. *Reproduction* 122:227-234
102. **Achermann JC, Hughes IA** 2008 Disorders of sex development, in *Williams textbook of endocrinology*, 11th ed Saunders Co, Philadelphia:pp 783-848
103. **Panesar NS, Chan KW, Ho CS** 2003 Mouse Leydig tumor cells produce C-19 steroids, including testosterone. *Steroids* 68:245-251
104. **Weissmann C** 2002 Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies: an introduction. *The Journal of toxicological sciences* 27:69-77
105. **Yu S, Michie SA, Lowe AW** 2004 Absence of the major zymogen granule membrane

protein, GP2, does not affect pancreatic morphology or secretion. The Journal of biological chemistry 279:50274-50279

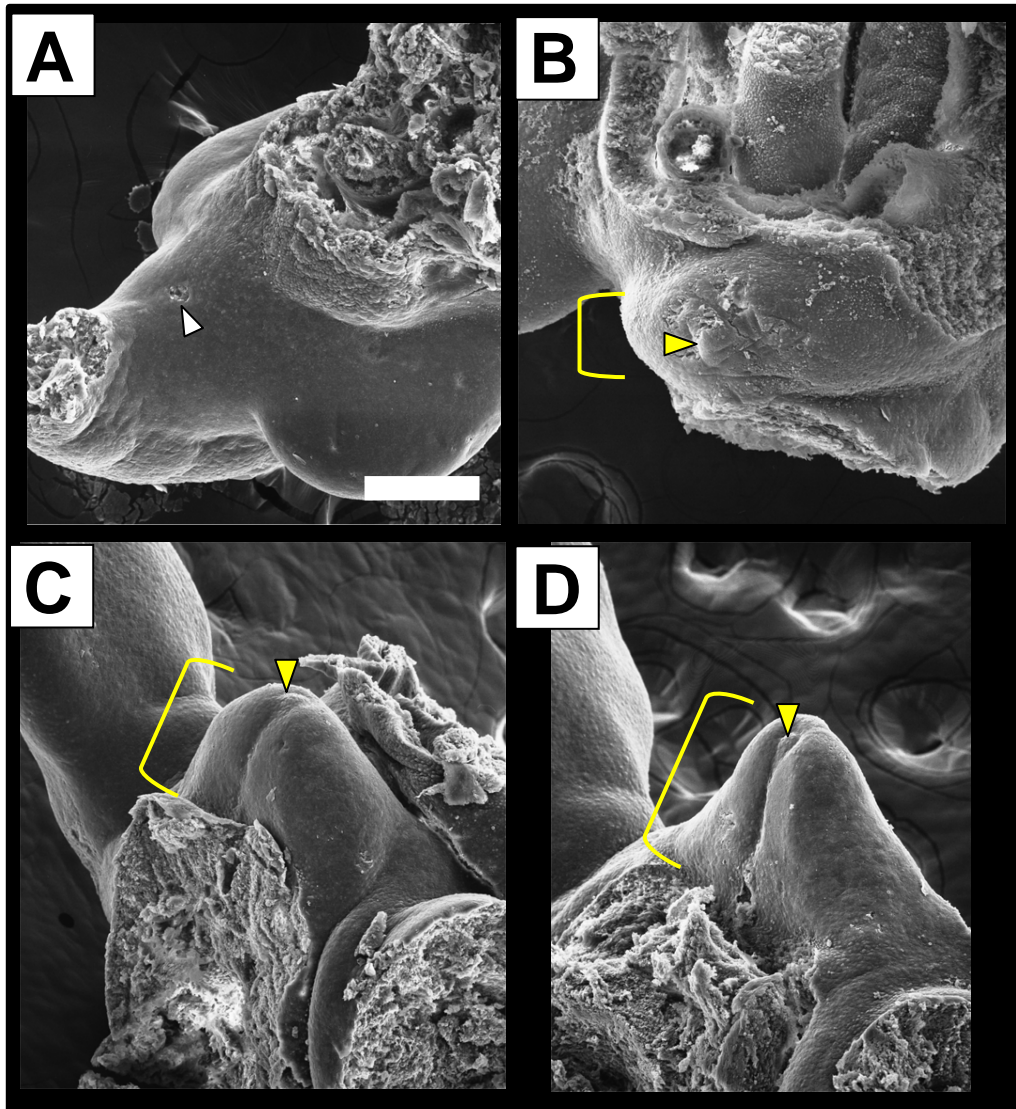


Fig. 1 スンクス外生殖器原基（胎生 14～18 日）の走査電子顕微鏡観察

A：胎生 14 日の外生殖器原基の形態観察。原基の隆起はみられなかった（白色矢印頭）。

B：胎生 15 日の外生殖器原基の形態観察。原基は臍帯と尾の間にわずかな隆起として観察された（黄色片括弧）。外生殖器原基の先端に、遠位尿道板上皮の構造が確認できた（黄色矢印頭）。

C：胎生 16 日の外生殖器原基の形態観察。原基の伸長がみられた（黄色片括弧）。

D：胎生 18 日の外生殖器原基の形態観察。原基はさらに著しく伸長した（黄色片括弧）。胎生 18 日までは、外生殖器原基の形態における雌雄差は認められなかった。

白色矢印頭：隆起予定領域、黄色矢印頭：遠位尿道板上皮、黄色片括弧：原基の隆起と伸長、スケールバー： 300 μm 。

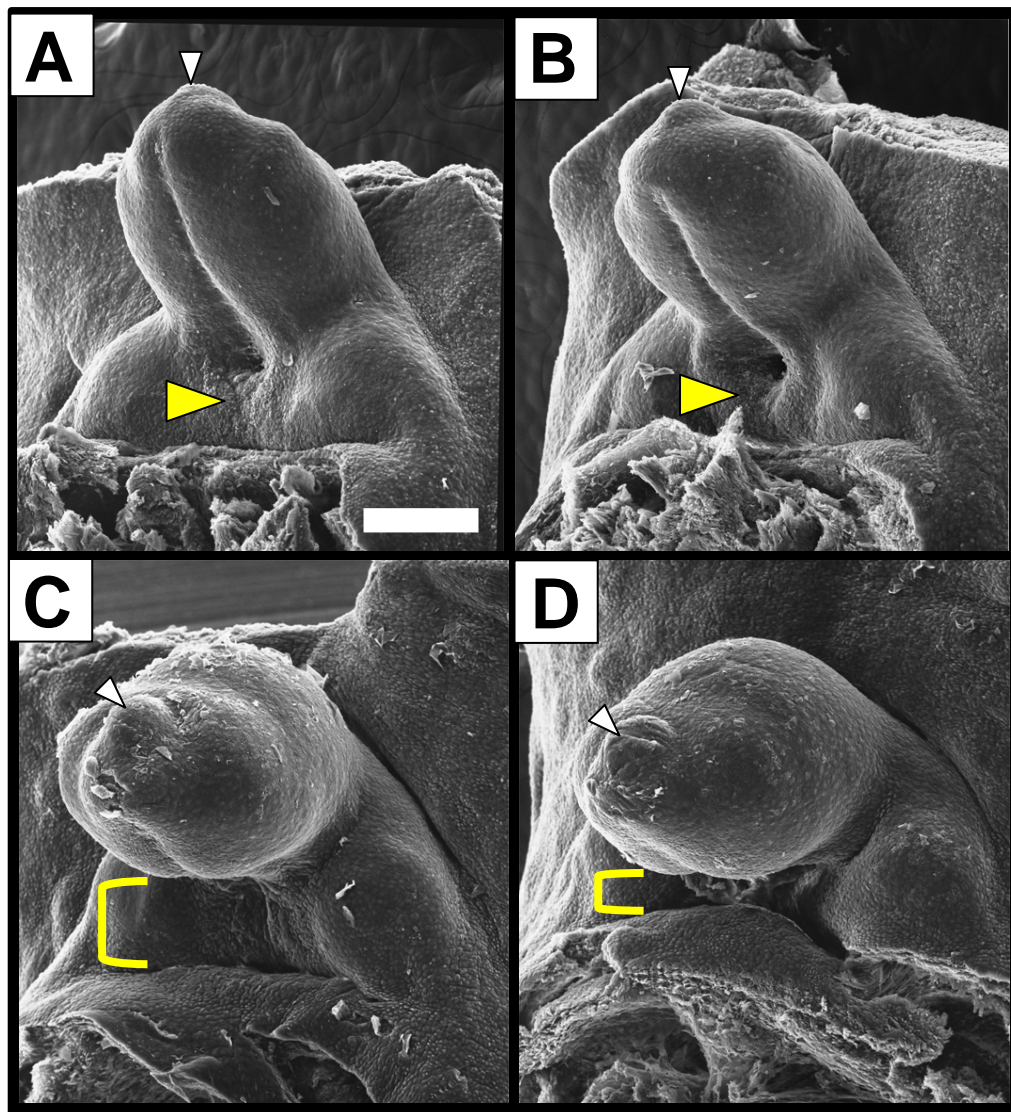


Fig. 2 スンクス外生殖器原基（胎生 20、22 日）の走査電子顕微鏡観察

A、B：胎生 20 日の外生殖器原基の形態観察。雄性（A）、雌性（B）の外生殖器原基の遠位側に形態の雌雄差は認められなかったが（白色矢印頭）、雄の外生殖器原基の近位側では尿生殖ヒダの癒着がみられ、雌の近位側で癒着はみられないという雌雄差が認められた（黄色矢印頭）。

C、D：胎生 22 日の外生殖器原基の形態観察。尿道形成において、雄性（C）、雌性（D）の差が認められた。雄の肛門性器間距離は雌に比べて長かった（黄色片括弧）。

白色矢印頭：将来の陰茎龟头、黄色矢印頭：形態の雌雄差が認められた近位側、黄色片括弧：肛門性器間距離、スケールバー：300 μm 。

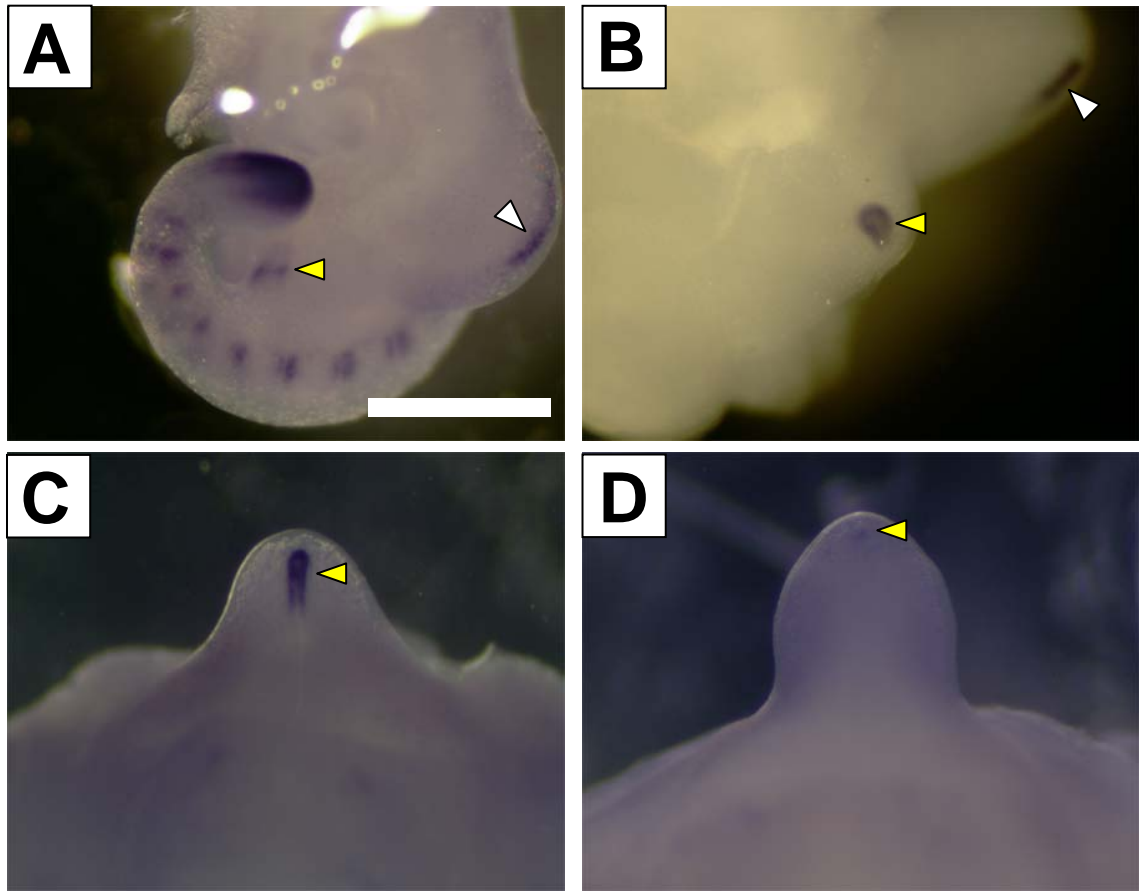


Fig. 3 スンクス外生殖器原基における *Fgf8* mRNA 発現細胞の局在

A : 胎生 14 日の *Fgf8* mRNA 発現細胞の局在解析。原基の隆起がみられない時期の腹側正中線上に *Fgf8* 遺伝子の発現が認められた (黄色矢印頭)。マウスの報告と同様に、*Fgf8* 遺伝子はスンクスの体節および肢芽の外胚葉性頂堤にも発現していた (白色矢印頭)。

B : 胎生 15 日の *Fgf8* mRNA 発現細胞の局在解析。外生殖器原基先端の遠位尿道板上皮 (黄色矢印頭) と外胚葉性頂堤 (白色矢印頭) に *Fgf8* 遺伝子の発現が認められた。

C : 胎生 18 日の外生殖器原基における *Fgf8* mRNA 発現細胞の局在解析。外生殖器原基先端の遠位尿道板上皮に *Fgf8* 遺伝子の発現が認められた (黄色矢印頭)。

D : 胎生 20 日の外生殖器原基 (雌性) における *Fgf8* mRNA 発現細胞の局在解析。外生殖器原基先端において *Fgf8* 遺伝子の発現はわずかに観察された (黄色矢印頭)。

黄色矢印頭 : 外生殖器原基での *Fgf8* 遺伝子発現、白色矢印頭 : 外胚葉性頂堤での *Fgf8* 遺伝子発現、スケールバー : 500 μm 。

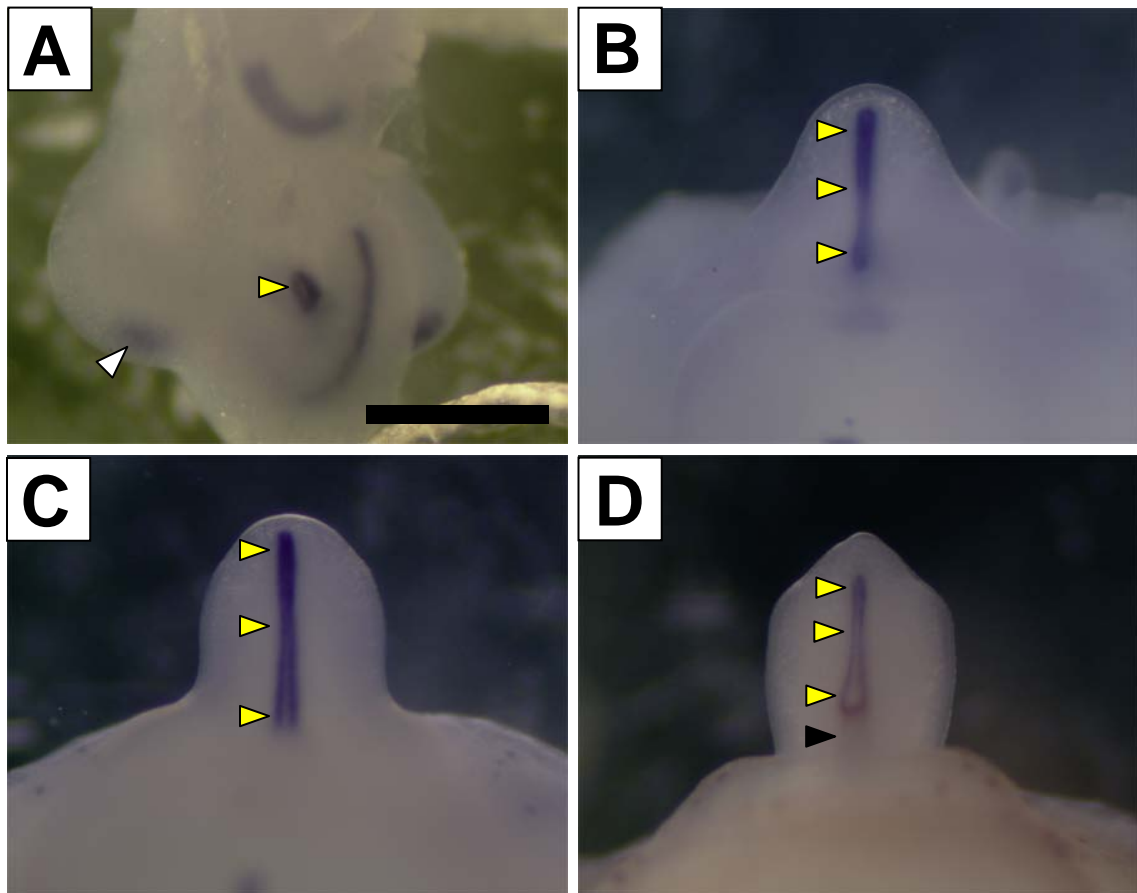


Fig. 4 スンクス外生殖器原基における *Shh* mRNA 発現細胞の局在

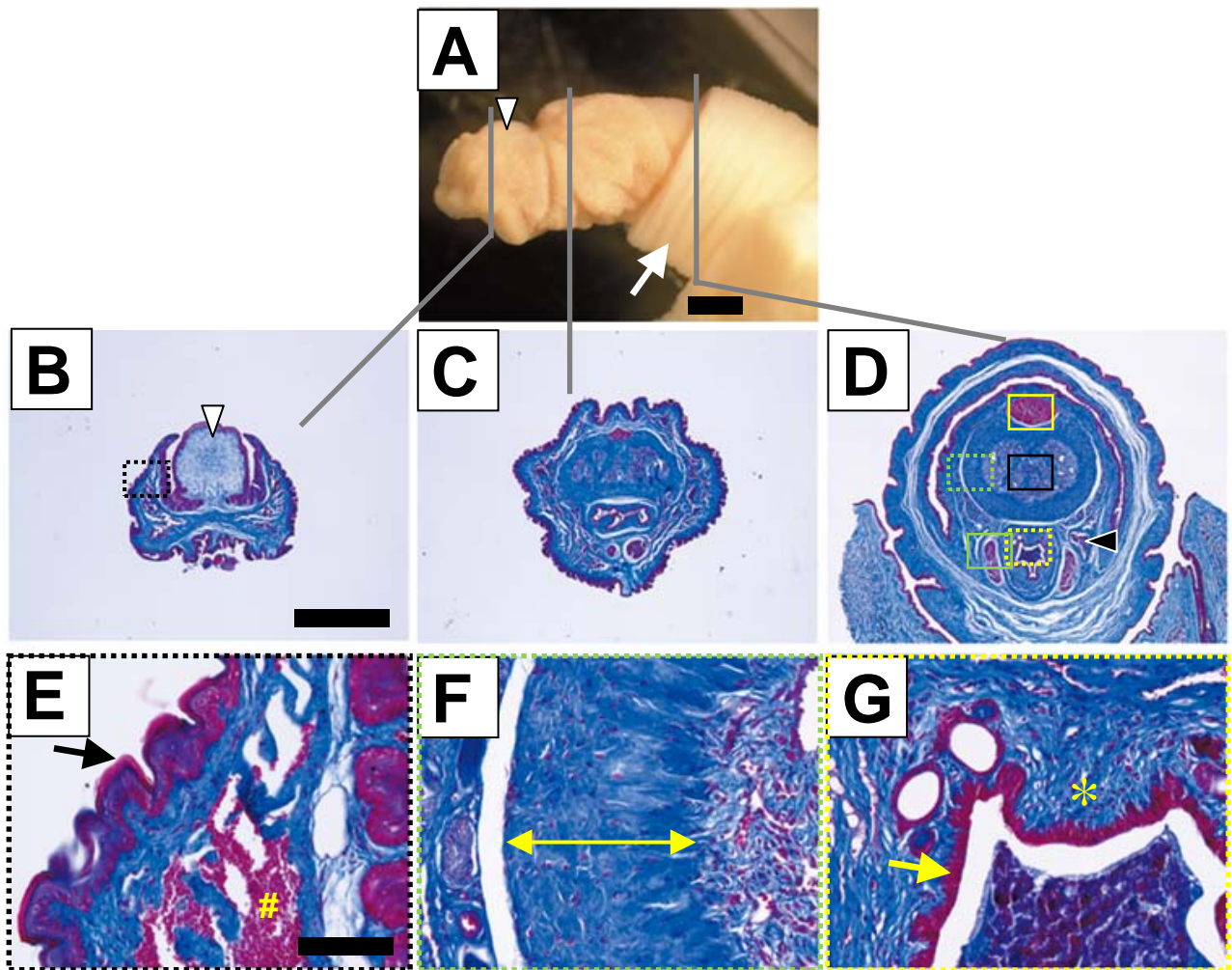
A : 胎生 14 日の *Shh* mRNA 発現細胞の局在解析。原基の隆起がみられない時期の腹側正中線上に *Shh* 遺伝子の発現が認められた (黄色矢印頭)。マウスの報告と同様に、*Shh* 遺伝子はスンクスの脊索および極性活性化領域にも発現していた (白色矢印頭)。

B : 胎生 18 日の *Shh* mRNA 発現細胞の局在解析。外生殖器原基において近位から遠位の尿道板上皮に *Shh* 遺伝子の発現が観察された (黄色矢印頭)。

C : 胎生 20 日の外生殖器原基 (雄性) における *Shh* mRNA 発現細胞の局在解析。外生殖器原基において近位から遠位の尿道板上皮に *Shh* 遺伝子の発現が観察された (黄色矢印頭)。

D : 胎生 22 日の外生殖器原基 (雄性) における *Shh* mRNA 発現細胞の局在解析。遠位側の尿道板上皮に *Shh* 遺伝子の発現が確認された (黄色矢印頭) が、近位側ではすでに管状の構造である尿道が形成されていたために、外側より *Shh* 遺伝子の発現は観察されなかった (黒色矢印頭)。

黄色矢印頭 : 外生殖器原基での *Shh* 遺伝子発現、黒色矢印頭 : 発現がみられない近位側、白色矢印頭 : 極性活性化領域での *Shh* 遺伝子発現、スケールバー : 500 μm 。



(Kamikawa-Miyado M et al. (2005) Zoological Science 22: 463-468, Fig. 1 より転載)

Fig. 5 成獣スナクス雄性外生殖器の外観と組織像

A：雄性外生殖器の側面観察。雄性外生殖器を尿生殖肛門裂より押し出し、外生殖器の先端を左側に向けた。外生殖器の背側遠位は、尿道海綿体からつながる陰茎龟头（白色矢印頭）がみられた。また、外生殖器近位には包皮が確認された（白色矢印）。

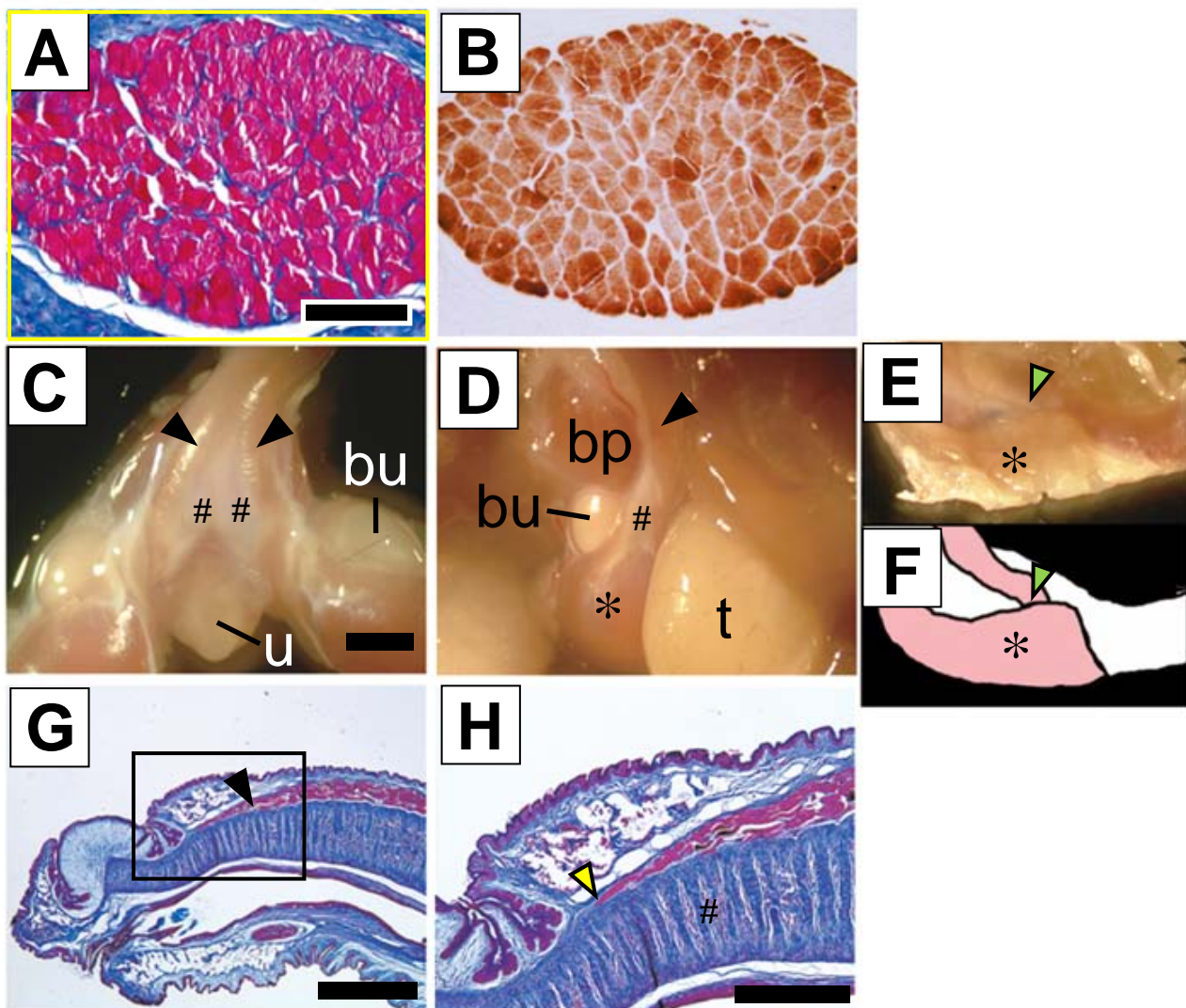
B－G：冠状断切片の Masson's trichrome 染色による組織学的解析。A の灰色線の位置で冠状断切片を作製した。遠位領域は、陰茎龟头（B の白色矢印頭）は粗な結合組織として観察され、龟头海綿体に接していた。近位領域は、外生殖器の背側に骨格筋（D の黄色領域）、中央部に陰茎海綿体（D の黒色領域）、腹側に尿道（D の黄色破線領域）が存在した。また、尿道の両側に、陰茎背動脈（D の黒色矢印頭）が観察された。

E：B の黒色破線領域の拡大画像。龟头海綿体（黄色シャープ）は、血管構造が発達しており、角化した数多くのとげ（黒色矢印）を持つ上皮に覆われていた。

F : D の緑色破線領域の拡大画像。陰茎中央部にある陰茎海綿体は非常に厚い白膜（黄色両矢印）に覆われていた。

G : D の黄色破線領域の拡大画像。陰茎腹側には、尿道海綿体（黄色アスタリスク）に囲まれた重層円柱上皮（黄色矢印）よりなる尿道が存在した。

白色矢印頭：陰茎亀頭、黒色矢印頭：陰茎背動脈、黄色領域：背側坐骨海綿体筋、黒色領域：陰茎海綿体の内部、緑色領域：陰茎後引筋、スケールバー：2 mm（A－D）、100 μ m（E－G）。



(Kamikawa-Miyado M et al. (2005) Zoological Science 22: 463-468, Fig. 2 より転載)

Fig. 6 成獣スンクス雄性外生殖器における坐骨海綿体筋の解剖学的、組織学的解析および fast-myosin heavy chain 陽性細胞の局在

A、B：坐骨海綿体筋の Masson's trichrome 染色による組織学的解析および fast-myosin heavy chain 陽性細胞の局在解析。Fig. 5D の黄色領域の拡大画像である。陰茎の背側に fast-myosin heavy chain 陽性の骨格筋が確認された。

C：陰茎近位部の背面観察。皮膚と膀胱を切除して、陰茎の近位部を背側から観察し、陰茎背側に存在する骨格筋（黒色矢印頭）を確認した。

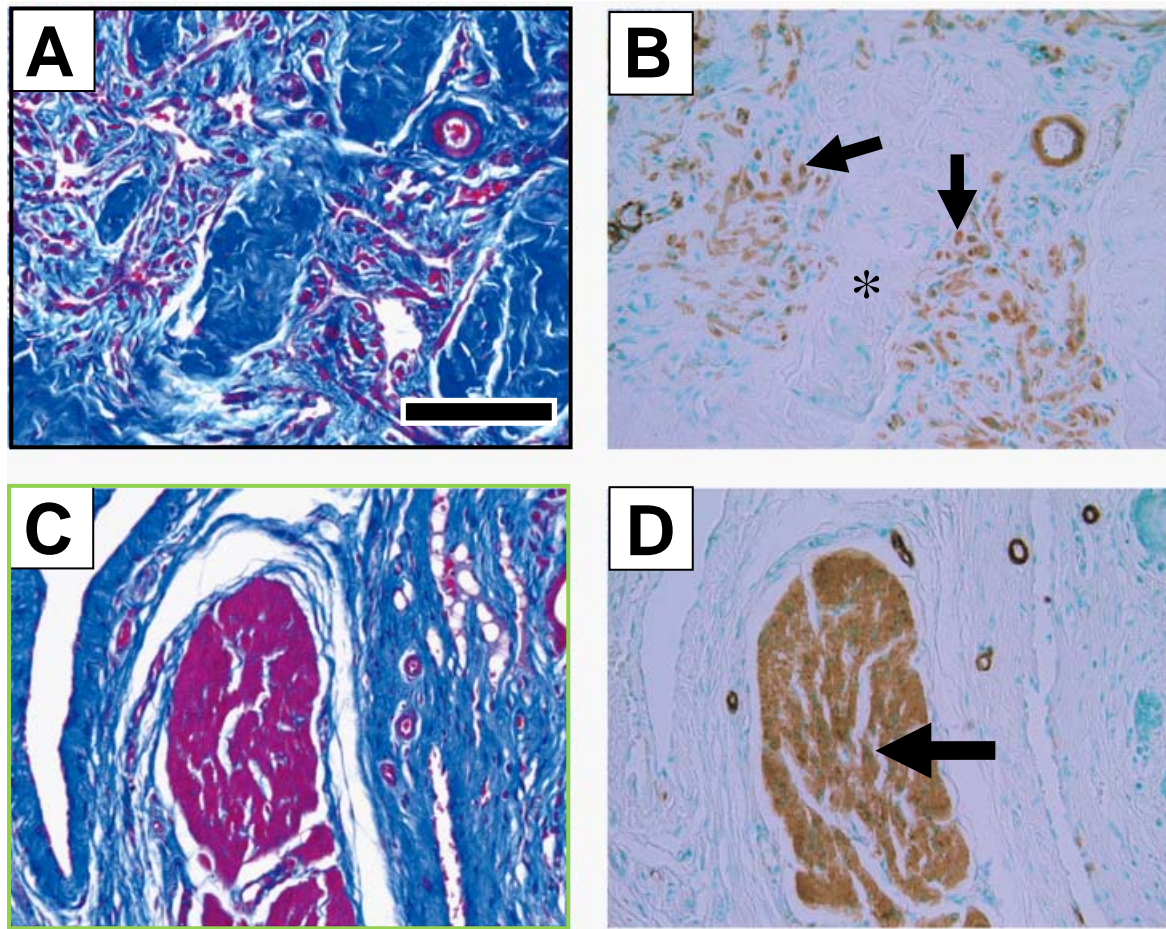
D：陰茎近位部の側面観察。

E、F：背側および腹側の坐骨海綿体筋の起始部。FはEのイラスト図である。

G、H：矢状断切片の Masson's trichrome 染色による組織学的解析。外生殖器の正中で矢状断切片を作製した。H は G の黒色領域の拡大画像である。

陰茎背側に存在する骨格筋（黒色矢印頭）は、坐骨結節の内側を起点（緑色矢印頭）とし、陰茎亀頭の後方の陰茎海綿体（黄色矢印頭）に停止していた。

bp：尿道球、bu：尿道球腺、t：精巣、u：尿道、黒色矢印頭：背側坐骨海綿体筋、緑色矢印頭：背側坐骨海綿体筋の起始部、黄色矢印頭：背側坐骨海綿体筋の停止部、*：腹側坐骨海綿体筋、#：陰茎海綿体、スケールバー：100 μm (A、B)、2 mm (C–F)、1 mm (G)、500 μm (H)。



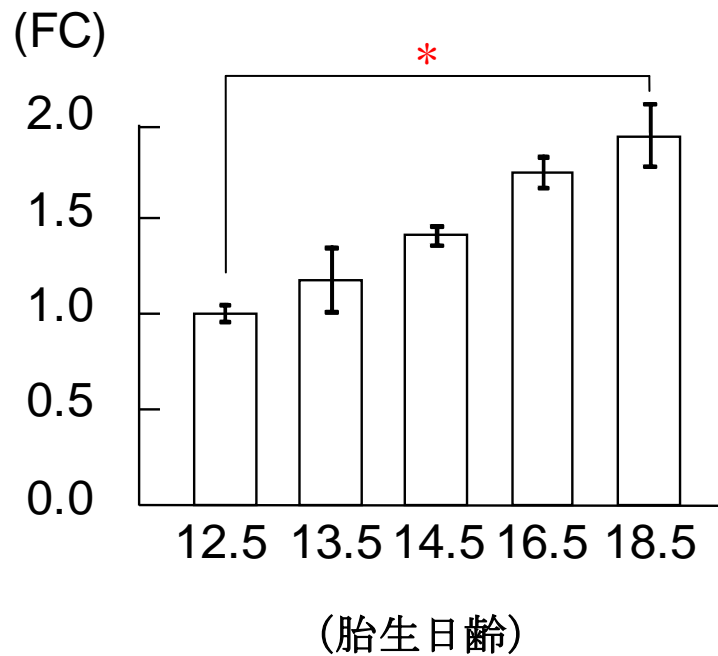
(Kamikawa-Miyado M et al. (2005) Zoological Science 22: 463-468, Fig. 3 より転載)

Fig. 7 成獣スンクス雄性外生殖器における陰茎海綿体と陰茎後引筋の組織学的解析および α -smooth muscle actin 陽性細胞の局在

A、B:陰茎海綿体の Masson's trichrome 染色による組織学的解析および α -smooth muscle actin 陽性細胞の局在解析。Fig. 5D の黒色領域の拡大画像である。陰茎海綿体は、血管内皮に覆われている相互に連結した海綿体様空間の網構造からなり、疎性結合組織（アスタリスク）と平滑筋の束を含む小柱（矢印）によって区分されていた。

C、D:陰茎後引筋の Masson's trichrome 染色による組織学的解析および α -smooth muscle actin 陽性細胞の局在解析。Fig. 5D の緑色領域の拡大画像である。尿道の両側に α -smooth muscle actin 陽性の一対の平滑筋が確認された（矢印）。片側のみ図示した。

矢印： α -smooth muscle actin 陽性細胞、*：疎性結合組織、スケールバー：100 μ m。

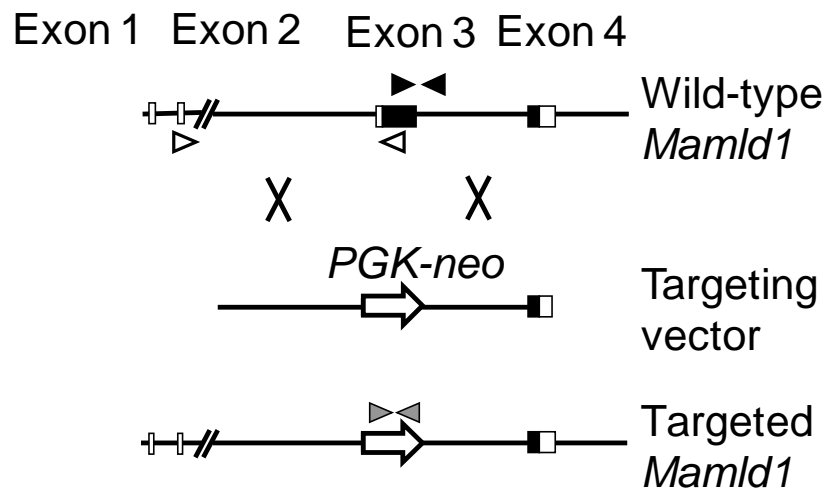


(Miyado M et al. (2012) Endocrinology 153: 6033-6040, Fig. 2 より転載)

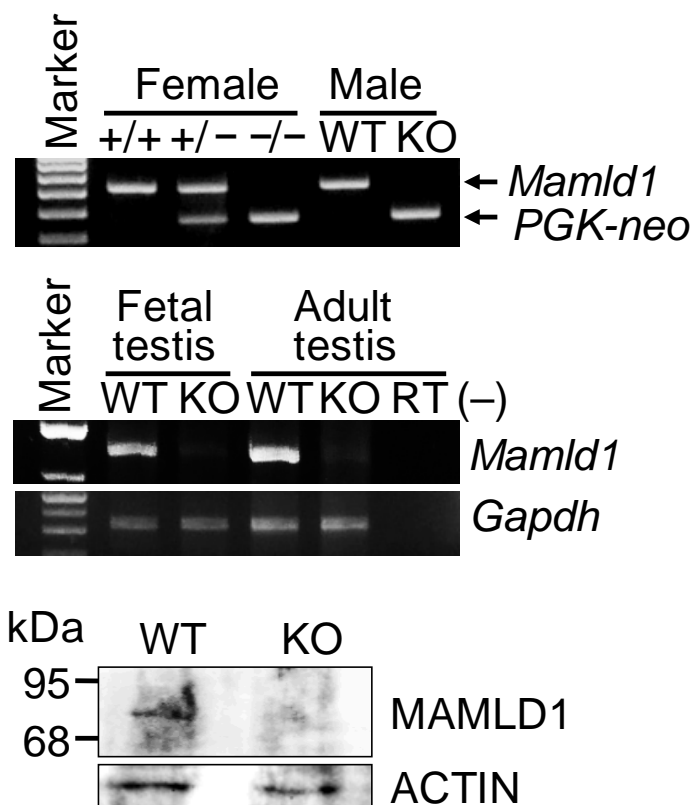
Fig. 8 野生型マウス胎仔精巣における *Mamld1* 遺伝子の mRNA 発現量

胎生中期から後期の野生型マウス胎仔精巣における *Mamld1* 遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR にて解析した。Fold Change (FC) は、内在性コントロール遺伝子である *Gapdh* に対する *Mamld1* 遺伝子の相対的な mRNA 発現量として算出した。胎生 12.5 日における *Mamld1* mRNA 発現量を 1.0 とした。*Mamld1* 遺伝子は胎生中期から後期のマウス胎仔精巣で発現しており、その発現量は経時的に増加していた。発現量増加には有意差が認められた。 $P < 0.05$ を有意差ありと判定し、赤色アスタリスクで示した。

A



B



(Miyado M et al. (2012) Endocrinology 153: 6033-6040, Fig. 1 より転載)

Fig. 9 *Maml1* 遺伝子欠損マウスの作製

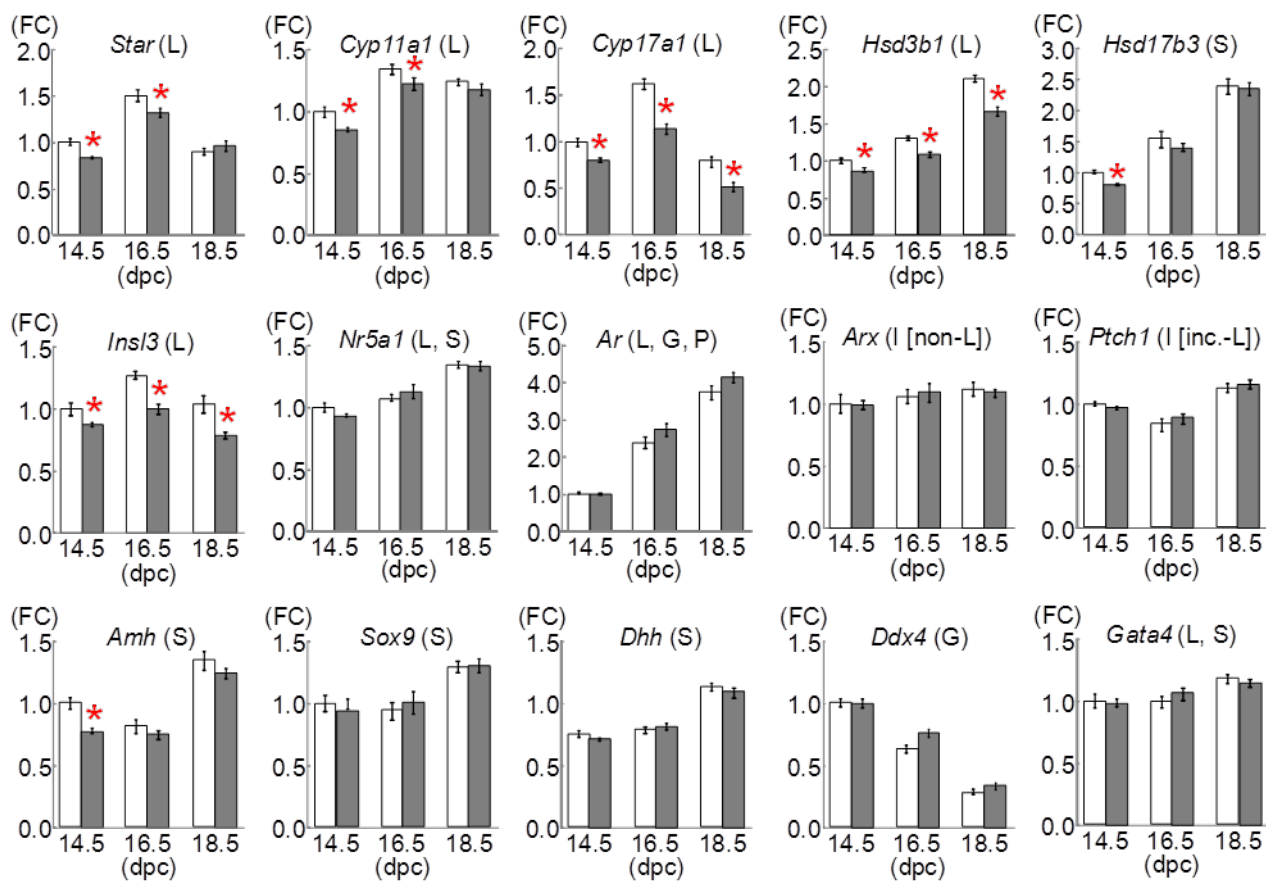
A : 遺伝子ターゲティング戦略の略図を示す。X 記号で示す相同組換えにより、*Maml1* の翻訳開始点を含むエクソン 3 の領域をネオマイシン耐性遺伝子 (*PGK-neo*) で置き換えた。

黒色箱：翻訳領域、白色箱：非翻訳領域、黒色矢印頭ペア：野生型 *Maml1* ゲノム増幅用プライマーセット、白色矢印頭ペア：野生型 *Maml1* 遺伝子転写産物増幅用プライマーセット、灰色矢印頭ペア：ネオマイシン耐性遺伝子増幅用プライマーセット。

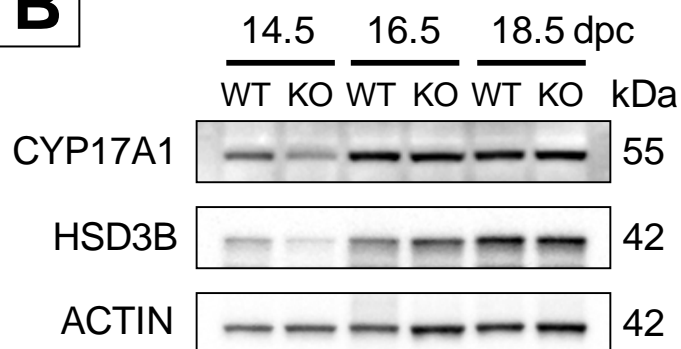
B : *Maml1* 遺伝子欠損の状態について、遺伝子型決定解析（上段）、RT-PCR 解析（中段）、ウエスタンブロット解析（下段）により確認を行った。*Maml1* 遺伝子欠損マウスの精巢において、*Maml1* 遺伝子および MAMLD1 タンパク質が検出されないことを検討し、*Maml1* 遺伝子欠損マウスが得られていることを確認した。

+/+ : 野生型雌マウス、+/- : *Maml1* 遺伝子ヘテロ欠損型雌マウス、-/- : *Maml1* 遺伝子ホモ欠損型雌マウス、WT : 野生型雄マウス、KO : *Maml1* 遺伝子欠損雄マウス、RT (-) : 逆転写酵素を含まないネガティブコントロール。

A



B



(Miyado M et al. (2012) Endocrinology 153: 6033-6040, Fig. 3 より転載)

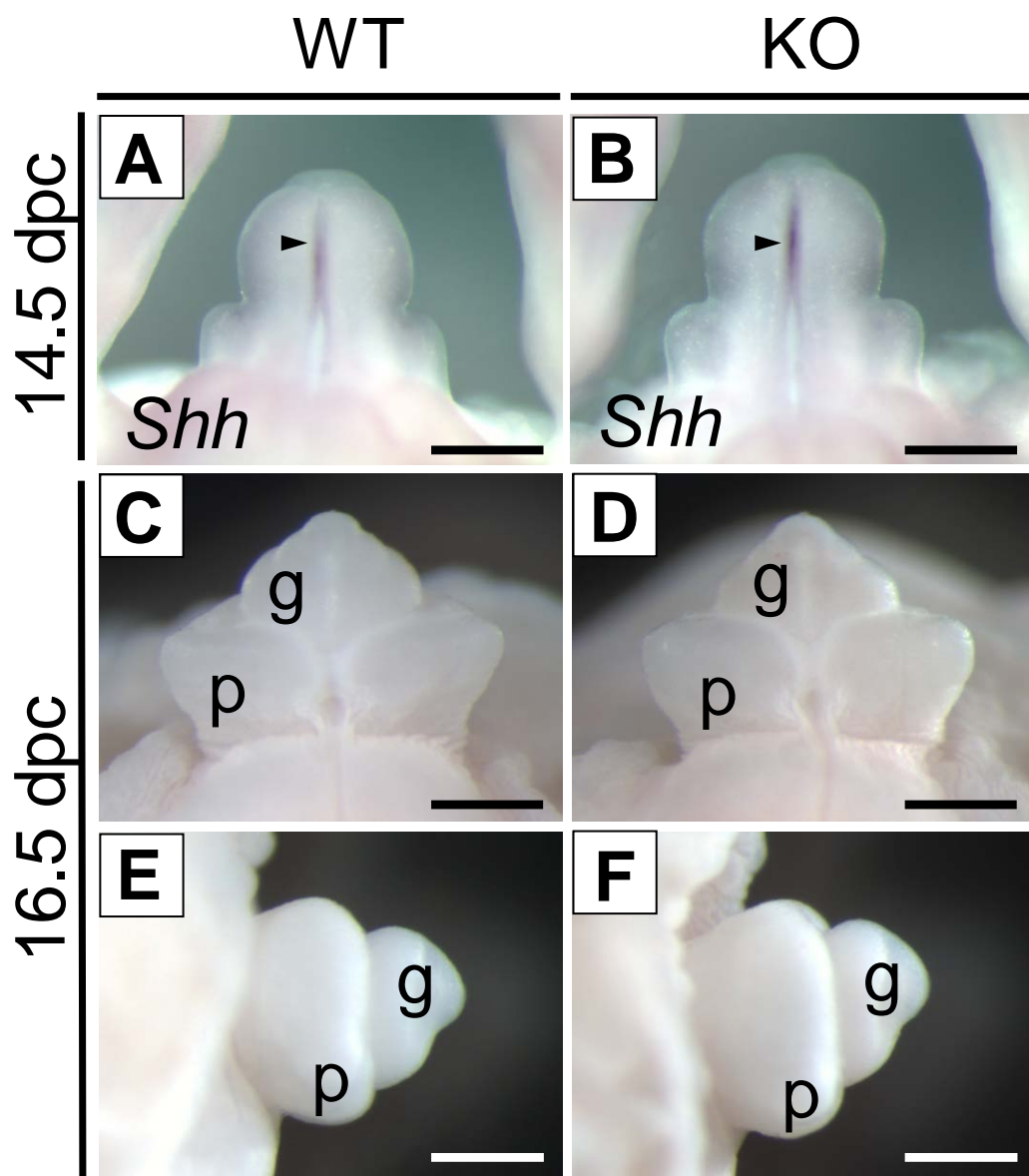
Fig. 10 胎生期の野生型と *Mamld1* 遺伝子欠損マウスの精巣における
遺伝子発現およびタンパク質発現の解析

A : 胎生 14.5 日、胎生 16.5 日、胎生 18.5 日の野生型および *Mamld1* 遺伝子欠損マウスの精巣におけるターゲット遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR にて解析した。Fold Change (FC) は、それぞれ内在性コントロール遺伝子である *Gapdh* に対するターゲット遺伝子の相対的な mRNA 発現量として算出した。それぞれのターゲット遺伝子について、胎生 14.5 日における mRNA 発現量を 1.0 とした。 $P < 0.05$ を有意差ありと判定し、赤色アスタリスクで示した。野生型マウスに比べて、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣において、ライディッヒ細胞特異的に発現する遺伝子 (*Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1* と *Ins13*) の mRNA 発現量が有意に低下していた。一方、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣において、ライディッヒ細胞以外の他の細胞（生殖細胞、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞を除く間質細胞、管周細胞）に発現する遺伝子、あるいはライディッヒ細胞と他の細胞の両方に発現する遺伝子は、野生型マウスと比べてそれらの遺伝子の mRNA 発現量に違いがなかった。

L : ライディッヒ細胞、S : セルトリ細胞、G : 生殖細胞、P : 管周細胞、I [non-L] : ライディッヒ細胞を除く間質細胞、I [inc.-L] : ライディッヒ細胞を含む間質細胞、白色棒 : 野生型雄マウス、灰色棒 : *Mamld1* 遺伝子欠損雄マウス、dpc : 胎生日齢。

B : 胎生 14.5 日、胎生 16.5 日、胎生 18.5 日の野生型および *Mamld1* 遺伝子欠損マウス精巣における CYP17A1、HSD3B のタンパク質の発現量をウエスタンブロット解析にて解析した。*Mamld1* 遺伝子欠損マウスの胎仔精巣における CYP17A1、HSD3B のタンパク質の発現量は、野生型マウスと比べて違いが認められなかった。

WT : 野生型雄マウス、KO : *Mamld1* 遺伝子欠損雄マウス、dpc : 胎生日齢。



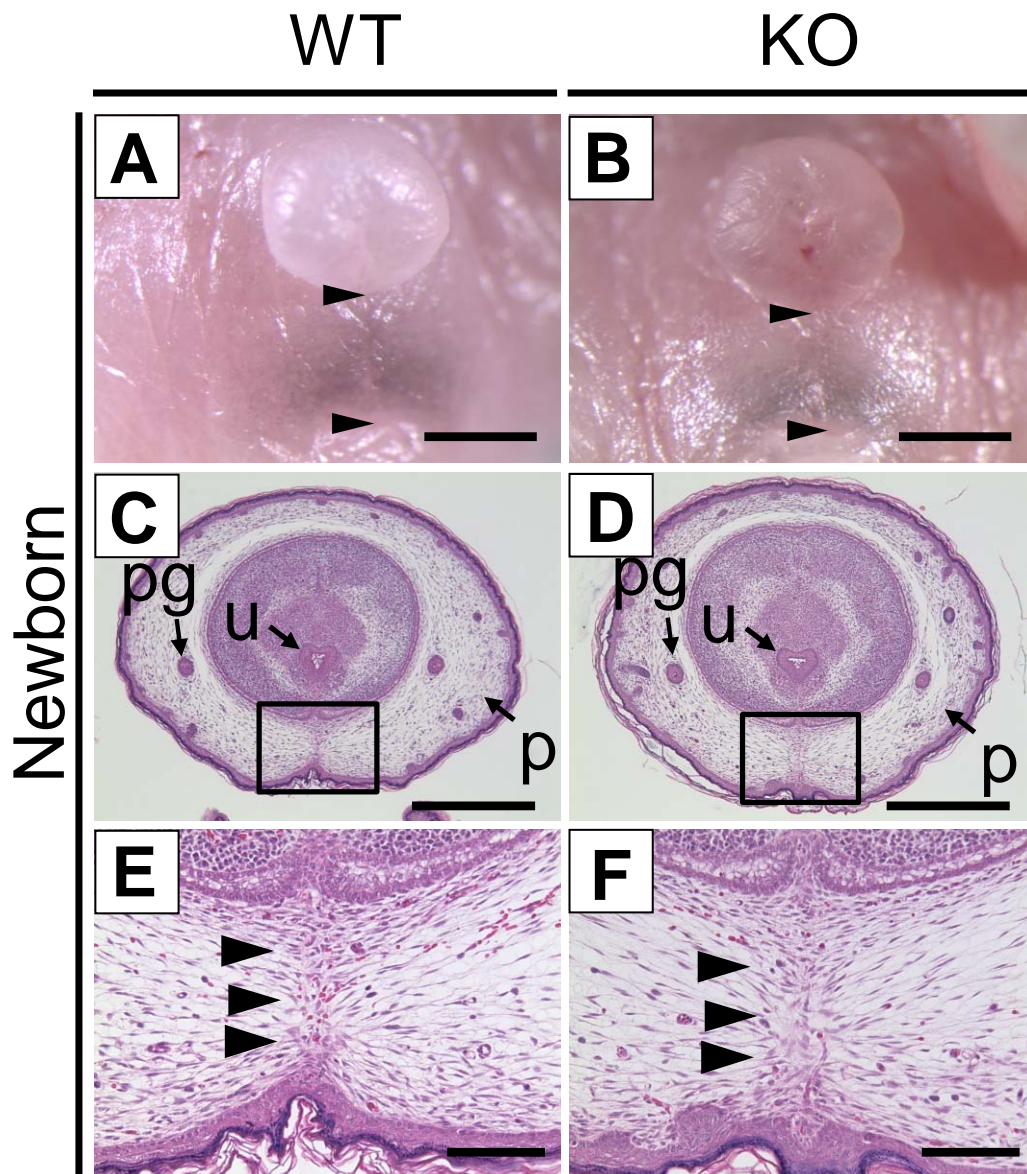
(Miyado M et al. (2012) Endocrinology 153: 6033-6040, Fig. 4 より転載)

Fig. 11 胎生期における野生型と *Mamld1* 遺伝子欠損雄マウスの外生殖器原基

A、B：胎生 14.5 日の外生殖器原基において *Shh* 遺伝子の発現解析。野生型マウスと同様に、*Mamld1* 遺伝子欠損雄マウスの尿道上皮において *Shh* 遺伝子の発現（矢印頭）が認められた。

C–F：胎生 16.5 日の外生殖器原基の外観観察。野生型マウスと同様の発生段階で、*Mamld1* 遺伝子欠損雄マウスの外生殖器原基の伸長および腹側正中で起こる尿道ヒダの融合が正常に起こっていた。

g：龟头、p：包皮、WT：野生型雄マウス、KO：*Mamld1* 遺伝子欠損雄マウス、dpc：胎生日齢、スケールバー：500 μm 。



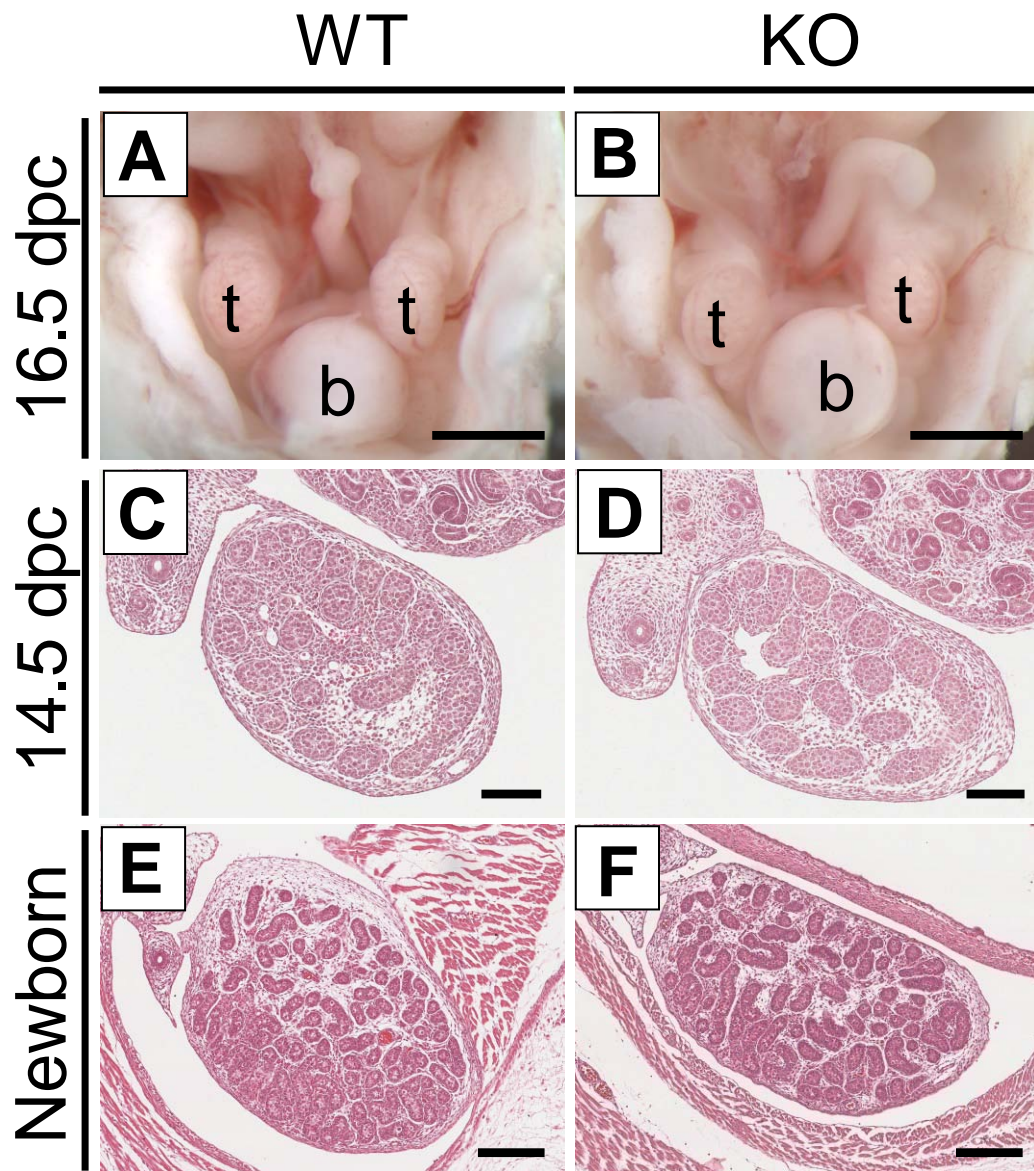
(Miyado M et al. (2012) Endocrinology 153: 6033-6040, Fig. 4 より転載)

Fig. 12 出生当日における野生型と *Mamld1* 遺伝子欠損雄マウスの外生殖器

A、B: 出生当日の外生殖器の外観。矢印頭で示す肛門性器間距離 (AGD: anogenital distance) は、*Mamld1* 遺伝子欠損と野生型雄マウスでは違いがなかった。

C-F: 出生当日の外生殖器の組織学的な解析。野生型マウスと同様に、*Mamld1* 遺伝子欠損雄マウスの外生殖器では正常な包皮の融合 (3つの矢印頭) が起きていた。

p: 包皮、pg: 包皮腺、u: 尿道、WT: 野生型雄マウス、KO: *Mamld1* 遺伝子欠損雄マウス、スケールバー: 1 mm (A、B)、500 μ m (C、D)、100 μ m (E、F)。



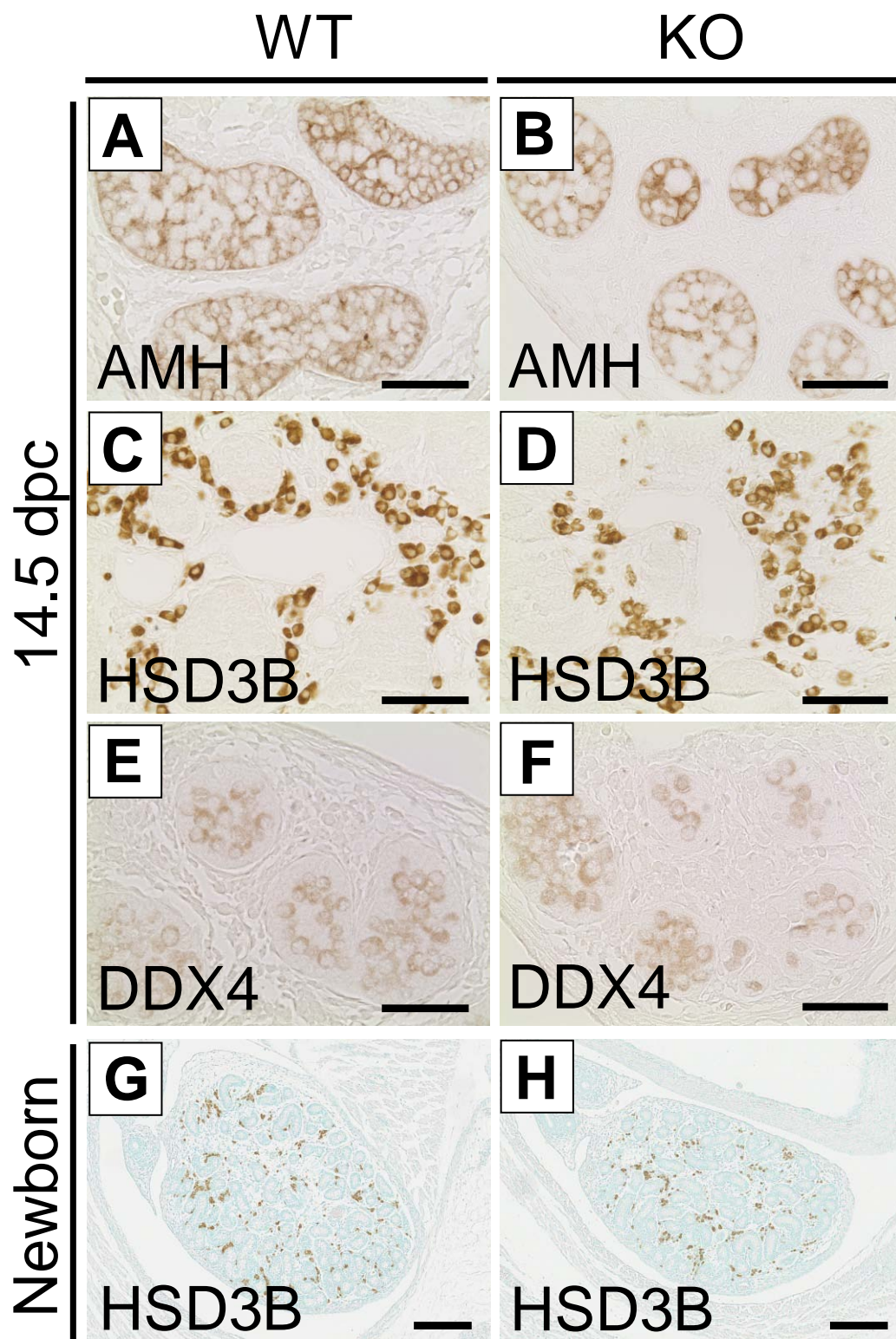
(Miyado M et al. (2012) Endocrinology 153: 6033-6040, Fig. 5 より転載)

Fig. 13 野生型と *Mamld1* 遺伝子欠損雄マウスの内生殖器

A、B：胎生 16.5 日の内生殖器の外観。*Mamld1* 遺伝子欠損と野生型雄マウスにおいて、正常な腹腔内の精巣下降とウォルフ管の発達およびミュラー管の退縮が確認された。

C–F：胎生 14.5 日および出生当日の内生殖器の組織学的な解析。*Mamld1* 遺伝子欠損と野生型雄マウスの胎仔精巣には違いがみられなかった。

b：膀胱、t：精巣、WT：野生型雄マウス、KO：*Mamld1* 遺伝子欠損雄マウス、dpc：胎生日齢、スケールバー：1 mm (A、B)、100 μ m (C、D)、200 μ m (E、F)。



(Miyado M et al. (2012) Endocrinology 153: 6033-6040, Fig. 5 より転載)

Fig. 14 野生型と *Maml1* 遺伝子欠損マウス精巣の免疫組織化学による観察

A、B：胎生 14.5 日の精巣における AMH 陽性細胞の局在。AMH はセルトリ細胞のマーカ一分子として知られており、*Maml1* 遺伝子欠損と野生型マウスの精巣において、AMH 陽性細胞の局在に違いはみられなかった。

C、D、G、H：胎生 14.5 日および出生当日の精巣における HSD3B 陽性細胞の局在。HSD3B はライディッヒ細胞のマーカ一分子として知られており、*Maml1* 遺伝子欠損と野生型マウスの精巣において、HSD3B 陽性細胞の局在に違いはみられなかった。

E、F：胎生 14.5 日の精巣における DDX4 陽性細胞の局在。DDX4 は生殖細胞のマーカ一分子として知られており、*Maml1* 遺伝子欠損と野生型マウスの精巣において、DDX4 陽性細胞の局在に違いはみられなかった。

WT：野生型雄マウス、KO：*Maml1* 遺伝子欠損雄マウス、dpc：胎生日齢、スケールバー：50 μm (A–F)、200 μm (G、H)。

TABLE 1. Comparison between *Mamld1* KO mice and their WT littermates

		KO		WT		P value
Body weight (g)	(at birth)	1.48 ± 0.03	(n = 10)	1.44 ± 0.03	(n = 10)	0.40
AGD (mm)	(at birth)	1.33 ± 0.02	(n = 10)	1.32 ± 0.02	(n = 10)	0.62
AGI (mm/g)	(at birth)	0.90 ± 0.02	(n = 10)	0.92 ± 0.02	(n = 10)	0.55
Leydig cells (HSD3B-stained cells) (number/HPF)	(at 14.5 dpc)	69.3 ± 8.2	(n = 3)	75.1 ± 7.6	(n = 3)	0.63
Testis weight (mg)	(at birth)	1.46 ± 0.08	(n = 10)	1.35 ± 0.08	(n = 10)	0.34
Intratesticular steroid metabolites	(at 18.5 dpc)					
Pregnenolone (pg/two testes)		17.9 ± 4.0	(n = 4)	15.4 ± 1.4	(n = 4)	0.57
Progesterone (pg/two testes)		16.5 ± 4.6	(n = 4)	15.0 ± 1.7	(n = 4)	0.56
17-OH pregnenolone (pg/two testes)		15.2 ± 2.9	(n = 4)	15.4 ± 1.3	(n = 4)	0.77
17-OH progesterone (pg/two testes)		10.4 ± 1.7	(n = 4)	13.5 ± 2.5	(n = 4)	0.15
Androstenedione (ng/two testes)		0.44 ± 0.15	(n = 4)	0.51 ± 0.07	(n = 4)	0.25
T (ng/two testes)		2.31 ± 0.30	(n = 4)	2.38 ± 0.31	(n = 4)	0.89

Expressed as mean ± SEM. HPF, high power field (234.1 μm × 175.5 μm).

(Miyado M et al. (2012) Endocrinology 153: 6033-6040, Table 1 より転載)

Mamld1 遺伝子欠損と野生型雄マウスの特性の比較

出生当日における *Mamld1* 遺伝子欠損雄マウスの体重は、野生型マウスと比べて違いがなかった。また、*Mamld1* 遺伝子欠損雄マウスの肛門性器間距離（AGD : anogenital distance）および肛門性器間距離を体重で割った値（AGI : AGD index）は、野生型マウスと比べて違いがなかった。さらに、出生当日の精巣重量および胎仔精巣内の T（テストステロン）とその他のステロイド代謝産物含有量は、*Mamld1* 遺伝子欠損マウスと野生型マウスで違いがなかった。

TABLE 2. Cross-mating experiments for *Mamld1*

Offsprings produced by cross-mating between <i>Mamld1</i> KO male mice (<i>n</i> = 5) and WT female mice (<i>n</i> = 24)					
Sex and <i>Mamld1</i> genotype	Male (–)	Male (+)	Female (–/–)	Female (+/–)	Female (+/+)
Number and frequency	n/o	89 (45.6%)	n/o	106 (54.4%)	n/o
Offsprings produced by cross-mating between <i>Mamld1</i> KO male mice (<i>n</i> = 14) and heterozygous female mice (<i>n</i> = 49)					
Sex and <i>Mamld1</i> genotype	Male (–)	Male (+)	Female (–/–)	Female (+/–)	Female (+/+)
Number and frequency	84 (23.6%)	96 (27.0%)	94 (26.4%)	82 (23.0%)	n/o
Offsprings produced by cross-mating between WT male mice (<i>n</i> = 6) and WT female mice (<i>n</i> = 12)					
Sex and <i>Mamld1</i> genotype	Male (–)	Male (+)	Female (–/–)	Female (+/–)	Female (+/+)
Number and frequency	n/o	58 (59.8%)	n/o	n/o	39 (40.2%)
Offsprings produced by cross-mating between WT male mice (<i>n</i> = 9) and heterozygous female mice (<i>n</i> = 46)					
Sex and <i>Mamld1</i> genotype	Male (–)	Male (+)	Female (–/–)	Female (+/–)	Female (+/+)
Number and frequency	86 (25.3%)	85 (25.0%)	n/o	84 (24.7%)	85 (25.0%)

WT or +, WT; KO or –, *Mamld1* KO; n/o, not obtained.

(Miyado M et al. (2012) Endocrinology 153: 6033-6040, Table 2 より転載)

Mamld1 遺伝子欠損マウスの交配実験

Mamld1 遺伝子は X 染色体上にあるため、一度の交配では全ての遺伝子型の仔を得ることはできない。そこで、野生型と *Mamld1* 遺伝子ヘテロ欠損の雌マウス、野生型と *Mamld1* 遺伝子ヘミ欠損の雄マウスをそれぞれ組み合わせて交配を行った。雌がヘテロ欠損型の場合、雄の遺伝子型に関係なく、得られた産仔は、それぞれの遺伝子型が 25% 前後となり、正常なメンデル比を示した。