

令和 4 年 9 月 5 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06470

研究課題名(和文) X0型の性染色体をもつトゲネズミの性は精子が決めるのか？ X/O精子の機能解析

研究課題名(英文) Do sperm preselect the sex of Japanese spiny rats (Genus Tokudaia) which lost their Y chromosome?

研究代表者

越本 知大 (Koshimoto, Chihiro)

宮崎大学・フロンティア科学総合研究センター・教授

研究者番号：70295210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：日本にはY-染色体を持たないX0-型性染色体を有するトゲネズミ(Tokudaia属)が生息する。本種は絶滅危惧種であることから研究活用が困難であるが、我々はX0型染色体構成を有する哺乳類成熟精子の性染色体構成を解析して、これらの減数分裂機構を直接議論できる根拠を提示することを試みた。しかしながら希少な試料にアプローチする前段階で複数のモデル齧歯類を対象にFACSを用いた精子分離およびFISH法によるX-、Y-精子の分別を試みたが、いずれにおいても大きな成果が得られず研究を継続している。一方で野生由来齧歯類の生殖工学的アプローチに資する副次的な情報をいくつか獲得することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の性を決定するY染色体の進化生物学的な意義を検討するため、X0型性染色体を有する日本固有種を対象としてその性決定機構の検討を試みたが、直接的な証拠を提示するための実験条件の設定に至ることができず、当初の主目的は達成できなかった。しかし本研究を進めるにあたって、絶滅危惧の希少種を対象として基礎研究を実施するために必要な野生由来の実験動物管理、または生殖工学に関する幾つかの基礎的知見が集積できた。今後はこれらの知見を活用して、当初の目的でX0-型を示す哺乳類における精子の性染色体構成比の解明と受精後の生殖細胞ゲノムの動態改正を継続していきたい。

研究成果の概要(英文)：The spiny rat (genus Tokudaia), which has X0-type sex chromosomes without Y-chromosomes, inhabits only in Japan. Although this species is endangered and therefore difficult to utilize in fundamental research, we have attempted to analyze the sex chromosome composition of mature mammalian spermatozoa with X0-type chromosome configuration to provide evidence for a direct discussion of these meiotic mechanisms. However, as a preliminary step to approach rare samples, we have attempted to isolate sperm using FACS and segregate X- and Y-sperm by FISH in several model rodents, but without significant results in either case, we are continuing our research. On the other hand, we have obtained some secondary information that contributes to the reproductive engineering approach for wild-derived rodents.

研究分野：実験動物学

キーワード：性染色体 トゲネズミ属 減数分裂 O-精子 実験動物管理 生殖工学技術

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の性は X-と Y-の性染色体の組合せで決定され、個体の雌雄は Y 染色体を有する雄の生殖細胞である。これに関連して「Y-染色体消失仮説」を J. A. M. Graves が 2006 年に提唱し、哺乳類の雄は絶滅に向かう可能性が示唆され、これを契機に、この説の妥当性が議論となっていた。我が国の固有種であるトゲネズミ(*Tokudaia*)属の齧歯類は進化の過程で雌雄ともに XO-型の奇数の染色体型を示す形質を獲得して、Y-染色体に依存せず雌雄分化する特異的な性決定様式を示す¹⁾ことが知られており、Y 染色体の消失が種の維持に及ぼす影響を直接検証するモデルとして位置付けることができるとして、世界的にも注目されていた。トゲネズミ属の特殊な性染色体構成は 1970 年代には知られており、性決定に重要な SRY 遺伝子が欠損することも知られていた。一方で本種は世界でも沖縄奄美諸島にのみ生息する絶滅危惧種で、国の天然記念物にも種指定されていたため、野生個体を用いた研究はほぼ不可能であった。一方で我々は野生由来齧歯類の研究資源化に向けた取り組みを続けており、系統分類学上トゲネズミ属に最も近縁なアカネズミ(*Apodemus*)属の齧歯類のうち、アカネズミ(*A. speciosus*)やヨーロッパモリネズミ(*A. sylvaticus*)など研究用コロニーを確立して^{2,3)}、病態モデル化や環境指標化などに活用してきた⁴⁻⁷⁾。こうした流れの中でアマミトゲネズミ(*T. Oshimensis*)についても調査研究を続けて^{8,9)}小規模ながら実験室コロニーを確立し¹⁰⁾、2018 年には人工繁殖にも成功していたため、これらを対象とした世界で唯一の研究環境が整いつつあった。

引用文献

- 1) 土屋公幸: 日本産ネズミ類の染色体変異、*哺乳類科学* **21** (1981): pp. 51-58 DOI: https://doi.org/10.11238/mammalianscience.21.1_51
- 2) 酒井悠輔・坂本信介・加藤悟郎・岩本直治郎・尾崎良介・江藤 毅、篠原明男・森田哲夫・越本知大: アカネズミ(*Apodemus speciosus*)の自然交配による繁殖を誘導できる飼育交配手法、*哺乳類科学* **53** (2013): pp. 57-65 DOI: <https://doi.org/10.11238/mammalianscience.53.57>
- 3) 越本知大: 実験動物としてのアカネズミ、*日本のネズミ* (本川雅治 編、東京大学出版 第 7 章) (2016): pp. 151-168 ISBN 978-4-13-060231-0
- 4) T. Eto, S. H. Sakamoto, Y. Okubo, C. Koshimoto, A. Kashimura, and T. Morita: Huddling facilitates expression of daily torpor in the large Japanese field mouse *Apodemus speciosus*. *Physiol. Behav.* **133** (2014): pp. 22-29. DOI: 10.1007/s13105-014-0353-0.
- 5) S. H. Sakamoto, S. N. Suzuki, C. Koshimoto, Y. Okubo, T. Eto, and R. O. Suzuki: Trap distance affects the efficiency and robustness in monitoring the abundance and composition of forest-floor rodents. *J. Forest Res.* **20** (2015): pp. 151-159. DOI: 10.1007/s10310-014-0447-0.
- 6) T. Eto, R. Ozaki, G. Kato, S. H. Sakamoto, C. Koshimoto, T. Morita: Flexibility of Digestive Tract Morphology in Response to Environmental Conditions in the Large Japanese Field Mouse *Apodemus speciosus*. *Mammal Study.* **41** (2016): pp. 71-76. DOI: 10.3106/041.041.0204
- 7) T. Eto, S. H. Sakamoto, Y. Okubo, Y. Tsuzuki, C. Koshimoto, T. Morita: Individual variation of daily torpor and body mass change during winter in the large Japanese field mouse (*Apodemus speciosus*). *J. Compar. Physiol. B.* **188** (2018): pp. 1005-1014. DOI: 10.1007/s00360-018-1179-9.
- 8) 城ヶ原貴通・山田文雄・越本知大・黒岩麻里・木戸文香・中家雅隆・望月春佳・村田知慧・三谷 匡 トゲネズミ研究の最近 3 ~ 琉球諸島哺乳類保全の次世代を担う者達 ~、*哺乳類科学* **53** (2013): pp. 170-173 DOI: <https://doi.org/10.11238/mammalianscience.53.170>
- 9) 城ヶ原貴通・越本知大・安田雅俊・小高信彦・黒岩麻里: トゲネズミ研究の最近(4) ~ 保全と生命科学研究を繋ぐ ~、*哺乳類科学* **58** (2018): pp. 103-104 DOI: <https://doi.org/10.11238/mammalianscience.58.103>
- 10) 篠原明男・山田文雄・櫻村 敦・阿部慎太郎・坂本信介・森田哲夫・越本知大: 絶滅危惧種アマミトゲネズミ *Tokudaia osimensis* の実験室環境における長期飼育、*哺乳類科学* **53** (2013): pp. 335-344 DOI: <https://doi.org/10.11238/mammalianscience.53.335>

2. 研究の目的

Y染色体を欠損しながら、哺乳類一般と同様に雌雄分化して有性生殖によって種を維持するアマミトゲネズミの性分化特性を明確にすることで、Y染色体の進化生物学的意義を考察する知見を得ることを研究の最終ゴールに設定した。またそれに至るための副次的な過程として、マウスやラットで確立されてきた実験動物学的手法を、トゲネズミ属をはじめとした野生由来齧歯類に活用する多様な手法を検討し、研究資源化に向けて必要な基礎的な情報の集積にも努めた。アマミトゲネズミはY染色体が消失してXO型の性染色体構成であることから、減数分裂によって生じる生殖細胞は雌雄の区別なく性染色体がX-型ないしはO-型となる。つまり半数の生殖細胞が性染色体を欠損する(O-型)と予測されるが、直接的な証拠は示されていない。さらにこれらの卵と精子が受精することで生まれる次世代では、性染色体型がXX-、XO-、OO-の個体が1:2:1で出現すると予測される。ところが実際のアマミトゲネズミ野生個体群の性染色体は雌雄共に全てXO-型を維持して、種として安定している。トゲネズミが産生する生殖細胞の性染色体構成はどのようになっているのであろうか？XX-型、OO-型の個体はどの段階でどの様に排除されるのだろうか。基礎研究のアプローチが困難な絶滅危惧の希少種を対象に、Y染色体欠損の進化生物学的な意義を考察し、哺乳類の有性生殖についての考察を深めるために、アマミトゲネズミの特異的な性決定機構の一端を明らかにするため、減数分裂を途中で停止した生殖細胞である卵子と異なり生殖巣内で減数分裂を完了して多量に産生される精子を対象に、(1)性染色体構成を明らかにし、O-精子が産生されていた場合には発生過程におけるゲノム動態の検証までを目指すために、(2)マウス卵子との間で異種顕微授精キメラ胚モデルの作出を検討したいと考えた。なお絶滅危惧種であるアマミトゲネズミの希少な試料を用いて実験を実施するには、動物個体のコロニーを安定して飼育繁殖し維持する必要があるのみならず、実験動物マウスでは普遍的な技術として確立している種々の基盤的・先鋭的な生殖工学技術を野生由来齧歯類に適用しなければならない。そこで、(3)近縁野生種であるアカネズミ属をはじめとした野生由来齧歯類をモデルとして、コロニー維持のための基礎技術や麻醉法、体外受精、顕微授精等の生殖工学的手法の開発を同時並行的に進める必要があり、野生種を用いたこれら関連技術の開発にも取り組んだ。

3. 研究の方法

(1)トゲネズミ精子のポピュレーション解析

トゲネズミ成熟精子の性染色体構成比を検証する方法として、当初はスミア標本をレーザーマイクロダイセクション法によって分離し、設定した性染色マーカーと常染色体上の対照マーカーを対象としたシングルセルマルチプレックスPCRにより検出する手法を検討した。しかし評価効率が高くない上に実験条件も特殊かつ容易でないことから第一選択肢から除外し、FACSによるポピュレーション解析を行うこととした。このため、Bechton Dechinsco社のFACSCaliberを用いた解析条件の設定を、マウス(*Mus*属)およびより近縁のヨーロッパモリネズミ(*Apodemus sylvaticus*)のX-/Y精子分離をモデルに行い、トゲネズミの希少な試料を解析する前段階と位置付けた。成熟マウスおよびヨーロッパモリネズミの精巣上体から回収した精子は冷エタノールにより固定処理し、二本鎖DNAを標準的な手法Hoechst33342、もしくはC548 Cell Cycle Assay Solution Deep Redで蛍光染色した。前固定時間および蛍光染色時間条件を検討しながらFACSCaliberによるFSC/SSCのポピュレーション解析の指摘条件を探索した。

(2)マウス卵子との間での異種顕微授精キメラ胚モデルの作出の試み

トゲネズミ精子由来ゲノムの受精後の動態・機能解析を行うことを目的として、マウス卵子への異種精子顕微授精モデルの構築を試みた。その前段階として、ES細胞が樹立されているうえマウス胚でのキメラ形成能が確認されているラットおよびヨーロッパモリネズミを対象として技術確立を目指した。

(3)野生由来齧歯類をモデルとした関連技術の開発

トゲネズミのストレス測定による人工環境順化の評価: 野生下での絶滅が危惧されるトゲネズミは飼育下でも繁殖率が極めて低く、人工環境下での高ストレスがその抑制要因になっていると考えられた。そこでファウンダー野生個体を飼育室に導入した直後からのストレス状態の変動を、尿中コルチコステロン濃度を指標として評価し、コロニーの拡大に向けた人工繁殖率の改善法を検討した。

近縁モデル種を対象とした生殖工学基盤確の探索: トゲネズミ属と系統分類学的に最も近縁のアカネズミ属齧歯類であるヨーロッパモリネズミを研究対象として、マウス卵との間の異種間キメラ作出のために必要な一連の生殖工学技術である体外受精法と顕微授精法、さらにはその前段階技術である卵胞卵子の体外成熟法などについて検討した。

野生由来齧歯類の至適麻醉方法の検討: トゲネズミ属と同等の体サイズで、これまでほとんど麻醉条件が検討されていない野生由来齧歯類であるデグー (*Octodon degus*) を用いて、実験動物で一般的な吸入麻醉薬を用いた至適麻醉条件を検証した。検討した麻醉薬は実験動物で一般的に用いられ、動物福祉的にも推奨されるセボフルラン、イソフルランとし、連続測定した脳波を指標とした指摘条件を決定することで、トゲネズミの麻醉条件検討のモデルケースとした。

4. 研究成果

(1) トゲネズミ精子のポピュレーション解析

冷エタノールによる前固定をせず Hoechst33342 染色のみを行なったマウス精子を、FACSCaliber を用いて FSC/SSC 分布によるゲーティングを行なったが、蛍光量の差による明確な集団の分離は認められなかった。一方で、冷エタノールで前固定し、C548 で染色した場合に、蛍光量の差による二峰性の分布が確認できた (図 1)。ただこの分離の再現性は低く、明瞭かつ安定した条件の確立には至らなかった。さらに同条件で、より近縁のアカネズミ精子を対象とした分離を試みたが、マウスのような二峰性の分布の確認には至らなかったことから、希少なトゲネズミ精子試料を用いた実験には到達できなかった。そこで、精子 FISH 法による別アプローチによる判定法を検討したが、こちらもマウスおよびアカネズミ精子を用いた条件設定の段階で十分な進展が見られず、トゲネズミ精子を用いた実験に移行する前段階での条件設定が続いている。

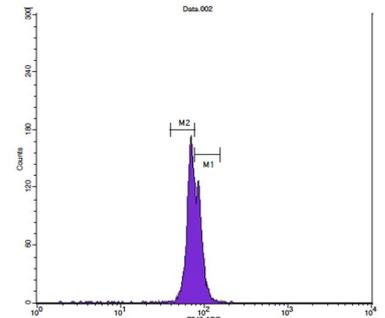


図 1 C548 染色によるマウス精子の分離

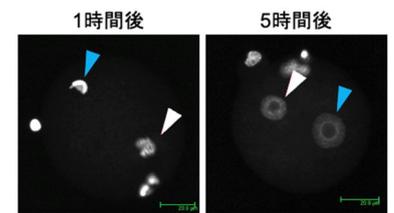


図 2 ヨーロッパモリネズミ精子を顕微注入したマウス卵の前核形成

(2) マウス卵子との間での異種顕微授精キメラ胚モデルの作出の試み

本実験実施に必要な技術を確認する目的で、マウス卵子にラットないしはヨーロッパモリネズミの精子を顕微注入してキメラ胚を作出した後に卵子中の精子頭部を Hoechst33342 で染色し、前核形成の動態を観察した。その結果、いずれの種の精子を用いても、雌雄両配偶子由来の前核形成が観察されたが、ラット精子の発生は前核期段階で停止した。一方でヨーロッパモリネズミ精子は前核形成が数時間遅延する傾向を示したが、mKSOM 培地で培養すると 24 時間後には注入胚の 30% が 2 細胞期に、96 時間後には 10% が胚盤胞期に発生することがわかった。

(3) 野生由来齧歯類をモデルとした関連技術の開発

トゲネズミのストレス測定による人工環境順化の評価: 野生環境から導入したアマミトゲネズミ雄 4 頭、雌 3 頭の 120 日間の単独飼育下でのストレスを評価するため、指標とした尿中コルチコステロン濃度の変化を図 3 に示した。導入した個体は捕獲時体重から当歳齢と推定され、観察対象とした個体は全て順調な増体がみられ、見かけ上は人工飼育に順応していると推定された。しかしストレス指標は変動が大きいものの、3 ヶ月間で低下する様子は見られず、長期飼育しているヨーロッパモリネズミのストレス負荷試験時と同等の値を示した (デー

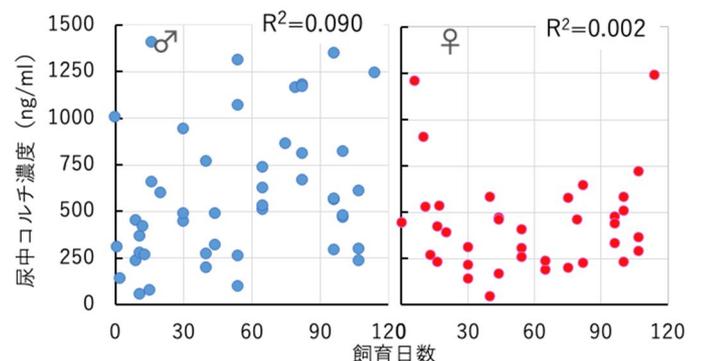


図 3 人工飼育開始直後のトゲネズミのストレス評価
尿中コルチコステロン濃度を指標とした

タ非表示)ことから、数ヶ月間単位では人工環境に適応できない可能性が示唆された。さらに、これらを繁殖のため雌雄同居飼育すると、コルチコステロン濃度は2.2倍に有意に上昇したことから、効率的な繁殖誘導にはストレス要因を同定して除去する必要があることが強く示唆された。

近縁モデル種を対象とした生殖工学基盤確の探索: アマミゲネズミの近縁種であるヨーロッパモリネズミ

ズミ PMS/GnRH 法で排卵を誘起したところ、M

期卵は 33.3%で、多くの排卵卵子が形態異常であることがわかった。また卵巣には多くの未排卵卵胞が残余していることから、未成熟卵子を回収して体外成熟を試みた。その結果、図 4a に示すとおり、mHTF もしくは mCZB 培地中でマウスとヨーロッパモリネズミの卵胞卵子を成熟培養した場合、後者の体外成熟率が有意低い (mHTF: 63.1% vs. 35.5%, mCZB: 45.2% vs. 30.4%)ことが、さらに図 4b に示すとおり、成熟時間が有意に短い(8-12 時間 vs.5-8 時間)ことが示され、卵子の体外成熟条件に有意差があることがわかった。次にヨーロッパモリネズミ排卵卵子を用いて、マウスで用いられる一般的な方法

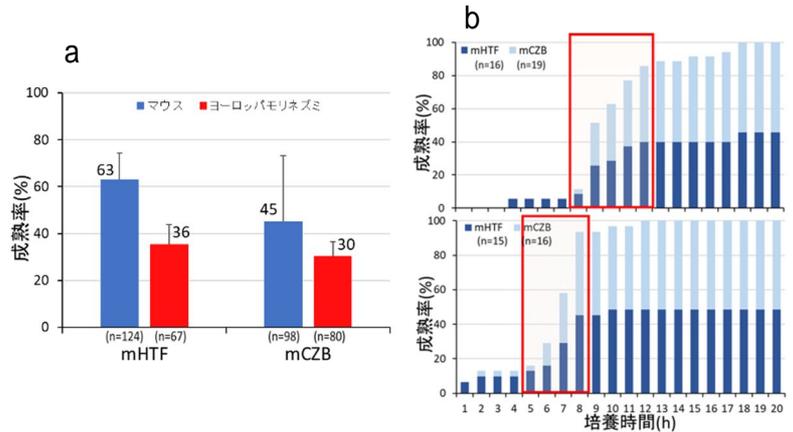


図 4 異なる培地中でのマウスおよびヨーロッパモリネズミの卵胞卵子の a)体外成熟率と b)成熟時間

で体外受精したが、雌性前核が確認されるのみで(図 5)、受精卵は得られなかった(マウス:モリ=86% vs. 0%)。このため、顕微授精法による受精卵作出を試みた。ところが本種卵子の細胞膜はマウス卵子と比べて極めて脆弱で、PEZO を用いて 10 μm の精子注入針を刺入したところ細胞が崩壊し、形態保持が困難であることがわかった(図 6)。そこで細胞膜の流動性の変化を期待して培地温度を 20、27、31、37 に設定し、さらに 5μm 注入針自作し刺入して卵子崩壊までの時間を比較した。その結果、培地温度 27 で 5μm の注入針を用いることで卵子崩壊までの時間が有意に延長できたが(p<0.05)、崩壊を完全に抑止することはできず、顕微授精による受精卵作出にも更なる方法の改善が求められた。

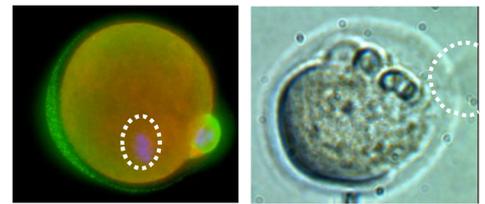


図 5 受精 6 時間後のヨーロッパモリネズミ卵子 雌性全角(点線)のみが確認された
図 6 ICSI 後のヨーロッパモリネズミ卵子 細胞質を噴出して崩壊する。

野生由来齧歯類の至適麻醉方法の検討: 成熟デグー雌個体 2 頭と雄個体 1 頭および対照として 5 ヶ月齢のウイスターラット雄個体 4 頭に対して指摘麻醉条件を検討した。動物に対してセボフルランないしはイソフルランを流量 5.0L/ min、濃度 4%で吸入して麻醉導入した後に、流量 1.0L/min、濃度 1-4%の 4 段階で順次 3 分ずつ維持した。その間、深麻醉下で出現する特徴的な脳波型(バーストサプレッション)中の平坦波形出現時間の総計を指標として麻醉深度をラットと比較して評価した。その結果、異なる濃度のイソフルランまたはセボフルラン麻醉ともに 20 分間の総平坦時間は、デグーでは両麻醉薬とも濃度 4%の場合でのみ優位に延長した(p<0.05 図 7)。一方でラットでは濃度 3%以上でイソフルランの方がセボフルランよりも総平坦時間が有意に長かった(p<0.05, 図 7)。すなわち両麻醉ともに動物種によって至適条件が異なっており、デグーの麻醉維持濃度はラットよりも高く設定する必要性が示唆された。希少種であるアマミゲネズミの試料採取等を麻醉下で実施する際には、条件設定を慎重に行う必要があることが改めて示された。

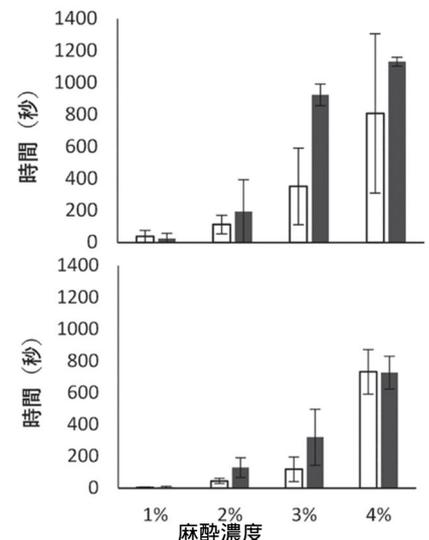


図7 イソフルラン(上)とセボフルラン(下)麻醉で出現する20分あたりの平坦脳波出現時間(:デグー、 :ラット)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 緒方穂波・前山賢太・林扶充子・仮屋博敬・川辺敏晃・名倉悟郎・城ヶ原貴通・篠原明男・越本知大	4. 巻 35
2. 論文標題 希少固有種アマミトゲネズミの実験動物化に向けた飼育ストレス評価の試み	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 九州実験動物雑誌	6. 最初と最後の頁 59-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 伊海結貴・七條宏樹・名倉悟郎・篠原明男・越本知大	4. 巻 37
2. 論文標題 脳波測定を活用したデグー（Octodon degus）のセボフルラン及びイソフルラン吸入麻酔特性の検討	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 九州実験動物雑誌	6. 最初と最後の頁 43-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 稲岡志織・前田麻乃加・名倉悟郎・篠原明男・中家雅隆・越本知大
2. 発表標題 ヨーロッパモリネズミの生殖工学技術確立に向けた未成熟卵の体外成熟培養
3. 学会等名 第38回九州実験動物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊海結希・七條宏樹・名倉悟郎・篠原明男・越本知大
2. 発表標題 脳波測定を活用したデグー（Octodon degus）のセボフルラン及びイソフルラン吸入麻酔特性の検討
3. 学会等名 九州実験動物研究会臨時発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横上由惟・名倉悟郎・篠原明男・中家雅隆・越本知大
2. 発表標題 ヨーロッパモリネズミ(Apodemus sylvaticus)の生殖工学技術の改善に向けた検討
3. 学会等名 第39回九州実験動物研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹口加那子・Narantsog Choijookhuu・名倉悟郎・篠原明男・菱川善隆・越本知大
2. 発表標題 ヨーロッパモリネズミ(Apodemus sylvaticus)の誘起排卵卵子及び卵胞卵子の蛍光免疫染色による形態的解析
3. 学会等名 第39回九州実験動物研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三谷 匡 (Mltani Tasuku) (10322265)	近畿大学・生物理工学部・教授 (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------