

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月5日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780257

研究課題名（和文）雄ゲノムのみ由来する個体&lt;Paternal-derived mouse&gt;の作製

研究課題名（英文） Generation of mice containing only paternal genome

研究代表者

大塚 沙織（OTSUKA SAORI）

北海道大学・獣医学研究科・特任助教

研究者番号：10566152

研究成果の概要（和文）：MRL/MpJ（MRL）マウスに出現する精巣内卵細胞の責任遺伝子は少なくとも2つあり、1つはY染色体に、もう1つはホモ劣性を示し、常染色体上に存在することがわかった。また、MRLマウス胎子精巣では、胎齢（E）12.5～14.5にかけて、精巣の頭側辺縁や中腎との境界部に位置する一部の性染色体組成XYの始原生殖細胞が減数分裂に移行し、卵細胞へと分化することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The testicular oocyte-producing pathway has at least 2 responsible genes, one on Chromosome Y and the other on autosome. The autosomal causative genes are suggested to be homozygous recessive. In addition, some XY primordial germ cells located in the vicinity of the rete testis or at the cranial edge of the fetal testis enter meiosis from E12.5-14.5 and differentiate as oocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・畜産獣医学・基礎畜産学

キーワード：形態、MRL/MpJマウス、精巣内卵細胞、性分化、減数分裂、生殖腺、生殖細胞

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 哺乳類の性分化

哺乳類の性は、精子のもつ性染色体によって受精時に決まるが、生殖腺、および生殖細胞は本来、雄にも雌にもなれる性質を有する。生殖腺の性分化は胎子期に雄の生殖腺体細胞がY染色体上の性決定因子であるSry（sex determining region on Y chromosome）を発現し、精巣への分化を誘導することから始まる。一方、生殖細胞はその性染色体組成

に関わらず、胎子期に減数分裂に移行して卵細胞となる資質を有するが、雄では周囲の体細胞が減数分裂移行を阻害し、生殖細胞を精子形成細胞へと分化させる。この機構により、雌では卵のみが、雄では精子のみが産生される。

## (2) MRL/MpJマウスの精巣は卵細胞を産生する

哺乳類ではキメラ動物、卵精巣や半陰陽を

除き、雄が卵細胞を産生するという報告はない。しかしながら、申請者は自己免疫疾患モデルとして知られる MRL マウスの精巣精細管内に卵細胞を発見した。精巣内卵細胞は、透明帯や卵胞上皮細胞など、卵巣内卵細胞と類似した形態学的特徴を呈し、生後 12 日目には精子受容能を有していた。さらに胎子期の精巣では、減数分裂、ならびに卵細胞マーカー陽性の生殖細胞が精巣辺縁や中腎との境界部付近に観察された。これらのことは、MRL 胎子精巣内では一部の始原生殖細胞が減数分裂に移行して卵細胞へと分化し、精子発生と卵子発生が同時進行することを示す。

### (3) 責任遺伝子は Y 染色体に存在する

MRL マウスと精巣内卵細胞を産生しない C57BL/6 (B6) マウスとの間で作出した F1 マウスの観察から、本表現型には複数の遺伝子が関与し、中でも責任遺伝子の少なくとも 1 つは Y 染色体にあることがわかった。MRL マウスの祖先系統 (B6、C3H/H3、AKR) における本表現型を検証した結果、AKR マウスでのみ精巣内卵細胞が観察された。さらに、Y 染色体上の Sry に着目、配列を様々な近交系マウス間で比較したところ、精巣内卵細胞を産生する MRL マウスと AKR マウスでのみ、Sry の CAG リピートの多型が観察された。これらのことから、本表現型は AKR マウスに由来し、Sry の多型と関連することが示唆された。

## 2. 研究の目的

(1) 精子しか産生しないはずの精巣で卵細胞が産生されるメカニズムを明らかにし、哺乳類における生殖腺、および生殖細胞の分化機構を解明する。

(2) 精巣内卵細胞を用いて雄由来のゲノムのみを有する個体 <Paternal-derived mouse> を作出することで、雄性単性生殖の可能性を検証する。

## 3. 研究の方法

(1) 遺伝的背景が精巣内卵細胞産生に与える影響の解析

MRL マウスの雄と様々な近交系マウス (A/J、B6、BALB/c、C3H/He、DBA/2) の雌の間で F1 を作製し、マウスの遺伝的背景が、精巣内卵細胞産生に与える影響を観察した。

### (2) コンソミックマウスの作出と解析

Y 染色体以外にも責任遺伝子を含む染色体があるか検証するため、Y 染色体のみが MRL マウス (B6-Y<sup>MRL</sup>)、その他は B6 マウスに由来

するコンソミックマウスと、逆に Y 染色体のみが B6 マウス、その他が MRL マウスに由来するコンソミックマウス (MRL-Y<sup>B6</sup>) を作出、精巣内卵細胞を産生するかどうか解析した。

### (3) MBM マウスを用いた QTL 解析

精巣内卵細胞形成に関与する遺伝子座を明らかにするため、MBF1 雌マウスと MRL 雄マウス間で作出した MBM マウスを用いて QTL 解析を行った。

### (4) 精巣内卵細胞の性染色体組成の解明

精巣内卵細胞の減数分裂進行状況を明らかにし、配偶子としての機能を検証するため、性染色体それぞれに特異的なプローブを用いて、生後 8 日齢の精巣内卵細胞の性染色体組成を調べた。

### (5) 胎子精巣内卵細胞の検出法の開発

胎子精巣から卵細胞のみを分離するため、減数分裂に移行した細胞特異的に GFP を発現する遺伝子改変マウス (RBRC02499) の雌と MRL 雄マウスから F1 マウス (TgMF1) を作出した。MRL マウスを父にもつ TgMF1 マウスは精巣内卵細胞を形成し、精巣内卵細胞は胎子期に減数分裂を経て形成されることから、F1 マウス胎子の精巣内卵細胞は GFP 陽性を示すと考えられた。生後 14 日齢の個体を作成し、精巣内卵細胞の産生を検証した後、E12.5~18.5 の胎子を作成、観察した。

### (6) 精巣内卵細胞産生の局所性の検証

(5) で作出した TgMF1 マウスを用い、精巣内卵細胞産生の局所性を検証した。E13.5 の TgMF1 マウス精巣を蛍光顕微鏡下で GFP 陽性領域と陰性領域に分割し、領域間で雄の体細胞マーカーである Sox9 (SRY-box containing gene 9) 遺伝子と雌の体細胞マーカーである Foxl2 (forkhead box L2) 遺伝子の発現比を比較した。

## 4. 研究成果

(1) 遺伝的背景が精巣内卵細胞産生に与える影響の解析

MRL マウスの雄と様々な近交系マウスの雌の間で作出した F1 マウスにおける精巣内卵細胞の出現率は下の Table 1 のようになった。C3HMRLF1 では、MRL マウスとほぼ同等の出現率が見られた一方、その他の F1 マウスでの出現率は低く、BALBF1 マウスでは検出されなかった。このことは、精巣内卵細胞産生能がマウスの遺伝的背景に大きく影響を受けることを意味する。C3H/He は MRL マウスの祖先系統の 1 つで、遺伝的背景の約 12% を共有する。この相同性が精巣内卵細胞の産生、あるいは生存に関与することが推測される。

Strain	No. of testes	No. of oocytes	Oocyte score
MRL/MpJ	140	161	1.150
AJMRLF1	80	29	0.363*
B6MRLF1	68	20	0.294*
BALBMRLF1	56	0	0.000*
C3HMRLF1	26	38	1.462
DBAMRLF1	34	7	0.206*

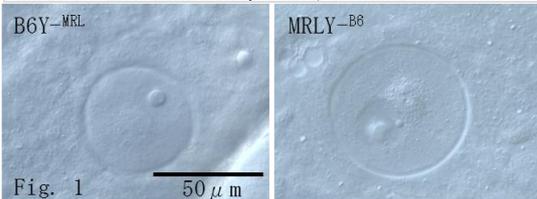
\*, significant differences between MRL mice (Mann-Whitney *U*-test,  $P < 0.05$ ).

### (2) コンソミックマウスの作出と解析

MRL マウス由来の Y 染色体を有する戻し交配系マウスでは、B6-Y<sup>MRL</sup> マウスを含む各世代で精巣内卵細胞が出現し、精巣内卵細胞は MRL マウス由来の Y 染色体のみで産生可能なことがわかった (Table 2, Fig. 1)。また、B6 マウス由来の Y 染色体をもつ MRL-Y<sup>B6</sup> マウスでも精巣内卵細胞が観察され、常染色体上にも責任遺伝子が存在することがわかった。さらに、雌の MRL マウスと雄の B6 マウスの間で作出した MRLB6F1 は精巣内卵細胞を産生しないことから、この常染色体上の責任遺伝子は、ホモ劣性を示すことが示唆された。

Strain	No. of testes	No. of oocytes	Oocyte score
MRL/MpJ	140	161	1.150
B6MRLN2	184	75	0.408*
B6MRLN4	68	14	0.206*
B6MRLN6	352	36	0.102*
B6MRLN8	456	30	0.066*
B6-Y <sup>MRL</sup>	330	22	0.067*†
MRL-Y <sup>B6</sup>	292	6	0.021*†
C57BL/6	56	0	0.000*
MRLB6F1	82	0	0.000*

\*, significant differences between MRL mice (Mann-Whitney *U*-test,  $P < 0.05$ ); †, significant differences between MRL-Y<sup>B6</sup> and B6-Y<sup>MRL</sup> mice (Mann-Whitney *U*-test,  $P < 0.05$ )



### (3) MBM マウスを用いた QTL 解析

精巣内卵細胞産生に関与する常染色体上の因子を明らかにするため、MRL マウスと B6 マウス間で N2 マウス (MBM) を作出し、QTL 解析を行った結果、15 番染色体の 11~17cM 領域に有意な相関が観察され (Fig. 2)、精巣内卵細胞産生に関与する可能性が示された。

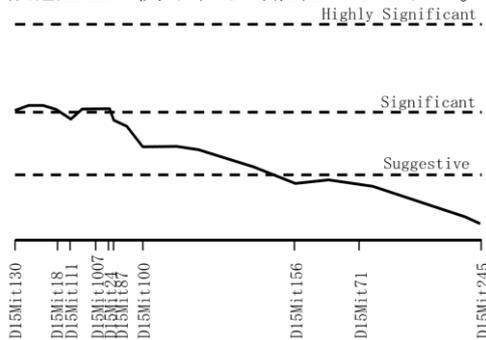
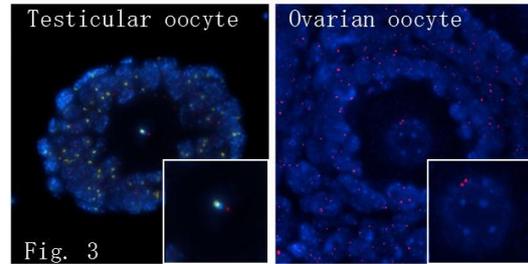


Fig. 2

\* (1)~(3)の結果は、Mammalian Genome に投稿し、revise 中である。

### (4) 精巣内卵細胞の性染色体組成の解明

生後 8 日齢の精巣内卵細胞の性染色体組成を調べた結果、X (赤)、Y (黄) 双方の性染色体が検出された (Fig. 3)。このことから精巣内卵細胞は性染色体組成 XY の始原生殖細胞から派生し、8 日齢の時点で、第一減数分裂を完



了していないことがわかった。

### (5) 胎子期精巣内卵細胞の検出法の確立

生後 14 日齢の TgMF1 マウスで、精巣内卵細胞の出現を検証した結果、精巣内卵細胞は MRL マウスとほぼ同等の出現頻度で観察された。次に E12.5~18.5 の生殖腺を観察したところ、GFP 陽性細胞は E12.5~14.5 の卵巣と精巣で検出され、特に精巣内の GFP 陽性細胞は中腎境界部と頭側辺縁に局在していた (Fig. 4)。

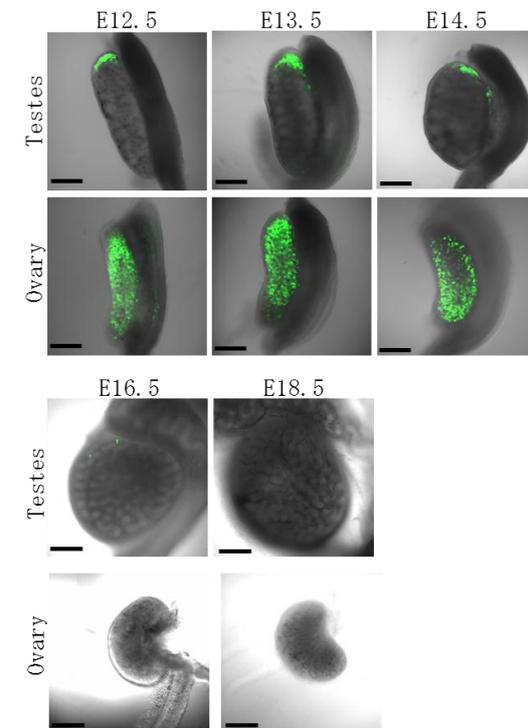


Fig. 4

Bars = 200 μm

### (6) 精巣内卵細胞産生の局所性の検証

E13.5 の TgMF1 マウス精巣を GFP 陽性領域と

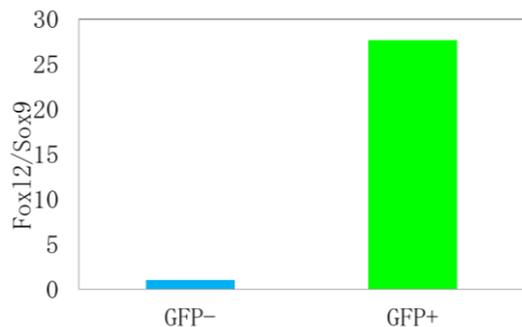


Fig. 5

陰性領域に分割し、領域間で雌雄体細胞マーカーの遺伝子発現を比較した結果、GFP 陽性領域では雌性体細胞マーカーである Foxl2 が GFP 陰性領域に比べて高発現していることがわかった (Fig. 5)。このことから、胎子精巣内における卵細胞の分化には、周囲体細胞の雌化が関与していると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ①大塚沙織、MRL/MpJ マウスにおける精巣内卵細胞への分化開始時期の特定、第 152 回日本獣医学会学術集会、2011 年 9 月 20 日、大阪府立大学 (大阪府・堺市)
- ②大塚沙織、MRL マウスの精巣内卵細胞出現に關与する遺伝的因子の解析、第 150 回日本獣医学会学術集会、2010 年 9 月 18 日、帯広畜産大学 (北海道・帯広市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/anat/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大塚 沙織 (OTSUKA SAORI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・特任助教

研究者番号：10566152