

学 位 論 文 題 名

Differential Effect of the Combination between Kit^W
or Kit^{W-v} Mutant Allele and the Kit^S Allele Derived
from *Mus spretus* on Male Hybrid Sterility

(Kit^W あるいは Kit^{W-v} 変異遺伝子と *Mus spretus* 由来 Kit^S 遺伝子の
組み合わせが雄性雑種不妊に及ぼす影響について)

学位論文内容の要旨

雑種不妊とは異型配偶子の生殖に影響が現れることを言う。この現象は哺乳類の場合オスに適用される Haldane のルールとして知られている。マウスにおいては7種類の雑種不妊が報告されているが、このうち6種類は確かに間違いないことが実証されている。

Kit 遺伝子は色素細胞の移動や肥満細胞発育、造血、配偶子形成など、広範囲に重要な役割を果たすことが知られており、肥満細胞成長因子の膜貫通型チロシンキナーゼ受容体をコードする proto-oncogene の一種である。 Kit 対立遺伝子の w -series は、その cDNA の様々な領域における突然変異に起因している。本研究において著者は、何種類かの変異した Kit 遺伝子とスペイン産野生型マウス *Mus spretus* (SPR) 由来の Kit^S 遺伝子を組み合わせて雑種不妊に関する解析を行った。

第一部では、最初に2種類のコンジェニック系統、すなわち Kit^W 遺伝子が WB- Kit^W 系統に由来する C57BL- Kit^W と、 Kit^S 遺伝子が SPR に由来する C57BL- Kit^S を作成した。 Kit^W 遺伝子はその白斑毛色により判別した。 Kit^S と他の Kit との違いはプロモーター領域の PCR を用いた SSLP によって確認した。第5染色体の34番地から45番地間のいくつかのマイクロサテライトマーカー多型と SSLP を用いて、コンジェニックマウスの Genotyping が行われ、C57BL- Kit^S の42番地から44番地領域が SPR に由来していることが明らかにされた。これらのコンジェニックマウスの相互の交配により、5つの組み合わせ： $+^{Kit}/+^{Kit}$ 、 $Kit^S/+^{Kit}$ 、 Kit^S/Kit^S 、 $Kit^W/+^{Kit}$ と Kit^W/Kit^S のマウスが得られた。 Kit^W/Kit^W

の組み合わせは出生前あるいは生後まもなく死亡してしまうため得ることができなかった。*Kit^W/Kit^S* のオスは精巣の縮小を伴う雑種不妊となるが、メスの妊性は正常であった。*Kit^W/Kit^S* のオスはその精子形成が減数分裂期以前のステージで停止し、精子を作ることができなかった。その原因を検討するため、*Kit^S* 由来の cDNA の塩基配列を C57BL 由来 +^{Kii} の cDNA と比較した。合計 33 箇所の塩基置換が観察され、そのうち 11 箇所はアミノ酸置換を伴う変異であった。アミノ酸置換の 7 箇所は細胞外ドメイン、1 箇所は膜貫通ドメイン、2 箇所はキナーゼ I ドメイン、1 箇所は C 末端に存在していた。*Kit^S* 遺伝子由来の mRNA と、+^{Kii} あるいは *Kit^W* 由来の mRNA の発現を判別するために RT-PCR-RFLP で可能にした。その結果、*Kit^W* と *Kit^S* それぞれに由来する mRNA の発現は *Kit^W/Kit^S* 不妊の精巣においてともに認められ、遺伝子発現レベルにおける異常ではないことが示唆された。

第二部では、*Kit^{W-v}/Kit^S* の組み合わせの生殖能力が調べられた。*Kit^W* と *Kit^{W-v}* の違いは、*Kit^W* タンパクはスプライシング異常により膜に結合できないが、*Kit^{W-v}* タンパクの方はキナーゼ領域の 1 アミノ酸変異だけで膜に結合できるもののキナーゼ活性が低いため細胞内情報伝達の行われないうことである。一方、*Kit^{W-v}/Kit^S* のオスは正常な妊性を有し、精巣の組織学的構造も正常であった。不妊の *Kit^W/Kit^S* のオスにおいて、どの時期に精子形成が停止するのかを解析するために、8, 12, 16, 20 日齢の精細管の発育段階を、+^{Kii}/+^{Kii} および *Kit^{W-v}/Kit^S* 正常のオスとの間で比較した。その結果、8 日齢では 3 つの遺伝子型の組み合わせで組織像の違いは見られなかったが、12 日から 20 日にかけて *Kit^W/Kit^S* のオスの精子形成はほとんど減数分裂期の前のステージで停止するような異常が観察された。さらに不妊の精巣において *Kit^S* 遺伝子に由来する Kit レセプタータンパク質の発現を確認するためにウェスタンブロットを行った。約 90 kDa の位置に Kit レセプタータンパク質とみられるバンドが検出され、正常に発現しているものと示唆された。そこでリガンド-レセプター相互作用に異常があり、SPR 由来の *Kit* リガンドが C57BL と異なるかどうかを調べるため、SPR 由来の *Kit* リガンド cDNA のコード領域の塩基配列を決定した。SPR 由来のリガンドは、C57BL と比較して 7 つの塩基置換が検出され、そのうち 2 つは細胞外ドメインのアミノ酸置換を生じていた。

以上の結果から、SPR と C57BL 間の Kit レセプターの細胞外ドメインのアミノ酸の違いが、*Kit^W/Kit^S* 不妊オスマウスにおけるレセプターのリガンドに対する親和性を低下

させる可能性が示唆された。すなわち Kit レセプターは精原細胞から精母細胞期に発現し、一方 Kit リガンドはセルトリ細胞で発現するが、*Kit^w/Kit^s* の組み合わせの場合レセプターとリガンドの相互作用が低くなり精子形成障害が現れることが一要因として考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 芳 幸

副 査 教 授 梅 村 孝 司

副 査 教 授 渡 邊 智 正 (農学研究科)

副 査 助 教 授 昆 泰 寛

学 位 論 文 題 名

Differential Effect of the Combination between Kit^W or Kit^{W-v} Mutant Allele and the Kit^S Allele Derived from *Mus spretus* on Male Hybrid Sterility

(Kit^W あるいは Kit^{W-v} 変異遺伝子と *Mus spretus* 由来 Kit^S 遺伝子の
組み合わせが雄性雑種不妊に及ぼす影響について)

マウス第5染色体の Kit 遺伝子は、受容体型チロシンキナーゼの一種で、精子形成に重要な役割を果たすことが知られている。 Kit 対立遺伝子の w -series は、コード領域における様々な突然変異体の一群である。 Kit^W 遺伝子とスペイン産野生マウス *Mus spretus*(SPR)由来の Kit^S 遺伝子を組み合わせたオスは雑種不妊となり、その要因に関する解析を行った。

2 種類のコンジェニック系統、C57BL- Kit^W と C57BL- Kit^S を作成した。それらの交配により得られた Kit^W/Kit^S のオスは精巣の縮小を伴う不妊となるが、メスは正常であった。 Kit^S 由来タンパクのアミノ酸配列は、正常 C57BL と合計 11 箇所のアミノ酸置換が観察され、そのうち 7 箇所が細胞外ドメインであった。 Kit^S と Kit^W 由来の mRNA の発現はそれぞれ不妊精巣でも認められ、遺伝子発現レベルの異常ではないことが示唆された。ウェスタンブロットでも、不妊精巣において約 90 kDa の Kit^S 由来レセプタータンパクとみられるバンドが検出された。不妊の Kit^W/Kit^S のオスにおいて、精子形成は生後 12 日目の精母細胞期前のステージで停止する組織像が観察された。

Kit^W 由来タンパクは膜貫通部位の欠失により膜に結合できないが、 Kit^{W-v} 由来タンパクはキナーゼ領域の 1 アミノ酸置換だけで膜に結合できる変異体である。 Kit^{W-v}/Kit^S のオスは正常な妊性を有し、精巣の組織像も正常であった。そこで、リガンドーレセプター間の相互作用に異常があることが推測され、 Kit 由来リガンドのコード領域のアミノ酸配列を決定した。SPR 由来のリガンドは、C57BL と比較して 2 箇所細胞外ドメインにアミノ酸置換を生じていた。以上の結果から、 Kit^W/Kit^S 不妊オスマウス

において SPR と C57BL 間の細胞外ドメインのアミノ酸の違いにより、レセプターのリガンドに対する親和性を低下させ、精子形成障害となる可能性が示唆された。

本研究はマウス *Kit* 遺伝子が雄性雑種不妊を引き起こし、リガンドーレセプター相互作用がその要因であることを示唆する貴重な知見を提供するものであり、よって審査員一同はサミール・アヒマド・モハマド・エルシャズリー氏が博士(獣医学)の学位を授与されるのに十分な資格を有するものと認めた。