

学 位 論 文 題 名

Genetic analysis of the meiotic metaphase-specific apoptosis
and the heat stress resistance of spermatocytes in the
MRL/MpJ mouse

(MRL/MpJ マウス精母細胞の減数分裂中期特異的アポトーシスと
熱ストレス抵抗性に関する遺伝学的解析)

学位論文内容の要旨

哺乳動物における精子形成過程は、1) 精粗細胞の有糸分裂、2) 精母細胞の減数分裂ならびに 3) 精子細胞から精子への形態変化に大きく分けられて進行していく。これらの過程では細胞分化のため多くの遺伝子発現が見られる。精子形成の阻止は形態学的にアポトーシスとして検出される。また、ヒトや野生動物では環境ホルモンによる精子数の減少、腹腔内停留精巣さらに精巣癌が問題視され、形態学的には精巣内に多数のアポトーシスが精母細胞ならびに精子細胞に共通して認められている。

MRL/MpJ マウス精巣には 3 つの興味ある表現型が存在する。すなわち、1) 第一減数分裂中期特異的アポトーシスの出現、2) 実験的腹腔内停留精巣における熱ストレス抵抗性精母細胞の存在、3) 生後における精巣内卵母細胞様細胞の出現、である。これらの表現型はいずれも精子形成プログラムの異常を示すものであり、その形態学的ならびに遺伝学的解析は、本プログラムの新たな経路を発見する端著となるばかりか、根治不能な雄性不妊に対する新規治療法の開発に貢献するものと信ずる。本研究では、MRL/MpJ マウスの具備する減数分裂中期特異的アポトーシス (MSA) ならびに熱ストレス抵抗性精母細胞の責任因子の同定を試みた。

MRL/MpJ マウスの MSA はステージ 12 の第一減数分裂中期に集中し、その数は通常マウスの約 25 倍であることが明らかとなっている。そこで、MSA の責任因子 (*msa*) について、(MRL/MpJ × C57BL/6)F₁ × MRL/MpJ の戻し交配個体雄 555 例を用いた染色体マッピングを行った。その結果、MSA は単一劣性遺伝様式を示し、かつ第 1 染色体テロメア側 *Cen-D1Mit150, 457-0.7 cM-msa*,

D1Mit271,403, *Exo1*, Rep2-1.4 cM-D1Mit166-Tel に存在することを明らかにした。さらに候補遺伝子の分子生物学的解析から DNA 修復に関連する *Exonuclease 1* (*Exo1*) 遺伝子のスプライシング異常が MSA の原因であることを突き止めた。また、MRL/MpJ マウスにおける *Exo1* の変異が、第 8 イントロンにおいて、スプライシングに重要な配列である branch point の 2 bp 上流のポイントミューテーションであったことから、実際にその変異がスプライシング異常を引き起こすか否かを *in vitro* splicing 実験により確認した。その結果、本来起こるスプライシングがこのポイントミューテーションにより異常となることを明らかにした。

次に、熱ストレス抵抗性について遺伝学的解析を行うにあたり、熱ストレス感受性精母細胞を持つ C57BL/6 と抵抗性精母細胞を持つ MRL/MpJ との F₁ 雄を作出し、停留精巣術を施したところ、術後 2 週で精巣重量は大きく減少した。このことから、熱ストレス抵抗性は劣性遺伝様式をとるものと推測した。そこで、F₂ 個体を用いた染色体マッピング法によりきわめて強く連鎖する熱ストレス抵抗性因子の同定を試みた。F₁ 個体同士を交配して得た F₂ 個体雄 140 例について、停留精巣術後 3 週における精巣重量、Sertoli cell index を計測した。さらに、全染色体上に 98 個のマイクロサテライトマーカーを選択し、polymerase chain reaction 法によるゲノムワイドスキャンを行った。F₂ 群の精巣重量ならびに Sertoli cell index は共に明らかな 2 群に分離せず連続的な値を示した。さらに quantitative trait loci (QTL) 解析の結果、いずれの表現型を量的パラメーターとした場合も極めて強く連鎖する QTL が第 1 染色体約 100 cM に位置することを見い出した。この QTL ピークは *Exo1* 遺伝子座と一致したことから、MRL/MpJ マウス精巣における熱ストレス抵抗性因子の一つとしても *Exo1* の変異が強く示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安居院 高 志
副 査 教 授 高 橋 芳 幸
副 査 教 授 昆 泰 寛
副 査 助教授 佐々木 宣 哉

学 位 論 文 題 名

Genetic analysis of the meiotic metaphase-specific apoptosis and the heat stress resistance of spermatocytes in the MRL/MpJ mouse

(MRL/MpJ マウス精母細胞の減数分裂中期特異的アポトーシスと
熱ストレス抵抗性に関する遺伝学的解析)

MRL/MpJ マウスは自己免疫疾患を呈するモデルマウスとして広く知られているが、精巣における精子形成過程において異常が見られる。即ち、定常状態では減数分裂中期特異的アポトーシスが多く見られ、一方人工的に腹腔内精巣停留術を施し熱ストレスを与えた場合には逆にアポトーシス細胞が少なく熱ストレスに抵抗性である。本研究ではこの 2 つの異常形質について遺伝学的解析を行い、その原因遺伝子の同定を行った。

まず精母細胞の減数分裂中期特異的アポトーシスについて、コントロールマウス系統 C57BL/6 と交配実験を行った結果、単一劣性遺伝様式を取ることが明らかとなった。更にこの責任遺伝子座 *msa* (metaphase-specific apoptosis) の染色体マッピングを行ったところ、第 1 染色体 100 cM の位置にマップされた。この付近に存在する遺伝子群について single nucleotide polymorphism を利用して更に詳細なマッピングを行ったところ、候補遺伝子として *exonuclease1* (*Exo1*) 遺伝子を同定するに至った。蛋白質をコードする領域について reverse transcription-polymerase chain reaction で調べたところ、正常型とエクソン 9 を欠失するそれより小さな 2 つのバンドを得た。この原因について、イントロン 8 の塩基配列解析を行った結果、branch site の 2 bp 上流に T から A への塩基置換を発見した。この塩基置換がスプライシング異常の原因になっていることを証明するために、C57BL/6 型もしくは MRL 型の変異を持つイントロン 8 にエクソン 8 及び 9 を連結したプラスミドコンストラクトを作製し、培養細胞に導入し *in vitro* スプライシングを調べた。その結果、MRL 型変異を持つプラスミドではスプライシングが起きないことを確認した。

次に精母細胞の腹腔内停留精巣術による熱ストレス耐性についても同様に遺伝学的解析を行ったところ、こちらは複数の責任遺伝子座が関与していることが明らかとなった。そこで quantitative trait loci 解析を行ったところ、主要な責任遺伝子座をやはり第 1 染色体 100 cM の位置にマップすることができた。このことから精母細胞の熱ストレス耐性においても *Exo1* 遺伝子の異常が関与していることが示唆された。

以上のように申請者は、MRL/MpJ マウスの 2 つの精子形成異常形質の原因解明のため緻密な遺伝学的実験を重ね、その原因を解明及び推定するに至った。一連の研究成果は獣医学、ことに実験動物学の分野において一定の水準を超えたものと判断された。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者、並木由佳の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規定第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。