

Title	遺伝子操作動物を用いた生殖細胞における性の分化機構の解析
Author(s)	磯谷, 綾子
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46525">https://hdl.handle.net/11094/46525</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	磯谷綾子
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 20244 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	遺伝子操作動物を用いた生殖細胞における性の分化機構の解析
論文審査委員	(主査) 教授 岡部 勝 (副査) 教授 山元 弘 教授 馬場 明道 教授 中川 晋作

## 論文内容の要旨

哺乳類をはじめとする大多数の生物種は“性”という仕組みを持つ有性生殖によって繁殖する。そして、生殖細胞はその有性生殖において子孫を作ることができる唯一の細胞である。このような生殖細胞は未分化な始原生殖細胞 (PGC) として発生し、生殖巣へ移動した後に性が決定された後、発生能を持つ卵子または、精子になるためにそれぞれ、分化して成熟していく。このような生殖細胞の分化の解析は生殖細胞の基礎研究の発展だけでなく、遺伝子操作動物の作製や不妊治療を目指した発生工学への応用につながる可能性をもっていると考えられる。

著者は生殖細胞の性分化の解析を行うために、著者の所属する研究室で作製された 142 ラインのグリーンマウスのうち、X 染色体上に *EGFP* 遺伝子が導入されたマウス (以下、X-GFP マウス) に着目した。“X-GFP マウス”の雄が野生型の雌と交配して、得られる胚は緑色蛍光を発する雌性胚と蛍光を持たない雄性胚として、生かしたまま着床前の段階で識別することができる。この着床前に雌雄が区別できる系は性分化の解析モデルマウスとして古くから用いられている雌性細胞と雄性細胞が混在した雌雄キメラマウスの作製を容易にし、多量の解析を可能にした。

これまでに、雌雄キメラマウスの雄からは XY 型由来の産仔しか得られないといわれていたので、このことを遺伝子改変マウスの作製に応用できるのではないかと考えた。すなわち、雌性胚に雄の遺伝子に変異を入れた ES 細胞を注入してキメラマウスを作製すると、効率的に ES 細胞由来の遺伝子に変異が入った F1 が得られるのではないかと考え検討した。その結果、この方法で作製した雄の ES キメラマウスからは確かに、100% ES 細胞由来の産仔が得られ、さらに、未熟な雄からも顕微授精によって 100% の確率で ES 細胞由来のアレルを持つ産仔が得られた。ところが、雌性胚を用いて作製した ES キメラマウスでは自然交配で産仔が得られないような不妊になるケースがあった。定法で作製されて産仔が得られない雄の ES キメラマウスは雌性胚に ES 細胞が注入されたものではないかと考え、これらの ES キメラマウスの精子、または精子細胞を用いて、顕微授精を行ったところ、半数以上のラインから ES 細胞由来のアレルを持つ産仔が得ることができた。

次に X-GFP マウスを用いることで、EGFP 蛍光により追跡が可能となった XX 型の生殖細胞が精巣内においてどのように分化するのかを調べるために、雌雄キメラマウスと XX 型性転換マウスとして知られている *Sry* トランスジェニックマウス (以下、*Sry*-TG) を用いて解析を行った。XX 型の生殖細胞は雌雄キメラマウスや XX 型 *Sry*-TG の精巣内において、誕生時には存在していたが、誕生 3 日目にはほとんど消滅していた。一方、XY 型の生殖細胞は XX 型の生殖細胞が消滅するような雌雄キメラマウスや XX 型 *Sry*-TG の精巣環境でも発生能を有した半数体に分化する

ことが分かった。これらのことから、XX型の生殖細胞が誕生後に消滅してしまうのは環境に問題があるのではなく、XX型生殖細胞自身に問題があるためと考えられた。そこで、精巣内のXX型生殖細胞が正しく、性分化しているかどうかを調べたところ、父型のゲノミック・インプリンティングを獲得しており、野生型と同様に雄型の生殖細胞（プロ精原細胞）として分化していることが明らかになった。しかし、通常、精巣内でXY型生殖細胞は誕生後に増殖するが、XX型生殖細胞は増殖しておらず、アポトーシスなどの機構によって消滅していることが示唆された。では、XX型プロ精原細胞は野生型のXY型プロ精原細胞とどのように違うために、増殖せずに、消滅したのかという疑問を解く手段として、遺伝子発現の違いに着目して調べた。その結果、XY型プロ精原細胞よりもXX型プロ精原細胞で発現が増加している遺伝子が多く検出され、これらの中にはXX型プロ精原細胞にのみ発現する遺伝子があり、これは誕生前から発現が確認された。このようなXX型プロ精原細胞で過剰に発現していた遺伝子は新生仔XO型Sry-TGの精巣ではほとんど発現していなかったが、XXY<sup>tdym1</sup>型Sry-TGの精巣では過剰に発現していた。

雌雄キメラマウスの精巣内で、ほとんどのXX型生殖細胞は雄の生殖細胞として分化し、誕生後間もなく消滅したが、一部は1週令以降に巨大な細胞として現れることが分かった。精巣内での巨大な細胞に関する報告はこれまでにXX型性転換マウス(SxraマウスやOdsマウス)の精巣内で卵子様の細胞が存在していたというものがあつたが、これらは切片を用いた、形態的な観察からのみで、大きさ以外にどのような特徴をもっているかは全く調べられていなかった。そこで、この精巣内に生じた巨大なXX型細胞がどのような性質を持つのかについて解析を行ったところ、胎仔期に減数分裂を開始しており、誕生後に大きくなって、透明帯を形成したり、精子と融合したりする能力を獲得していることが確かめられた。この精巣内に見つかった巨大化する雌の生殖細胞を『精巣卵』と名づけ、さらに、卵子では誕生後に成熟とともに、獲得されていくといわれているゲノミック・インプリンティングについて調べたところ、大多数のXX型生殖細胞が父型のインプリンティングを獲得する精巣環境下でありながら、不完全ではあるが母型のインプリンティングを獲得することが明らかになった。

以上のように、X-GFPマウスを用いた雌雄胚選別法によって雌雄キメラマウスの作製が容易になり、雌性胚に雄性のES細胞を注入して作製したキメラマウスを用いて、遺伝子変異動物の作製を効率化する系が確立できた。また、X-GFPマウスを用いることで精巣内のXX型生殖細胞が追跡可能になったことから、雄に分化したXX型プロ精原細胞は正常な精巣環境でも、増殖せずに、消滅することが明らかになった。さらに、XX型プロ精原細胞で過剰に発現する遺伝子は生殖細胞が増殖・分化する新生仔のXY型精巣やXO型精巣ではほとんど発現しないが、生殖細胞が消滅するXX型精巣やXXY型精巣で過剰に発現しており、X染色体が2本あることがこれらの遺伝子の過剰発現に繋がっていることを示唆した。また、雌雄キメラマウスの精巣内のXX型生殖細胞はほとんどが父型のインプリンティングを獲得したプロ精原細胞に分化するが、一部は同じ精巣環境でありながら、透明帯を形成したり、精子と融合したり、不完全ではあるが母型のインプリンティングを獲得したりできる『精巣卵』として分化していたことから、一度、生殖細胞の性決定が起こると、その後の性分化は環境によらずに定められてしまうことが明らかになった。

#### 論文審査の結果の要旨

本論文ではX染色体上にEGFP遺伝子が挿入されたマウスを用い、遺伝子変異マウス作製の迅速化の検討を行っている。あらかじめ選別した着床前の雌性胚に雄性のES細胞を注入することにより、ES細胞由来の産子のみが得られる系を確立し、遺伝子変異マウス作製の迅速化の可能性を示した。また、着床前の雌雄の胚を集合させて作った雌雄キメラマウスの精巣内に存在するXX型生殖細胞の解析を行い、そのほとんどが父型のインプリンティングを獲得したプロ精原細胞に分化していることを明らかにした。XX型プロ精原細胞は誕生後に増殖せずに消滅することから、DNAマイクロアレイを行い、XY型との差を見ることによって消滅に関連する可能性のある遺伝子を同定することができた。また、雌雄キメラマウスを作製したときに、一部のXX型生殖細胞が精巣内において卵子としての特徴を持つ『精巣卵』として分化することも見出し、それらが不完全ではあるが母型のインプリンティングを獲得することも示した。これらは生殖細胞の性決定システムに関する重要な知見を加えるものであり、本研究が博士(薬学)の学位授与に値するものと認める。