

氏名	浅野 友香
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第4015号
学位授与の日付	平成21年 9月30日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	精子形成が減数分裂第一分裂で停止する ENU 誘発突然変異マウスに関する研究
論文審査委員	教授 国枝 哲夫 教授 近藤 康博 教授 及川 卓郎

学位論文内容の要旨

生殖細胞は、世代を越えて生命情報を継承する唯一の細胞である。生殖細胞の発生分化プロセスでは、ゲノムの再プログラム化や DNA 組換えなどの重要な生命現象が起こっており、これらの過程の解明は、基本的な生命現象の理解、不妊治療や生殖のコントロールへの応用などに貢献することが期待される。近年では、突然変異動物やノックアウト動物などを用いることで、生殖細胞で生じている様々なメカニズムを解明しようという試みがなされている。*repro23* マウスは、精子形成異常を呈する ENU 誘発突然変異マウスである。*repro23* ホモ雄個体は、精子形成がパキテン期で停止することが報告されているが、その詳細な表現型は明らかにされておらず、その原因遺伝子は同定されていない。そこで本研究では、*repro23* ホモ個体の詳細な表現型解析および原因遺伝子同定を行なった。

まず、*repro23* マウス精巣の組織学的解析を行なったところ、*repro23* ホモ個体の生殖細胞は精子形成が減数分裂第一分裂前期パキテン期以降は観察されず、またクロマチンが凝集した様な構造をもつ精母細胞が多数観察され、幾つかの精細管では顕著な空胞化が観察された。蛍光免疫染色では、パキテン期以降の生殖細胞は認められず、少数認められたパキテン期細胞では X-Y 染色体の対合異常が観察された。また、クロマチンの凝集した様な構造をもつ精母細胞は、 γ H2AX 抗体に強い反応性を示し、ザイゴテン期の細胞と考えられたが、アポトーシス陽性反応は認められなかった。さらに、*repro23* ホモ個体の精巣では、パキテン期以降に発現する遺伝子の発現がほとんど認められず精子形成がザイゴテン期前後で停止していると考えられた。次に連鎖解析により *repro23* の候補領域を第 7 染色体上の約 2.2Mb の領域に特定し、本領域内に存在し減数分裂に関与すると思われる *Tdrd12* 遺伝子の塩基配列を調べた結果、C から A への塩基置換により、ナンセンス変異が生じていることが明らかとなった。半定量的 RT-PCR 法により *Tdrd12* 遺伝子の発現部位および発現時期の検討を行ったところ、精巣および卵巣でのみ特異的に発現しており、特に精巣で強い発現が観察された。また、生後最初に精子形成が同調して進行する First Wave 期では、生後 4 日齢から弱い発現が見られ 16 日齢ごろにはピークに達した。この発現パターンは、*repro23* の精子形成における異常の出現時期と一致していた。さらに、生殖細胞におけるレトロトランスポゾンの発現抑制への *Tdrd12* の関与について検討したところ、*repro23* ホモ個体でレトロトランスポゾンの発現の上昇が確認され、*Tdrd12* は生殖細胞におけるレトロトランスポゾンの発現抑制に関与していることが示唆された。

以上、本研究では、*repro23* ホモ個体においては、精子形成が減数分裂第一分裂期前期ザイゴテン期で停止しており、その異常の原因が *Tdrd12* 遺伝子に生じたナンセンス変異であることが明らかとなった。したがって、*Tdrd12* は哺乳類の精子形成に重要な役割を果たし、*repro23* ホモ個体では *Tdrd12* 遺伝子の機能を欠損することで、精子形成に異常を呈することが考えられた。

論文審査結果の要旨

本研究は、ほ乳類の精子形成に関わる分子機構を解明することを目的として、ENUにより誘発された突然変異により精子形成が減数分裂第一分裂で停止する *repro23* マウスについて、その表現型の解析と原因遺伝子の解明を試みたものである。その主な結果は以下の通りである。

まず精巣の組織学的解析により、*repro23* ホモ個体の精子形成では減数分裂第一分裂前期で停止し、クロマチンが凝集した様な構造をもつ精母細胞が多数観察され、幾つかの精細管では顕著な空胞化が認められること、さらに少数認められたパキテン期細胞ではX、Y染色体の対合異常が観察されることを明らかにしている。また、クロマチンの凝集した様な構造をもつ精母細胞は、 γ H2AX抗体に強い反応性を示すことからザイゴテン期の生殖細胞と考えられること、*repro23* ホモ個体の精巣ではパキテン期以降に発現する遺伝子の発現がほとんど認められないことから、*repro23* ホモ個体では精子形成がザイゴテン期前後で停止していると結論づけている。さらに連鎖解析により *repro23* の候補領域を第7染色体上に特定し、本領域内に存在し減数分裂に関与すると思われる *Tdrd12* 遺伝子の塩基配列を調べた結果、本遺伝子にナンセンス変異を同定している。つぎに、半定量的RT-PCR法により *Tdrd12* 遺伝子の発現部位および発現時期の検討を行い、精巣で特異的に発現しており、その発現パターンは、*repro23* の精子形成における異常の出現時期と一致していることを確認している。最後に生殖細胞におけるレトロトランスポゾンの発現抑制への *Tdrd12* の関与について検討したところ、*repro23* ホモ個体でレトロトランスポゾンの発現の上昇が確認され、*Tdrd12* は生殖細胞におけるレトロトランスポゾンの発現抑制に関与している可能性を明らかにしている。これらの結果から、*Tdrd12* は哺乳類における減数分裂の進行とレトロトランスポゾン発現の抑制に重要な役割を果たし、*repro23* ホモ個体ではその機能を欠損することで、精子形成に異常を呈すると結論づけている。

以上の本研究の結果は、ほ乳類の精子形成に関わる分子機構を解明する上で重要な知見であると考えられ、当該研究分野の研究に及ぼす影響は大きく、それゆえ、浅野友香氏は自然科学研究科の博士（農学）の学位を受ける資格があるものと判定した。