

氏名	KHALAJ MARYAM
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学術
学位授与番号	博甲第3667号
学位授与の日付	平成20年 3月25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	Study on primordial germ cell development in an ENU induced mutant mouse with germ cell depletion (生殖細胞の欠損を呈するENU誘発突然変異マウスにおける始原生殖細胞の発生に関する研究)
論文審査委員	教授 国枝 哲夫 教授 佐藤 勝紀 教授 及川 卓郎

#### 学位論文内容の要旨

Gametogenesis of mammals is a complex process that involves numerous cellular and molecular steps including specification, migration, proliferation and survival of primordial germ cells (PGCs). In the present study, primordial germ cell development in an ENU induced *repro22* mutant mouse with germ cell depression, the gene responsible for this mutation, and its effects on germ gonad function in adult mouse were investigated.

First, fine mapping of the *repro22* locus was performed by linkage analysis using F2 progeny and the critical region was narrowed to 70-kb region of the distal end of mouse chromosome 4. By sequencing the genes located in this region, the *repro22* mutation was identified as a missense mutation in *Mad2l2* gene, a spindle checkpoint genes essential for cell cycle regulation. This finding indicated that the essential role of the spindle checkpoint function in development of PGCs. Second, PGCs formation, migration and proliferation in the developing embryos were examined by alkaline phosphatase staining. The results showed gradually reduced PGCs, and complete absence of PGCs in genital ridge of the mutant mice. As a result, no testicular and ovarian germ cells was observed in the adult mutant mouse. These findings indicated that the *Mad2l2* gene might have an essential role in proliferation of PGCs. Third, effects of the absence of the germ cell in the adult gonads were examined. The mutant adult testis showed hyperplasia of Leydig cells and as a result, serum testosterone level was significantly elevated. On the other hand, the weights of the mutant ovaries were significantly increased in aged mouse, and histological analysis showed tubulostromal adenoma with hyperproliferation of gonadal stromal cells and tubule-like structures. The disturbance of endocrine system caused by the lack of germ cell in gonad was suggested to be responsible for these phenotypes. Finally, RT-PCR and immunohistochemical analyses with anti-3 $\beta$ -HSD antibody showed that the *Mad2l2* expression was gradually increased from day 0 to day 32 and decreased later in adult mice. The *Mad2l2* immunoreactivity was found in type B spermatogona and early stage of spermatocytes, and round spermatids, indicating that the *Mad2l2* gene functions not only during development of PGCs but also during spermatogenesis. BAC transgenic mouse was also generated to confirm the function of the *Mad2l2* gene in germ cell development.

The present findings provide a novel insight of mammalian germ cell development, and the *Mad2l2* deficient mouse will be an excellent model to evaluate the development of mammalian germ cell.

## 論文審査結果の要旨

本研究は、生殖細胞の欠損を呈する*repro22*突然変異マウスについて、生殖細胞欠損の発生機構と欠損による生殖腺に生じる異常の検討、および連鎖解析による原因遺伝子の同定と、その遺伝子の機能の解析を試みたものである。その主な結果は以下の通りである。

*repro22*マウスは、変異性薬剤であるENUにより誘発された突然変異マウスであり、雌雄とも成体では生殖細胞が完全に欠損している。そこで本研究では、まず*repro22*ホモ個体の胎生期における生殖細胞を組織学的に詳細に解析した結果、*repro22*ホモ個体では正常に始原生殖細胞が出現するが、その後の生殖丘への移動の過程で正常個体に比べてその増殖が著しく低下し、出生時には生殖腺に生殖細胞がほとんど存在しなくなることを明らかにしている。さらに、生殖細胞の欠損が生殖腺に与える影響を検討するために、加齢マウスの精巣および卵巣の組織学的解析を行ったところ、精巣においてはライディッヒ細胞の過形成が、卵巣においては管状間質腺腫とよばれる腫瘍が発生することを明らかとしている。次に連鎖解析により*repro22*遺伝子の位置を第4染色体上に特定し、この領域内に存在する遺伝子の塩基配列を解析することで、細胞周期のチェックポイント機能を持つと推測される*Mad212*遺伝子にミスセンス変異が存在することを見いだしている。さらに*Mad212*遺伝子の発現パターンを調べるとともに*Mad212*タンパク質の精巣内での局在を明らかにしている。以上のことから、*repro22*における生殖細胞の欠損が*Mad212*遺伝子に生じた突然変異に起因し、*Mad212*遺伝子が生殖細胞の増殖に不可欠であると結論づけている。

以上の結果は、生殖細胞の増殖に関する新しい遺伝子を同定することで、生殖細胞発生の分子機構の解明に大きく寄与するものであり、当該分野の研究に及ぼす影響は大きく、それゆえ、Khalaj Maryam氏は自然科学研究科の博士（学術）の学位を受ける資格があるものと判定した。