

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14971

研究課題名(和文)「ホールデンの規則」を制御する遺伝子の特定による生殖隔離機構の解明

研究課題名(英文) Identification of reproduction isolation gene

研究代表者

水野 聖哉 (Mizuno, Seiya)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：10633141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：異種間交配により誕生したオス個体は生殖能力がないことが多い。この生殖隔離は、種を保全するための強力なバリアーである。最近、マウス二亜種を利用した遺伝学的な研究で、生殖隔離を制御する染色体領域が明らかとなったが、原因遺伝子は完全には特定されていない。そこで本研究では、その遺伝子の発見を目指した。

X染色体上にある生殖隔離制御領域中には37個の遺伝子が存在する。それらからマウス二亜種間で多型があり、かつ精巣で発現している遺伝子が16個あることを見出した。それらを単一で欠損させたマウスでは稔性が認められたが、いくつかを複数同時に欠損させたマウスにおいて致死や不稔等の異常表型が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖隔離は、『進化』を語る上では避けては通れない課題だが、実験的検証モデルがないため、その分子メカニズムは約1世紀にわたり不明であった。マウス遺伝学の発展と成熟、さらに野生Mmmに由来する近交系マウスの確立により、この謎が徐々に解き明かされている。本研究では、生殖隔離制御遺伝子の特定には至らなかったが、有力な候補遺伝子を同定することに成功した。この成果をもとにした今後の研究で新たな生殖隔離制御遺伝子を発見できれば、種分化や種の保存という有性生殖する多くの生命体の進化に関わる謎の一端が解明される。更に、精子形成不全の原因遺伝子の特定は、生殖医療の発展にも寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In mammal, male hybrid animals often show sterility phenotype. This reproduction isolation phenomenon plays critical role for species preservation. However, molecular mechanism of this phenomenon is not fully understood yet. Two hybrid sterility related chromosome regions (Hst1 and Hstx2) were found using with *Mus musculus musculus* (Mmm) and *Mus musculus domesticus* (Mmd). Although causative gene on Hst1 has been already identified, causative gene(s) on Hstx2 is still unknown. Here, we attempted to identify the hybrid sterility gene(s) on Hstx2. There are 37 genes on Hstx2 region. We confirmed polymorphisms between Mmm and Mmd in these genes. We found SNPs in 16 genes. Fourteen of them were expressed in the testis. We then produced these gene KO mouse strains. Unfortunately, male infertility was not found in all KO strains. To investigate the polygenic effect, we produced multiple genes deletion strains. Interestingly, two stains showed embryonic lethality and sterility phenotypes.

研究分野：実験動物学

キーワード：生殖隔離 進化 野生マウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「異種交配で誕生した個体において、一方の性にのみ生殖能力の低下が現れる場合、生殖能力が低下する性は異型接合体である。」という、進化に関する経験則がある (*J. Haldane, J. Genet, 1922*)。この経験則は Haldane's rule (ホールデンの規則) と呼ばれる。哺乳類の性染色体の組み合わせはオスが XY、メスが XX であるから、この場合、異型接合体はオスになる。つまり、異種交配で生まれたオス (XY) で生殖能力が低下するが、メス (XX) で生殖能力の低下は観察されない。この現象により異なる種間同士は生殖的に隔離される。生殖隔離は種の保存に最も重要であるが、その制御分子メカニズムは長らく不明であった。最近、二つのマウス亜種である *Mus musculus musculus* (以下、*Mmm*) と *Mus musculus domesticus* (以下、*Mmd*) を用いた遺伝的解析により、生殖隔離の謎が少しずつ明らかになってきた。*Mmm* の遺伝背景を主に持つ近交系統である PWD マウスと *Mmd* の遺伝背景を主にもつ近交系統である C57BL/6 マウスを数世代に渡り交配することで得られたコンソミック系統を用いた順遺伝学的な研究で、生殖隔離制御遺伝子が二つの遺伝子座 (*Hst1* と *Hstx2*) 上にあることが示された (*Bhattacharyya, et. al., PLoS Genet, 2014*)。その後、*Hst1* 上に存在する遺伝子である *Prdm9* が生殖隔離を制御することが報告されたが (*Davies, et. al., Nature, 2016*)、*Hstx2* 上に存在するであろうもう一つの生殖隔離制御遺伝子については報告がない。

2. 研究の目的

本研究では、*Hstx2* 領域に存在することが予想されている生殖隔離制御遺伝子の特定を目指した。

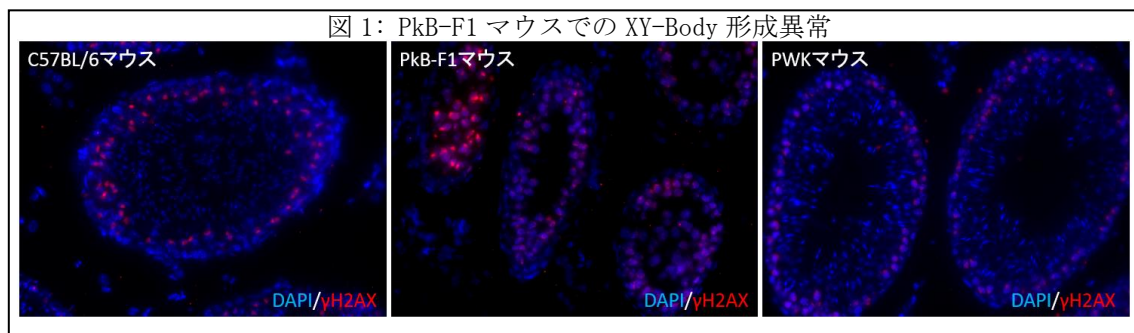
3. 研究の方法

- (1) *Hstx2* 領域には 37 個の遺伝子が存在する。これらの中から生殖隔離制御遺伝子を絞り込むために、*Mmm* と *Mmd* のゲノム配列を比較解析することでタンパク質コーディング配列もしくは成熟 miRNA 配列中に *Mmm* と *Mmd* 間で多型がある遺伝子を抽出する。
- (2) その後、FANTOM5 (<http://fantom.gsc.riken.jp/5/>) 等の発現データベースを利用して、精巣で発現している遺伝子を抽出する。
- (3) *Mmm* と *Mmd* 間で多型があり、かつ精巣で発現している遺伝子についてそれぞれを *Mmd* の遺伝背景でノックアウトする。これらのノックアウトマウスは CRISPR/Cas9 を用いた受精卵ゲノム編集で作出する。作出したオスのノックアウトマウスと野生型のメスマウスを交配することでノックアウトマウスの稔性を確認する。
- (4) ノックアウトマウスが不稔性や胚性致死を示した場合には、生殖隔離の候補遺伝子として認定し、その局在や遺伝子発現について評価する。

4. 研究成果

(1) PWK マウスの評価

PWD マウスの入手が困難であったため、理研バイオリソース研究センターより入手可能な PWD 系統の近似近交系統である PWK マウスを使用することとした。まず、雌の PWK マウスと雄の C57BL/6 マウスを交配し、Pkb-F1 マウスを作出した。Pkb-F1 マウスの精子形成能を精子先体のマーカーを用いて評価した結果、予想通り、精子が形成されていなかった。精母細胞で生じる減数分裂 (パキテン期) では、 γ H2AX が性染色体を覆った XY-body が形成される。PWD と C57BL/6 マウスの F1 雄マウスではこの XY-body の形成が障害されることが知られている。そこで、Pkb-F1 マウスの精巣でこの XY-Body の状態を γ H2AX の抗体を用いて解析した結果、PWD と C57BL/6 マウスの F1 雄マウスと同様に異常な局在が観察された (図 1)。以上の結果から、PWD マウスと同様に、PWK マウスと C57BL/6 マウスとの間でも生殖隔離が生じることが明らかとなった。



(2) 候補遺伝子の探索

そこで、*Hstx2* 領域に存在する 37 個の全ての遺伝子について PWK と C57BL/6 間に多型があるのかを解析した。PWK と C57BL/6 マウスの尾部よりゲノム DNA を抽出し、protein coding gene に関しては coding sequence (CDS) を、miRNA 遺伝子に関しては成熟 miRNA をコードする領域のゲノム配列を PCR で増幅し、その PCR 産物をサンガーシーケンス法でダイレクトシーケンスすることで多型を特定した。その結果、16 個の遺伝子内に PWK と C57BL/6 間で多型があることが明らかとなった。つぎにこの 16 個の遺伝子が精巣で発現しているのかをデータベースを

参照することで解析した結果、14 個の遺伝子が精巣で発現していることを見出した。その 14 遺伝子の具体的な内訳は protein coding gene が 6 つで、miRNA 遺伝子が 8 つである。これらの 14 の遺伝子はいずれもノックアウトマウスの報告がなく生体における遺伝子機能は未知であった。

(3) KO マウスの作製と表現型解析

抽出された 14 の遺伝子の生体での機能を探るために、各遺伝子をノックアウトしたマウスの作製を実施した。各遺伝子について確実に全てのスプライスバリエントを欠失させるため、各遺伝子全長の上流と下流に guide RNA の標的配列を設置し、標的遺伝子の全長をゲノムから切除する戦略でノックアウトマウスを作出した。

各遺伝子のノックアウトマウス作出成績を表 1 に示す。なお、miRNA 遺伝子の 2-7 は近接していたために、一度にすべてを切除するデザインとした。

表1. 各遺伝子欠損マウスの作出成績

遺伝子	# of embryos		# of offspring					# of mutant mice				Total ^d	Mutation efficiency ^(c,d)
	injected	transferred ^a	newborn ^b (birth rate ^{b/a})	Screened ^c			♂		♀				
				♂	♀	total	Gene ⁻ /Y	mosaic	Gene ⁻	Gene ⁻ or mosaic			
Protein Coding 1	100	98	18	18.4%	10	6	16	1	0	1	1	3	18.8%
Protein Coding 2	105	90	32	35.6%	20	11	31	8	2	2	5	17	54.8%
Protein Coding 3	266	249	38	15.3%	20	16	36	1	1	0	1	3	8.3%
Protein Coding 4	84	82	27	32.9%	19	8	27	10	3	2	5	20	74.1%
Protein Coding 5	112	90	6	6.7%	4	2	6	1	0	2	0	3	50.0%
Protein Coding 6	83	80	31	38.8%	17	14	31	7	6	1	7	21	67.7%
miRNA Gene 1	155	146	41	28.1%	20	18	38	5	2	5	2	14	36.8%
miRNA Gene 2	75	72	26	36.1%	20	4	24	3	1	0	3	7	29.2%
miRNA Gene 3													
miRNA Gene 4													
miRNA Gene 5													
miRNA Gene 6													
miRNA Gene 7													
miRNA Gene 8													
miRNA Gene 8	158	153	52	34.0%	28	16	44	12	1	1	1	15	34.1%

表 1 に示す通り、すべての作製で各標的遺伝子を完全に欠失したオス個体 (Gene⁻/Y) が得られた。これらのファウンダー雄マウスと野生型メスとを交配した結果、全てのケースで、ノックアウトアレルを有する F1 メスマウスが誕生した。以上の結果から、*Hstx2* 遺伝子座に存在するどの遺伝子を単一で欠損させても稔性に影響はないとの結論に至った。

(4) 更なる候補遺伝子群の解析

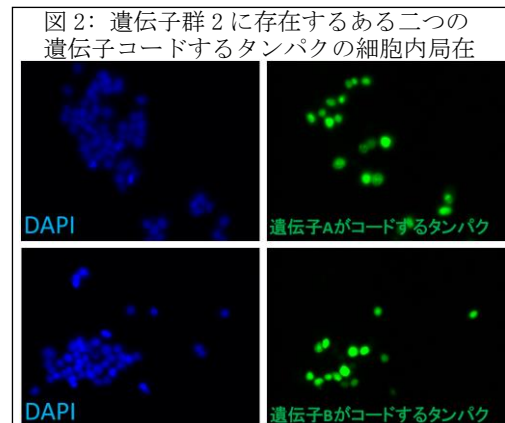
単一遺伝子ノックアウトマウスを作出する過程で、機能的に相互しうる遺伝子群が *Hstx2* 遺伝子座に存在していることを見出した。そこで、生殖隔離制御は単一遺伝子ではなく、複数の遺伝子が関与しているとの仮説を立てた。この仮説を検証するため、相互補完している可能性がある遺伝子群を染色体から切除する多重遺伝子欠損マウスと作出・解析することとした。

表2. 各遺伝子群欠損マウスの作出成績

遺伝子群	# of embryos		# of offspring					# of mutant mice				Total ^d	Mutation efficiency ^(c,d)
	injected	transferred ^a	newborn ^b (birth rate ^{b/a})	Screened ^c			♂		♀				
				♂	♀	total	Gene ⁻ /Y	mosaic	Gene ⁻	Gene ⁻ or mosaic			
1	110	90	17	19%	11	6	17	0	1	0	0	1	5.9%
2	301	281	19	6.8%	10	7	17	1	0	0	0	1	5.9%

遺伝子群欠損マウスの作製成績を表 2 に示す。前述の単一遺伝子欠損マウス作製と違い、変異マウスの取得率が著しく低かった。これは変異マウスが胚性致死し出生に至らなかったためと考えられる。また、大変興味深いことに、それぞれの作製で得られた各 1 匹の雄ファウンダーマウスが保持する遺伝子群欠損変異は次の世代に遺伝しなかった。具体的には、遺伝子群 1 欠損雄ファウンダーマウスと野生型メスマウスを交配した結果、7 匹の F1 メスマウスが得られたが、その全てが遺伝子群 1 欠損変異を有していなかった。また、遺伝子群 2 欠損雄ファウンダーマウスと野生型メスマウスを数カ月間同居させても野生型メスマウスは妊娠しなかった。そこで、このファウンダーの精子と野生型卵母細胞とで顕微授精を実施したが、次の世代は得られなかった。以上の結果は、これらの遺伝子群が生存および生殖に重要であることを強く示唆している。

特に遺伝子群 2 は欠損しても低確率ではあるが生存が可能なおこと、また、生殖に必須であることが示されたことから、更なる解析を実施した。遺伝子群 2 に存在しているある 2 つの遺伝子がコードするタンパク質の細胞内局在を HEK293T 細胞での過剰発現系で解析した。その結果、これらのタンパク質は核に強く局在した (図 2)。生殖隔離では減数分裂時の対合に異常が生じるため、核タンパクをコードするこれらの遺伝子が生殖隔離現象を制御している可能性がある。今後はこれらのタンパクがマウス精巣においてどのような挙動を示すかを検討していく予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① 水野 聖哉、大徳 陽子、濱田 優子、後藤 慶子、加藤 花名子、飯島 沙織、Abdelaziz Elsayed Ibrahim Elzeftawy、八神 健一、高橋 智、杉山 文博 “生殖隔離機構を制御する候補遺伝子領域の解析” 第 65 回日本実験動物学会総会（富山市）2018 年
- ② 森本 健斗、沼田 幸樹、水野 聖哉、大徳 陽子、加藤 花名子、八神 健一、高橋 智、杉山 文博 “生殖隔離制御遺伝子座 Hstx2 内に存在する隣接関連遺伝子群の機能同定” 第 66 回日本実験動物学会総会（福岡市）2019 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/lab-animal/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：吉木 淳

ローマ字氏名：YSHIKI Atsushi

研究協力者氏名：森本 健斗

ローマ字氏名：MORIMOTO Kento

研究協力者氏名：沼田 幸樹

ローマ字氏名：Numata Koki

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。