

## マウス2-cell block胚に関する原因遺伝子座の染色体上の同定と候補遺伝子解析

家畜生産学講座 家畜改良増殖学分野

井上新哉

[目的]特定系統のマウス受精胚を体外培養すると、2細胞期で発生が停止し、この現象は2-cell blockと呼ばれている。これまでの研究により、2-cell blockを起こす原因には2つの遺伝子座が関与し、それらは第3および第4染色体の一つずつ存在すると推定されているが、詳細な位置は同定されていない。また、2-cell blockの分子メカニズムも明らかにされていない。そこで本研究では、2-cell block原因遺伝子座の染色体上の詳細な位置の同定、候補遺伝子解析および胚由来 total RNA の2-cell block 解除に関する解析を行った。

[方法]原因遺伝子座の染色体上の同定には、2-cell block を起こす AKR/N と起こさない C57BL/6 の交配で得た F1 を、AKR/N に戻し交配して作成したバッククロス雌マウス 196 匹を供し、第3および第4染色体上のマイクロサテライトマーカーを用いて連鎖解析を行った。第4染色体上の原因遺伝子座周辺に位置する *Clsn* と *Gn12* について、6系統由来の cDNA をクローニングし、多型解析を行った。AKR/N 特異的なアミノ酸置換が確認された遺伝子 *Gn12* については、その cRNA を AKR/N 2細胞期胚に顕微注入し、2-cell block が解除されるか胚発生を観察した。また、胚由来 total RNA を AKR/N 2細胞期胚に顕微注入し、胚発生の観察を行った。

[結果]連鎖解析の結果、原因遺伝子座は第3染色体の7~25番地（特に17.5番地）付近と第4染色体の54~66番地（特に58番地）付近に存在することが示唆された。候補遺伝子の多型解析の結果、*Clsn* では AKR/N 特異的な変異は検出されなかった。一方、*Gn12* では2箇所 AKR/N 特異的なアミノ酸置換が確認された。しかしながら、*Gn12* cRNA を顕微注入したところ、2-cell block は解除されなかった。胚由来 total RNA を顕微注入した結果、正常発生することが判っている系統の C57BL/6 M2 卵子およびリン酸無添加培地で体外培養した AKR/N 4細胞期胚由来 total RNA では、2-cell block は解除されたが、AKR/N M2 卵子由来 total RNA では解除されなかった。

[考察および結論]本研究では2-cell block原因遺伝子座の染色体上の位置が絞り込まれ、第4染色体上の原因遺伝子座付近に存在する *Gn12* において AKR/N 特異的なアミノ酸置換が検出された。しかしながら、*Gn12* cRNA の顕微注入で2-cell block は解除されなかった。2-cell block の解除には、2つの原因遺伝子が正常発生を示す遺伝子型である必要があることから、まだ *Gn12* が原因遺伝子である可能性を否定することはできない。最後に、リン酸無添加培地で体外培養した AKR/N 4細胞期胚由来 total RNA の顕微注入で2-cell block が解除されたことから、体外培養液からのリン酸の除去は AKR/N 初期胚の転写に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられた。