



マウスの生殖効率に関する研究

進導, 美幸

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2024-09-06

(Date of Publication)

2025-09-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3445号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100492473>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

マウスの生殖効率に関する研究

令和 6 年 7 月

神戸大学大学院理学研究科

進導 美幸

博士論文

マウスの生殖効率に関する研究

進導 美幸

目次

第1章 序論

第2章 マウス過排卵処理に関する研究

第1節 諸論

第2節 材料と方法

第3節 結果

第4節 考察

第3章 精漿タンパク質に関する研究

第1節 諸論

第2節 材料と方法

第3節 結果

第4節 考察

第4章 考察

図

謝辞

参考文献

第1章 序論

マウスは医学・科学研究において最も多用されるモデル生物である。その理由として特筆すべき点は、科学的合理性の観点から遺伝的、微生物的、環境的背景が明らかなことである。まず、マウスは遺伝的に均一な近交系（純系）が多数樹立されている（Russell, 1978）。形質が固定されていることは実験結果の再現性に直結するうえ、それぞれの系統間での比較により、逆に遺伝的差異を利用し、個人差について検討するということも可能にする。次に、マウスは微生物的に完全に制御された環境で飼育されている。細菌や寄生虫、真菌の保有は宿主の生理機能を変化させ、不顕性感染であっても研究結果の不確実性に繋がるため、マウスは病原体を持たない（specific pathogen free ; SPF）動物を検査された供給源から入手し、病原体の侵入を可能な限り防ぐ環境下で飼育する（Baker, 1998）。その他の特徴として、マウスでは体外受精（*in vitro* fertilization ; IVF）による受精卵作製、受精卵や精子をはじめとした配偶子凍結、顕微授精など、多様な発生（生殖）工学技術が確立されている。これらの技術は遺伝子改変マウスの作製など研究目的以外に、動物の SPF 化、施設間での系統の授受やバックアップの目的でも積極的に活用されている。

メスマウスの性周期は約 4 日で、発情前期、発情期、発情後期、発情休止期の 4 つに分類される。性周期の判定は膣細胞（膣スメア）、電気インピーダンス、尿を用いた生理学的解析、そして外性器の目視観察などがあり、膣スメアが最も正確な方法とされ、目視観察が簡便かつ効率のよい方法である（Byers et al., 2012）。発情期のメスはオスを受け入れる可能性が高いことから、発情前期のメスを選別し、個別飼育のオスと一晩同居させ、翌日の午前中に交尾の有無の判定を実施する（Behringer et al., 2016）。メスマウスは交尾成立により白色の膣栓が形成され（図 1）、膣栓確認日から 19 日後に出産す

る。ただし、性周期はそれぞれのメスで異なるために、発情前期のメスを選別するには交配数よりも多くのメスを準備しなければならない。なお、自然交配で得られる受精卵は1匹の C57BL/6N で 9.1 ± 2 個である (Yokoyama et al., 1989)。

メスマウスの排卵前には、脳下垂体から分泌される卵胞刺激ホルモン (follicle stimulation hormone ; FSH) が卵巣中の卵胞の成熟を促す。成熟した卵胞の顆粒膜細胞からはインヒビンが分泌され、下垂体へのネガティブフィードバックにより過剰な卵胞成熟を抑制し、排卵数を一定に保つ (Medan et al., 2007)。卵胞が十分に成熟すると顆粒膜細胞からエストラジオールが分泌され、その血中濃度が上昇することにより視床下部から黄体化ホルモン放出ホルモン (luteinizing hormone-releasing hormone ; LHRH) の大量分泌が起こり、次いで下垂体から黄体形成ホルモン (luteinizing hormone ; LH) が一過的に過剰放出され、その結果、排卵が起こる (図2)。マウスを含めたいくつかの動物種では、これらの内在性ホルモンの代替として、FSH の代わりに妊馬血清性腺刺激ホルモン (equine chorionic gonadotropin ; eCG)、LH の代わりにヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin ; hCG) を一定間隔で投与することで排卵周期を人為的に調節する過排卵処理が有効である (Fowler and Edwards, 1957; El-Ratel et al., 2020) (図2)。eCG および hCG を用いると一頭体からの排卵数の増加、および複数個体の排卵周期の同一化を引き起こすことが可能となり、同時に多数の卵子を得ることができるが、マウス系統 (Spearow and Barkley, 1999) やメスの週齢 (Takeo et al., 2019) により排卵数に差があること、一部系統で eCG への応答性が低いこと (Hasegawa et al., 2012) が報告されている。また、eCG と排卵数の増加には相関関係が認められる一方、過剰な eCG はかえって排卵を阻害する (Sato., 1965) ため、eCG 単体で増やせるマウスの排卵数には限界がある。ラットを用いて内在性のインヒビンとエストラジオールの関係を調べた研究から、インヒビンが発情周期中の FSH 分泌の主要な卵巣側の抑制因子であることがわかった (Arai et al., 1996)。その後、内在性のインヒビンの中

和する新たな過排卵処理が考案され、抗インヒビン血清（anti-inhibin serum AIS）を用いた過排卵処理がハムスター（Kishi et al., 1996）で報告された。続いてモルモット（Shi et al., 2000）、マウス（Wang et al., 2001）など他のげっ歯類でも AIS を用いた過排卵処理が有効であることが示された。さらにマウスでは、AIS と eCG を併用することで 1 匹から 100 個以上の卵子を回収する過排卵処理が開発され（Takeo and Nakagata, 2015）、マウスの過排卵処理で得られる卵子の数は、近年、飛躍的に増大した。しかしながら、腔に射出された精子の数に対し受精の場である卵管膨大部に到達する精子の数は極めて少なく、数十匹程度であるという報告もある（Kawano et al., 2014）。したがって、より効率的に受精卵を得るためには、過排卵処理と連続して IVF を行うことが、大半の系統において最も有効な手段であると考ええる。また、卵子・受精卵採取の際にメスは安楽死させるため、1 個体から得られる受精卵を増やすことは使用するメスの数を減らすことにも繋がり、生殖工学技術は実験動物使用数削減にも貢献する。

マウス IVF の技術は *in vivo* での知見に根差したものも多く、IVF の効率を高めるためには体内受精の研究が必須である。マウスでは卵管まで上走した精子を回収して IVF の効率を調べたり、子宮内液を IVF 培地に添加して精子の受精率の変化を調べたり（Yamashita et al., 2008）、人工的な腔栓を作製することでマウスの人工授精を実施したり（Kawano et al., 2014）と、より自然な受精の状態を再現する試みが行われてきた。しかし、このような実験が実施できるのは身体が小さい実験動物であるからこそ可能であり、ヒトにおいて女性の体内を遊泳する精子を回収して IVF に用いることは非常に難しい。

一方で、マウスを使用しても体内での生理現象を再現できない場合もある。精子は、オスの副性器腺から分泌される精漿と混ざった状態で射出され、メスの生殖管内に一定期間留まることで受精する能力（受精能）を獲得する（Fujihara et al., 2018）。ウシやウマは人工腔を用いて射出精子を回収可能であるが、マウスで射出精子を子宮以外から

回収することはかなり難しい。また、マウスの前立腺分泌液と精嚢分泌液をシャーレ上で混合しても凝固が起こるために、本来の精液を *in vitro* で再現することができない。したがって、マウスの生殖効率を高めるためには *in vivo*、*in vitro* 両方の観点から研究を進めることが重要である。

本研究では、第2章として *in vitro* 研究を発展させるため、卵子の効率的な入手について比較検討を実施した。第3章では、*in vivo* 研究を発展させるため、体内受精において重要とされる精漿タンパク質が精子の受精能に及ぼす影響について機能解析を実施した。

第2章 マウス過排卵処理に関する研究

第1節 緒論

第2章では、マウス過排卵処理に関する研究を行った。過排卵処理とは、IVFに必要な複数の卵子を薬剤によって放出させることを指し、その高い効率性により、1回の実験で使用するマウスを大幅に減らすことが可能となる。FSHとeCGは共に、卵胞の発育とインヒビンの分泌を促す (Fowler & Edwards, 1957)。インヒビンは下垂体からのFSH分泌を抑制することによって排卵を抑制するが、その機能はAISによって中和される (Takeo & Nakagata, 2015)。3週齢から30週齢のC57B6/J (B6J) マウスにおいて、AIS + eCGの投与は、6週齢を除いて、eCG単独投与よりも多くの卵子の排卵を誘導した (Takeo et al., 2019)。

最も頻繁に使用されている近交系マウス系統のひとつであるC57BL/6は、複数の亜系統に分かれており、B6NとB6Jマウスは50年以上も前から分離されている (Mekada et al., 2009)。両系統間に見られる遺伝的な違いはわずかであるが、肥満 (Ge et al., 2019)、糖耐能とインスリン分泌 (Fergusson et al., 2014; Wong et al., 2010)、低酸素虚血性脳損傷に対する反応 (Wolf et al., 2016) などの代謝反応には顕著な違いが存在する。これらの知見から、基礎研究において、とりわけ内分泌系を研究する際にB6亜系統間の混血マウスを使用することは、慎重に検討しなければならない事項であるといえる。いくつかの内分泌ホルモンの分泌は、視床下部－下垂体－卵巣軸を介して調節されている (Baird, 1987) ため、B6亜系統間の内分泌系の表現型の違いは、視床下部－下垂体－卵巣軸の機能変化によって生じている可能性がある。

B6Jは主にトランスジェニック (Tg) マウスやノックアウト (KO) マウス作製に用いられており (Bothe et al., 2004)、B6NはES細胞とジーンターゲティング技術を用いたマウスノックアウト作製プロジェクトで用いられたために利用が広がった (Kang

et al., 2018)。そのような歴史的背景から、今日、この 2 系統を由来とした遺伝子改変マウスが多数存在する。これらの亜系統には薬剤代謝 (Warden et al., 2020) やアルコールの嗜好性 (Ramachandra et al., 2007) など、薬剤投与に対しても異なる表現型を示す例が報告されている。さらに eCG の至適条件は系統により異なり (Spearow, 1988)、過排卵処理の応答性が B6 亜系統間でも異なる可能性が考えられた。加えて AIS を用いた過排卵処理において使用された系統は B6J のみで、B6N を用いた報告がなかった (Mochida et al., 2017; Takeo and Nakagata, 2015)。そこで本章では、B6N および B6J の 2 つのマウス亜系統を用いて eCG による過排卵処理、および AIS + eCG による過剰排卵処理を実施し、亜系統間の排卵数に差があるか検証した。

第 2 節 材料と方法

動物

マウスは C57BL/6NCrSlc (B6N)、C57BL/6JJmsSlc (B6J) の 2 系統を使用した。マウスは SPF 環境下、室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、照明 12 時間点灯 (8 時から 20 時まで)、不断給餌および自由飲水により飼養した。本研究は国立成育医療研究センター動物実験委員会の承認を得て実施した (承認番号: 2005-007)。

過排卵処理、卵子の回収

4-15 週齢の B6N、B6J マウスのメスを使用した。過排卵処理は、16-18 時に 7.5 単位の eCG (あすかアニマルヘルス)、もしくは $100 \mu\text{L}$ の HyperOva® (AIS + eCG の混合物、九動) をメスマウスの腹腔内に投与し、48 時間後に 7.5 単位の hCG (あすかアニマルヘルス) を腹腔内に投与した。hCG 投与後 14-16 時間でマウスを安楽死させ、卵管から卵子を回収した。卵子は mHTF 培地 (九動) を流動パラフィン (ナカライテスク) で覆った 35 mm ディッシュ (IWAKI) 中で培養した。

統計処理

解析には過排卵処理への応答が低い、あるいは応答しなかった個体の排卵数も含む。数値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。B6N と B6J の排卵数の有意差 (P 値) は Student の t -検定または Mann-Whitney の U 検定を用いて算出した。 $P = 0.05$ 未満を有意とした。

第3節 結果

4 週齢および 10–15 週齢のメスマウスに eCG を単独で処理した場合、B6N マウスの平均排卵数は 20.0 ± 1.5 であったのに対し、B6J マウスでは 21.5 ± 2.7 と、系統間に有意な差は見られなかった (図 3 A、B、C、 $P = 0.761$)。AIS + eCG を 4 週齢および 10–15 週齢のメスマウスに投与した場合、B6N の平均排卵数は 37.2 ± 2.0 であったのに対し、B6J では 47.7 ± 3.8 と有意差は見られなかったものの、B6J において高い傾向にあった (図 3 A、B、C、 $P = 0.0540$)。

図 3 A、B からわかるように、B6J 系統の 4 週齢メスマウスに AIS + eCG 処理を行った場合、約 100 個の排卵を示す個体が観察された。そこで AIS + eCG 処理に関して、4 週齢メスマウスのみデータを抽出し比較した。その結果、B6N の平均排卵数は 37.7 ± 5.2 に対し、B6J では 61.9 ± 10.3 と有意差は出ないものの、B6J において高い値を示した ($P = 0.118$)。また eCG 単独処理に関しても 4 週齢メスマウスを用いてデータを集めて比較したところ、B6N の平均排卵数は 26.2 ± 2.2 、B6J では 32.4 ± 2.9 と、やはり有意差はないものの B6J で高い値となる傾向が見られた ($P = 0.073$)。

第4節 考察

本研究では、B6N 系統および B6J 系統のメスマウスを用いて eCG および AIS + eCG

処理を行い、排卵数を検証した。その結果、両方の系統ともに eCG 単独処理より AIS + eCG 処理により排卵数が増加した。その排卵数は、B6N よりも B6J 多い傾向を示したが、有意な差は見られなかった。また、以前に報告された内容と同様に (Takeo et al., 2019, Takeo and Nakagata, 2015)、B6N および B6J メスマウスから採取した卵子を体外受精に用いた場合、受精率は AIS の有無に影響されなかった。本研究の結果から、B6N と B6J 間における過排卵処理に対する反応性は類似していると考えられた。

eCG と hCG による過排卵処理の排卵数は、B6J 系統で 47.3 ± 2.5 個、A/J 系統は 10.3 ± 1.6 個である (Spearow, 1999)。この報告では、C57BL/6J 系統のメスは、A/J 系統のメスよりも外来の eCG に対する反応性が高く、一方で hCG 単独投与のみの場合は C57BL/6J のメスが A/J のメスよりも排卵数が少ないことから、C57BL/6J 系統は外来の hCG に対する反応性は低いと考えられる。したがって、C57BL/6J 系統の eCG-hCG に対する比較的高い応答性は内在性ゴナドトロピンによる多数の卵胞成熟が起こったことよりも、卵胞成熟の誘発または卵胞閉鎖の阻止に関する機構が両系統で異なることに起因する可能性がある (Spearow, 1988)。また、C57BL/6J と A/J のホルモン誘導性の排卵数の違いに関わる遺伝子座が 17 番染色体上の主要組織適合遺伝子座 (Histocompatibility-2 ; H-2) 付近にあり、さらに A/J と SLJ/J、A.SW/SnJ 系統の比較からは H-2 周辺の遺伝子座以外に 2 つもしくは 3 つの遺伝子座に関わる可能性が示されている (Spearow and Bradford, 1983) が、いずれも原因となる遺伝子の特定は進んでいない。本研究で AIS を用いた過排卵処理において、4 週齢の B6J のみ 100 個近い排卵をした個体が観察された原因は不明であるが、視床下部-下垂体-卵巣軸の反応性が、少なくとも 4 週齢の時点では B6N と異なること、その素因はこれら H-2 周辺の遺伝子座に由来する可能性がある。今後、B6 の垂系統間で H-2 周辺の SNP 探索、RNA-seq による発現量解析、性腺機能およびホルモン分泌に関わる視床下部や下垂体などの発生過程を比較することによって、過排卵処理への応答性が系統により異なる理由が明

らかにされると考える。

成熟メスを使用した過排卵処理において、eCG 単独使用時（B6N で 20.0 ± 1.5 個、B6J で 21.5 ± 2.7 個）に対し、AIS を併用した場合は（それぞれ 37.2 ± 2.0 個および 47.7 ± 3.8 個）と、両系統ともに排卵数が約 2 倍にも増加した。この結果から、AIS を利用することは、同じ卵子数を確保する際に必要なメスの数が約半分で済むことを意味し、動物使用数の削減に直結する。現在、国立成育医療研究センターで 1 年間に保存する遺伝子改変マウスの受精卵の 8 割以上は C57BL/6 系統に由来する。B6N および B6J において AIS に対する排卵数に大きな違いがないという結果が得られたことは、受精卵保存・個体復元業務を実施する上で有意義な結果となった。

第3章 精漿タンパク質に関する研究

第1節 緒論

第3章では、自然交配下でのマウスの受精メカニズムについて解析を行った。体外受精と体内受精において大きく異なる点のひとつに、精子がオス個体から射出されてメス個体へ移動する点がある。オスの射出時には精子は、液性成分である精漿と混合される。精子が遺伝情報の伝達を担うのに対し、精漿は精子のエネルギー源となるだけでなく、運動・受精といった機能の調節、精液の凝固による精子の流出防止、抗菌作用、抗酸化作用など複数の役割を併せ持つ (Iwamoto et al., 1992; Edstrom et al., 2008; Jensen-Seaman & Li, 2003)。

精漿中に存在するタンパク質は、その種の生殖効率に直結することから分子進化速度が速いことで知られる (Swanson & Vacquier, 2002; Karn et al., 2008; Ramm et al., 2009; Claw et al., 2018)。霊長類の精漿タンパク質においても社会性行動と相関してアミノ酸配列や構造が変化し、生理的な違いに繋がった可能性が示されている (Jensen-Seaman and Li, 2003)。ヒト精囊から分泌される精漿タンパク質 Semenogelin (SEMG) は強塩基性のタンパク質で、精液の凝固や精子の運動性、受精能を抑制するはたらきを持つ (Robert & Gagnon, 1999)。多くの霊長類において SEMGI と SEMGII が存在し、SEMGII をコードする遺伝子 *SemgII* の変異増加は、種特異的な精液凝固やメスの乱交レベルと相関がある (Dorus et al., 2004)。

げっ歯類の精囊では、精漿タンパク質 seminal vesicle secretions (SVS) と名付けられた7つのタンパク質、SVS1 から SVS7 が合成、分泌される (Ramm et al., 2009)。マウスでは、SVS2 が精囊から分泌される主な強塩基性タンパク質であり、精子細胞膜からのステロールの流出を防ぎ、遊離コレステロールを精子細胞膜に取り込むことで、精子の受精能を抑制することが知られている (Kawano & Yoshida, 2007)。Srs2 遺伝子はマ

ウス 2 番染色体上に局在し、精嚢分泌物の成分をコードする 5 つの遺伝子 (*Svs3a*, *Svs3b*, *Svs4*, *Svs5*, *Svs6*) は *Svs2* とタンデムに並んでおり、それら遺伝子群の長さは約 100 kbp である。*Svs2-6* 遺伝子は、乳清酸性タンパク質 4 ジスルフィドコア型 (whey acidic protein four-disulfide core; WFDC) プロテアーゼ遺伝子の祖先遺伝子が重複して生じたものであるとされており、*Svs3a*, *3b* が *Svs2* のパラログである (Clauss et al., 2002; Clauss et al., 2005)。

ヒト SEMGI/II およびマウス SVS2-6 タンパク質を比較すると、機能的に類似する点が多くあり、ゲノム遺伝子座にも類似性がある一方で、遺伝子配列の相同性の低さから *SemgI/II* と *Svs2-6* の種間比較はこれまで実施されてこなかった。マウス SVS2 は単独で精子の受精能を抑制することが知られているが、SVS2 以外にも SVS4 にも同様の機能がある。また、SVS3 は単独で受精能獲得を抑制しないが、SVS2 と共処理することで SVS2 単独よりも強い受精能抑制作用を示す (Araki et al., 2016)。一方で、遺伝子クラスターの形成によって、異なる機能を重複遺伝子に付与することがある。これらの *Svs* 遺伝子群がクラスターとして機能している可能性も含め、*Svs* 遺伝子群が体内受精に果たす機能に着目し、この領域を欠失したマウスを作製し、その表現型について解析を実施した。

第 2 節 材料と方法

ドットプロット解析

マウス *Svs2*, *Svs3a*, *Svs3b*, *Svs4*, *Svs5*, *Svs6* およびヒト *SemgI*, *SemgII* の遺伝子の相同性を調べる目的で、Advanced PipMaker (<http://pipmaker.bx.psu.edu/cgi-bin/pipmaker?advanced>) を使用した。解析に使用したゲノム情報は UCSC Genome Browser (<https://genome-asia.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) から入手した。

Svs2-6 欠損マウス作製

Svs2-6 欠損マウスの作製には、以前の研究で既に作製されていた *Svs2*^{+/-}マウスを利用した (Kawano et al., 2014)。*Svs2*^{+/-}マウスには *Svs2* 領域に loxP 配列が 1 カ所残存した。そこで、*Svs* クラスターの最も下流に存在する *Svs5* の下流に、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム切断とホモロジーアーム・loxP 配列を持つ single-stranded oligodeoxynucleotides (ssODN) を用いることにより、もうひとつの loxP 配列を挿入することを目指した (図 5A)。gRNA は専門の Web ツールを用いて設計した (crispr.genome-engineering.org、図 5A)。gRNA と Cas9 mRNA は Inui et al., 2018 に従い合成した。ssODN は Integrated DNA Technologies から購入した (図 5B)。

インジェクションに用いる受精卵は体外受精により作出した。卵子は、B6D2F1 のメスに過排卵処理を行うことで得た。精子は、成熟した *Svs2*^{+/-} のオスマウスから精巣上体尾部を回収し採取した。gRNA、Cas9 mRNA、ssODN の混合溶液を受精卵の前核に顕微鏡下で注入し、翌日までオイルを張った KSOM ドロップにて CO₂ インキュベーターで培養した。2 細胞期胚を ICR の偽妊娠メスの卵管に移植し、19 日後に F0 個体を得た。生後 3 週間で離乳し、尻尾からマウスゲノムを抽出し、P1/P2 プライマーを用いて loxP 配列の検出を行った。loxP 配列を持つ 4 匹の F0 個体 (*Svs2*^{+/-}、loxP-KI) を C57BL/6J のメスと交配させ F1 世代を得た。このうち、同一染色体上に loxP を持つ個体 (*Svs2*^{+/-}、loxP-KI) を B6; 129S4-Meox2<tm1(cre)Sor>/J (*Meox-cre* Tg) と交配させ、F2 世代を得た。F2 世代の仔のゲノムを用いて P5/P6 プライマーおよび Cre_F/R プライマーで genotyping を行った。

マウスは SPF 環境下、室温 23 ± 1°C、照明 12 時間点灯 (8 時から 20 時まで)、不断給餌および自由飲水により飼養した。本研究は国立成育医療研究センター動物実験委員会の承認を得て実施した (承認番号：2004-004)。

精嚢分泌物の調整

精嚢は 8–20 週齢のオスマウスから回収し、内容物を 1 mL の 8 M 尿素に完全溶解した。サンプルを SDS–PAGE により分離し、クーマシンブルー (CBB) 液にて染色した。本研究は明治大学動物実験規定に則り実施した (IACUC15-0014)。

in vivo / *in vitro* におけるオスマウスの妊孕性確認

in vivo での受精能を確認するため、8–16 週齢のメスマウス 2 匹を 8–16 週齢のオスマウス 1 匹と 2 週間同じケージで飼育し、その後 19 日以内に何匹の産仔が得られるか調べた。

in vitro での受精能を確認するため、8–12 週齢の C57BL/6J のメスマウスに過排卵処理をして卵子を回収した。12–16 週齢のオスマウスから精巢上体尾部精子を取り出し、100 μ L の TYH ドロップ培地に懸濁した。さらに TYH ドロップ培地で精子を 10 倍希釈し、受精能獲得のため 2 時間培養した。その後、卵子を入れた IVF ドロップ培地へ、 1.5×10^5 精子/mL になるように精子を添加した。6 時間の培養後、卵子は Hoechst33342 (Invitrogen) にて染色し、蛍光顕微鏡 (Olympus) にて観察することで前核の形成率を算出した。

精子のミトコンドリア活性は MitoTracker Deep Red FM (Thermo Fisher Scientific) を用いて Iwai et al., 2018 に従って行った。精巢上体尾部から回収した精子と 500 nM の MitoTracker を 37°C で 30 分間培養した後、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss) にて観察した。

統計処理

データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。統計処理には Student の t-検定を用いた。 $P = 0.05$ 未満を有意とした。

第3節 結果

ヒト *SemgI* は下流に *SemgII* が、マウス *Svs2* は下流に *Svs3-6* がそれぞれ存在する。しかし種間におけるアミノ酸の相同性が高くないことから、これまで配列比較は実施されてこなかった。そこで、周辺遺伝子を含めたゲノム領域を用いてドットプロット解析を行った (図 4A)。その結果、マウスおよびヒトに共通してみられる相同遺伝子 *Slpi* および *Wfdc15b* では、相同性が 50% を超える黒いドットの表示が 遺伝子のイントロンおよびエクソン関係なく全体に見られた。一方、ヒト *PI3* 遺伝子は今回抽出したマウスゲノム領域に相同遺伝子は存在せず、さらにドットプロット解析から顕著な黒いドットのシグナルが検出されなかった。これらの結果から、ドットプロット解析は遺伝子の相同性を検出するのに適した方法であることが分かった。

この方法を用いてヒトとマウスの精囊タンパク質をコードする遺伝子を調べたところ、ヒト *SemgI* とマウス *Svs2*, *Svs3a*, *Svs3b*, *Svs4*, *Svs5*, *Svs6* の間、さらにヒト *SemgII* とマウス *Svs2*, *Svs3a*, *Svs3b*, *Svs4*, *Svs5*, *Svs6* との間に、相同性が 50% を超える黒いドットが検出された。しかし *Slpi* や *Wfdc15b* 遺伝子とは異なり、相同性が見られたゲノム領域は大半が CDS 以外の領域であった。

さらに SMART を用いてタンパク質のドメイン検索をおこなった (図 4B)。その結果、ヒト SEMGI・II には Semg ドメインが同定された。またこのドメインは、マウス SVS2、SVS3 の N 末にも部分的に存在していることがわかった。また SVS2 および SVS3 の中間および C 末には SVS_QK ドメインが複数検出され、このドメインはヒト SEMGI および SEMGII には検出されなかった。一方で、マウス SVS4-6 にはヒト Semg ドメインは見られず、代わりに SVS4_5_6 ドメインが見られた。

以上の結果から、ヒト *SemgI/II* とマウス *Svs2-6* の遺伝子群は互いに相同である可能性が示された。

次に *Svs* 遺伝子群の機能解析を行うために、*Svs2-6* 欠損マウスを作製した。顕微鏡を用いたマイクロインジェクションにより gRNA、Cas9 mRNA、ssODN を前核に注入した (図 6 A)。その結果、99 個の 2 細胞期胚が得られ、3 匹の仮親に胚移植を実施し、33 匹の F0 個体を得た (図 6 A、B)。F0 世代のゲノムを用いて genotyping を行ったところ、10 匹において loxP 配列を持つことが確認された。このうち 5 匹を B6J と交配し、得られた F1 個体のゲノムを用いて P1/P2 プライマーおよび P3/P4 プライマーを用いて PCR を実施し、同一染色体上に loxP 配列を有する F0 世代の選別を実施した (図 6A、図 7A)。その結果、#711 の 1 個体のみが目的通りの変異を有していることが判明した (図 6B)。この個体のゲノムを用いた PCR 産物をクローニングし配列を確認した結果、12 クローン中 5 クローンで不完全な loxP 配列が確認されたが (図 7B)、C57BL/6J のメスと交配して得た F1 個体では 6 匹のうち完全な loxP 配列を持つ個体が 2 匹得られた。この F1 個体を *Meox-cre* Tg マウスと交配し F2 世代を得たところ、約 100 kbp 離れていた二つの loxP の間が Cre リコンビナーゼによって消失し、P5/P6 プライマーで PCR を実施したところ予想された約 1000 bp サイズのバンドを検出することができた (図 5C、図 7C)。以上の結果より、塩基配列上で設計通り *Svs2-6* を欠損したマウスを作製することに成功したと考えた。

Svs2-6^{-/-} マウスの精囊分泌物を SDS-PAGE で分離し CBB 染色を実施した。野生型マウスの精囊分泌物では、約 100 kDa に SVS1、約 40 kDa に SVS2、約 36 kDa に SVS3、約 15 kDa に SVS4、約 14 kDa に SVS5、約 11 kDa に SVS6 および SVS7 が検出された (図 8A)。しかし今回作製した *Svs2-6*^{-/-} マウスの精囊分泌物には約 15–40 kDa 間にみられる SVS2–6 が検出されなかった。*Svs2-6* とは別の染色体上に存在する *Svs1* および *Svs7* がコードする SVS1、SVS7 のタンパク質は検出されたが、その発現量は野生型マウスのものと異なり、SVS1 は減少し、SVS7 は増加する傾向がみられた。さらに野生型

マウスの精嚢分泌物には見られなかった複数のバンドも検出された(図 8A、黒矢頭)。

*Svs2-6^{-/-}*マウスの外見上の形態は野生型マウスと比較して変化は見られず(図 8B-a、e)、精嚢の形態およびその内部構造についても野生型マウスと大きな違いは見られなかった(図 8B-b、c、f、g)。*Svs2-6^{-/-}*オスマウスの妊孕性を確かめるため、野生型メスマウスとの自然交配を実施した。その結果、産仔数は 0.43 ± 0.14 と野生型オスマウスと比較すると非常に低い値であったが、*Svs2^{-/-}*オスマウスを用いた時の産仔数 0.63 ± 0.13 と同程度の産仔数であった(図 8C、 $P = 0.420$)。さらに精巣上体精子を用いた IVF では野生型オスマウスと同等の高い受精率を示し(図 8D)、精巣内での精子形成も正常であること(図 8B-d、h)、精子のミトコンドリア活性を測定した結果も野生型オスマウスと同等の値を示した(図 8E)。以上の結果から、作製した *Svs2-6^{-/-}*オスマウスの妊孕性は非常に低いものの、精子の形態や運動性には問題がないことが明らかとなった。

第 4 節 考察

Svs 遺伝子ファミリーの機能を包括的に理解するために、本研究では *Svs2-6* 遺伝子座全体を欠損させた *Svs2-6^{-/-}*マウスを作製した。*Svs2-6^{-/-}*マウスから採取した精巣上体尾部の精子は形態も機能も正常であったが、雌性生殖器内での繁殖力は著しく低かった。この結果は、*Svs2^{-/-}*オスマウスに見られる表現型と類似している(Kawano et al., 2014)。*Svs2-6^{-/-}*オスマウスから得られた産仔数と、*Svs2^{-/-}*オスマウスから得られた産仔数を比較すると、*Svs2-6^{-/-}*オスマウスの産仔数が *Svs2^{-/-}*オスマウスの産仔数よりわずかに低下する傾向がみられたが、有意な差は認められなかった。この結果は、*Svs* 遺伝子ファミリーの中でも SVS2 が最も妊孕性に関与するタンパク質であることを示唆する。

*Svs2^{-/-}*オスマウスでは、産仔数が減少する原因をメス子宮内における精子生存率の低下にあると報告している(Kawano et al., 2014)。本研究においてもほぼ同じ表現型が得

られたことから、*Svs2-6*^{-/-}オスマウスの精子もメス生殖器内で死滅している可能性が高い。SVS2 が精子と結合するには、精子細胞膜に存在するガングリオシド GM1 が必要である (Kawano et al., 2008)。GM1 は、SVS3 や SVS4 よりも高いレベルで SVS2 と相互作用し (Araki et al., 2016)、SVS2 タンパク質は SVS3-6 を介さずに精巣上体精子が子宮内で生存することを助けるはたらきを持つ (Kawano et al., 2014)。そして比較プロテオミクス解析により、SVS2 が種を超えて精子の競合レベルと正の相関性があることが報告されている (Ramm et al., 2009)。これらの結果からも、マウスの生殖において SVS2 が極めて重要であることが分かると同時に、SVS3-6 タンパク質が体内受精における SVS2 の欠損を補うことができないと考えられる。

自然交配では、SVS2 はメスの生殖管内で様々な長さに分解される。また、ヒト SEMGI/II も前立腺から分泌される前立腺特異抗原 (PSA) と呼ばれるセリンプロテアーゼによって分解される (Amelar, 1962)。ヒトとマウスにおける精漿タンパク質の断片化から、SVS2 と SEMGI/II は複数または短い配列からなる、機能的に保存されたドメインを含むという仮説が立つ。実際、SEMG I と II は繰り返し単位を含み、精子運動阻害剤や精漿タンパク質分解後の殺菌剤としてはたらく (Iwamoto et al., 1992; Jensen-Seaman & Li, 2003; Edstrom et al., 2008)。SVS2 の断片化メカニズムはまだ不明であるが、本研究においてドメイン解析をおこなった結果、SVS2 中に 17 回繰り返されているユニークな繰り返しドメイン、SVS_グルタミンおよびリジン (QK) が明らかになった (図 4 B)。単一の SVS_QK ドメインは塩基性アミノ酸 K を含む 12 個のアミノ酸からなり、哺乳類ではラットとマウス由来の精漿タンパク質でのみ検出される。SVS4、5、6 のいずれにもこのドメインが存在しないことから、SVS_QK ドメインは *Svs* 遺伝子群の拡大後に進化した可能性がある。SVS_QK ドメインの機能は不明であるが、塩基性アミノ酸の繰り返しはメスの生殖管における免疫寛容や、メスの免疫系からの精子の保護の役割を可能にすると考えられる。

Svs 遺伝子群は、比較的最近になってタンDEM重複により出現した (Ramm et al., 2009)。どの遺伝子も 3 つのエクソンからなり、*Svs2-6* 遺伝子の塩基配列は、第 1 エクソンと予想プロモーター領域を含むその上流領域において、ヒト *SemgI/II* と相同性が高いことが判明した (図 4 A)。相同性が低い領域は、精液のゲル化または凝集 (腔栓) の形成に必要な分泌タンパク質の大半をコードする第 2 エクソンにある。*Svs2-6* 遺伝子がコードする分泌タンパク質のアミノ酸は多様であり、この多様化は *Svs* 遺伝子ファミリーの急速な進化によって説明することが可能であり、これは種特異的な交尾行動や種分化に対する適応に相当する (Lundwall, 1996; Dorus et al., 2004)。同様のケースとして、主要組織適合性複合体 (MHC)、抗菌ペプチド、免疫グロブリンをコードする遺伝子などはいくつかのパラログや偽遺伝子重複が存在する (Hughes & Yeager, 1998; Ota et al., 2000; Semple et al., 2003; Fawcett & Innan, 2011)。NKG2D リガンドとして知られる、MHC クラス I 様分子は多くのウイルスが免疫を回避するための主要な標的である (Jonjić et al., 2008)。MHC 領域に位置する祖先遺伝子の NKG2DL 遺伝子は重複を経て、MIC 遺伝子と MILL 遺伝子を生み出した。これら 2 つの遺伝子は有体類のオポッサムでは保持されているが、ヒトでは MILL 遺伝子が失われ、げっ歯類では MIC 遺伝子が失われた。NKG2DL 遺伝子ファミリーの種特異的進化は、種特異的病原体の感染を引き起こす。このような免疫学的観点からも、マウスの SVS2 タンパク質は子宮内でメスの免疫反応から精子を保護する役割を担っていると予想される (Kondo et al., 2010)。

第4章 考察

Russell と Burch が提唱した動物実験の 3Rs (Replacement、Reduction、Refinement) の概念は、動物の愛護及び管理に関する法律第五章、第四十一条にも規定されているように、動物実験において必須の理念である。質の高い研究と、3Rs によって非人道性を最小限に抑えることは同じゴールを目指しており、その結果として効率的な研究が可能になる。また、動物実験における「効率的」とは、金銭的、動物資源、施設、人員から最大限の科学的・医学的知見を得ることである (Tannenbaum and Bennett, 2015)。過排卵処理および IVF を用いてマウス受精卵を得ることは、3Rs のうち reduction の達成に直結し、それぞれの技術には遺伝学や生理学、発生学といった分野横断的な知見が求められる。

本研究の第2章では、最も研究で利用実績がある近交系マウス B6 の亜系統、B6N と B6J を用いて、eCG 単独投与、または AIS と eCG を併用した2種類の過排卵処理を実施し、排卵数を比較した。その結果、両系統の排卵数に有意差はみられなかった。注目すべき点として、4週齢の B6J に AIS を併用した過排卵処理時にのみ、1個体で 100 個近い排卵を示す個体が観察されたことが挙げられる。近交系マウスは遺伝的に均一であるため、この表現型は確率的、あるいは環境的な事象によるものと考えられる。B6.C3-A^{vy}/J は近交系であるが、個体により毛色が異なるという特徴を持つ。この表現型は毛色に関わるアグーチ遺伝子上流に挿入された intracisternal A particle (IAP) 型レトロトランスポゾンが制御因子として機能することに由来し、プロモーター領域の DNA メチル化の程度により黄色（低メチル化）から野生色（高メチル化）の体毛となる (Morgan et al., 1999)。また、一般的な DNA メチル化は受精直後にリセットされる (Morgan et al., 2005) が、A^{vy} 対立遺伝子を制御する IAP のメチル化状態は部分的にリセットされず、母親の栄養状態に依存することが知られている (Cropley et al., 2006)。他にも、1つの

繁殖コロニーから得られた C57B6/J マウスを 5 つの異なる施設でそれぞれ飼育し、その後異なる 1 つの動物施設にマウスを集約し飼育した研究では、異なる飼育施設で飼育されたマウスはマイクロバイオーーム組成をはじめ、体重や慢性ストレスの指標となる副腎重量、オープンフィールドテストや明暗試験の結果、行動に関わる脳領域のクロマチンアクセシビリティに違いがみられるなど、飼育環境が分子レベルから行動レベルにまで幅広く影響を与えることが報告されている (Jaric et al., 2022)。これらの事例からも、排卵数に関与する因子は遺伝的要因以外にも多数存在する可能性があり、今後原因遺伝子の特定およびエピゲノム、飲水、餌、床敷といった飼育環境など多角的な視点から研究を進めていきたい。

第 3 章では、CRISPR/Cas9 システムを用いて *Svs2*^{-6/-} マウスを作製することに成功した。作製した *Svs2*^{-6/-} マウスは *Svs2*^{-/-} マウスと類似の表現型であった。このことは、SVS3-6 が SVS2 の機能を補う効果がないことを示している。したがって、マウス体内受精においてもっとも重要な精漿タンパク質は SVS2 であるといえる。精漿タンパク質について、ヒトとマウスの動物種間における遺伝子の相同性を解析した結果、ヒト *Semg* とマウス *Svs* が存在する染色体領域のうち、遺伝子間領域の保存性が高いことが示された一方で、タンパク質をコードする遺伝子の相同性が低かった。このことは、精漿タンパク質は分子進化速度が早いという、これまでの報告 (Ramm et al., 2008) と一致する。さらに本研究ではヒト-マウスで共通するドメイン構造についても初めて示された。今後は、SVS2 にみられた *Semg* ドメインが有する機能について、解明を進める必要がある。

その後の解析で、*Svs2*^{-6/-} マウスのオスは若年期から前立腺肥大を発症し排尿障害を呈することが判明した (Shindo et al., unpublished)。原因として、*Svs2*^{-6/-} マウス作製時に染色体上から約 100 kbp の領域を除いたため、発現制御配列や microRNA をコードする領域などを欠損した可能性がある。本実験において欠失させた *Svs2*-6 の遺伝

子領域の約 15 kbp 下流には *secretory leukocyte protease inhibitor* (*Slpi*) 遺伝子が存在する。*Slpi* 遺伝子は、近年、前立腺がんの新たなバイオマーカーとなる分子であると注目されており、前立腺がんの細胞や組織において高発現している (Miyazaki et al., 2022)。この分子のプロモーター領域は *Svs* 遺伝子クラスターとは逆の位置に存在するが (Kikuchi et al., 1995)、その発現制御部位が今回作製した欠失領域にある可能性は否定できない。その他、一般的にはヒト前立腺肥大において男性ホルモンの変化が密接に関係している (Vignera et al., 2016) との報告があるため、今後、*Svs2-6*^{-/-} マウスのホルモン値に異常がないか測定する予定である。

Svs2-6^{-/-} マウスは、マウス特有に発現する精漿タンパク質の大半を発現しないことを利用して、ヒト *Semgl/II* を発現する (*Semg*-KI) マウスの作製を実施した (Shindo et al., unpublished)。Yoshimi et al., 2016 で報告された 3H2OP 法を利用し、1 つの gRNA でマウスゲノムを切断、2 つの gRNA でヒト *Semg* を含む BAC クローンを切断し、相同組み換えのホモロジーアームとしてマウスゲノムとヒトゲノムを含む ssODN を用いた。その結果、期待されたゲノム編集が起こり、*Semg*-KI マウスの作製に成功した。*Semg*-KI マウスの精漿中には、SVS2-6 が存在しないこと、SEMGI/II が検出されることが確認された。この KI マウス系統を用いることで、ヒト *Semg* が体内で果たす役割について検討することが可能となるはずである。今後、さらなる解析に取り組みたい。

マウスの生殖効率を高めるためには、今後も継続して卵子の質・数を高めること、精子の運動性・受精能を含めた受精機構の解明が必要である。AIS + eCG を用いた過排卵処理は幅広い週齢に対して過排卵処理が有効であることが報告されているが、当施設において野生型のメスを用いる場合は基本的に 12 週齢で過排卵処理を実施している。また、オスは 10 週齢以降 48 週齢以内を使用している。各研究者が飼育する遺伝子改変マウスを用いる場合には先述の条件に当てはまらない個体が提供されることも多く、マ

ウスの週齢および遺伝的背景などに応じて排卵数や受精率が大きく変動する。したがって、過排卵処理や受精環境の至適条件を探すことは重要であるが、一方で卵子や精子の質が担保されない条件下でいかに効率を高めるかという点も実務において求められる。本研究を遂行することで異なるマウス亜系統においても同一の過排卵処理が有効であることや、精漿タンパク質が自然交配に必要であることが示されたが、あくまでマウスの生殖における一部分を解明したに過ぎない。今後もマウス生殖について卵子、精子、*in vivo*、*in vitro*、それぞれの側面から生殖効率を高めるための研究を続けていきたい。

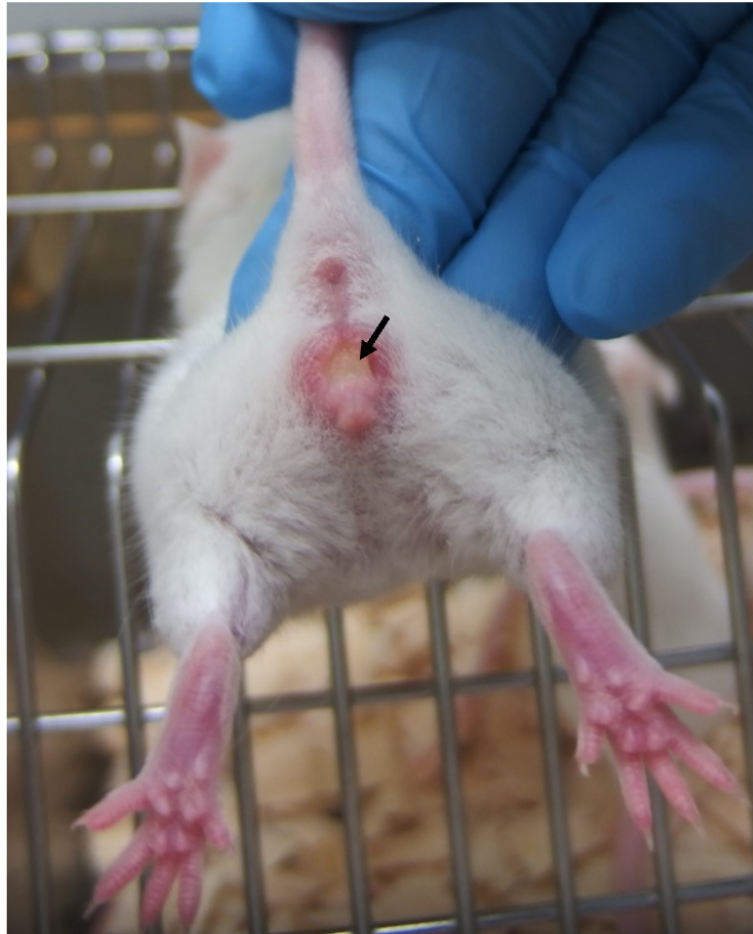


図1：マウスの膣栓

発情前期のメスと、成熟したオスを一晩同居させると、翌朝にメスの膣口に膣栓(矢印)が確認される。これによってメスが交尾に成立したと判定する。胚移植に使用する偽妊娠マウスを作製する場合は、精管結紮したオスを使用する。

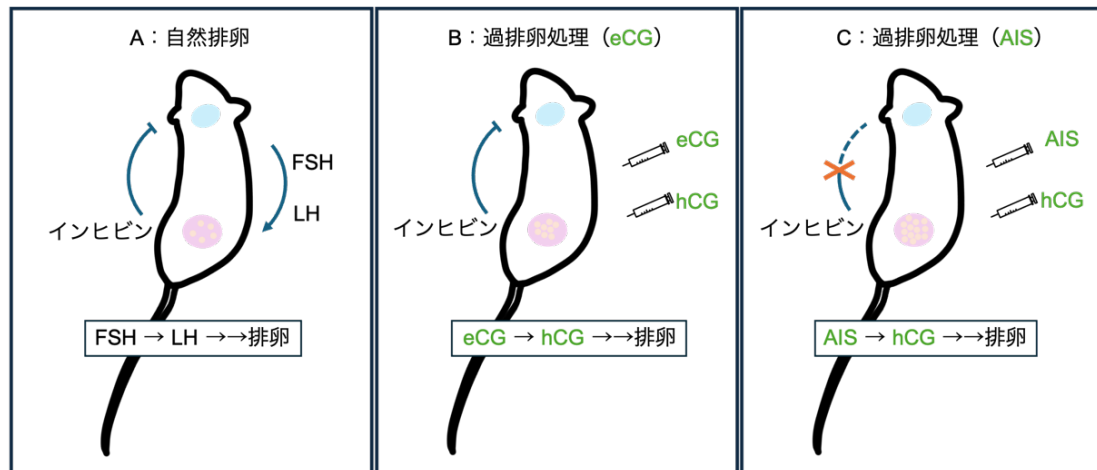


図 2：マウス排卵に関する模式図

A：自然排卵では脳下垂体から分泌された卵胞刺激ホルモン（FSH）が卵巣中の卵胞の成熟を促す。成熟した卵胞からはインヒビンが分泌され、過剰な数の卵胞成熟を防ぐ。最終的に、下垂体から分泌される黄体形成ホルモン（LH）の過剰放出（LH サージ）により排卵が起こる。

B：過排卵処理時には、FSH の代わりに eCG、LH の代わりに hCG を用いる。この際もインヒビンの分泌は起こる。

C：AIS 処理時には、内因性のインヒビンの作用が抑制されるため、過剰な数の卵が排卵される。

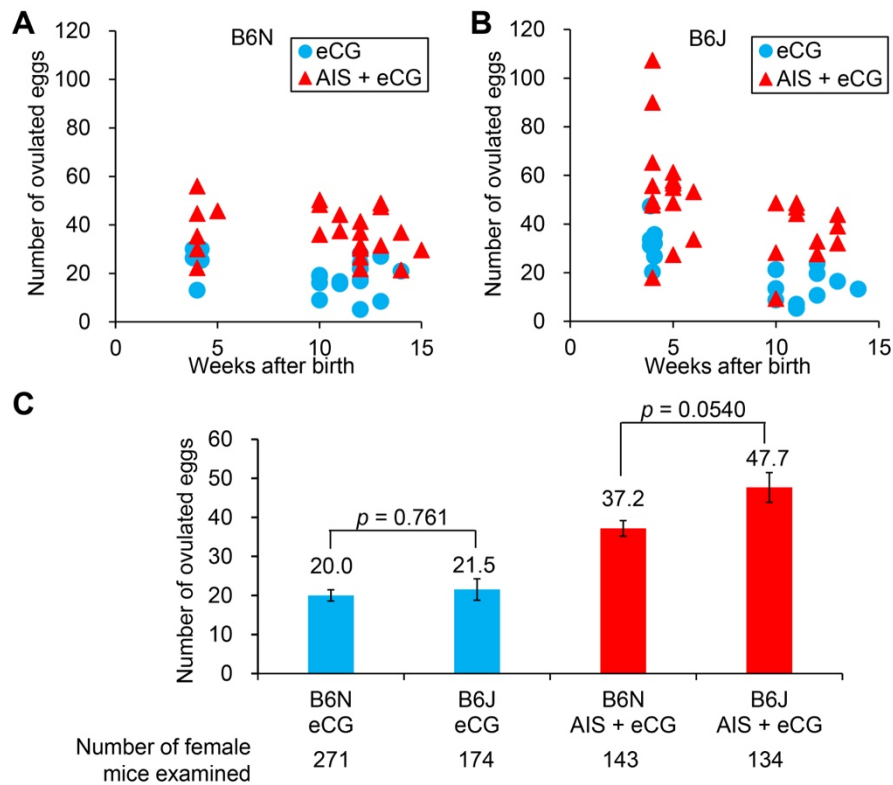


図3：C57BL/6N（B6N）とC57BL/6J（B6J）の2系統において過排卵処理によって得られた排卵数

亜系統間で排卵数を比較するため、B6N（A）とB6J（B）に対してeCG単体（青○）、eCG + AIS（赤△）の2種類の過排卵処理を実施した。グラフA・B内の△および○はそれぞれ3匹または4匹分の平均排卵数を示す。C：亜系統間における各過排卵処理時の排卵数の比較。

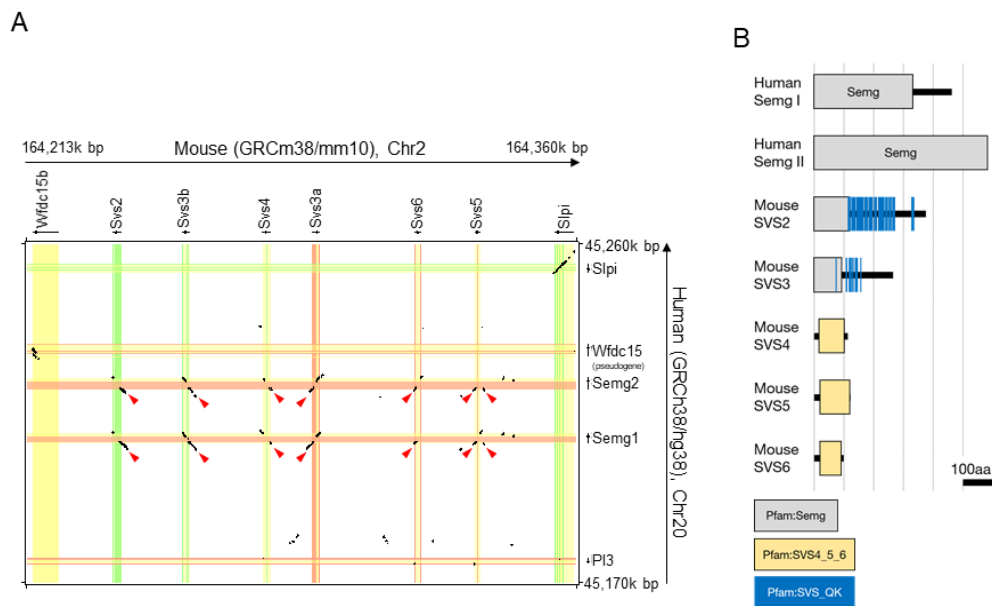


図 4：マウスとヒト精漿タンパク質の比較解析

A：PipMaker によるヒト *Semenogelin* (*Semg*) とマウス *Svs* の種間配列比較。X 軸がマウス 2 番染色体上の *Svs* 遺伝子群とその周辺遺伝子、Y 軸がヒト 20 番染色体上の *Semg* 遺伝子とその周辺遺伝子を示す。X 軸上にマウスの塩基配列の場所を示し、ヒト配列との配列相同性が高い (50–100%) 場所を黒点で示す。オレンジと緑の網かけ部分はそれぞれ+鎖、−鎖のエクソンを示し、黄の網かけはイントロンを示す。赤い矢じりはマウスーヒトにおいて遺伝子配列の類似性が高いことを示す。

B：ヒト SEMGI/II およびマウス SVS2–6 のドメイン構造。SEMG I/II と SVS2、3 は *Semg* ドメインを共有している (灰ボックス)。SVS4–6 は他のドメインを共有している (黄ボックス)。

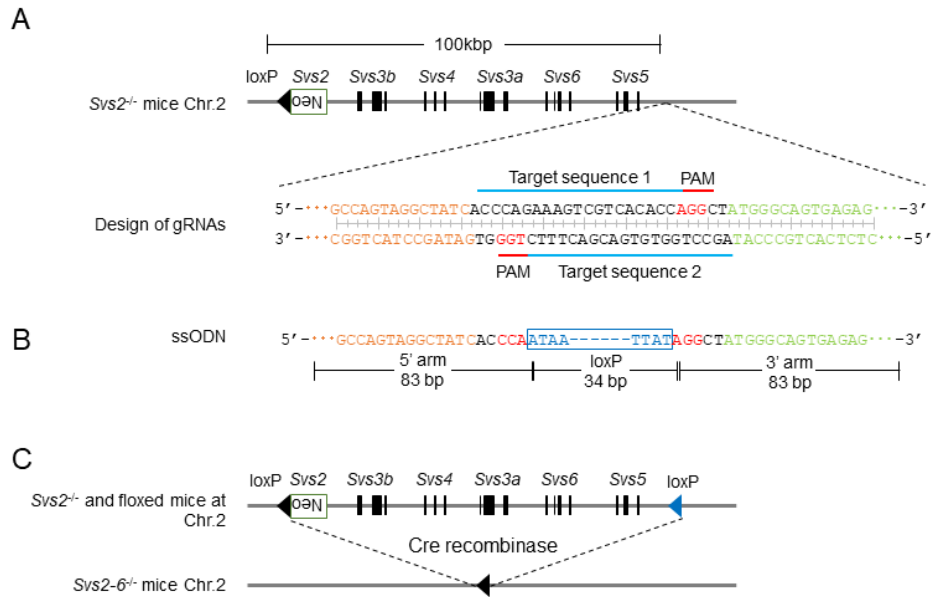


図 5： *Svs* 遺伝子群を欠損するマウス作製についての概要

A： *Svs5* 下流に 2 種類の gRNA を設計した。青線が CRISPR のターゲット配列、赤線がプロトスペーサー隣接モチーフ（protospacer adjacent motif ; PAM）を示す。オレンジと緑で示した塩基はそれぞれターゲティング部位の上流と下流を示す。

B： loxP 配列とホモロジーアームを含むノックインのための ssODN 配列。

C： Cre-loxP システムによる約 100 kbp の領域を欠損した *Svs2-6*^{-/-} マウスの模式図。

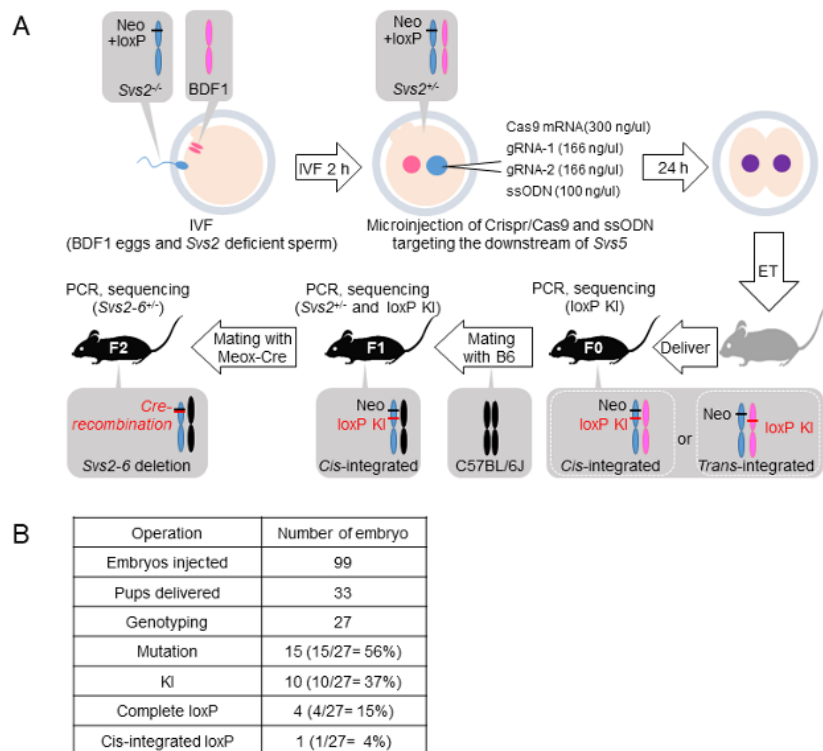


図 6 : *Svs2-6*^{-/-} マウス作製の計画

A : BDF1 マウスから回収した卵子と *Svs2*^{-/-}マウスの精子を用いた IVF で作出した前核期胚を用いて、受精卵の雄性前核に顕微鏡下で gRNA、Cas9 mRNA、ssODN をインジェクションした。これにより、青で示すオス由来の染色体上に loxP 配列のノックインが起こり、同一染色体上に loxP を持つ個体が得られた。

B : インジェクションおよび胚移植を実施した際の結果についてまとめた表。

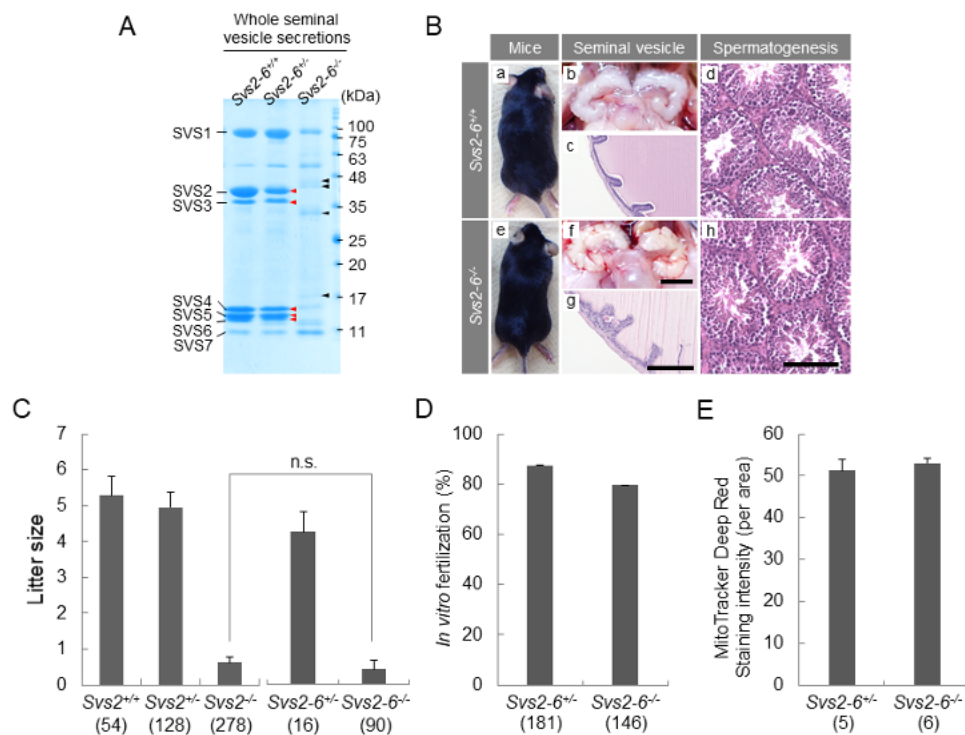


図 8: *Svs2-6*^{-/-}オスマウスの生殖に関する表現型

A: オスから採取した精嚢のタンパク質を SDS-PAGE により分離後、CBB 染色したものの。赤矢じりで示した SVS2-6 は *Svs2-6*^{-/-}オスマウスの精嚢から検出されなかった。

B: 8 週齢の野生型オスマウス (a) と *Svs2-6*^{-/-}オスマウス (e) の外観写真。8 週齢のオスマウスの精嚢の外観 (b と f)。スケールバーは 5mm を示す。8 週齢のオスマウスにおける精嚢パラフィン切片を HE 染色したもの (c と g)。8 週齢のオスマウスにおける精巣パラフィン切片を HE 染色したもの (d と h)。スケールバーは 100 μm を示す。

C: オスの自然交配による妊孕性のデータ。括弧内の数字は実験に使用したオスマウスの数を示す。

D: *Svs2-6*^{+/-}と *Svs2-6*^{-/-}のオスマウスから回収した精巣上体尾部精子を用いた体外受精における受精率。数値は 3 回実施した実験の平均値 ± 標準誤差を示す。括弧内の数字は

調べた卵子の数を示す。

E : $Srs2-6^{+/-}$ と $Srs2-6^{-/-}$ のオスマウスにおいて精巣上体尾部精子を用いたミトコンドリア染色の蛍光強度。括弧内の数字は調べたオスの数を示す。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、助言いただいた神戸大学大学院理学研究科、井上邦夫博士に深謝いたします。

また、本研究を行うにあたり、国立成育医療研究センター実験動物管理室、津村秀樹博士には実験動物の基礎から遺伝子改変マウスの歴史まで、様々な場面で指導いただきました。深く感謝の意を表します。過排卵処理の研究においては国立成育医療研究センター再生医療センター、宮戸健二博士ならびに別府大学食物栄養科学部、宮戸真美博士に助言をいただきました。精漿タンパク質に関する研究においては明治大学農学部、河野菜摘子博士に多くの助言をいただきました。明治大学農学部、乾雅史博士には遺伝子改変マウス作製について意見をいただきました。株式会社ジェー・エー・シーの皆さまには国立成育医療研究センター実験動物施設における動物の飼育管理で大変お世話になりました。心から感謝いたします。

参考文献

Russell, S. E. (1978). *Origins of inbred mice*, Morse III, C. D.

<https://www.informatics.jax.org/morsebook/index.shtml>

Baker, G. D. (1998). Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. *Clinical microbiology reviews*, 11(2), 231–66.

<https://doi.org/10.1128/cmr.11.2.231>

Byers, L. S., Wiles, V. M., Dunn, L. S., & Taft, A. R. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS one*, 7(4), e35538.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035538>

Behringer, B., Gertsenstein, M., Nagy, V. K., & Nagy, A. (2016). Selecting female mice in estrus and checking plugs. *Cold spring harbor protocol*, 2016(8).

<https://doi.org/10.1101/pdb.prot092387>

Yokoyama, M., Hasegawa, T., & Nomura, T. (1989). Experimental system for production of transgenic mice. *Journal of mammalian ova research*. 6(2), 151–155.

Medan, S. M., Arai, Y. K., Watanabe, G., & Taya, K. Inhibin: Regulation of reproductive function and practical use in females. (2007). *Animal science journal*, 78, 16–27.

<https://10.1111/j.1740-0929.2006.00399.x>

Fowler, E. R., & Edwards, G. R. (1957). Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. *Journal of endocrinology*, 15(4), 374–384. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0150374>

El-Ratel, T. I., Abdel-Khalek, E. A., & Fouda, F. S. (2020). Effect of ovarian stimulation by different gonadotrophin treatments on *in vivo* and *in vitro* reproductive efficiency of rabbit does under high ambient temperature. *Tropical animal health and production*, 53(1), 22. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02429-w>

Spearow, L. J., & Barkley, M. (1999). Genetic control of hormone-induced ovarian rate in mice. *Biology of reproduction*, 61(4), 851–856. <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.4.851>

Takeo, T., Mukunoki, A., & Nakagata, N. (2019). Ovulation of juvenile, mature, and aged female C57BL/6 mice following coadministration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin. *Theriogenology*, 135, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.028>

Hasegawa, A., Mochida, K., Matoba, S., Yonezawa, K., Ohta, A., Watanabe, G., Taya, K., & Ogura, A. (2012). Efficient production of offspring from Japanese wild-derived strains of mice (*Mus musculus molossinus*) by improved assisted reproduction technologies. *Biology of reproduction*, 86(5), 1–7. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.098491>

Sato, A. Some observations on induced polyovulation and superpregnancy in mature

mice. (1963). *Embryologia*, 7(4), 285–294.

Arai, K., Watanabe, G., Taya, K., & Sasamoto, S. (1996). Roles of inhibin and estradiol in the regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone secretion during the estrous cycle of the rat. *Biology of reproduction*, 55(1), 127–33. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.1.127>

Kishi, H., Okada, T., Otsuka, M., Watanabe, G., Taya, K., & Sasamoto, S. (1996). Induction of superovulation by immunoneutralization of endogenous inhibin through the increase in the secretion of follicle-stimulating hormone in the cyclic golden hamster. *Journal of endocrinology*, 151(1), 65–75. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1510065>

Shi, F., Ozawa, M., Komura, H., Watanabe, G., Tsonis, G. C., Suzuki, K. A., & Taya, K. (2000). Induction of superovulation by inhibin vaccine in cyclic guinea-pigs. *Journal of reproduction and fertility*, 18(1), 1–7. <https://doi.org/10.1530/reprod/118.1.1>

Wang, H., Herath, B. C., Xia, G., Watanabe, G., & Taya, K. (2001). Superovulation, fertilization and *in vitro* embryo development in mice after administration of an inhibin-neutralizing antiserum. *Reproduction*, 122(5), 809–16. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220809>

Takeo, T., & Nakagata, N. (2015). Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice. *PLoS One*, 10(5), e0128330.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128330>

Kawano, N., Araki, N., Yoshida, K., Hibino, T., Ohnami, N., Makino, M., Kanai, S., Hasuwa, H., Yoshida, M., Miyado, K., & Umezawa, A. (2014). Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: PNAS*, *111*(11), 4145–4150. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320715111>

Yamashita, M., Honda, A., Ogura, A., Kashiwabara, S., Fukami, K., & Baba, T. (2008). Reduced fertility of mouse epididymal sperm lacking *Press21/Tesp5* is rescued by sperm exposure to uterine microenvironment. *Genes to cells*, *13*, 1001–1013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2008.01222.x>

Fujihara, Y., Miyata, H., & Ikawa, M. (2018). Factors controlling sperm migration through the oviduct revealed by gene-modified mouse models. *Experimental animals*, *67*(2), 91–104. <https://doi.org/10.1538/expanim.17-0153>

Flower, E. R., & Edwards, G. R. (1957). Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. *Journal of endocrinology*, *15*(4), 374–384. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0150374>

Takeo, T., Mukunoki, A., & Nakagata, N. (2019). Ovulation of juvenile, mature, and aged female C57BL/6 mice following coadministration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin. *Theriogenology*, *135*, 1–6.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.028>

Mekada, K., Abe, K., Murakami, A., Nakamura, S., Nakata, H., Moriwaki, K., Obata, Y., & Yoshiki, A. (2009). Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Experimental animals*, 58(2), 141–9.

<https://doi.org/10.1538/expanim.58.141>

Ge, Q. M., Yeung, C. S., Mak W C. J., & Ip M. S. M. (2019). Differential metabolic and inflammatory responses to intermittent hypoxia in substrains of lean and obese C57BL/6 mice. *Life science*, 238, 116959. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116959>

Fergusson, G. Ethier, M., Guévremont, M., Chrétien, C., Attané, C., Joly, E., Fioramonti, X., Prentki, M., Poitout, V., & Alquier, T. (2014). Defective insulin secretory response to intravenous glucose in C57Bl/6J compared to C57Bl/6N mice. *Molecular metabolism*. 3(9), 848–854. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.09.006>

Wong, N., Blair, R. A., Morahan, G., & Andrikopoulos, S. (2010). The deletion variant of nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) does not affect insulin secretion or glucose tolerance. *Endocrinology* 151, 96–102. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0887>

Wolf, S., Hainz, N., Beckmann, A., Maack, C., Menger, D. M., Tschernig, T., & Meier, C. (2016). Brain damage resulting from postnatal hypoxic-ischemic brain injury is reduced in C57BL/6J mice as compared to C57BL/6N mice. *Brain research*, 1650, 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.09.013>

Baird, T. D. (1987). A model for follicular selection and ovulation: lessons from superovulation. *Journal of steroid biochemistry*, 27(1–3), 15–23.
[https://doi.org/10.1016/0022-4731\(87\)90289-5](https://doi.org/10.1016/0022-4731(87)90289-5)

Bothe, G. W. M., Bolivar, J. V. Vedder, J. M., & Geistfeld, G. J. (2004). Genetic and behavioral differences among five inbred mouse strains commonly used in the production of transgenic and knockout mice. *Genes, brain and behavior*, 3(3), 149–57.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-183x.2004.00064.x>

Iwamatsu, T., & Chang, C. M. (1969). *In vitro* fertilization of mouse eggs in the presence of bovine follicular fluid. *Nature*, 224, 919–920.
<https://doi.org/10.1038/224919a0>

Kang, K. S., Hawkins, A. N., & Kearney, A. J. (2018). C57BL/6J and C57BL/6N substrains differentially influence phenotype severity in the *Scn1a*^{+/-} mouse model of Dravet syndrome. *Epilepsia open*, 4(1), 164–169. <https://doi.org/10.1002/epi4.12287>

Warden, S. A., DaCosta, A., Mason, S., Blednov, A. Y., Mayfield, D. R., & Harris, A. R. (2021). Inbred substrain differences influence neuroimmune response and drinking behavior. *Alcohol: clinical and experimental research*, 44(9), 1760–1768.
<https://doi.org/10.1111/acer.14410>

Ramachandra, V., Phuc, S., Franco, C. A., & Gonzales, A. R. (2007). Ethanol preference

is inversely correlated with ethanol-induced dopamine release in 2 substrains of C57BL/6 mice. *Alcohol: clinical and experimental research*, 31(10), 1669–76.
<https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00463.x>

Spearow, L. J. (1988). Major genes control hormone-induced ovulation rate in mice. *Journal of reproduction and fertility*, 82(2), 787–97.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0820787>

Mochida, K., Hasegawa, A., & Ogura, A. (2017). Recent technical breakthroughs for ARTs in mice. *Journal of mammalian ova research*, 34(1), 13–21.
<https://doi.org/10.1274/032.034.0104>

Takeo, T., Mukunoki, A., & Nakagata, N. (2019). Ovulation of juvenile, mature, and aged female C57BL/6 mice following coadministration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin. *Theriogenology*, 135, 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.028>

Spearow, L. J., & Barkley, M. (1999). Genetic control of hormone-induced ovulation rate in mice. *Biology of reproduction*, 61(4), 851–856.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod61.4.851>

Spearow, L. J., & Bradford, E. G. (1983). Genetic variation in spontaneous ovulation rate and LH receptor induction in mice. *Journal of reproduction and fertility*, 69(2), 529–37.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0690529>

Iwamoto, T., Tsang, A., Luterman, M., Dickson, J., Delamirande, E., Okuno, M., Mohri, H., & Gagnon, C. (1992). Purification and characterization of a sperm motility-dynein ATPase inhibitor from boar seminal plasma. *Molecular reproduction and development*, 31(1), 55–62. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080310110>

Edström, A. M., Malm, J., Frohm, B., Martellini, J. A., Giwercman, A., Mörgelin, M., Cole, A. M., & Sørensen, O. E. (2008). The major bactericidal activity of human seminal plasma is zinc-dependent and derived from fragmentation of the semenogelins. *Journal of immunology*, 181(5), 3413–3421. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3413>

Jensen-Seaman, I. M., & Li, W. -H. (2003). Evolution of the hominoid semenogelin genes, the major proteins of ejaculated semen. *Journal of molecular evolution*, 57(3), 261–70. <https://doi.org/10.1007/s00239-003-2474-x>

Swanson, W. J., & Vacquier, V. D. (2002). The rapid evolution of reproductive proteins. *Nature reviews genetics*, 3(2), 137–144. <https://doi.org/10.1038/nrg733>

Karn, R. C., Clark, N. L., Nguyen, E. D., & Swanson, W. J. (2008). Adaptive evolution in rodent seminal vesicle secretion proteins. *Molecular biology and evolution*, 25(11), 2301–2310. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn182>

Ramm, S. A., McDonald, L., Hurst, J. L., Beynon, R. J., & Stockley, P. (2009). Comparative proteomics reveals evidence for evolutionary diversification of rodent

seminal fluid and its functional significance in sperm competition. *Molecular biology and evolution*, 26(1), 189–198. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn237>

Claw, K. G., George, R. D., MacCoss, M. J., & Swanson, W. J. (2018). Quantitative evolutionary proteomics of seminal fluid from primates with different mating systems. *BMC genomics*, 19(1), 488. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4872-x>

Robert, M., & Gagnon, C. (1999). Semenogelin I: a coagulum forming, multifunctional seminal vesicle protein. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 55(6–7), 944–960. <https://doi.org/10.1007/s000180050346>

Dorus, S., Evans, P. D., Wyckoff, G. J., Choi, S. S., & Lahn, B. T. (2004). Rate of molecular evolution of the seminal protein gene SEMG2 correlates with levels of female promiscuity. *Nature genetics*, 36(12), 1326–1329. <https://doi.org/10.1038/ng1471>

Kawano, N., & Yoshida, M. (2007). Semen–coagulating protein, SVS2, in mouse seminal plasma controls sperm fertility. *Biology of reproduction*, 76(3), 353–361. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.056887>

Clauss, A., Lilja, H., & Lundwall, A. (2002). A locus on human chromosome 20 contains several genes expressing protease inhibitor domains with homology to whey acidic protein. *The Biochemical journal*, 368(Pt 1), 233–242. <https://doi.org/10.1042/BJ20020869>

Clauss, A., Lilja, H., & Lundwall, A. (2005). The evolution of a genetic locus encoding

small serine proteinase inhibitors. *Biochemical and biophysical research communications*, 333(2), 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.125>

Araki, N., Kawano, N., Kang, W., Miyado, K., Yoshida, K., & Yoshida, M. (2016). Seminal vesicle proteins SVS3 and SVS4 facilitate SVS2 effect on sperm capacitation. *Reproduction*, 152(4), 313–21. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0551>

Inui, M., Mokuda, S., Sato, T., Tamano, M., Takada, S., & Asahara, H. (2018). Dissecting the roles of miR-140 and its host gene. *Nature cell biology*, 20(5), 516–518. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0077-4>

Kawano, N., Yoshida, K., Iwamoto, T., & Yoshida, M. (2008). Ganglioside GM1 mediates decapacitation effects of SVS2 on murine spermatozoa. *Biology of reproduction*, 79(6), 1153–1159. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.069054>

Iwai, M., Harada, Y., Miyabayashi, R., Kang, W., Nakamura, A., Kawano, N., Miyamoto, Y., Yamada, M., Hamatani, T., Miyado, M., Yoshida, K., Saito, H., Tanaka, M., Umezawa, A., & Miyado, K. (2018). Chemotactic behavior of egg mitochondria in response to sperm fusion in mice. *Heliyon*, 4(11), e00944. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00944>

Ramm, S. A., McDonald, L., Hurst, J. L., Beynon, R. J., & Stockley, P. (2009). Comparative proteomics reveals evidence for evolutionary diversification of rodent seminal fluid and its functional significance in sperm competition. *Molecular biology and evolution*, 26(1), 189–198. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn237>

Amelar, R. D. (1962). Coagulation, liquefaction and viscosity of human semen. *The Journal of urology*, 87, 187–190. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)64936-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)64936-X)

Lundwall A. (1996). The cloning of a rapidly evolving seminal-vesicle-transcribed gene encoding the major clot-forming protein of mouse semen. *European journal of biochemistry*, 235(1–2), 424–430. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.00424.x>

Hughes, A. L., & Yeager, M. (1998). Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annual review of genetics*, 32, 415–435. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.32.1.415>

Ota, Y., Tamegai, H., Kudo, F., Kuriki, H., Koike-Takeshita, A., Eguchi, T., & Kakinuma, K. (2000). Butirosin-biosynthetic gene cluster from *Bacillus circulans*. *The Journal of antibiotics*, 53(10), 1158–1167. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.53.1158>

Sample, C. A., Rolfe, M., & Dorin, J. R. (2003). Duplication and selection in the evolution of primate beta-defensin genes. *Genome biology*, 4(5), R31. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-5-r31>

Fawcett, J. A., & Innan, H. (2011). Neutral and non-neutral evolution of duplicated genes with gene conversion. *Genes*, 2(1), 191–209. <https://doi.org/10.3390/genes2010191>

Jonjić, S., Polić, B., & Krmpotić, A. (2008). Viral inhibitors of NKG2D ligands: friends or

foes of immune surveillance? *European journal of immunology*, 38(11), 2952–2956.
<https://doi.org/10.1002/eji.20083882>

Tannenbaum, J., & Bennett, B. T. (2015). Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *Journal of the american association for laboratory animal science : JAALAS*, 54(2), 120–132.

Morgan, D. H., Sutherland, G.E. H, Martin, I.K. D., & Whitelaw, E. (1999). Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nature Genetics*, 23, 314–318.
<https://doi.org/10.1038/15490>

Kikuchi, T., Abe, T., Satoh, K., Narumi, K., Sakai, T., Abe, S., Shindoh, S., Matsushima, K., & Nukiwa, T. (1997). Cis-acting region associated with lung cell-specific expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 17(3), 361–367. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.17.3.2212>

Vignera, L. S., Condorelli, A. R., Russo, I. G., Morgia, G., & Calogero, E. A. (2016). Endocrine control of benign prostatic hyperplasia. *Andrology*, 4(3), 404–11.
<https://doi.org/10.1111/andr.12186>

Kondo, M., Maruoka, T., Otsuka, N., Kasamatsu, J., Fugo, K., Hanzawa, N., & Kasahara, M. (2010). Comparative genomic analysis of mammalian NKG2D ligand family genes provides insights into their origin and evolution. *Immunogenetics*, 62(7), 441–450.
<https://doi.org/10.1007/s00251-010-0438-z>

Morgan, D. H., Santos, F., Green, K., Dean, W., & Reik, W. (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Human Molecular Genetics*, 14 Spec No 1:R147–58. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi114>

Cropley, E. J., Suter, M. C., Beckman, B. K., & Martin, K. I. D. (2006). Germ-line epigenetic modification of the murine A^y allele by nutritional supplementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: PNAS*, 103(46), 17308–17312. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607090103>

Ramm, A. S., McDonald, L., Hurst, L. J., Beynon, J. R., & Stockley, P. (2008). Comparative proteomics reveals evidence for evolutionary diversification of rodent seminal fluid and its functional significance in sperm competition. *Molecular biology and evolution*, 26(1), 189–98. <https://doi.org/10.1093/moldev/msn237>

Miyazaki, Y., Goto, T., Li, X., Nakayama, K., Okasho, K., Takeda, M., Mizuno, K., Kimura, H., Uegaki, M., Sumiyoshi, T., Teramoto, Y., Akamatsu, S., Kobayashi, T., Ogawa, O., & Inoue, T. (2023). Up-regulation of secretory leukocyte protease inhibitor in human samples might have a potential role of predicting prostate cancer recurrence and progression after surgery and hormonal therapy. *Cancer medicine*, 12(3), 3328–3342. <https://doi.org/10.1002/cam4.5134>

Yoshimi, K., Kunihiro, Y., Kaneko, T., Nagahora, H., Voigt, B., & Mashimo, T. (2016). ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes.

Nature Communications, 7, 10431. <https://doi.org/10.1038/ncomms10431>