

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 8 月 30 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10646

研究課題名(和文) 卵活性化因子 PLC の機能解析と精巣内遺伝子導入による男子不妊症治療法の開発

研究課題名(英文) In vivo gene transfer into the testis is an effective method for studying function of sperm protein phospholipase C zeta.

研究代表者

窪田 裕樹 (Kubota, Hiroki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：10347403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：受精のKey triggerと推定されている卵活性化因子PLC(phospholipase C) zetaの機能解析を行うべく、マーカーとなる蛍光タンパクとの融合タンパクを発現するベクターを作成した。融合タンパク発現ベクター溶液をマウス精巣内に注入し、エレクトロポレーション法により遺伝子導入を試みたところ、精巣上体精子において蛍光タンパク発現精子を確認することができた。

研究成果の概要(英文)： We have looked to see if in vivo gene transfer into the testis could be used to study the pattern of localization of sperm protein phospholipase C zeta (PLC ). We employed a vector designed to produce a fusion of full length clone of mouse PLC and the enhanced yellow fluorescent protein (EYFP). Male mice (4-6 weeks of age) were used for in vivo experiments. For each animal, the right testis was exposed and the PLC -EYFP injected into the rete testis via the efferent duct. An electrical current was subsequently applied to the right testis whilst the left testis was left completely untouched throughout the procedure to act as a control.

We detected EYFP fluorescence in the epididymal sperm at 40 days after the procedure. The expression of EYFP was evident predominantly in the sperm head in their mid-pieces. Our results suggest that this approach could have great relevance for the study of sperm function and male infertility.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：精巣内遺伝子導入 PLC zeta

## 1. 研究開始当初の背景

男子不妊症の治療は卵細胞質内精子注入法 (ICSI) の登場により大きく変化し、現在では精巣内から採取した円形精子細胞を用いて ICSIを行うことで拳児を得ることが可能になっている。しかし、ICSIによって精子を注入した卵のうちおよそ40%が胚として発生することができないとされ、その理由については不明である。

受精時に卵細胞質内で周期的なカルシウム濃度の上昇 (Ca oscillation) が見られることはかねてから知られていたが、その分子生物学的メカニズムは長い間不明のままであった。2004年によく同定された phospholipase Cの精子特異的な isoformである phospholipase C zeta (PLC  $\zeta$ ) はマウス卵において受精時に見られるものとほぼ同一のカルシウムの上昇を惹起するため、卵活性化のトリガー分子と考えられている。したがって ICSIによっても受精できない精子の一部にはこのメカニズムの障害の可能性が想定され、遺伝子治療の対象となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

現時点では表現型が致死となることなどからノックアウトマウスの作成が困難な上に精細胞においては適切な培養系が得られていないため、PLC  $\zeta$  の発現制御メカニズムや細胞内での動態については十分に解明されていない。

そこで我々は精巣内遺伝子導入法を用いて、精巣へ組み換え遺伝子を導入することで精子に GFP などの蛍光蛋白と PLC  $\zeta$  の融合蛋白を発現させることで、受精という生命現象の鍵を握る PLC  $\zeta$  の解析が可能になり、PLC  $\zeta$  が真に卵活性化因子であるのかという問いに答えられるのではないかと考えた。

エレクトロポレーションを用いた精巣内遺伝子導入法は、効率に優れ安全性も高く、精子形成や受精・胚発生メカニズムの研究に有用なツールとなるが、本研究は更にこれを発展させ、機能的な遺伝子と蛍光蛋白との融合蛋白を精子に発現させることを目指している。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス精巣への遺伝子導入

サブクローニングされた PLC  $\zeta$  遺伝子を制限酵素で切り出して、GFP もしくは YFP 遺伝子を含むベクターに融合蛋白を発現するようにサブクローニングする。PLC  $\zeta$  遺伝子+GFP もしくは YFP 遺伝子を制限酵素で切り出して、サイトメガロウイルスのエンハンサーと chicken の  $\beta$ -actin プロモーターを含む pCAG ベクターに組み込んで、融合蛋白の発現ベクターを作成した。

ICR 系の雄マウス (4-6 週) を用い、麻酔下に精巣網から逆行性に精細管内へ融合蛋白発現ベクター溶液を注入し、エレクトロポレーション法で精巣に電気刺激を加え、遺伝子導入を試みた。

電気刺激後、2 週ないし 3 週後に上記マウスを屠殺し、精巣及び精巣上体を摘出する。精巣は直ちに液体窒素で凍結保存し、後に凍結切片を作成する。精巣上体尾部からは精子を回収し、蛍光顕微鏡下で融合蛋白の発現及び局在について観察した。

セルソーターを用いて精巣上体精子から融合蛋白発現精子を分離・調整し、IVF または卵細胞質内精子注入法 (ICSI) に供した。

蛍光顕微鏡下で先体反応に始まる受精・胚発生のプロセスにおける融合蛋白の動態を観察することを試みた。

## 4. 研究成果

マウス精巣の cDNA ライブラリーから既知のプライマーを用いて、PCR 法により PLC  $\zeta$  遺伝子 (2.2Kb) を増幅する。得られた PCR 産物をゲル電気泳動により単離したのち精製したものを、TOPO ベクターにサブクローニングし、シーケンスを解析して全塩基配列を確認した。サブクローニングされた PLC  $\zeta$  遺伝子を制限酵素で切り出して、GFP もしくは YFP 遺伝子を含むベクターに融合蛋白を発現するようにサブクローニングする。PLC  $\zeta$  遺伝子+GFP もしくは YFP 遺伝子を制限酵素で切り出して、サイトメガロウイルスのエンハンサーと chicken の  $\beta$ -actin

プロモーターを含む pCAG ベクターに組み込んで、融合蛋白の発現ベクターを作成した。同時に GFP または YFP のみを発現するコントロールベクターも作成しておいた。

HEK293 細胞に燐酸カルシウムを用いて、前述の融合蛋白発現ベクターを遺伝子導入し、48 時間培養する。これらの細胞から、ウェスタンブロット法により合成された蛋白の検出を行い、予想される分子量と一致することを確認しておいた。

このベクターを TOP10 細胞を competent cell として増幅しておき、ICR 系の雄マウス（4-6 週）を用い、麻酔下に精巣網から逆行性に精細管内へ融合蛋白発現ベクター溶液を注入し、エレクトロポレーション法に基づいて精巣に電気刺激を加えた。

電気刺激後、2 週ないし 3 週後に上記マウスを屠殺し、精巣及び精巣上体を摘出する。精巣は直ちに液体窒素で凍結保存し、後に凍結切片を作成する。蛍光顕微鏡下で融合蛋白の発現・局在を観察する。精巣の一部は遺伝子導入による精巣へのダメージを検討するためグルタルアルデヒドで固定し、切片を作成した後に TUNEL 染色を行ってアポトーシスの検出を試みたほか、H-E 染色を行い組織学的に造精機能障害について検討した。精巣上体尾部からは精子を回収し、蛍光顕微鏡下で融合蛋白の発現及び局在について観察した。

セルソーターを用いて精巣上体精子から融合蛋白発現精子を分離・調整を試みたが、十分な数の融合蛋白発現精子は得られなかった。遺伝子導入の条件設定を変えて、実験を繰り返したが、遺伝子の発現が経時的に減衰していき、精子での発現が乏しい状況であった。そこで数少ない融合蛋白発現精子を分離して、卵細胞質内精子注入法（ICSI）を試みた。

蛍光顕微鏡下で先体反応に始まる受精・胚発生のプロセスにおける融合蛋白の動態を観察したが、マーカーとしての蛍光が速やかに失われてしまい、十分な結果が得られ

なかった。共焦点顕微鏡と CCD カメラにより細胞内カルシウム濃度変化を観察したが、正常な受精の際に見られるような Ca oscillation は認められなかった。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 野崎 哲史、武田 知樹、岩月 正一郎、田口 和己、窪田 裕樹、神谷 浩行、梅本 幸裕、佐々木 昌一、安井 孝周:Micro-TESE における組織採取量と採精率の検討。第 105 回日本泌尿器科学会総会、2017.4.21-24、鹿児島市

2. 梅本 幸裕、岩月 正一郎、佐々木 昌一、武田 知樹、野崎 哲史、窪田 泰江、窪田 裕樹、佐藤 剛、杉浦 真弓、安井 孝周:顕微鏡下精巣内精子採取術に対する採精予測因子の検討 Sertoli cell only syndrome と Inhibin-B の関連。第 62 回日本生殖医学会学術講演会・総会、2017.11.16-17、下関市

3. 武田 知樹、岩月 正一郎、野崎 哲史、神谷 浩行、窪田 裕樹、窪田 泰江、松本 洋介、伴野 千尋、澤田 祐季、佐藤 剛、佐々木 昌一、梅本 幸裕、杉浦 真弓、安井 孝周:名古屋市立大学病院での他施設連携による精子採取の成績。第 39 回中部生殖医学会学術集会、2017.6.24、名古屋市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

窪田 裕樹 (Kubota Hiroki)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号：10347403

### (2) 研究分担者

佐々木 昌一 (Sasaki Shoichi)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号：50225869

林 祐太郎 (Hayashi Yutaro)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：40238134

梅本 幸裕 (Umemoto Yukihiro)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：80381812

岩月 正一郎 (Iwatsuki Shoichiro)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号：70595397

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

John Parrington (Oxford 大学薬理学)