

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：34438

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10653

研究課題名(和文) 精巣、副甲状腺に強く発現する新規遺伝子による精子分化機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of spermatogenesis of novel genes strongly expressed in testis and parathyroid gland

研究代表者

畑村 育次 (Hatamura, Ikuji)

関西医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：80336883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者が以前ラット二次性副甲状腺亢進症モデルより、過形成副甲状腺に特異的に発現する遺伝子を数個見つけクローニングした遺伝子の一つKANSL1-L(KAT8 Regulatory NSL Complex Subunit 1-Like) KOマウスの作製をおこなった。そのKANSL1-L KOマウスのフェノタイプは野生型のマウスと比較して優位に精巣が4, 9週齢において小さく、精子形成を認めず、KANSL1-L遺伝子は精子分化に重要な分子であり、今回の研究で第一減数分裂に関わるHif3およびCcna1分子を制御し、ディプロテン期以降に必要な分子で、精子形成に重要な役割を担っていることが証明された。

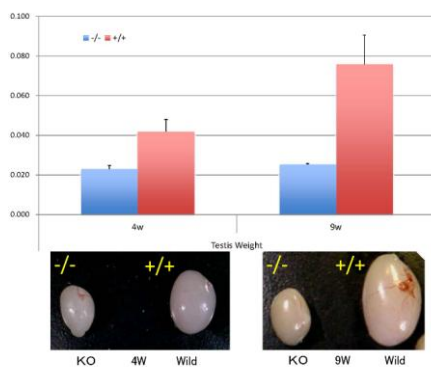
研究成果の概要(英文)：The spermatogenesis is one of the complex processes in mammalian body and the details have been unknown yet. At first, Kansl1-L was identified as a parathyroid gland specific gene in our early research. Kansl1-L targeted mice grew normally and kept health in their life. The tissue structure of the parathyroid gland of them was normal. The most evident feature of the Kansl1-L null mice was the male infertility. We investigated about causations of male infertility in Kansl1-L null mice. By our experiments, it was exhibited that Kansl1-L gene expressed strongly in spermatocyte of the seminiferous tubule. In Kansl1-L null mice, the size of testis was smaller than wild one. In addition, the expressions of some spermatocyte marker Hif3 and Ccna1 genes were diminished and the spermatogenesis was stopped at the pachytene stage. As a result, apoptosis of spermatocytes was induced. This study was proved that Kansl1-L gene functioned as a key regulator of spermatogenesis.

研究分野：分子医学

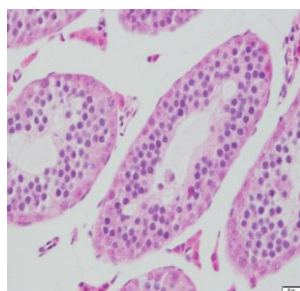
キーワード：spermatogenesis apoptosis

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は基盤研究 (C)、平成 15-16 年度「慢性腎不全に併発する 2 次副甲状腺機能亢進症発症に関与する新規遺伝の機能解析」で分担者としてラットの二次性副甲状腺亢進症モデルより、過形成副甲状腺に特異的に発現する遺伝子を数個見つけ、副甲状腺主細胞に特異的に発現する遺伝子のクローニングに成功し、その遺伝子が副甲状腺過形成組織においてその遺伝子発現が亢進することを確認した。それらの遺伝子の中で KANSL1-L (KAT8 Regulatory NSL Complex Subunit 1-Like) 遺伝子に注目し、KO マウスの作製を試みていた。作製した KANSL1-L KO マウスのフェノタイプは野生型のマウスと比較して優位に精巣が 4, 9 週齢において小さかった。(下図)



その精巣組織においては 4 週齢後以降より明らかに野生型マウスの組織と異なり、野生型では見られる減数分裂によってつくられた配偶子、すなわち精子細胞やその後精子形成をへて成熟した小さくとがった精子は全く認められず、A 型精母細胞、それから有糸分裂をおこない精子を産生するように運命づけられた B 型精粗細胞を認めることはできたが、それ以降の精子細胞の分化の過程を示す細胞は全く認められなかった。(右図) すなわち B 型精母細胞から成熟した精子を作製する分



化機能は最初の段階から全く機能していないということが組織学的に考えられた。一方非造精細胞、セルトリ細胞、ライデッヒ細胞は組織学上正常であった。

### 2. 研究の目的

二次性副甲状腺亢進症モデルラットの上皮小体よりクローニングした遺伝子: KANSL1-L (KAT8 Regulatory NSL Complex Subunit 1) 遺伝子を KO (Knock out) したマウスを作製した。その KO マウスのフェノタイプは精巣が優位に小さく、その精巣組織においては B 型精母細胞から一次精母細胞は確認されるが、それ以降精子の分化を全く認めることができなかった。また副甲状腺では組織学的には異常を認めなかったが intact PTH および血清 P 濃度に優位に高値であった (10 週齢)。この精子分化異常は KANSL1-L 遺伝子自身が直接関与するのか、また intact PTH や血清 P 濃度がいかに関係するのかを中心に、精子形分化におけるこの KANSL1-L 蛋白の機能を解明し、精子の分化における分子機構の解明をおこない、人の不妊症の解明や治療、産業家畜の安定供給や有害野生動物の繁殖抑制にも繋げることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) KANSL1-L 遺伝子欠損ホモ接合体マウス及び野生型の精巣組織において、経時をおって組織化学的に精子形成の検討をおこなった。

(2) KANSL1-L 遺伝子欠損ホモ接合体マウスの精子形成過程を、精子形成過程において野生型における細胞特異的および時期特異的に発現するマーカー遺伝子の発現様式と比較検討を RT-PCR 法を用いておこない、KO マウスにおいて精子形成のどの過程で制止しているかを検討した。

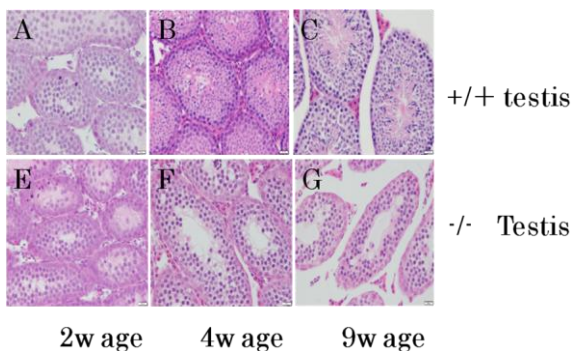
(3) KO マウスの精巣組織に於いて、組織学的に核の断片化を疑う組織変化を認めた

ので、KO マウス、及び野生型の精巣組織より DNA の抽出し DNA ラダーの検討をおこなった。

4) KO 及び野生型のマウスの精巣組織 (4 週齢) に於いて、経時的に tunel 染色をおこないアポトーシスの解析をおこなった

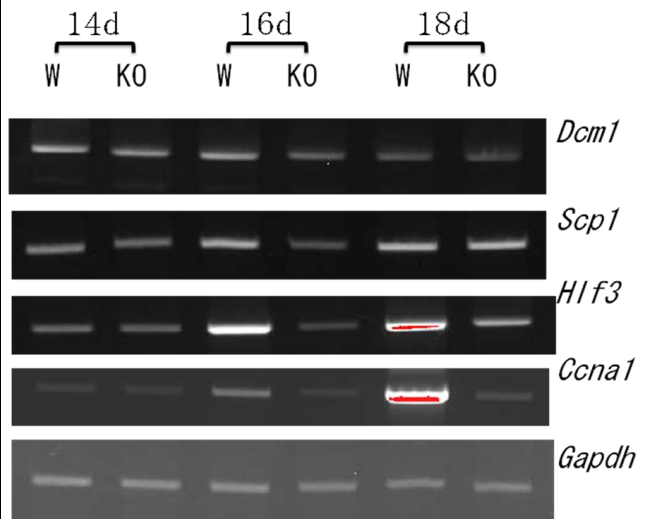
#### 4. 研究成果

(1) 2, 4, 9 週齢の KANSL1-L 遺伝子欠損ホモ接合体マウス及び野生型の精巣組織において、組織化学的に精子形成の検討をおこなった結果以下の図に示すように 4, 9 週齢の KO マウスの精巣組織に於いて明らかに野生型マウスの組織と異なり、野生型では見られる減数分裂によってつくられた配偶子、すなわち精子細胞 (spermatid) やその後精子形成をへて成熟した小さく上がった精子は全く認められず、A 型精母細胞、それから有糸分裂をおこない精子を産生するように運命づけられた B 型精粗細胞を認めることはできたが、それ以降の精子細胞の分化の過程を示す細胞は全く認められなかった。また精母細胞の一部の核に断片化を認めた。



(2) 野生型精巣に於いて出生後 14 日：初期パキテン期、16 日：後期パキテン期、18 日：ディプロテン期、ディアキネシス期、20 日：精子細胞に分化することがわかっていること。およびそれに伴って Dcm1, Scp1 分子が後期パキテン期に発現し Hlf3 分子は後期パキテン期、ディプロテン期に発現し、Ccna1 分子はディプロテン期にとよく発現することが既に

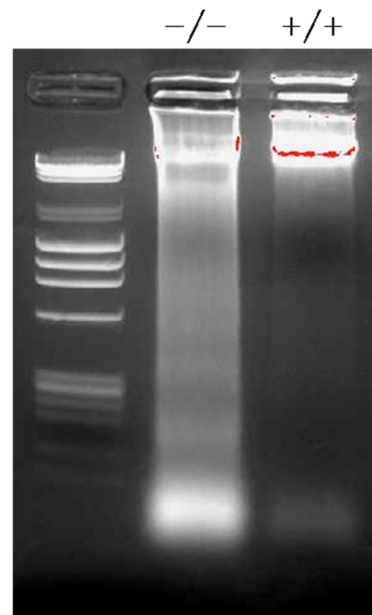
わかっている所以他们の遺伝子発現様式を検討した、以下の図に示す。



Hlf3 分子の発現が 16 週齢の野生型の精巣で強く発現しているに対して KO マウスの精巣では抑制され、Ccna1 分子の発現は 18 週齢の野生型の精巣で強く発現しているに対して KO マウスの精巣では抑制されていた。

このことから KO マウスの精巣における精子形成の過程で 14 週齢までの初期パキテン期まで分化するが、それ以降すなわちディプロテン期以降分化が進まないことが精子形成に影響を及ぼしていることが示された。

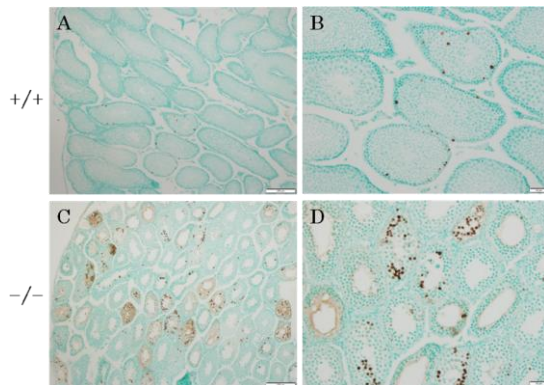
(3) KO マウス、及び野生型の精巣組織(4 週)より DNA の抽出し DNA ラダーの検討をおこなった。その結果を以下に示す。



様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

KO マウス精巣組織に於いて DNA ラダーを認めた。

(4) KO 及び野生型のマウスの精巣組織(4週齢)に於いて、経時的に tunel 染色をおこなったところ以下の図に示すように KO マウスの精巣組織に於いて精母細胞の tunel 陽性細胞が野生型と比し明らかに多いことを認めた。



以上のことより、KANSL1-L 遺伝子欠損ホモ接合体マウス (KO マウス) の精巣は野生型と比較して4, 9 週齢において明らかに小さく、その組織に於いて特徴的であった。すなわちA型精母細胞、それから有糸分裂をおこない精子を産生するように運命づけられたB型精粗細胞を認められたが、それ以降分化して形成される精子を認めていない。

減数分裂時に特異的に発現する遺伝子分子マーカーを RT-PCR で検索したところ、後期パキテン期で発現する Hlf3 の発現が KO マウスの精巣で発現がないことより、B型精母細胞より減数分裂が開始し、第一分裂のディプロテン期以降分化が進まず、第二分裂が開始されずに精子形成がすすまず、そのB型精粗細胞が細胞死をきたしたと考えられる。このことはDNA ラダー、およびtunel 染色において示されている。

KANSL1-L 遺伝子は精巣の精子形成において、第一次減数分裂時に作用する Hlf3 および Ccna1 分子の発現に関与し、精子形成の分化を制御していると考えられる。

KANSL1-L 遺伝子の発現がないことで、これら Hlf3 および Ccna1 分子の発現が抑制され、第一分裂のディプロテン期以降分化が進まず、第二分裂が開始されずに精子形成が抑制され、精粗細胞のアポトーシスを誘導したと考えられる。

以上より KANSL1-L 遺伝子は精子形成の分化に重要な分子と考えられる。

#### 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 Psp KO マウスは精巣形成不全を示す 鍵弥 朋子<sup>1</sup>、伊藤 俊治<sup>2</sup>、荒川 裕也<sup>1</sup>、櫻井 威織<sup>2</sup>、櫻井 悠加<sup>2</sup>、椎崎 和弘<sup>3</sup>、畑村 育次<sup>2</sup>(1. 関西医療大・保健医療・臨床検査、2. 関西医療大・院保健医療・保健医療、3. 自治医大・分子病態治療研究センター・抗加齢医学研究部) BMB 2015 12/1 神戸ポートアイランド 神戸国際会議場

② Psp 遺伝子の破壊は老齢マウスで腎臓の空胞化を引き起こす 伊藤 俊治<sup>1</sup>、鍵弥 朋子<sup>2</sup>、荒川 裕也<sup>2</sup>、宇野 誠<sup>1</sup>、早田 荘<sup>1</sup>、椎崎 和弘<sup>3</sup>、畑村 育次<sup>1</sup>(1. 関西医療大・院・保健医療学、2. 関西医療大・保健医療・臨床検査学、3. 自治医大・分子病態治療研究センター・抗加齢医学) BMB 2015 12/2 神戸ポートアイランド 神戸国際会議場

③ 新規精巣形成因子 Psp の欠損は精巣ヒストンのアセチル化に影響しアポトーシスを引き起こす 伊藤 俊治<sup>1</sup>、鍵弥 朋子<sup>2</sup>、荒川 裕也<sup>2</sup>、畑村 育次<sup>1</sup>(1. 関西医療大・院・保健医療学、2. 関西医療大・保健医療学・臨床検査学) The 39<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan 11/30 パシフィコ横浜 2016

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

畑村 育次 (HATAMURA, Ikuji)  
関西医療大学・保健医療学部・教授  
研究者番号：80336883

### (2) 研究分担者

伊藤 俊治 (ITO, Shyunji)  
関西医療大学・保健医療学部・准教授  
研究者番号：50275351

鍵弥 朋子 (KAGIYA, Tomoko)  
関西医療大学・保健医療学部・助教  
研究者番号 50717650

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )