

令和元年6月14日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10689

研究課題名(和文) 精巣特異的PKCデルタKOマウスを用いて男性不妊・不育の原因を探る

研究課題名(英文) Search for causes of male infertility using testis-specific PKC delta KO mice

研究代表者

新野 由子 (NIINO, Yuko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・研究員

研究者番号：60398683

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)：PKCデルタは全身に分布するリン酸化酵素であり、マウスでは1つの遺伝子から7つのタンパク質が生成され、7つのうちの4分子種の発現が特に精巣において顕著である。PKCデルタの機能を知るためにノックアウトマウスを作成したところ、PKCデルタ遺伝子を持たないマウスは本来25%産まれるはずだが3.9%しか産まれて来なかった。精子に問題があれば受精・初期卵割等に不具合が出ると考えられたがそこには問題はなく、胎児の発生に問題があることがわかった。PKCデルタは胎児の発生に重要な機能を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PKCデルタ遺伝子をヘテロに持つ両親からPKCデルタ遺伝子を持たないマウスは3.9%しか産まれて来ない。この遺伝子をヘテロに持つマウスは普通に産まれてきて普通に育つ。本研究によりPKCデルタ分子がマウス胎児の発生に重要な機能を持つことが明らかになった。今後、ノックアウトマウスの胎児の発生を解析することにより、PKCデルタ分子が胎児発生のどの段階で機能しているのかが明らかになれば、その段階で死ね可能性のある胎児への治療や妊娠前の治療に役立つ可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：PKC delta is distributed ubiquitously in various cells and tissues. Seven molecules are produced from one PKCdelta gene in mouse. Four of seven molecules are specifically expressed in mouse testis. We generated the PKCdelta conditional knockout mice to analyze the function of PKCdelta. The birth rate of PKCdelta gene deficient mice is expected to be 25% of the all new born mice, but only 3.9% of new born mice were the knockout mice. As a result, the fertilization and the cleavage with the sperm from PKCdelta knockout mouse male were normal. PKCdelta the knockout mice seems to have some problems in their embryonic developments. PKCdelta may play a crucial role in the embryonic developments.

研究分野：分子生物学

キーワード：PKCデルタ ノックアウトマウス 胎児発生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### [1] Protein Kinase C(PKC)

Protein Kinase C(PKC)は細胞内情報伝達機構において重要な役割を果たすセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞増殖、細胞分化、腫瘍形成、細胞死などに関与している。PKCはその構造上、cPKC、nPKC、aPKCの3のグループに大別される大きなファミリーである。細胞内情報伝達に非常に重要なPKCであるが、精巣での研究は遅れており、免疫組織学的解析が散見されるのみであり、それも抗体によって異なる結果となっている。我々は精巣特異的に発現するPKC分子を単離し研究している。これまでに、マウス精巣において特異的に発現するPKC分子であるPKCシータII(Niino et al., 2001,)及びPKCデルタIV, V, VI, VIIについて報告しており(Kawaguchi et al., 2006) 現在もPKCデルタについて研究を続けている。PKCデルタはこれまでにマウスにおいて一つの遺伝子から7つのタンパク質(1, 2, 4, 5, 6, 7, 9)が生成されるという報告がある。これらのうち、1と2は普遍的に存在している。4, 5, 6, 7の4つの分子種は精巣特異的に発現しており、特に4と5は発現量が非常に多く、round spermatidのみに発現していた。この結果からPKCデルタ4, 5, 6, 7分子は精巣内で重要な機能を持つと予想できる。

### [2] PKCデルタノックアウトマウス

PKCデルタの機能を明らかにするため、科研費をいただいて(研究課題番号:21590204) Cre-LoxPシステムを用いたPKCデルタコンディショナルノックアウト(KO)マウスを作出した(PKCデルタ flox mouse)(理化学研究所に寄託済み)。精巣特異的分子だけをノックアウトすることは不可能な遺伝子構造を持つため、研究開始当時に報告のあったPKCデルタ分子すべてを欠失することでPKCデルタの機能を網羅的に解析することを目的として作出した。このマウスはPKCデルタ遺伝子のエキソン7の両側にLoxP配列を待っている。これに、精巣内のspermatocytes, spermatids, spermatogoniaでCreを発現するPGK2-Creマウスを交配し、最終的に得られたPKCデルタhetero KOマウス同志を交配し、子マウスを得ようとした。しかし、産まれた全仔マウス80匹のうち、ホモノックアウトマウスは0匹であった。

## 2. 研究の目的

生殖系組織におけるPKC分子種の機能を詳細に研究した報告はない。特に精巣特異的に発現する細胞内情報伝達分子PKCデルタに着目し、不妊あるいは子宮内不育の将来的な治療、相談を目的に行われた研究はこれまでにはない。またPKCデルタ1と2は細胞分化、細胞増殖、アポトーシスなどに関わるというこれまでの研究から、PKCデルタ分子は胎生致死のみならず受精、卵割、着床というすべての発生段階において機能する可能性があることが予想される。PKCデルタノックアウトマウスを用いて初期発生を解析することで、PKCデルタが原因で起きる不妊あるいは子宮内不育の予防・治療方法探索に奇与したい。

## 3. 研究の方法

### [1] ノックアウトマウスの交配

PKCデルタ遺伝子をヘテロに持つノックアウトマウス(He)同士を交配し、得られた仔マウスの遺伝子型を確認し、PKCデルタのホモノックアウトマウス(Ho)の出生率を確認した。

### [2] 受精・発生

[1]でHoマウスが産まれてくることがわかったため、PKCデルタ分子を持たない精子に受精能があるのか、卵割は正常に進むかを調べるために、Ho及び野生型(WT)マウスのオスから精子を採取し、WTメスの卵子を用いて受精及び2細胞期卵の観察を行った。

### [3] 胎児の発生

マウスの発生において、9日-10日胚(E9-E10)の時期に肝臓や心臓など重要な臓器が発生し初め、それに問題のある胎児はその後発生しない。そこでHeの雌雄マウスを交配し、11.5日胚(E11.5)を観察した。また、このときの胎児の切片標本作製した。

### [4] 組織解析

当初の背景となったデータと異なり、PKCデルタのホモノックアウトマウス(Ho)が産まれることがわかったが、その割合は非常に低いものだった。[3]の解析によりHoマウスの多くは体内で死亡することが明らかになったが、産まれたHoマウスも死亡するまでには至らなかったが体内に問題を内在していると考えて、生後約3ヶ月令及び6ヶ月令で組織切片を作成し組織の状態の解析をした。

## 4. 研究成果

### [1] 出生個体数

研究期間中にHeマウスのオスとメスを交配し、離乳まで育った仔マウスは386匹。遺伝子型の結果は以下の表の通りであった。

	オス	メス	計	(%)
野生型(WT)	51	53	104	26.9
ヘテロ型(He)	144	123	267	69.2
ホモ型(Ho)	3	12	15	3.9

産まれた Ho の仔マウスは全体の 3.9%であった。この結果は、本来の期待値 25%から大きく逸脱していた。

#### [2]受精・卵割

Ho マウスが産まれてくることがわかったため、PKC デルタ分子のうち 4 種は精巢特異的に発現しているという事実から、Ho オスの精子に受精能があるのか、また卵割は正常に進むのかを調べた。(Ho メスの卵子も使用できれば良かったが、Ho マウスはほとんど産まれて来ないため、オスとメスを同時に使用できるタイミングはなかった。)

この実験に使えた Ho オスは 1 匹だったため、C57BL6 野生型メスを 3 匹用意し、卵子を採取した。同様の受精発生実験を WT オス及び購入した C57BL6 マウスオスの精子でも行った。

結果は以下の通り。

交配	2細胞期胚	未受精卵	異常卵/胚	
B6 x KO	132	45	40	217
	61%	21%	18%	
B6 x WT	168	51	61	280
	60%	18%	22%	
B6 x B6	72	18	27	117
	62%	15%	23%	

KO:Ho 精子、WT:WT 精子、B6:C57BL6 精子。

未受精卵と発生の異常な卵の割合が Ho マウス精子とコントロールの精子で変わらないこと、正常な 2 細胞胚の割合も一定していることから、Ho マウスの精子による受精および 2 細胞期までの発生には問題はないことがわかった。このことは Ho マウスが 4%程度しか産まれて来ない原因は、受精卵の子宮内での着床または体内での発生に問題があることを示唆していると考えられる。ただし、これは Ho マウス 1 匹だけの結果であることを明示しておきたい。

#### [3]胎児の発生

PKC デルタノックアウトマウスの体内での発生を調べるために He の雌雄マウスを交配し、11.5 日胚(E11.5)を観察したところ、この時点で存在した胎児とそれらの胎児のうち心拍が確認できた胎児の割合は、以下の通り。

E11.5	WT	He	Ho
すべての胎児	22	68	29
(%)	18.5%	57.1%	24.1%
心拍のある胎児	16	61	9
(%)	18.6%	70.9%	10.5%

全胎児における各遺伝子型の分布の割合はメンデルの法則 (1:2:1) に近い。このことは PKC デルタを持たない受精卵が着床することを示唆している。

しかし、着床したこれらの胎児のうち心拍が確認できた胎児の割合になると、ノックアウトマウスはその多くが死んでおり、また、死んでいる胎児は吸収されつつある状態だった。

この時点で心拍のある Ho の胎児の割合(10.5%)は、出生し離乳した Ho 個体の割合(3.9%)より高い。これはこの E11.5 の時期に心拍のある胎児が、出生までに何らかの理由でさらに減少することを示唆していると思われる。

マウスの発生において、E9-E10 の時期に肝臓や心臓など重要な臓器が発生する。Ho の多くは E11.5 で死んでおり、He、WT に比べて多くの胎児が死んでいることから、PKC デルタ分子が心臓、肝臓などの臓器形成に重要な役割を持つ可能性を考え、生きていた Ho マウスの E11.5 胚の組織標本を本研究期間内に作成した。

今後これらを解析する予定である。

#### [4]組織解析

研究開始後、PKC デルタのホモノックアウトマウス(Ho)が産まれることがわかったが、数が圧

倒的に少なく、月令を合わせた行動学的解析等ができることを期待したが不可能だった上、産まれてきた全 15 匹の Ho マウスの最初の 10 匹は 1 匹を除いて 2.5 ヶ月から 10 ヶ月令で死んだ。(1 匹だけ 14 ヶ月令で死亡。) そのため、Ho マウスの胎生死亡と早い時期での成獣の死亡に関連があると考えて、Ho マウス成獣 3-6 ヶ月令で組織を採取し、切片標本を作製した。現在、解析を続けているが、オスのマウス 2 匹の心臓に石灰化した組織が観察できた。このことは PKC デルタ遺伝子の欠失により心臓の正常な発生、機能に問題が起きる可能性を示唆していると考えられる。

PKC デルタ遺伝子の欠如による男性不妊という仮説は正しくなかったが、本研究により、PKC デルタ分子が胎児の発生に重要な機能を持つことを明らかにできた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

新野由子 小倉潔 多屋長治 川島育夫 笠原浩二、Protein KinaseC delta(PKCδ)はマウス初期発生において重要な機能を持つ、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：小倉潔

ローマ字氏名：(OGURA, kiyoshi)

所属研究機関名：公益財団法人東京都医学総合研究所

部局名：生体分子先端研究分野

職名：主任研究員

研究者番号(8桁)：70233492

研究分担者氏名：多屋長治

ローマ字氏名：(TAYA, choji)

所属研究機関名：公益財団法人東京都医学総合研究所

部局名：基盤技術研究センター

職名：室長

研究者番号(8桁)：90175456

研究分担者氏名：後藤孝也

ローマ字氏名：(GOTO, takaya)

所属研究機関名：大東文化大学

部局名：スポーツ健康科学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：80284355

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。