

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15687

研究課題名(和文) 精巣特異的カルシニューリンを標的とした男性避妊薬の開発

研究課題名(英文) Study of sperm calcineurin to develop male contraceptive

研究代表者

伊川 正人 (IKAWA, MASAHIRO)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：20304066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：カルシウム依存性の脱リン酸化酵素(カルシニューリン)は、酵素ドメインと調節ドメインから成るヘテロダイマーである。ヒトやマウスでは、それぞれ3つと2つの遺伝子にコードされている。また我々は精子特異的に存在する精子カルシニューリンが受精能力に必須であることを報告している。本課題では、上記5つのORFをPCR増幅して発現ベクターを作製し、培養細胞で酵素活性を再構築できることを確認した。その結果、男性避妊薬の標的分子となりうる精子カルシニューリンのみを阻害する小分子の探索が可能な系を構築した。またin silico解析から、精子カルシニューリンの基質と考えられる12遺伝子を見つけることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Calcineurin consists of a catalytic subunit and a regulatory subunit. There are 3 ORFs for catalytic subunit (ca, cb, cc) and 2 ORFs for regulatory subunit (r1, r2). We have shown that sperm specific calcineurin (cc/r2) is essential for sperm fertilizing ability so that the specific inhibitor may be used as male contraceptive. In this study, we cloned all 5 human ORFs into mammalian expression vector and succeeded to reconstitute the functional calcineurins in HEK293T cells. Beside, we searched in silico database and listed the 12 candidate proteins as sperm calcineurin specific substrates expressed in testis. Our study paved the way to screen the molecules for male contraceptive.

研究分野：実験動物学

キーワード：カルシニューリン 避妊薬 不妊モデル ゲノム編集 実験動物

### 1. 研究開始当初の背景

日本では年間約 20 万件もの人工妊娠中絶が行われているが、その理由の1つとして望まない妊娠が挙げられる。米国でも約 50%が予定外の妊娠とされ、約半数で人工妊娠中絶が行われている (Finer, Contraception 2006)。このような状況を改善するには、効果的な避妊法の開発や普及が急務である。現在、避妊法として広く普及しているのはコンドームであるが、装着を怠るケースや破損などのために、数%の確率で妊娠するリスクが残る。また女性用避妊薬(ピル)が存在する一方、男性用避妊薬の開発は成功していない。男性には、精管結紮術(パイプカット)という方法もあるが、外科的手術が必要とされハードルが高い。避妊を女性(ピル)だけに頼るのは男女平等の観点からも望ましくなく、男性が自身の生殖能力をコントロールできる男性用避妊薬の開発が望まれている。

古くから男性用避妊薬の候補として注目されているのが綿実に含まれるゴシポールであるが、投薬中止後も生殖能力が回復しないことがあるため(Coutinho, Contraception 2002)、実用化には至っていない。最近では、JQ1 という化合物が、可逆的な避妊薬の候補として報告されているが (Matzuk, Cell 2012)、JQ1 は精子形成を阻害して精巣が萎縮するため、服薬を躊躇する可能性がある。また約 5 週間かかる精子形成過程をターゲットにしているため、効果が現れるまでに時間がかかる上、万が一、異常精子から子孫が得られた場合に変異原となる可能性を否定できない。

そのような状況の中、申請者らは精子特異的に局在するカルシウム依存性の脱リン酸化酵素(精子カルシニューリン)が、男性避妊薬の標的分子となりうることを明らかにした(Miyata, Science 2015)。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリン A(CsA)や FK506 は、臓器移植後の拒絶を抑える免疫抑制剤として広く用いられているが、これらを投与すると 2 週間で雄マウスは不妊になり、投薬中止後 1 週間で生殖能力が回復した。CsA や FK506 が精巣上体での精子成熟過程(約 1 週間)を標的にしているため短期間で効果があり、JQ1 で認められた精巣萎縮も起こらない。精子は形態学的にも正常であり、顕微授精により正常な子孫を得ることもできる。CsA や FK506 は免疫機能も抑制するので男性避妊薬として使用できないが、精子カルシニューリンを特異的に阻害できれば、短期間で効果があり可逆的な男性避妊薬の開発に繋がる可能性がある。

### 2. 研究の目的

(1) 最先端技術である DNA エンコード化合物ライブラリーを用いて、精子カルシニューリンを特異的に阻害する化合物を探索する。  
(2) 阻害剤が見つからない場合のバックアップとして、精子カルシニューリンの基質を

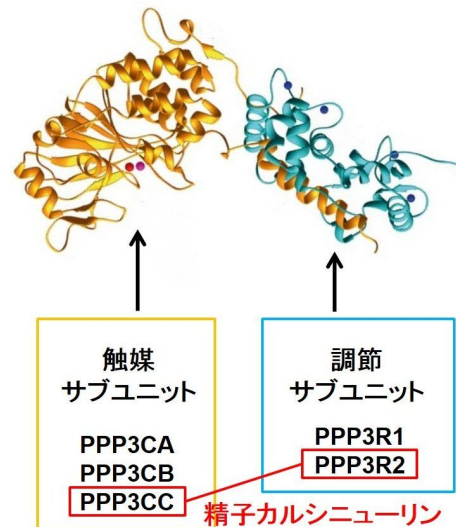
探索する。これは男性避妊薬の新たな標的分子となる。

### 3. 研究の方法

(1) DEC-Tec を用いた精子カルシニューリン阻害剤の探索【図 1】

カルシニューリンは触媒サブユニットと調節サブユニットのヘテロダイマーである。哺乳類では 3 種類の触媒サブユニット (PPP3CA, PPP3CB, PPP3CC) と 2 種類の調節サブユニット (PPP3R1, PPP3R2) が知られており、精子カルシニューリンは PPP3CC と PPP3R2 で構成される。精子カルシニューリンは精巣上体移行中に精子尻尾の中片部を屈曲可能にしており、Ppp3cc と Ppp3r2 のどちらを KO しても雄マウスは不妊になる。

申請者らは、ヒト精子にも PPP3CC と PPP3R2 が存在していることを明らかにしていることから、培養細胞でリコンビナントタンパク質を発現させて精子カルシニューリン (PPP3CC/PPP3R2) がカルシウム依存性の脱リン酸化酵素活性を示すことを確認するとともに、精製のために FLAG 等のタグでラベルすることを計画した。



【図 1】精子カルシニューリンサブユニット

### (2) 精子カルシニューリンの基質探索

上記の探索では精子カルシニューリンの特異的な阻害剤が見つからない可能性がある。その場合のバックアップとして、精子カルシニューリンの基質を探索する。免疫細胞カルシニューリン(CA/R1, CB/R1 ヘテロダイマー)の基質は転写因子である NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells)である。一方、精子カルシニューリン(CC/R2 ヘテロダイマー)は精巣上体移行中の精子成熟過程で機能するが、このステージの精子では既に遺伝子の転写が停止しており、精子カルシニューリンの基質は転写因子でない可能性が高い。そのため、精子カルシニューリンと基質の相互作用を阻害する化合物も副作用の少ない男性避妊薬の候補となりうる。また精子構造物の多くは精巣特異的に発現している遺伝子

にコードされており、他組織では発現していないことが多いため、その機能を阻害する化合物も副作用の少ない男性避妊薬の候補となりうる。

#### in silico での探索

カルシニューリンの基質では PxlIT、PxlIQ、PxlIN、PxlID というアミノ酸配列が良く保存されている (Goldman, Mol. Cell 2014)。既に、この配列を含むタンパク質で、精巣での発現が報告されている遺伝子を in silico で探索してある。これらの基質候補と CC/R2 ヘテロダイマーが結合するのか、両方の遺伝子を培養細胞に強制発現させて解析する。

#### リン酸化プロテオミクスによる探索

精子カルシニューリンを持たない K0 精子では、脱リン酸化酵素活性がないために、基質のリン酸化状態が異常になっているはずである。リン酸化プロテオミクスにより基質候補を探索する。

#### TG マウスを用いた探索

申請者は、基質に結合するが、酵素活性がないために基質から離れない変異型精子カルシニューリンを発現する TG マウスを作製した。変異型精子カルシニューリンには FLAG タグ、HIS タグが付けてあり、pull-down アッセイにより、結合している基質を同定する。

基質候補が見つかりしだい、CRISPR/CAS9 を用いて K0 マウスを作製する。申請者らの研究室では恒常的に K0 マウスを作製しており (Mashiko, Sci Rep 2013)、2-3 ヶ月で K0 マウスを準備できる。K0 雄マウスの生殖能力と精子中片部の屈曲能を調べることにより、精子カルシニューリン K0 マウスと同じ表現型が認められるかを確認する。

## 4. 研究成果

### (1) DEC-Tec を用いた精子カルシニューリン阻害剤の探索

ヒト精巣の cDNA ライブラリーから PPP3CA, PPP3CB, PPP3CC, PPP3R1, PPP3R2 の各オープンリーディングフレームを PCR により増幅してシーケンス確認した後に、普遍的発現プラスミド pCAG にクローニングした。また各サブユニットの C 末端に FLAG タグを付加した発現プラスミドも構築した。

次に、これらの各サブユニットを HEK293T 細胞に発現させて、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降し、ヘテロダイマー形成することを確認した。さらに、これらのヘテロダイマーがカルシウム依存性の脱リン酸化酵素活性を有することを確認した。

現在は、共同研究機関であるペイラー医科大学の小分子スクリーニングセンターの受入手続きを行っており、承認され次第、DNA コードされた小分子ライブラリーのスクリーニングを開始する。

### (2) 精子カルシニューリンの基質探索

#### in silico での探索

ゲノムにコードされる約 2 万 3 千のタンパク質の配列を検索し、PxlIT、PxlIQ、PxlIN、PxlID を有するタンパク質を約 220 個リストアップした。その内、精巣特異的もしくは多く発現する 12 遺伝子に着目した。今後、これらについて CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを利用して K0 マウスを作製し、解析する予定である。

#### リン酸化プロテオミクスによる探索

Ppp3cc の K0 マウス精子と野生型マウス精子をリン酸化プロテオミクスにより比較したが、差のあるタンパク質は同定できなかった。

#### TG マウスを用いた探索

酵素活性ドメインに変異を入れた Ppp3cc を発現するベクターを構築して培養細胞で発現させたところ、十分な発現量が得られるものの酵素活性を有さないことが確認できた。しかし当該変異を CRISPR/Cas9 法により導入した点変異マウスでは、Ppp3cc タンパク質の存在量が著しく低下してしまった。精子機能不全が酵素活性低下によるものなのか、量的低下によるものなのか区別できなかった。

本研究により、精子カルシニューリンを標的とした男性避妊薬の候補となる小分子のスクリーニング体制を整えることができた。また精子カルシニューリンに特異的な基質の候補因子を 10 個程度に絞り込むことに成功した。これらの K0 マウスが同様の表現型を示す場合には、新たな薬剤標的となることが期待される。

## 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 4 件)

Young SA, Miyata H, Satouh Y, Aitken RJ, Baker MA, Ikawa M. CABYR is essential for fibrous sheath integrity and progressive motility in mouse spermatozoa. J Cell Sci. 2016 Dec 1;129(23):4379-4387. 査読有  
DOI:10.1242/jcs.193151  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27802166>

Young SA, Miyata H, Satouh Y, Muto M, Larsen MR, Aitken RJ, Baker M, Ikawa M. CRISPR/Cas9-mediated mutation revealed cytoplasmic tail is dispensable for IZUM1 function and male fertility. Reproduction. 2016 Dec;152(6):665-672. 査読有

DOI: 10.1530/REP-16-0150  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27624483>

Oji A, Noda T, Fujihara Y, Miyata H, Kim YJ, Muto M, Nozawa K, Matsumura T, Isotani A, Ikawa M. CRISPR/Cas9 mediated genome editing in ES cells and its application for chimeric analysis in mice. Sci Rep. 2016 Aug 17;6:31666. 査読有  
DOI: 10.1038/srep31666.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27530713>

Miyata H, Castaneda JM, Fujihara Y, Yu Z, Archambeault DR, Isotani A, Kiyozumi D, Kriseman ML, Mashiko D, Matsumura T, Matzuk RM, Mori M, Noda T, Oji A, Okabe M, Prunskaitė-Hyrylainen R, Ramirez-Solis R, Satouh Y, Zhang Q, Ikawa M, Matzuk MM. Genome engineering uncovers 54 evolutionarily conserved and testis-enriched genes that are not required for male fertility in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Jul 12;113(28):7704-10. 査読有  
DOI: 10.1073/pnas.1608458113  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27357688>

〔学会発表〕(計 3件)

宮田治彦 . ゲノム編集技術を用いた精子機能の解析 . 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 . 2017.3.30 . 長崎大学医学部 (長崎県長崎市)

伊川正人 . 遺伝子改変マウスが切り拓く配偶子研究の未来と臨床応用への展望 . 第 61 回日本生殖医学会学術講演会・総会 . 2016.11.4 . パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

伊川正人 . ゲノム編集を用いた受精関連遺伝子の網羅的機能解析 . 創薬薬理フォーラム 第 24 回シンポジウム . 2016.9.29 . 日本薬学会 長井記念館 (東京都渋谷区)

〔図書〕(計 1件)

野田大地 , 大字亜沙美 , 伊川正人 . 羊土社 . ゲノム編集技術を使った遺伝子改変マウスの作製 実験医学別冊 マウス表現型解析スタンダード . 2016 . 74-82

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/information/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊川 正人 (IKAWA, Masahito)  
大阪大学・微生物病研究所・教授  
研究者番号 : 20304066

(2)研究分担者 : なし  
( )

研究者番号 :

(3)連携研究者

宮田 治彦 (MIYATA, Haruhiko)  
大阪大学・微生物病研究所・助教  
研究者番号 : 50604732

野田 大地 (NODA, Taichi)  
大阪大学・微生物病研究所・研究員  
研究者番号 : 50712551