

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09144

研究課題名(和文) Transgenic spermを用いた卵活性化因子PLC の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of PLC zeta using transgenic sperm.

研究代表者

窪田 裕樹 (Kubota, Hiroki)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：10347403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウス精巣からクローニングしたPLC 遺伝子とGFPとの融合蛋白を発現させるベクターを作製し、雄マウスの精巣内にエレクトロポレーション法により遺伝子導入を行った。導入から2週間後に精巣上体内精子を回収したところ、融合蛋白の発現が認められるtransgenic spermを同定することができた。このtransgenic spermとマウス卵子を用いて、卵細胞質内精子注入法を試みたところ、正常なCa oscillationと同一とはいえないが、卵細胞質内のCa濃度の上昇が観測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、私たちが開発した精巣内遺伝子導入技術は、標的とする遺伝子を導入したtransgenic spermを作成することが可能である。これを応用することにより、標的遺伝子の機能解析並びに受精のメカニズムの解明に多大な貢献を果たすことが期待される。

最終的には遺伝子治療がなされた精子を用いて、遺伝子異常を次世代に継承させない理想的な治療法の開発を目指している。

研究成果の概要(英文)：We employed a vector designed to produce a fusion of full length clone of mouse PLC and the enhanced green fluorescent protein. Male mice (4-6 weeks of age) were used for in vivo experiments. For each animal, the right testis was exposed and the PLC -GFP injected into the rete testis via the efferent duct. An electrical current was subsequently applied to the right testis. We also detected GFP fluorescence in the epididymal sperm at 2 weeks after the procedure. These transgenic sperm were introduced into the mouse egg using intracytoplasmic sperm injection technique. We demonstrated the significant elevation of Ca concentration in the egg cytoplasm.

研究分野：Andrology

キーワード：PLC zeta egg activation transgenic sperm

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、現在では精巢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 ζ) 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 ζ 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。

そこで我々は精巢内遺伝子導入法を用いて、精巢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 ζ と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 ζ の解析が可能になり、PLC ζ 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巢内遺伝子導入法は、効率に優れ安全性も高く、精子形成や受精・胚発生の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) マウス精巢への遺伝子導入

サブクローニングされた PLC ζ 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 ζ 遺伝子 + GFP もしくは YFP 遺伝子を制限酵素で切り出して、サイトメガロウィルスのエンハンサーと chicken の β -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、麻酔下に精巢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巢に電気刺激を加え、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、精巢及び精巢上体を摘出する。精巢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。精巢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巢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

マウス精巢の 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 ζ 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 ζ 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 遺伝子+ GFP もしくは YFP 遺伝子を制限酵素で切り出して、サイトメガロウィルスのエンハンサーと chicken の β -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 時間培養した。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した。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した。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(transgenic sperm)を分離・調整を試みたが、ごく少数を回収するにとどまった。遺伝子導入の条件設定を変えて、実験を繰り返すことで、精子全体の 2% ほどまで増加が見られた。得られた transgenic sperm を用いて、IVF を試みたが、精子運動率が低く受精に至らなかった。卵細胞質内精子注入法 (ICSI) を試みたところ、一部の卵細胞で分裂が見られたが、胚盤胞の形成は明らかではなかった。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ところ、卵細胞質内の Ca 濃度の上昇は確認できたが、卵活性化のトリガーである Ca oscillation と同一であることの証明はできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	安井 孝周 (Yasui Takahiro) (40326153)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	梅本 幸裕 (Umemoto Yukihiro) (80381812)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	岩月 正一郎 (Iwatsuki Shoichiro) (70595397)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教 (23903)	
研究分担者	野崎 哲史 (Nozaki Satoshi) (50813432)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員 (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関