

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590176

研究課題名（和文） 精子形成・成熟過程で発現する新規受容体と水チャネルの機能解明

研究課題名（英文） Functional analysis of a new water channel on mouse spermatogenesis

研究代表者

吉永 一也（YOSHINAGA KAZUYA）

熊本大学・医学部・教授

研究者番号：50136719

研究成果の概要：精子形成・成熟の分子機構を明らかにするために、精巣および精巣上体における新規アクアポリン 11（AQP11）遺伝子およびタンパク質の発現を調べた結果、AQP11 は精母細胞と精子細胞に強く発現していた。また AQP11 ノックアウトマウス精巣を光顕および電顕レベルで調べた結果、生殖細胞とくに精母細胞のアポトーシス像が多数観察された。これらの結果から、AQP11 の欠損は精子形成細胞の細胞死（アポトーシス）に関与することが推察された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：解剖学、分子形態学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：精巣、精子形成、アポトーシス、水チャネル、アクアポリン、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 精子形成の一連の増殖・分化プロセスが厳密な周期性を示しながら進行するためには、生殖細胞自身での遺伝子群の発現と同時に、セルトリ細胞やライディッヒ細胞といった周囲細胞との相互作用が重要である。

(2) 近年、精子形成・成熟の制御機構に関連性のある遺伝子が次々と単離され、遺伝子改変動物を用いた解析も盛んに行われてきた。しかし、生殖細胞と周囲細胞間の相互作用を担う具体的な分子機構を明らかにした報

告例は少ない。ところで最近、細胞の水やグリセリンなどの小分子輸送をコントロールする膜チャネルタンパク質・アクアポリン（AQP）が、さまざまな細胞の増殖や吸収分泌機構に関与することが多数報告されてきた。しかし、精巣を含めた生殖系での役割は解明されていない。

(3) 本研究では、こうした AQP に注目し、精子形成・成熟の分子メカニズムを解明するために、新規に同定された AQP11 に焦点を絞り、分子～細胞・組織～個体のレベルで研究を行

うことを企画した。

2. 研究の目的

本研究では、「精子形成・成熟における AQP 遺伝子とそのタンパク質の生理的役割解明」を目指して、主として新規 AQP11 の機能解析を行う。具体的には、

(1) AQP11 が精子形成過程のいつ、どこで、どのように発現・局在するのかを遺伝子およびタンパク質レベルで明らかにする。細胞膜局在の場合はその極性を、細胞質内局在の場合は細胞内オルガネラとの関連を電顕レベルで明らかにする。

(2) GFP 標識遺伝子を導入した培養細胞について、AQP11 タンパク質の発現パターンを形態学および生化学的に明らかにする。AQP11 は細胞質内発現が示唆されているので、とくに細胞内オルガネラとの関連を明らかにする。

(3) AQP11 遺伝子ノックアウトマウスの精巣および精巣上体について、精子形成・成熟のいつ、どこで、どのような異常がみられるのかを光顕と電顕レベルで明らかにする。また、RNA 干渉により作製された AQP11 遺伝子ノックダウン細胞の形態学的異常を明らかにする。

(4) 小胞体との関連が示唆されている AQP11 について、数々のストレスの細胞への負荷による局在変化を細胞・分子レベルで明らかにし、特異的に結合するタンパクを特定する。

(5) AQP とホモロジーの高い遺伝子をデータベースサーチで探索し、新規の遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

(1) AQP11 遺伝子の発現解析：若齢および成熟マウス精巣における AQP11 の発現を RT-PCR 法を用いて調べ、精子形成のどの段階で AQP11 が発現するのかを検討する。発現細胞の特定はジゴキシゲニン標識 - RNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法により行う。

(2) AQP11 タンパク質に対する抗体の作製：マウス AQP11 のアミノ酸配列の N 末端および C 末端に対応するペプチド抗体は、大腸菌に発現させた GST 融合タンパク質を用いてウサギに免疫して作製する。

(3) AQP11 タンパク質の局在解析：マウス AQP11 に対する特異抗体を用いて、成熟マウス精巣における AQP11 の局在を免疫組織化学的に検索する。細胞内小器官における局在は免疫コロイド金法を用いて電顕レベルで精査する。緑色蛍光タンパク質 (GFP) をつないだ発現ベクターを培養細胞へ導入し、蛍光顕微鏡を用いて解析する。

(4) AQP11 遺伝子欠損マウスの形態学的解析：標的遺伝子組み替え法を用いて作製された AQP11 ノックアウトマウス (明治薬科大学・石橋賢一博士作製) の精巣から光学顕微鏡および電子顕微鏡用試料を作製し、組織および細胞レベルで形態学的異常を調べる。

(5) 生体内への局所的遺伝子導入実験：ソノポレーション法に従い、ガラスキャピラリーに充填した AQP11 遺伝子の発現ベクター-マイクロバブル混合液をマウス精細管に微小注入し、遺伝子導入装置と超音波照射端子を用いて超音波を照射する。細胞内に導入された DNA は蛍光抗体法により確認する。

4. 研究成果

(1) AQP11 遺伝子の発現：精巣における AQP11 の遺伝子レベルでの発現を RT-PCR 法を用いて調べた結果、AQP11 mRNA は生後 2 週目以降の精巣で強い発現を認めた (図 1)。さらに、*in situ* ハイブリダイゼーション法による解析では、PCR 法による発現パターンと一致して精母細胞と円形精子細胞に陽性反応がみられた。

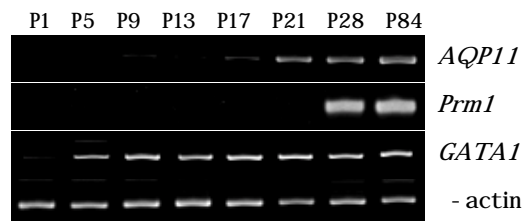


図 1 生後マウス精巣における AQP11 mRNA の発現

(2) 抗 AQP11 抗体の作製：マウス AQP11 のアミノ酸配列の両末端に対応するペプチドに対する抗ウサギポリクローナル抗体を作製したところ、各末端側を認識する合計 4 種類の特異抗体を得ることができた。この抗体を用いた精巣のウェスタンブロット解析の結果、約 27 キロダルトンの位置に単一のバンドを認めた。

(3) AQP11 タンパク質の局在：上記抗体を用いて AQP11 の局在を免疫組織学的に調べた

結果、AQP11は生後2週目以降の精巣で発現し、とくに精母細胞と円形精子細胞の細胞質に強い陽性反応を認めた。これに対し、生殖細胞の細胞膜やセルトリ細胞は陰性を示した。さらに、緑色蛍光タンパク分子(GFP)をつないだ発現ベクターを培養細胞へ導入して観察した結果、AQP11のN末端とC末端に連結したGFPは小胞体マーカー(KDEL)と一致しており、AQP11は細胞質内の小胞体に局在することを確認した。

(4) 顕微鏡レベルにおけるAQP11ノックアウトマウス精巣の異常：パラフィン包埋切片とエポキシ包埋切片を用いてAQP11ノックアウトマウス精巣を調べた結果、核濃縮を伴った大小の精母細胞が精細管の中央寄りに多数観察された。これらの細胞についてTUNEL染色を行ったところ、陽性反応を示した(図2)。また、TUNEL陽性細胞の数を生後経時的に調べた結果、AQP11の遺伝子発現と一致して生後17日頃に急激に増えていることが判明した(図3)。さらに、アポトーシスの実行に関与するとされる活性型カスパーゼ3抗体との免疫二重染色を行った結果、TUNEL陽性細胞とカスパーゼ3陽性細胞がほぼ一致した。この所見から、AQP11ノックアウトマウス精細管内のTUNEL陽性細胞はカスパーゼ3依存の細胞死を起こしていると考えられた。

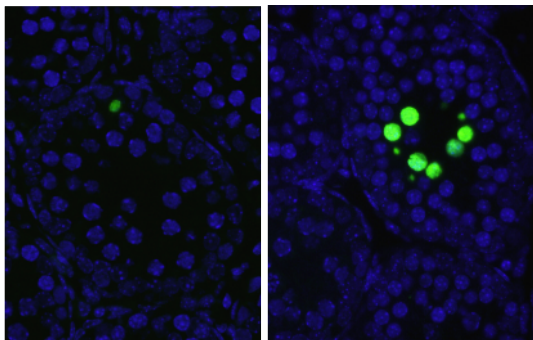


図2 生後17日齢マウス精巣の TUNEL 染色を施した蛍光顕微鏡写真。野生型精巣(左)とAQP11^{-/-}精巣(右)。

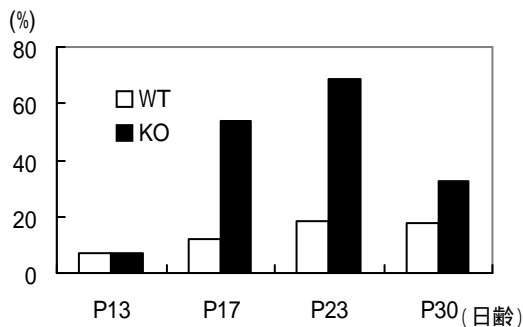


図3 TUNEL陽性細胞が存在するマウス精細管の割合

(5) 電顕レベルにおけるAQP11ノックアウトマウス精巣の異常：電子顕微鏡を用いて観察した結果、精母細胞の縮小と核クロマチンの濃縮・断片化(図4)それに続くセルトリ細胞による貪食像(図5)が観察され、典型的な生殖細胞のアポトーシス像を示した。

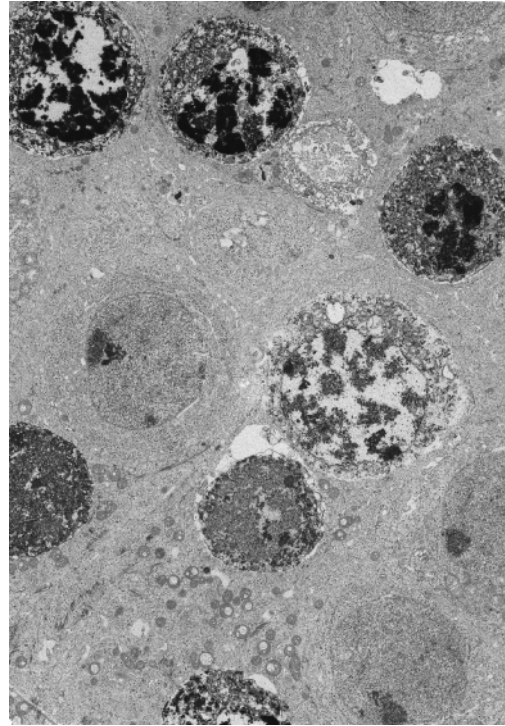


図4 AQP11-KO マウス精巣の電子顕微鏡写真

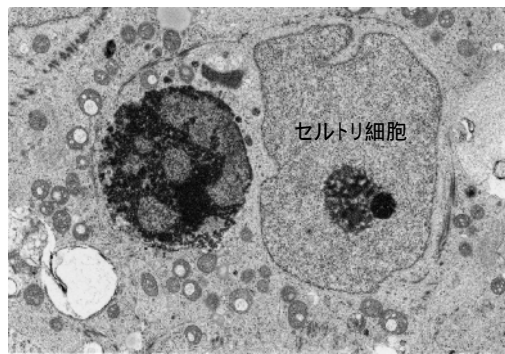


図5 セルトリ細胞による貪食像

(6) 本研究課題で得られた上記の成果から、AQP11分子は精母細胞および精子細胞の細胞質(小胞体)に局在し、その欠損は精子形成細胞の細胞死(アポトーシス)に関与することが推察された。このことは、現在までに国内外で報告されていないAQPの新たな機能を発見できる可能性があることを示すもので注目される。今後は、AQP11のアポトーシス誘導という観点から研究を進めていく必要があると考えている。

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)

[学会発表](計 3件)

吉永一也、迫村紘子、廣瀬加奈子、石橋賢一：アクアポリン 11 の欠損はマウス精細胞の細胞死を引き起こす。第 23 回日本生殖免疫学会全国学術集会、2008 年 12 月 6 日、富山市

吉永一也：精子形成とアクアポリン。第 113 回日本解剖学会全国学術集会シンポジウム、2008 年 3 月 29 日、大分県由布市

吉永一也、近藤慎一、今泉和則、石橋賢一：アクアポリン 11 欠損マウスにみられた精巢内アポトーシス。日本解剖学会第 63 回九州支部学術集会、2007 年 10 月 20 日、長崎市

[図書](計 1件)

小路武彦、吉永一也、菱川善隆：サイエンス社、永遠の不死 - 精子形成細胞の生物学、2009 年、143

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉永一也 (YOSHINAGA KAZUYA)
熊本大学・医学部・教授
研究者番号：50136719

(2)研究分担者

近藤 慎一 (KONDO SHINICHI)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：20404395

(3)連携研究者

(4)研究協力者

石橋 賢一 (ISHIBASHI KENICHI)
明治薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：80223022