

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19591898
 研究課題名（和文）プロタミンノックアウトマウスを用いた精子の核凝縮と RNA 制御機構の解明
 研究課題名（英文）Analyses of Sperm nuclear condensation in Protamine KO mice.
 研究代表者
 竹田 直樹（TAKEDA NAOKI）
 熊本大学・生命資源研究支援センター・助教
 研究者番号：90304998

研究成果の概要：

ヒト雄性不妊において発現異常が多く見受けられる精細胞特異的発現タンパク質プロタミンに着目し、マウス ES 細胞をもちいた遺伝子破壊法によってプロタミン 1 欠損マウスを作製してその解析をおこなった。その結果プロタミン 1 欠損マウスは、ヘテロで精子核凝縮の不全に由来すると思われる精子運動能の著しい減退による不妊を示し、無力精子症様の疾患モデルマウスになりうる事がわかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：精子、ES 細胞、プロタミン、核凝縮、haploinsufficiency

1. 研究開始当初の背景

2.

現在、妊娠を望むカップルの約 10%が不妊であるとされる中で、体外授精をはじめとする生殖補助医療技術の発展は多くの福音をもたらしている。これらの技術は進歩を続けており、近年では卵細胞質内精子注入法（ICSI）によって後期精子細胞でも妊娠が可能になってきている。しかし、妊性をもつ配偶子の選抜など考慮すべき問題が山積しているのが現状である。

不妊疾患の原因については未だ未解明な

部分が多い。特に原因の約半数が不明とされる男性不妊においては、臨床表現形から原因を探求することは患者への負担や解析法など多くの困難を伴っている。他の多くの疾患では、動物による疾患モデルによる解析が解明の手助けとなる。しかし、生殖に関わる現象は一般的に不妊という表現型を示すために、自然変異体などの生命資源としての蓄積が困難である事が、この分野の研究の妨げとなっている。

この問題を解決すべく、表現型からの探索ではなく、遺伝子からのアプローチを試みた。

マウス ES 細胞を用いた Gene Targeting 法は、目的の遺伝子に対して変異を挿入し、さらに個体発生させる事が可能である。その特徴は試験管内的な実験ではなく、個体を疾患モデルとする事であり、また哺乳動物において遺伝学的な解析が可能になることである。これはヒトでの多くの臨床知見や症例を踏まえることができ、また実験結果を還元しやすい事を意味する。

3. 研究の目的

不妊疾患の原因については未だ未解明な部分が多い。特に原因の約半数が不明とされる男性不妊においては、臨床表現形から原因を探求をすることは患者への負担や解析法など多くの困難を伴っている。そこで本研究ではマウス ES 細胞を用いた Gene Targeting 法により疾患モデル動物を作製し、これを用いて精子形成から成熟に至る機構の解明を目指すものである。

本研究ではヒトの不妊症例において発現量の異常や、ファミリー遺伝子との比率の乱れなどが数多く示唆されている精子特異的タンパク質:プロタミン1に着目した。

プロタミン1は精子発生において最も遅く発現する遺伝子であり、その機能は精子における染色質の保護と凝縮にあるとされる。

そこで ES 細胞を用いた Gene Targeting 法によってプロタミン1ノックアウトマウスを作製し、その機能の解析をおこなう事を試みた。

プロタミン1の欠失により、精子発生の異常や核凝縮の不全などが生じ、その結果とし

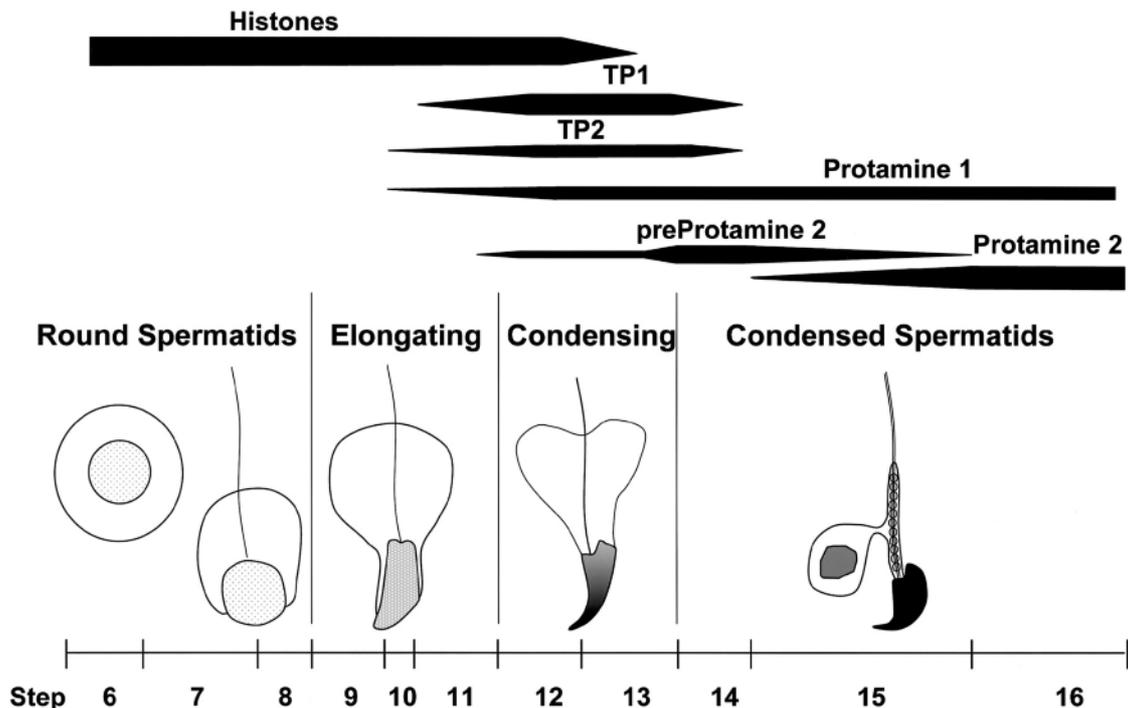
て雄性不妊となる事が期待される。この様にして作出された遺伝子改変マウスは、疾患モデル動物として利用できる可能性が高い事が期待される。

3. 研究の方法

プロタミン1遺伝子改変マウスは、常法を改良して作製した。まずエクソンに薬剤遺伝子を挿入したターゲティングベクターを作製し、マウス ES 細胞へ遺伝子導入をおこない、薬剤選別によって変異 ES 細胞を得た。その中から相同組換えによりプロタミン1遺伝子がターゲティングベクターと置換されたものを同定し、その相同組換え体 ES 細胞を宿主に注入することでキメラマウスを作出した。キメラマウスを野生型マウスと交配させ、変異 ES 由来の遺伝子改変マウスを得た。

先に述べた様にプロタミン1遺伝子の欠損は生殖不全に至ると思われるため、常法を改良した。即ち、通常使用される ES 細胞は XY 染色体を持つため作出されるキメラマウスは雄となるが、本実験では Y 染色体が脱落した XO 株を用いた。これにより遺伝子改変マウスを作製する上で最も困難な生殖系列への伝搬と、プロタミン1欠損による不妊による系統の断絶を防ぐ事が可能となる。

得られた変異マウスは、精子性状の確認とともに妊孕性の確認をおこなう。不妊の場合には、プロタミン類等の各種核タンパク質の発現を調べる。また DNA の凝縮についても調べる。これらは、野生型と比較をおこない精子発生のどの段階において変異が生じてい



るか同定をおこなう。

また、生殖補助技術を用いるなどして、次世代の作出が可能か否か検討をおこなう。

4. 研究成果

プロタミン1のノックアウトマウスは既に米国 Cho らによって優性遺伝による不妊であることが報告されているが、キメラマウスでの解析の為に宿主の精子が混入しており、十分な機能解析はされていないと思われる。

Cho らが十分な解析が出来なかった理由は、ジーンターゲット法に用いられる胚性幹細胞 (ES 細胞) のほとんどは XY 染色体を持つためにそのキメラマウスはオスとなる為である。プロタミン1の様に雄性生殖細胞で表現形が出る場合には不向きであるため、申請者はメスのキメラマウスを作出する X0 株の ES 細胞を用いてプロタミン1ノックアウトマウスを作製し解析をおこなった。

その結果、このヘテロ変異マウスは、Cho らと同様に不妊であった。

ヘテロ変異マウスの精巣上体尾部から精子を取り出し体外授精を試みたが、ヘテロ変異由来の精子は運動能が喪失、もしくは著しく減退しており、これにより不妊となる事が明らかとなった。これはヒトにおける無力精子症様の症状であり、その疾患モデル動物として有望と考えられる。

しかし、精巣及び精巣上体の大きさは野生型と有意差はなく、精巣上体尾部から得られる精子数も大きな差はなかった。また精巣での精子発生過程を HE 染色により観察をしたが、差違は見られなかった。

しかし、運動能を欠失している事から、エネルギー源である ATP 量を MTT アッセイにより測定をおこなったところ、ヘテロ変異由来精子では有意に減少していた。そこで次にミトコンドリアの膜電位を蛍光色素により測定したところ、ヘテロでは膜電位の喪失が生じている事が明らかとなった。また透過型電

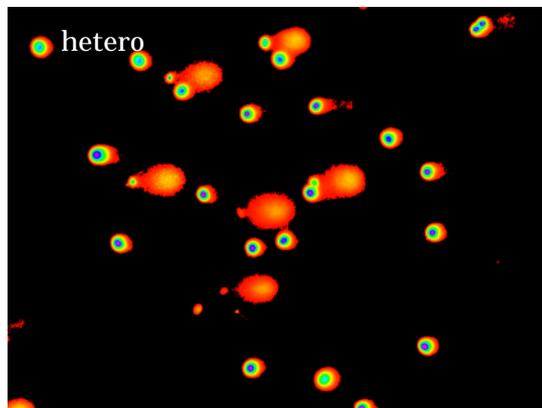
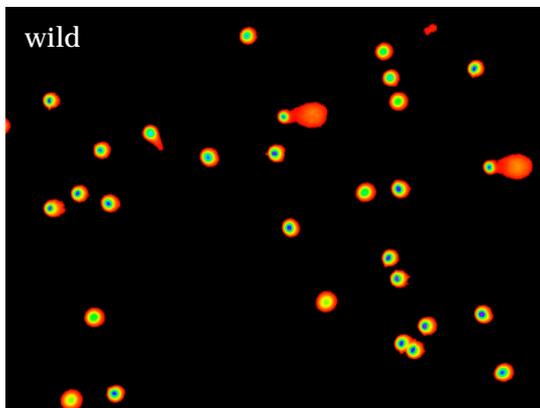
子顕微鏡による観察によって鞭毛微小管の構造に欠陥を生じていた。精子の運動能の減退はこれらミトコンドリアと微小管構造の複合的要因に由来することが明らかとなった。

これらの成果は Prm1 が精子の完成過程の最後に発現する単なる DNA に結合する構造タンパク質ではなく、他の因子と相互作用をする新規の現象を見出した事であり、ユニークかつ意義の有ることと思われる。

以上のようにプロタミン1欠損マウスは運動能の減退により不妊となる事がこれまでに明らかとなった。そこで、プロタミン本来の役割と期待される DNA の凝縮と保護について解析をおこなった。

プロタミン1を破壊した結果、ヘテロで不妊となったが、ウエスタンブロットによる解析ではプロタミン1のタンパク量は野生型マウスの約半量が発現していた。しかし同調的に発現するファミリー遺伝子であるプロタミン2はほとんど発現が見あらず、その前駆体が多く検出された。これらの事から、プロタミン1はプロタミン2の発現に大きく影響を与えている事が明らかとなっている。また透過型電子顕微鏡により精子頭部を観察した結果、ヘテロでは電子密度が低下していた事を含めると、これらプロタミン類の発現低下により、核の凝縮が不全となってる事が推測される。

さらにコメットアッセイをおこなったところ、ヘテロ精子では DNA の損傷が激しくなっているものが見られ、プロタミンが精子の DNA の凝縮と共に保護を担っている事が明らかとなった。しかし、取り出した精子を過酸化水素処理をおこない、保護効果の検討をおこなったが、顕著な増加は見られなかった。これは恐らく外挿した過酸化刺激がプロタミンのジスルフィド結合により中和されることで、DNA 鎖の切断を防いでいるものと思われる。これらの結果から、プロタミンは精子発生過程、もしくは成熟過程において DNA を保護しているのではないかと推測される。



コメットアッセイ : Single Cell Gel Electrophoresis

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1件)

竹田直樹、相同組換え法による遺伝子破壊マウス作製技術、日本薬理学雑誌 2007 年 129 巻 5 号、330-336 査読無

[学会発表](計1件)

佐藤慎祐：マウス ES 細胞の染色体数・核型分析とキメラ形成能の検討．第 25 回九州実験動物研究会総会、2007 年 11 月 10 日 熊本

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹田 直樹 (TAKEDA NAOKI)

熊本大学・生命資源研究支援センター・助教
研究者番号：90304998

(2)研究分担者

(3)連携研究者