

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06470

研究課題名(和文) 不妊マウスから単離された新規原因遺伝子Adamts12による卵巣機能制御の解明

研究課題名(英文) Regulation of ovarian function by Adamts12, a novel causative gene isolated from infertile mutant mice

研究代表者

辻 岳人 (Tsuji, takehito)

岡山大学・環境生命自然科学学域・教授

研究者番号：90314682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまで生殖機能との関連性が全く知られていなかったADAMTSファミリーの一員であるAdamts-like2 (Adamts12) 遺伝子が、雌の生殖機能の制御に関わる重要な因子であることを明らかにした。特に、Adamts12遺伝子の突然変異マウス(stb/stb)が、卵胞発育の遅延や子宮低形成、性周期の乱れを示すことを明らかにし、これらの異常は卵巣でのステロイドホルモン合成や下垂体ホルモンの遺伝子発現の低下に関わる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Adamts12遺伝子が属するADAMTSファミリーは26種類が知られており、細胞外マトリックス環境に保持された潜在性成長因子の活性化に携わるとしてさまざまな研究分野で急速に注目されている。雌性生殖機能への関与は未だ不明なものの、その役割の解明が待たれている。本研究の結果から、Adamts12遺伝子が卵巣および下垂体における生殖機能制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。ADAMTS12タンパクを介したECM環境による生殖機能制御の解明に向けて新たな重要知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified that the Adamts-like2 (Adamts12) gene, a member of the ADAMTS family whose relevance to reproductive function was unknown, is an important factor involved in the control of female reproductive function. We found that the mice with a nonsense mutation in the Adamts12 gene exhibit delayed ovarian follicle development, uterine hypoplasia, and disturbed estrous cycle, and that these abnormalities may be related to decreased gene expression of steroid hormone synthesis in the ovary and pituitary hormones.

研究分野：動物遺伝学

キーワード：Adamts12 ovary

1. 研究開始当初の背景

ADAMTS (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) ファミリーは、複数の細胞外マトリックス結合モジュールとメタロプロテアーゼ活性を持ち、細胞外マトリックス (ECM) の安定性維持や成長因子の活性化を調節することが報告されている。ADAMTS ファミリーの一員である *Adamts-like2* (ADAMTSL2) は、N 末端のプロテアーゼドメインを欠いた短縮型構造を特徴とし、その分子レベルでの作用機序や役割は十分に解明されていない。

本研究で取り扱う *Stubby* (*stb/stb*) マウスは、矮小を特徴とする自然発生のミュータント系として樹立された。我々はこれまでに F2 交雑個体を用いた連鎖解析とポジショナルクローニングにより、*Adamts12* 遺伝子のナンセンス変異を同定した。この遺伝子は、ヒトの骨格形成不全の遺伝性疾患である *Geleophysic dysplasia-1* の原因遺伝子として報告されている。

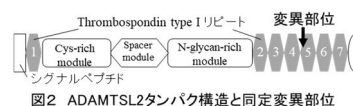
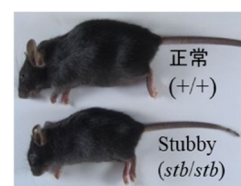


図2 ADAMTSL2タンパク構造と同定変異部位

stb/stb マウスの雄では勃起不全や射精不能による不妊が報告されている (Biol. Reprod. 1987)。さらに、我々はこれまでに雌個体では自然交配により産仔が全く得られず、成熟個体の卵胞での閉鎖卵胞数の増加や子宮の顕著な低形成を示すことを確認しており、*Adamts12* 遺伝子は生殖機能に関わる重要な因子であることが示唆された。しかし、ADAMTSL2 に突然変異を持つヒトやノックアウトマウスにおいて生殖機能との関連性を示す報告はこれまでにない。したがって、ADAMTSL2 の未知の作用機序と生殖機能への影響を解明することは、生殖制御システムに関する新たな重要知見をもたらすことが期待された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、卵巣機能を含む雌生殖機能の制御における *Adamts12* 遺伝子の役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

1) 免疫組織化学染色および in situ ハイブリダイゼーション

市販抗体および異なる 4 領域の組換えタンパクを抗原として作製したウサギポリクローナル抗体を用いて、*stb/stb* マウスと正常マウスの卵巣における ADAMTSL2 タンパクの検出を行った。また、in situ ハイブリダイゼーションでは、*Adamts12* cDNA から合成した DIG 標識プローブを用いて、正常マウスの卵巣での遺伝子発現を試みた。

2) *Adamt1s2* 遺伝子のナンセンス変異による発現量およびタンパク局在への影響

stb/stb マウスと野生型 (+/+) マウスの卵巣および下垂体における *Adamt1s2* 遺伝子の発現量を定量解析した。さらに、*Adamt1s2* 遺伝子の全長およびナンセンス変異直前領域を含む発現ベクターを作成し、HEK293 細胞でのタンパク局在を比較した。

3) *Adamt1s2* 遺伝子の変異により発現量が変化する遺伝子の同定

stb/stb マウスと野生型 (+/+) マウスの卵巣および下垂体 RNA を用いて、RNA-seq 解析による遺伝子発現量の比較を行った。

4. 研究成果

1) 免疫組織化学染色および in situ ハイブリダイゼーションによる卵巣における発現パターンの解析

ADAMTSL2 抗体を用いた免疫染色の結果、市販製品および作製した抗体のいずれにおいても、正常マウス卵巣の顆粒膜細胞において一定の陽性反応は得られたものの、十分に特異的なシグナルを得ることができなかった。また、in situ ハイブリダイゼーションでも顆粒膜細胞において陽性反応が確認されたものの、センスプローブでも弱い陽性反応が観察されたため、卵巣での発現パターンを結論づけるには至らなかった。

2) *Adamt1s2* 遺伝子のナンセンス変異による発現量およびタンパク局在への影響

stb/stb マウスと野生型 (+/+) マウスの卵巣および下垂体で *Adamt1s2* 遺伝子の発現量を比較したところ、*stb/stb* マウスでは卵巣と下垂体でそれぞれ約 59% および約 95% の低下が確認された (図 3)。そのため、*stb/stb* マウスでは短縮型 ADAMTSL2 タンパクが存在する可能性が示唆された。そこで、*Adamt1s2* 遺伝子発現ベクターを培養細胞へ導入してタンパク局在の変化を比較した。その結果、正常な全長 ADAMTSL2 タンパクは細胞外に局在するのに対し、短縮型は異常タンパクとして小胞体に取り込まれることが確認された。

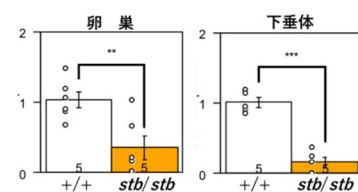


図 3 *Adamt1s2* 遺伝子の発現量比較

そこで、*Adamt1s2* 遺伝子発現ベクターを培養細胞へ導入してタンパク局在の変化を比較した。その結果、正常な全長 ADAMTSL2 タンパクは細胞外に局在するのに対し、短縮型は異常タンパクとして小胞体に取り込まれることが確認された。

3) *Adamt1s2* 遺伝子の変異により発現量が変化する遺伝子の同定

stb/stb マウスと野生型 (+/+) マウスの卵巣および下垂体での遺伝子発現量を網羅的に解析した結果、ステロイドホルモン合成経路の酵素や複数のホルモン遺伝子の発現が低下していることが確認された。特に、*Fshb* および *Pr1* 遺伝子はリアルタイム PCR による定量解析でも顕著な低下が確認された (図 4)。一方で、ADAMTSL2 相互作用因子として報告されている細胞外マトリックスの遺伝子発現には差が認められなかった。これらの結果から、*Adamts12* 遺伝子が卵巣および下垂体における生殖機能制御に重要な役割を果たすことが強く示唆された。

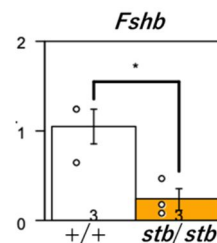


図 4 *Fshb* 遺伝子の発現量比較

4) *stb/stb* マウスの卵胞発育、産仔数、性周期について

幼若期の 3 週齢における卵巣を観察したところ、正常マウスでは十分に発育した胞状卵胞が確認されたが、*stb/stb* マウスでは胞状卵胞のサイズが比較的小さいものが見られた。また、TUNEL 染色では、正常マウスでは TUNEL 陽性の閉鎖卵胞が多く存在するのにに対し、*stb/stb* マウスでは少なかった (図 5)。5 週齢以降の卵巣で

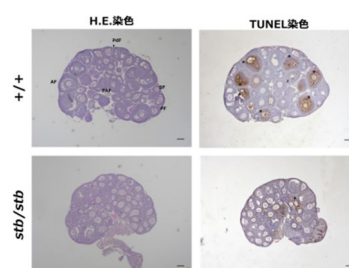


図 5 *stb/stb* マウスの卵巣組織

も同様の解析を行ったが、顕著な違いは認められなかった。これまでに我々が実施した交配実験では、*stb/stb* 雌マウスでは雄同様に産仔を全く得ることはできなかった。本研究で再度実施したところ、産仔を得られる個体が認められ、その産仔数は *stb/+* マウスと同等の産仔数であった。しかし、産仔が得られる効率は正常マウスよりも低い傾向があり、その要因の 1 つとして性周期を解析したところ、正常マウスで観察される 4~5 日間の正常な性周期がほとんど認められず、性周期の延長が観察された。

Adamts12 遺伝子が属する ADAMTS ファミリーは 26 種類が知られており、ECM 環境に保持された潜在性成長因子の活性化に携わるとしてさまざまな研究分野で急速に注目されている。雌性生殖機能への関与は未だ不明なものの、いくつかの ADAMTS ファミリーが卵巣や子宮で遺伝子発現は確認されており、その役割の解明が待たれている。雌性不妊の研究動向としては、これまでステロイドホルモンや局所の成長因子などの効果が多く解明されているが、ECM の視点から調節機構の存在を示した報告はほとんどない。本研究の結果から、*Adamts12* 遺伝子が卵巣および下垂体における生殖機能制御に重要な役割を果たしていること明らかになり、ADAMTSL2 タンパクを介した ECM 環境による生殖機能制御の解明に向けて重要知見が得られたものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iwanaga Yuka, Tsuji Kaori, Nishimura Ayaka, Tateishi Kouji, Kakiuchi Misa, Tsuji Takehito	4. 巻 34
2. 論文標題 A nonsense mutation in mouse Adamts12 causes uterine hypoplasia and an irregular estrous cycle	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mammalian Genome	6. 最初と最後の頁 559 ~ 571
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00335-023-10016-1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岩永 有可 藤原 靖浩 辻 岳人
2. 発表標題 細胞外マトリックスの構成因子であるAdamts12は幼若期マウスの精巣で発現しテストステロン合成に関与する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuka Iwanaga, Yasuhiro Fujiwara, Takehito Tsuji
2. 発表標題 A nonsense mutation in Adamts12 causes delayed testicular descent and abnormal spermatogenesis and testosterone synthesis in juvenile mice
3. 学会等名 36th international mammalian genome conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩永 有可, 立石 晃司, 辻 岳人
2. 発表標題 細胞外マトリックスの構成因子であるAdamts12遺伝子にナンセンス突然変異を持つ雌マウスの生殖機能に関する解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

〔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	若井 拓哉 (Wakai Takuya) (60557768)	岡山大学・環境生命科学研究科・准教授 (15301)	

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
---------	---------