

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月1日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500385

研究課題名（和文）精子と卵子の融合に不可欠なチロシン硫酸化蛋白の同定

研究課題名（英文）Identification of tyrosine-sulfated proteins essential for sperm-egg interaction

研究代表者

佐々木 宣哉 (SASAKI NOBUYA)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：20302614

研究成果の概要（和文）：近年、一部の分泌蛋白または膜結合蛋白の特定チロシンの水酸基が硫酸化されることが明らかとなり、硫酸化チロシンが蛋白間分子結合に関与し、リン酸化と並ぶ重要な翻訳後修飾と考えられるようになってきた。哺乳類は2種類のチロシン硫酸化を触媒する酵素 Tyrosylprotein sulfotransferase (TPST1, TPST2)を持ち、このうち *Tpst2* 遺伝子を欠損するノックアウトマウスは、精子の数、運動性、先体反応には異常はないが、卵子との膜融合能力に異常があり不妊となることから、卵子との融合に重要な精子蛋白のチロシン側鎖が TPST2 によって硫酸化されることが示唆された。本研究では当該蛋白の同定を試みた。

研究成果の概要（英文）：Tyrosine (Tyr) sulfation is a common posttranslational modification of secreted proteins or membrane-bound proteins that is implicated in numerous physiological and pathological processes. Interestingly, the *Tpst2* mutant shows severe hypothyroidism and male infertility due to the abnormality of sperm transport and capacitation and /or fertilization. These results suggest that the unknown testis specific protein(s) are preferentially sulfated by TPST2. In this study, I tried to identify Tyr-sulfated-protein(s) essential for sperm-egg adhesion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：総合領域・実験動物学

キーワード：チロシン硫酸化 精巣-卵子融合

## 1. 研究開始当初の背景

近年、一部の分泌蛋白または膜結合蛋白の特定チロシンの水酸基が硫酸化されることが明らかになった（チロシン硫酸化）。現在のところチロシン硫酸化を受ける蛋白は 80 種類しか知られていないことから、チロシン硫酸化の生理学的機能はいまだ不明である。研究代表者は、甲状腺において TSH と TSH レセプターの結合に TSH レセプターのチロシン硫酸化が必須であることを明らかにしてきた。この他に、HIV-1 ウイルスがヒト細胞に感染する際には、チロシン硫酸化を受けたケモカインレセプターにのみ結合し感染が成立する。また、血液凝固系がチロシン硫酸化によってその結合能を増加させる。このように硫酸化チロシンが蛋白間分子結合に関与し、リン酸化と並ぶ重要な翻訳後修飾と考えられるようになってきた。チロシン硫酸化を触媒する酵素 tyrosylprotein sulfotransferase (TPST) は、ゴルジ体に存在し、線虫から哺乳類まで高度に保存されており、哺乳類は 2 種類の TPST (TPST1 及び TPST2) を持つ。 *Tpst1* ノックアウトマウスは正常であるが出産数が少なく、 *Tpst2* ノックアウトマウスの雄は不妊になることから、TPST が生殖機能に重要な機能を有する事が考えられるが、その詳細は明らかではない。 *Tpst1/Tpst2* ノックアウトマウスは出生直前に呼吸不全により致死となることからチロシン硫酸化の成体での機能はほとんど解明されていない。 *Tpst2* 遺伝子ノックアウトマウスは、精子の数、運動性、先体反応には異常はないが、卵子との膜融合能力に異常があり不妊となることから、卵子との融合に重要な精子蛋白のチロシン側鎖が TPST2 によって硫酸化されることが示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究は TPST2 によってチロシン硫酸化を受ける精子の蛋白をプロテオーム解析によって同定し、 *Tpst2* 遺伝子ノックアウトマウスにおける不妊原因因子を同定し、いまだ不明な点が多い精子-卵子の相互認識機構の分子基盤を解明する。本研究により得られる知見に

よって、種を超えて保存される精子-卵子融合という根源的な現象のメカニズムの一端が明らかとなると考えられる。

## 3. 研究の方法

具体的には、

(1) 精巣特異的 TPST コンディショナル KO マウスの作出: *Tpst2* ノックアウトマウスは成長期において甲状腺機能低下症が見られ精巣の発達に影響を与える。さらに甲状腺ホルモンの補充療法は逆に妊性低下の副作用が見られる。そこで甲状腺機能低下症の影響を完全に排除し、精巣だけでの機能を解析するために *Tpst2* コンディショナルノックアウトマウスを作出する。このマウスと精巣特異的に Cre リコンビナーゼを発現する *Sycp1-Cre* トランスジェニックマウスと交配することによって、精巣特異的な *Tpst2* ノックアウトマウスを作成する。また *Tpst1* 及び *Tpst2* はアミノ酸レベルで 70% の相同性があり、TPST1 と 2 の標的蛋白に対する基質特異性の違いや精巣での役割での違いについて全く解明されていない。そこで精巣特異的 *Tpst1* コンディショナルノックアウトマウスも作成し、 *Tpst1* 及び *Tpst2* ノックアウトマウス、さらにダブルノックアウトマウスを作出し、精巣の機能を精査する。

(2) 精巣におけるチロシン硫酸化を受ける蛋白質の同定: *Tpst1* 及び *Tpst2* コンディショナルノックアウトマウス、さらにダブルノックアウトマウスの精子由来蛋白を抽出し二次元電気泳動を用いた網羅的解析を行い、マスペクトロメトリー (MALDI-TOF MS) 法およびデータベース解析により TPST1、TPST2 それぞれに、または、両方にチロシン硫酸化される標的蛋白を同定する。

(3) これらのマウスを用いて、交配試験、精子形成過程や精子-卵子結合能について表現型を精査し、精子に含まれる全蛋白質の抽出法、高解像度二次元電気泳動法、および MALDI TOF-MS を用いた網羅的蛋白質の同定法等、種々の条件検討を行う。

#### 4. 研究成果

(1) *Tpst2* 遺伝子の酵素活性部位をコードする exon を loxP で挟み込んだコンディショナルノックアウトベクターを、常法により ES 細胞に導入し、ES 細胞の選抜を行い、胚盤胞に移植し、複数のキメラマウスを得た。残念ながら、現在まで、germline transmissionを確認することができなかった。

(2) そこで、*Tpst2* の hypomorphic (機能低下) 変異である DW/J-*grt* マウスの精巣蛋白を抽出し、受精の際の卵子と精子の形質膜の融合のために必要とされる分子のうち、精子側で発現する Izumo 蛋白の発現を western blot にて比較した。しかしながら *grt* マウスにおける Izumo の発現量は正常マウスと同等であり、また、免疫沈降した Izumo 蛋白に対して、チロシン硫酸特異的抗体を用いた western blot を行ったが、バンドは検出されず、Izumo 蛋白がチロシンの硫酸化を受けていないことが示唆された。10 週齢のマウスから精子由来蛋白を用い二次元電気泳動を行う。チロシン硫酸化特異的モノクローナル抗体と Pro-Q Diamond 蛍光染色法を用い、チロシン硫酸化蛋白スポットの可視化検出と比較を行い、そのうち正常マウスと比較してスポットの出現消失や強度の変化のあったものを検出したところ、*grt* マウスでは、約 50KDa の蛋白の発現が低下していることが明らかとなった。今後、スポットをゲルより切り出し MALDI TOF-MS を用いアミノ酸配列情報による蛋白種の同定とチロシン硫酸化の有無を検出する予定である。さらに免疫染色にて、不妊責任蛋白の精子における、または受精時の細胞局在を調べる。さらに *in vitro* での受精阻害実験等を用い TPST2 欠損マウスにおける不妊責任因子を確定する。

(3) 本研究の一部として *Tpst2* 遺伝子の自然発症変異を有する DW/J-*grt* マウスも対象に研究を行っていたが、このマウスの異常症状である甲状腺機能低下症が遺伝的背景の影響を強く受けることを発見した。即ち、遺伝的

背景が DW/J あるいは C57BL/6J の時は *Tpst2* 遺伝子の *grt* 変異に伴う甲状腺機能低下症が強く現れるが、遺伝的背景を 129 系統に置換すると症状が殆ど現れなかった。マウスの遺伝子操作に用いられる ES 細胞は多くが 129 系統由来であることから、129 系統が甲状腺機能低下症に対して抵抗性を示すという現象は 129 系統の甲状腺研究への使用に注意を喚起するとともに、TSHR シグナル非依存性の甲状腺発達および機能を示唆するという点で極めて重要である。この結果を受け、129 系統における甲状腺機能低下症に対する抵抗性遺伝子座の同定およびそのメカニズムを明らかにすることを目的として、*grt* 変異を有する DW/J 系統と 129 系統のバッククロス個体を用いて、甲状腺機能低下症に伴う体重低下を指標に quantitative trait loci 解析を行った。その結果、主な抵抗性遺伝子座は第 2 染色体上の *D2Mit62* と *D2Mit304* 間に限局することが示唆された。また、コンジェニックマウスを作製した結果からも、体重及び甲状腺低形成の重篤度の両方に影響が認められた。以上の結果から、129 系統の *Tpst2<sup>grt</sup>* による甲状腺機能低下症に対する抵抗性は少なくとも第 2 染色体上の 104.0~154.3Mb 間に位置し、かつ、抵抗性遺伝子は TSH シグナル非依存性の甲状腺発達に関与している可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

①佐々木宣哉、Current status and future prospects for research on tyrosine sulfation、Curr Pharm Biotechnol、印刷中、査読有

②細田弥生、佐々木宣哉、安居院高志、Identifying quantitative trait loci affecting resistance to congenital hypothyroidism in 129/SvJcl strain mice、PLoS One、Vol.7、e31035、2012、査読有

③細田弥生、佐々木宣哉、安居院高志、Hypothyroid phenotype of the *Tpst2* mutant mouse is dependent upon genetic background、Biomedical Research、Vol.31、pp207-211、2010、査読有

〔学会発表〕（計 2 件）

①細田弥生、佐々木宣哉、安居院高志、129/Sv 系統における甲状腺機能低下症に対する抵抗性遺伝子座の解明、第 148 回日本獣医学会学術集会、2009 年 9 月 25 日、鳥取市

②細田弥生、佐々木宣哉、安居院高志、129/Sv 系統における甲状腺機能低下症に対する抵抗性遺伝子座の解明、第 6 回北海道実験動物研究会 2009 年 7 月 9 日、帯広市

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 宣哉 (SASAKI NOBUYA)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：20302614