

## 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 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591828

研究課題名（和文） 不妊疾患関連遺伝子プロタミン2変異マウスの作製と解析

研究課題名（英文） Analysis of Protamin2deficient mouse

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（和文）：不妊疾患関連遺伝子プロタミン2変異マウスの作製と解析

ヒト男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2欠損マウスを作製してその解析を目的とした。プロタミン1欠損マウスでの解析により、プロタミン2欠損マウスにおいてもキメラマウスおよびヘテロマウスにおいて男性不妊であることが予想された。その為 Y 染色体を脱落した ES 細胞でのジーンターゲティングをおこなうことで変異マウスを得て、生殖不全変異マウスの系統化を試みた。

研究成果の概要（英文）：Analysis of Protamin2deficient mouse

In the human male infertility, abnormal expression of sperm cell-specific expression protein protamine is often seen. Therefore, we've tried to analyze a protamine-2 deficient mice by gene targeting method using mouse embryonic cells. Analysis of protamine-1 deficient mice to be male sterile in the chimeric mice and heterozygous mice in protamine-2 deficient mice was expected. Therefore, by using the gene targeting into ES cells without chromosome Y, to generate mutant mice, we challenged strains of germ-deficient mutant mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生殖医学

キーワード：ノックアウトマウス、発生・分化、精子

## 1. 研究開始当初の背景

妊娠を望むカップルの8～10組に1組が不妊であるとされている中で、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、近年では円形精子細胞卵子内注入法 (ROSI) によって妊娠が可能にもなっている。

一方で不妊の原因については、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う事から解明が進んでいない。その中でも特に不妊の原因の約半数を占める男性要因においては、ROSI の様な技術が先行した事も相まって、環境や遺伝的要因などが推測されながら原因の解明は進んでいない。

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。これまでに多くの自然発生した変異体が維持されてきているが、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生命資源としての蓄積が困難である。この様な特殊な事情がこの分野の研究の妨げの一因となっている。

この問題を解決すべく、ジーンターゲット法による疾患モデル動物の作製を試みた。この方法の特徴は試験管内的な実験ではなく、動物個体を解析できる事である。さらにマウスはヒトと同じ哺乳動物において遺伝学的な解析が可能である。これによってヒトでの多くの臨床知見や症例を踏まえることが可能となり、また動物実験での結果を還元しやすい事を意味する。

## 2. 研究の目的

これまで解析が困難である男性不妊疾患を、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る。その疾患モデル動物を遺伝子改変技術を用いて作製し、その解析する事を目的とする。

前述の通り生殖に関わる変異体は実験解析系を構築しにくい分野でもあるため、本研究のように遺伝学的アプローチがおこなえる研究は稀少である。本研究ではメスキメラを作出する ES 細胞 (X0 株) を用いて Prm2 ノックアウトマウスを作製する事が可能である事から、当該研究の手法は雄性不妊を来す他の遺伝子への適用が今後大いに期待される。

これまでに多くの不妊疾患において、プロタミン類の mRNA やタンパク質の発現異常が指摘されている。これらの原因の多くは不明であるが、精子発生過程における異常が、最終的な結果としてプロタミン類の発現異常となって表面化すると推測できる。本研究の進展より、ヒトでおこなわれている様々な特殊不妊検査を変異マウスと野生型マウスの間でおこない、比較する事で、遺伝学的な関係性を見いだす事が出来ると思われる。またそれらの結果を基に、ヒト疾患との相似性を探る事でより詳しい雄性不妊の分類や表現型からの疾患原因への探索が期待できる事が期待される。

## 3. 研究の方法

男性不妊に関わるとされる遺伝子に変異を挿入する事で、人為的に疾患モデル動物を作製する。本研究ではマウス ES 細胞を用いたジーンターゲット法によって、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で疾患モデル動物を作製する。いわゆるジーンターゲット法によるノックアウトマウスの作製と解析は、ヒトと同じ哺乳動物であると同時に遺伝学的な解析が可能である事が最大の特徴である。即ちヒトでの多くの臨床知見や症例を踏まえることができ、またその実験結果を還元しやすいと思われる。

ヒトにおいては精子特異的発現タンパク質であるプロタミン類の発現低下が多くの不妊疾患において認められる事から、その疾患に重要であると考えられている。プロタミン類は精子発生において主に核凝縮に寄与するとされているが、その詳細な機能については未解明な点が多い。これらの事から我々はこれまでにプロタミン1のノックアウトマウスを作製し、そのヘテロ変異マウスが雄性不妊となる事を明らかにした。その解析の過程でプロタミン1の発現低下と同時にそのファミリー遺伝子であるプロタミン2の発現にも異常が認められた事から、これらが密接に関与していると推測した。

これらの事から本研究ではプロタミン 2 (Prm2) に着目し、そのノックアウトマウスの作製と解析を試みた。

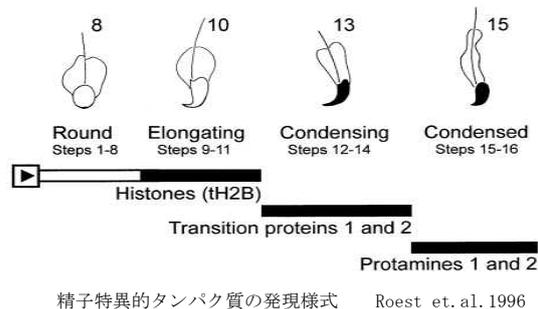
ジーンターゲット法では、まず ES 細胞へ標的となる遺伝子を破壊したベクターを導入し、相同組換えによって片方の遺伝子に変異が導入された組換え体を単離する。一般に哺乳動物培養細胞の染色体への遺伝子導入頻度は 1000 個に 1 個とされ、その中で相同組換えは更に 1000 個に 1 回とされる。この様な極めて低い頻度の現象である相同組換えを単離する為に、薬剤耐性による遺伝子導入体の選抜と、薬剤感受性による非相同組換え体の淘汰を利用した選別法を組み合わせ利用する。変異 ES 細胞はキメラを経てマウス個体にする事が可能であるが、この能力は細胞培養中に失われやすい為に注意深い手技が必要である。

ついでこの変異 ES 細胞をマウス胚へ注入する事によってキメラマウスを作製する。作製したキメラマウスを野生型マウスと交配させる事によって子孫を得る。しかし、従来のジーンターゲット法で使用する ES 細胞は雄株 (XY 型) である事からプロタミンの様にはヘテロ変異マウスの精子で不妊になる特殊なケースでは、キメラマウスが得られて

もその個体から子孫は得られない為、十分な解析ができない。そこでY染色体が脱落したユニークなES細胞(XO型)を用いる事でこの問題点を解決する。即ちES細胞XO株へジーンターゲットングする事によって相同組換え体を得てキメラを作製し、雌キメラマウスを経る事で、系統を維持し、遺伝学的な解析を試みる。

得られた Prm2 欠損キメラ雌マウスは、野生型雄マウスと交配させる事によって、ヘテロ変異マウスを得る事が出来る。ヘテロ変異雄マウスは不妊である事が予想されその解析をおこなう。ヘテロ雌マウスは交配させる事によって繁殖させ、不妊疾患モデルマウスの系統維持をおこなう。

作製された Prm2 欠損マウスは、既に作製されている Prm1 欠損マウスと同様に不妊であることが予想される。Prm1 欠損ヘテロマウスの精子は、鞭毛の構造異常により無力精子症様の表現形を示し不妊となる事が明らかになっている。一般にプロタミン類は精子発生過程に発現するDNA結合タンパク質でありその主たる機能はDNAの凝縮に関わっているとされているが、Prm1 欠損マウスでの鞭毛の構造異常など予期しない表現型が認められた為、これらの解析が必要である。



Prm2 ヘテロ欠損マウスは、ファミリー遺伝子である Prm1 欠損マウスと同様に不妊である事が予想される。

Prm2 は、Prm1 と同様に2つのエクソンからなる小さな遺伝子であるが、Prm2 はまず前駆体タンパク質が発現し、次いで切断によって成熟タンパク質となる事が知られている。そこで、協調的に働くと思われる Prm1 や、ヒストンからの遷移タンパク質との相関を野生型と変異型を比較する事によって解析を進める。またこれら Prm1、Prm2 それぞれの変異体マウスと野生型マウスを比較解析することで、精子特異的核タンパク質の機能分担と相互関係を推測する。

Prm2 欠損マウスの予想される表現型は、おそらくヒトでの無力精子症様を示すと思われる。そこで、ヒトでおこなわれている様々な特殊不妊検査を変異マウスと野生型マウスでおこない比較する。ヒト、ウマ、ウシ等

の大型動物と異なりマウスでは採取できる精子が1匹から10 $\mu$ lと限られ、人工的射精の方法が確立されていないために検体調製の度にマウスを処置しなければならない。その為実験によってはスケールダウンが必要で、かつ解析用変異マウスの維持を十分に考慮する必要がある。検討している検査項目は精子生存性検査、体外受精による受精能検査、運動能の測定、コメットアッセイ、SCS アッセイ、電子顕微鏡等による観察である。プロタミンはそのタンパク質構造的にはDNA結合タンパク質であることから、精子のDNAの凝縮状態を観察する事で、多くの知見が得られるであろう。特に遺伝学的に管理された変異マウスでの観察は多くの情報を得られる事が期待できる。また抗 Prm 抗体や抗 Tubulin 抗体等を用いた免疫染色や、ミトコンドリア電位の測定、他の精子遷移タンパク質の発現様式など分子生物学的解析を用いて変異表現型の探索をおこなう。

#### 4. 研究成果

Prm2 欠損マウス作製のための、相同組換えベクターの作製をおこなった。

Prm2 は他のプロタミンファミリー遺伝子(Tnp2、Prm2、Prm1)と同一染色体上で隣接しており、クラスターを形成している。当該遺伝子領域は精巣では非常に活発に発現しているが、ES細胞内では不活化されているために相同組換えが極めて生じにくいと予想される。これは我々が作製した Prm1 ノックアウトマウスでの相同組換え頻度が、上述の2段階の薬剤選別法をおこなっても解析したコロニーの300個に1個程度であった事からも推察できる。他の遺伝子のノックアウトの頻度が50-100個に1個である事に比べてもこの領域での相同組換え頻度は非常に低い事がわかる。さらに Prm2 遺伝子は2エクソンで723bpと非常に短いため相同組換えに必要な特異的な配列が少ない事も相同組換え頻度低下の一因になると思われる。通常のジーンターゲットング法では相同組換え領域が6kbp程度で十分だが、本計画では領域をさらに長く設定した。また単離選別の効率を上げる為に複数の Negative 選別を導入する予定も含め、これらの条件を満たすようベクターの最適化をおこなうことでこれを克服を試みた。さらにこれら多検体からの相同組換え体スクリーニングを効率よくおこなう為に、PCR法による同定を設計した。

上記の工夫をおこなったベクターを用いてターゲットングをおこなったが、相同組換え体は得られなかった。そこで相同領域を更に長く設定する改良をおこない相同組換え体の単離を目指している。

この領域における相同組換え頻度が低い理由は、ES 細胞内での発現が低い事に加え、特異的な配列が少ない事が考えられる。更にこの領域特有の GC 配列の多さと共に、繰返し配列が多い事も原因であると考えられる。

#### 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 1 件)

1. 竹田直樹、黒田和子、吉松麗加、中川佳子、  
A Novel ES cell Line ,Balthal, for Gene  
Targeting, with High  
Germline-Differentiating Potency、日本動物学会第 82 回大会 2011/09/21、旭川市大雪  
クリスタルホール (北海道)

[その他]

ホームページ等

<http://www.irda.kumamoto-u.ac.jp/>

#### 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