

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10日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780252

研究課題名（和文） 核膜孔タンパク質 Tmem48/Ndc1 の配偶子形成過程における機能の解明

研究課題名（英文） Functional analysis of nucleoporin Tmem48/Ndc1 during gametogenesis

研究代表者

秋山 耕陽（AKIYAMA KOUYOU）

岡山大学・大学院自然科学研究科・非常勤研究員

研究者番号：20515142

研究成果の概要（和文）：核膜孔は、核の形態維持や核-細胞質間の物質輸送に寄与する真核生物に必須の構造であるが、配偶子形成における機能は全く解っていない。本研究では、Tmem48/Ndc1 の機能を明らかにすることで配偶子形成過程における核膜孔の役割の解明を目指した。その結果、Tmem48/Ndc1 が精巢で特異的に発現するタンパク質と結合している可能性があること、Tmem48/Ndc1 が減数分裂第一分裂前期の雄性生殖細胞と胎仔線維芽細胞の核の形態維持に極めて重要な役割を果たしていること、そしてマウス胎仔線維芽細胞の増殖に必須であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The function of the nucleoporin during gametogenesis remains unknown, although the nucleoporin has an important role in various biological natures, such as the nucleo-cytoplasmic transport and nuclear morphology assembly, *in vitro*. In this study, it is proposed to elucidate the role of the nucleoporin during gametogenesis. As result, the examinations indicated that Tmem48/Ndc1 binds to some proteins which are specific expression in spermatogenic cells, serves the maintenance of nuclear architecture of the mouse embryonic fibroblast cells or the germ cells during meiosis prophase I, and is dispensable to the proliferation activity of the mouse embryonic fibroblast cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用動物科学

キーワード：(1) 畜産学 (2) 生殖生物学 (3) 遺伝子 (4) 発生・分化 (5) 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

配偶子である精子もしくは卵子は、受精を通して次世代に遺伝情報を伝達することで種の連続性を維持することに特化した細胞であ

る。精子もしくは卵子の形成過程に異常が生じると多く場合『生殖異常』として現れる。獣医畜産の分野において、流産や不受胎として診断される不妊、その結果である繁殖率の

低下といった生殖障害は、畜産農家の経済的損失につながる。そして、ヒトの場合でも生殖異常により正常な精子もしくは卵子が形成されないと多く場合『不妊』に至る。不妊症は、約10%の夫婦の男女いずれかにその症状があるとされ、先進国を中心に深刻な問題となっているヒト疾病の1つである。これまでに畜産学や獣医学の分野において開発された技術が応用され、生殖補助医療として広く貢献しているが、根本的な治療方法などは確立されていない。そのため配偶子形成の分子機構を解明する研究は、動物の生殖コントロール法や不妊症の治療方法の開発につながる重要な課題として取り組まれ、配偶子形成には多くの遺伝子が様々な細胞において機能する複雑な分子機構を経て成立することが解ってきたが、不明な点も多く残っている。米国ジャクソン研究所において樹立された配偶子形成と骨格形成に異常を呈する *sks* 突然変異マウスは、核膜孔タンパク質 *Tmem48/Ndc1* に生じた突然変異により、相同染色体の対合に異常が生じることで、減数分裂第一分裂前期パキテン期以降の発生が停止するため、無精子症に至る。これまでに核膜孔は、多数のタンパク質で構成される細胞内構造物であり、核の構造維持や核-細胞質間の物質輸送に必須であることが知られている。しかし、生体における機能は、作出されたノックアウトマウスが発生初期で致死になるなどの問題から十分に解明できていない。さらに、配偶子形成における役割を示した報告は皆無である。

2. 研究の目的

核膜孔は、核の形態維持や核-細胞質間の物質輸送に寄与する真核生物に必須の構造であるが、配偶子形成における核膜孔の機能は全く解っていない。*sks* マウスの表現型は、核膜孔タンパク質 *Tmem48/Ndc1* を介した分子機構が配偶子形成に必須であることを

明確に示しており、配偶子形成における核膜孔の機能を解明できる唯一のモデル動物である。それゆえ本研究では、*Tmem48/Ndc1* の機能を明らかにすることで、配偶子形成における核膜孔の役割を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) *Tmem48/Ndc1* と相互作用するタンパク質の同定

Tmem48/Ndc1 を pGBKT7 ベクターに、精巢 cDNA ラブラリーを pACT2 ベクターもしくは pGADT7-Rec ベクターに組み込み、酵母菌株 AH109 および Y187 に形質転換し、一倍体組換え酵母株を作成した。それぞれを接合させたのち、選択培地上で培養することで陽性コロニーを獲得した。各陽性コロニーからプラスミドを抽出し、pACT2 ベクターに組み込まれている精巢 cDNA の配列を調べることで *Tmem48/Ndc1* と結合するタンパク質を特定した。

(2) 相互作用タンパク質の発現時期および発現部位の解明

成体マウスの各臓器から抽出した RNA を鋳型に cDNA を合成した後、*Gapdh* の発現を内部標準として半定量的 RT-PCR を行うことで (1) により特定された遺伝子の発現パターンを調べた。

(3) *Tmem48/Ndc1* の核の形態維持に関する解析

① 胎仔線維芽細胞における核構造の解析

胎齢 14.5 日の各遺伝子型の *sks* マウスの胎仔線維芽細胞を初代培養し、以下の実験を行った。 1×10^5 cells/ml の密度で播種した胎仔線維芽細胞を播種後 24 時間後の時点で 10%ホルマリンにて固定した後、核膜孔複合体のマーカー抗体および坑 LAMINB1 抗体を用いた免疫蛍光染色を行うとともに DAPI で核染色を行った。また、アポトーシスの発

生頻度は、 1×10^5 cells/ml の密度で播種した胎仔線維芽細胞を播種後 24 時間後に 10%ホルマリンにて固定した後、TUNEL 法により調べた。また、 5×10^3 cells/well になるように 96 well-plate に播種した後、播種後 3 時間、24 時間、48 時間および 72 時間後の時点で MTS アッセイを行うことで各遺伝子型の胎仔線維芽細胞の増殖活性を調べた。

② 精巣における核構造の解析

メタカン固定液により固定した各遺伝子型の成体 *sks* マウスの精巣をパラフィン包埋し、薄切することで組織標本を作成した。精巣組織標本は、坑 LAMINB1 抗体および坑 SCP3 抗体を用いて免疫蛍光染色を行うとともに DAPI で核染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。また、ブアン氏固定液により固定した各遺伝子型の成体 *sks* マウスの精巣をパラフィン包埋し、薄切することで組織標本を作成し、TUNEL 法によりアポトーシスの発生頻度を調べた。

(4) Tmem48/Ndc1 の卵子形成機構における機能解析

① 排卵された卵子の観察

各遺伝子型の成体 *sks* マウスのメスに 10 単位の PMSG を腹腔内に投与し、48 時間後に 10 単位の hCG を腹腔内に投与することで過排卵処理を行った。hCG 投与後 14 時間から 16 時間後に卵管膨大部から排卵された卵丘細胞-卵母細胞複合体を採取した。採取した卵丘細胞-卵母細胞複合体はヒアルロニダーゼ処理により卵丘細胞を卵母細胞から分離させ、卵母細胞の裸化を行った。裸化した卵を 2%PFA により固定し、抗 α -tubulin 抗体を用いて免疫蛍光染色を行うことで、紡錘体を可視化するとともに DAPI で DNA を染色した後、蛍光顕微鏡で観察した。

② 受精能および発生能の観察

①と同様の方法に各遺伝子型の *sks* マウス

のメスに過排卵処理を施した後、野生型のオスとを同居させることで交配を行った。翌日、メス個体の膣栓の有無および膣スミア像により交尾行動の有無を判断した。膣栓を確認した正午を 0.5 日とし、1 日胚および 1.5 日胚をそれぞれ卵管灌流法により卵管から採取した。回収した胚は KSOM 培地中で培養し、24 時間ごとに胚の発生を観察した。

③卵母細胞および受精卵における TMEM48 の発現解析

①および②の方法により、排卵された未受精卵(MII 期胚)、前核期胚、二細胞期胚よりタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティングを行うことでTMEM48タンパク質の発現を調べた。また、採取した卵および胚を2% PFAにより固定し、抗TMEM48抗体により免疫染色を行うことでTMEM48の局在を可視化し、蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) Tmem48/Ndc1 と相互作用するタンパク質の同定

マウス精巣において Tmem48/Ndc1 と結合するタンパク質を酵母 Two-Hybrid 法を行うことで探索することを試みた。その結果、マウス精巣において Tmem48/Ndc1 と結合する可能性のあるタンパク質として 29 種のタンパク質を特定した。これらはいずれも Tmem48/Ndc1 と結合することが報告されていないタンパク質であった。

(2) 相互作用タンパク質の発現時期および発現部位の解明

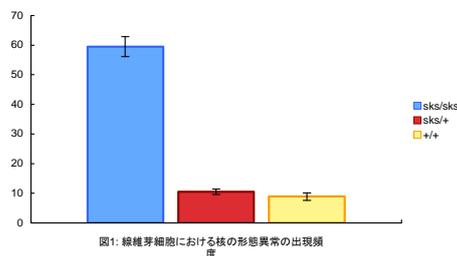
(1)により特定された遺伝子の発現を半定量的 RT-PCR 法よりマウスにおいて発現している組織を調べたところ、4 種の遺伝子が精巣で特異的に発現していることがわかった。次にこれらの精子形成ファーストウェーブにおける発現パターンを調べたところ、1 種が減数分裂の初期から発現する遺伝子、2

種が第一分裂前期パキテン期に発現が始まる遺伝子、そして1種が円形精子細胞に発現が始まる遺伝子であることが判明した。

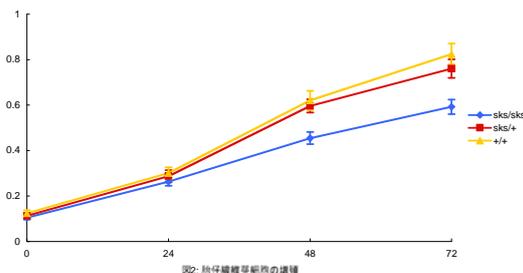
(3) Tmem48/Ndc1 の核の形態維持に関する解析

① 胎仔線維芽細胞における核構造の解析

各遺伝子型の胎仔より胎仔線維芽細胞を初代培養し、核染色により核の形態を調べたところ、*sksl/sks* では、約 60% の細胞において、核の一部が突出もしくは陥入が生じていることが明らかになった(図 1)。



さらに抗 LAMINB1 抗体を用いて核膜の形態を免疫蛍光染色により調べたところ、*sksl/sks* では核膜の一部が欠損しているもしくは網目状になっていることが判明した。次に、核の形態異常によりアポトーシスの発生頻度を TUNEL 法により調べたところ、いずれの遺伝子型においても TUNEL 陽性細胞の数は同等であることから、核の形態異常がアポトーシスの原因にはならないことが判った。一方で、核の形態異常が胎仔線維芽細胞の増殖活性に影響しているかを MTS アッセイ法により測定したところ、*sksl/sks* の細胞の増殖活性は、*sks/+* および *+/+* の 50~60% 程度であることがわかった(図 2)。



② 精巣における核構造の解析

各遺伝子型の成体の精巣組織標本を作成し、抗 LAMINB1 抗体および抗 SCP3 抗体を用いて免疫蛍光染色により調べたところ、*sksl/sks* では約 60% の減数分裂第一分裂過程にある生殖細胞において核の一部が突出もしくは陥入していることが明らかとなった。さらに SCP3 の局在パターンを指標に、核の形態異常が生じる発生段階を調べたところ、減数分裂第一分裂前期パキテン期後以降の精母細胞にその異常が際立つことが明らかになった。そこでアポトーシスの発生頻度が亢進しているかについて TUNEL 法により調べたところ、いずれの遺伝子型においても TUNEL 陽性細胞の数は同等であることから、生殖細胞においても線維芽細胞と同様に核の形態異常によりアポトーシスは起こらないことが明らかになった。

(4) Tmem48/Ndc1 の卵子形成機構における機能解析

① 受精能および発生能の観察

sksl/sks より排卵される卵子の受精能および発生能を検討するため、過排卵処理を施した *sksl/sks* もしくは *+/+* のメス個体のそれぞれを *+/+* のオス個体と交配させ、1.5 日胚を卵管灌流により採取したところ、*+/+* 個体では約 75% が 2 細胞期胚であったの対して *sksl/sks* では、その多くが未受精や異常卵割を起こした異常胚であり、形態的に正常な 2 細胞期胚は約 18% にとどまることが明らかになった。さらに、回収した 2 細胞期胚の発生を観察したところ、*+/+* 由来の胚は、約 96% が胚盤胞期まで発生を進行させたのに対して、*sksl/sks* 由来の胚は、2 細胞期胚以降に全く発生が進行しないことが判明した。

② 卵母細胞および受精卵における Tmem48/Ndc1 の発現

野生型マウスより MII 期胚および前核期胚

または2細胞期胚を採取し、ウェスタンブロッティングによりTmem48/Ndc1の発現を調べたところ、MII期胚、前核期胚および2細胞期胚のいずれにおいても発現が確認された。次に、MII期胚および前核期胚におけるTmem48/Ndc1の局在を免疫蛍光染色により調べた結果、MII期胚では卵全体に一樣の陽性反応があったが、前核期胚に発生が進行すると前核周囲に局在するようになることが明らかになった。

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)

秋山耕陽. 哺乳類の精子形成を制御する分子機構. 遺伝育種学研究会. 2011年. 39号. 75-94ページ. 査読有り

[学会発表] (計5件)

①秋山耕陽 (他8名). 黒毛和種牛に発生する前肢帯筋異常症の原因遺伝子の同定と遺伝子診断法の確立. 日本動物遺伝育種学会第12回年次大会. 広島県. 2011年11月

②梶田晋平、秋山耕陽 (他2名). マウス精巣においてTMEM48/NDC1と相互作用するタンパク質の探索. 第59回岡山実験動物研究会. 岡山県. 2010年

③藤原靖浩、秋山耕陽 (他4名). repro34突然変異マウスを用いたStx2/Epim遺伝子の精子形成における機能の解析. 第57回日本実験動物学会. 京都府. 2010年

④梶田晋平、秋山耕陽 (他2名). マウス精巣においてTMEM48/NDC1と相互作用するタンパク質の探索. 第57回日本実験動物学会. 京都府. 2010年

④梶田晋平、秋山耕陽 (他5名). Cloning of candidate genes for TMEM48 binding proteins, which could be involved in gametogenesis. Society

for the Study of Reproduction. アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 ミルウォーキー. 2010年
⑤藤原靖浩、秋山耕陽 (他4名). The roles of Syntaxin2/Epimorphin (Stx2/Epim) in progression of meiosis during spermatogenesis. Society for the Study of Reproduction. アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 ミルウォーキー. 2010年

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 耕陽 (AKIYAMA KOYO)

岡山大学・大学院自然科学研究科・非常勤
研究員

研究者番号：20515142

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者