

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790284

研究課題名（和文） 雄性生殖能力に関する亜鉛トランスポーターの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of the zinc transporter involved in male fertility.

## 研究代表者

福村 龍太郎 (FUKUMURA RYUTARO)

独立行政法人理化学研究所・新規変異マウス研究開発チーム・開発研究員

研究者番号：90392240

研究成果の概要（和文）：本研究により、マウス亜鉛トランスポーター *Slc39a6* 遺伝子は雄性生殖能に必須の分子であることが明らかとなった。*Slc39a6* ナンセンス変異型マウスは、メスの生殖能には異常がなく、オスのみに妊性能の異常がみられた。精巣組織や精子の形態および運動能には異常が見られなかったが、体外受精検査から精子の著しい受精能の低下が観察され、精子の受精能に問題があることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：This study revealed that murine zinc transporter *Slc39a6* gene was essential for male fertility. The ENU mutant mice that carried a nonsense mutation on *Slc39a6* gene exhibited sterility in male. The testis and spermatozoa morphologies of *Slc39a6* mutant mice were normal. By in vitro fertilization, the decreased fertility of their spermatozoa was observed. *Slc39a6* gene may act to the sperm fertility.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：亜鉛トランスポーター、雄性不妊、ENU

## 1. 研究開始当初の背景

亜鉛は、さまざまな酵素の活性維持に必要な金属元素であり、亜鉛結合モチーフとして Zn フィンガー、Ring フィンガー、LIM、PHD ドメインなどの亜鉛結合モチーフの存在が知られている。また、亜鉛イオンが細胞内外でシグナル分子として機能することが明らかとなり、亜鉛の生体調節因子としての作用に注目が集まっている。生体内での亜鉛ホメオスタシス維持に機能するトランスポーターが次々と報告され、その生理学的重要性が分子レベルで解明されつつある。高等生物において、生理学的条件下で機能する亜鉛トランスポーターは、ZIP トランスポーターと ZnT トランスポーターの 2 種類に分けられ、前者

が主に細胞外から細胞内部への亜鉛輸送に関わり、後者は細胞内部から細胞外への亜鉛排出に関与する。両トランスポーターとも様々な部位に発現し、細胞内亜鉛ホメオスタシス維持に機能し、アルツハイマー、糖尿病、胚発生、がん転移、免疫などの疾病や生理機能に幅広く機能している事が知られ、近年、非常に重要な金属元素として注目されている。

研究代表者は 2003 年度に高精度遺伝子発現解析法 (HiCEP 法) を開発し、この手法を用い、哺乳動物の概日リズム中心である SCN で光刺激により誘導かつ日周期性発現変動する 4 つの遺伝子を発見、報告した。この 4 遺伝子のうちの 1 つである *Slc39a6* は ZIP トラン

スポーターに含まれる亜鉛トランスポーターであった。若手研究(B)「概日リズム変動遺伝子の点突然変異マウスを用いた概日リズム機構解析」(H20~21)において *Slc39a6* 遺伝子と概日リズムとの関係を明らかにするために、理研 ENU ジーンドリブンミュタジェネシスシステムを使用し、*Slc39a6* 遺伝子の変異アレルスクリーニングを行った。1エクソンをスクリーニングしたところ、ナンセンス変異(Y541X)を発見した。このナンセンス変異マウスの概日リズムを測定した結果、野生型との差は見出せなかった。しかし、*Slc39a6* ナンセンス変異マウスに他の異常がないか調べた所、ナンセンス変異マウスの雄マウスの生殖能力が著しく低下していることを発見した。*Slc39a6* 遺伝子は乳がん由来培養細胞株をエストロゲン処理後、発現される遺伝子として同定され、乳がん組織に高発現し、がん転移に関与することが示唆されていたが、雄性生殖能力に関する影響は報告されていなかった。

## 2. 研究の目的

亜鉛は、タンパク質の構造維持に必須であり、細胞内外のシグナル分子としても機能する。研究代表は亜鉛トランスポーター *Slc39a6* 遺伝子のナンセンス変異型点突然変異マウスが、雌マウスの生殖能力は正常にもかかわらず、雄マウスの生殖能力が著しく低下していることを発見した。亜鉛トランスポーター *Slc39a6* 遺伝子が雄性生殖能力にどの様に寄与しているか、ENU ジーンドリブンミュタジェネシスシステムを用いた複数の点突然変異遺伝子産物および変異マウスの解析からそのメカニズムを検証する。

## 3. 研究の方法

### 1) *Slc39a6* 遺伝子変異アレルスクリーニング

ENU 変異マウスライブラリーは ENU 投与された C57BL/6J オスマウスを非投与マウスと交配させ、生まれた ENU 変異マウス 8,000 匹の精子凍結とゲノム DNA をアーカイブ化している。ENU 変異マウス 1 匹当たりのゲノムには ENU 誘発点突然変異が 3000 個、生じている。このゲノム DNA アーカイブから標的遺伝子に ENU 変異が生じている個体を変異スクリーニングにより発見し、ENU 変異をもつ個体を凍結精子から IVF により復元し、個体レベルでの機能解析が可能となる。変異スクリーニング法には高感度融解曲線解析法 (HRM) を用いた。*Slc39a6* 遺伝子のエクソン 12 個を個別に増幅する PCR プライマーをデザインし、ゲノム DNA を 2 個体分、プールした 96 穴プレート 36 枚 (7502 個体) をテンプレート DNA として、PCR 増幅を行う。PCR には、5nM SYTO9 (Invitrogen) を加えた。PCR 産物を熱変性処

理 (98°C20 秒、28°C20 分) し、HRM 解析装置 (LightCycler480、Roche) で融解曲線を計測し、変異サンプルを抽出した。SYTO9 は二本鎖 DNA 特異的に結合し、励起する蛍光試薬である。PCR 産物内の変異の有無により融解曲線に変化が生じるため、変異サンプルを検出可能となる。各手法ともにプール化したサンプルから変異個体を同定するため、プールしていないマウスゲノム DNA を用い、PCR 後にシーケンス反応を行い、変異同定を行った。

### 2) ENU 変異マウスの雄性妊性能検査

凍結精子を融解後、C56BL/6J 雌マウスから採取した未受精卵に加え、受精卵を作製し、仮親として ICR 雌マウスに移植、出産させ、産仔 (G2) を得た。G2 マウスの遺伝型は野生型ホモ (+/+) または変異型ヘテロ (+/M) となるので、遺伝型検査を行い、変異型ヘテロメス個体を選別し、C57BL/6J オスと交配させ、G3 マウスを生産した。G3 マウスの変異型ヘテロ同士を交配させ、変異型ホモ (M/M) マウスを生産し、オスマウスの妊性能を C57BL/6J マウスと交配させ、確認した。

### 3) *Slc39a6* ナンセンス変異マウスの網羅的 ENU 変異同定

*Slc39a6* ナンセンス変異マウスの G1 世代のゲノム DNA を用い、次世代シーケンス技術を用いたエクソーム解析を行い、*Slc39a6* 遺伝子上の ENU 変異以外に雄性不妊に関与する遺伝子への ENU 変異の有無を検証した。エクソーム解析には SureSelect All Mouse Exon Kit (Agilent) を用い、3ug のゲノム DNA からライブラリーを作製し、SOLiD4 Genetic Analyzer (Life Technology) を用い、ペアエンドシーケンスを行った。得られたシーケンスデータはマウスリファレンス配列 (mm9) にマッピングし、SNV 解析を行い、ENU 変異候補を抽出した。ENU 変異候補は MassARRAY Analyzer (SEQUENOM) を用い、検証実験を行い、ENU 変異を確定させた。

### 4) ナンセンス変異型マウスにおける海馬および精巣形態の確認

12 週齢のナンセンス変異型マウスの変異型ホモを用意し、海馬を観察する個体は、麻酔を投与後にブアン固定液で環流固定を行い、脳組織を摘出後、ブアン固定液につけ、パラフィン包埋を行った。精巣を観察する個体は頸椎脱臼後に速やかに精巣、精巣上体尾部を摘出し、ブアン固定後にパラフィン包埋を行った。包埋されたサンプルから切片作成を行い、海馬切片は HE 染色および CV 染色を行い、精巣組織は HE 染色のみを行った。顕微鏡下で組織形態の観察を行い、コントロールとして用意した同腹の野生型ホモマウスの各組織と比較を行った。

5) 体外受精によるナンセンス型変異マウスの受精能力検査および精子形態観察。

ナンセンス型変異マウスの精巣上部尾部から精子をM2培地に懸濁し、37°C、60分、5%CO<sub>2</sub>化で培養後、ホルモン投与処理したC57BL/6J雌マウスから採取した未受精卵と混ぜ、37°C、24時間、5%CO<sub>2</sub>化で培養後、実体顕微鏡により2細胞胚の数を測定し、精子の受精能力を検討した。精子懸濁液300μlをスライドガラスに垂らし、風乾後、Diff-Quik染色を行い、顕微鏡下で精子形態の観察を行った。

#### 4. 研究成果

1) *Slc39a6* 遺伝子変異アレルスクリーニング。

*Slc39a6* 遺伝子上にあるENU変異をENUマウス変異ライブラリーからスクリーニングした結果、ナンセンス型変異(Y541X)の他に、4つのアミノ酸置換型変異(E510G, M521K, H112R, I345M)と2つのシノニマス型変異を発見した(表1)。E510K, H112R, I345Mの3系統のENUマウスを凍結精子より個体化し、雄性妊性能の確認を行った。

表1. *Slc39a6*遺伝子上のENU変異

塩基置換	変異型	アミノ酸置換
A→G	ミスセンス	E510G
T→A	ミスセンス	M521K
T→C	シノニマス	
T→A	ナンセンス	Y541X
A→G	ミスセンス	H112R
C→G	ミスセンス	I345M
C→T	シノニマス	

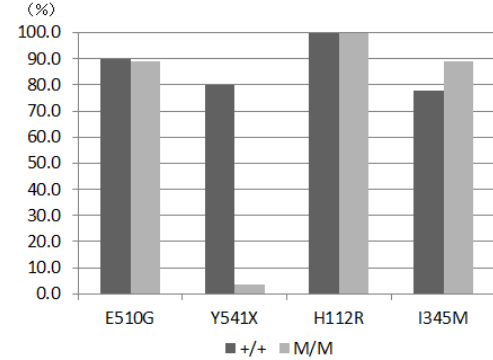
2) ENU変異マウスの雄性妊性能検査

各ENU変異マウスの兄妹交配を行い、野生型ホモ(+/+), 変異型ヘテロ(+/M), 変異型ホモ(M/M)の3遺伝型を持つ個体の生産を行った。+/+とM/Mのオスマウスをそれぞれ、C57BL/6Jメスと1週間同居させ、その後、メスマウスが妊娠するか確かめた。それぞれの+/+マウスの雄性妊性能は正常で一番低い系統でも77.8%であった(図1)。M/Mマウスの結果、ナンセンス型変異マウスY541Xの妊性能は3.8%(3/80)と著しく低下していることがあらためて確認されが、3つのミスセンス型変異マウスは正常であった(図1)。

3) ナンセンス変異マウスの網羅的ENU変異同定

エクソーム解析の結果、標的配列に対する

図1 *Slc39a6* 変異マウスの雄性妊性能テスト

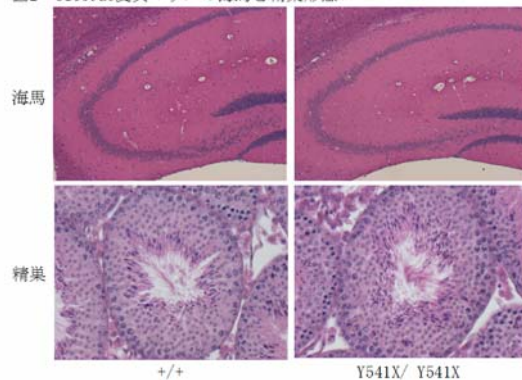


シーケンス量は平均x79.5の厚みが得られ、SNV解析の結果、96個のENU変異候補を抽出した。変異候補の中には発見済みのナンセンス変異も検出されていた。XXX個のENU変異候補に対し、MassARRAY Analyzerで検証実験を行った結果、41個が真のENU変異と同定された。このうち、アミノ酸変化を引き起こす変異は13個であり、GO解析の結果から、雄性生殖に関与する遺伝子は見つからなかった。さらにナンセンス変異から前後に3Mb以内にアミノ酸配列変化を引き起こすENU変異は発見されなかった。

4) ナンセンス変異型マウスにおける海馬および精巣形態の確認。

*Slc39a6* 遺伝子はマウスでは広範囲に発現が確認されるが、特に精巣と海馬で強い発現が観察される。そこで両組織にナンセンス変異型マウスで異常が生じてないか、組織切片を作製し、観察した。その結果、Y541/Y541マウスと+/+マウスでの両組織における差は観察されなかった(図2)。

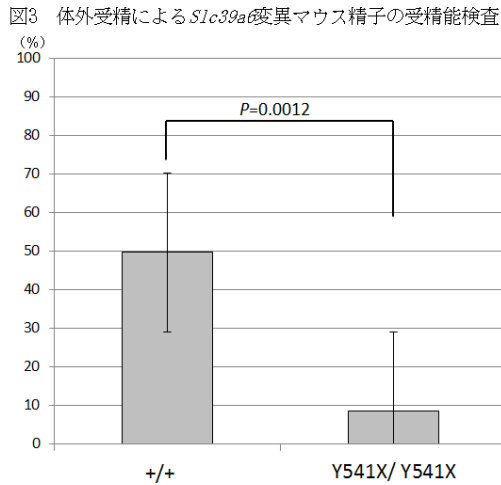
図2 *Slc39a6*変異マウスの海馬と精巣形態



5) 体外受精によるナンセンス型変異マウスの受精能力検査および精子形態観察。

体外受精によるナンセンス型変異マウスの受精能力検査には+/+マウス5匹、Y541/Y541マウスを8匹使用した。C57BL6Jの未受精卵と各系統の精子懸濁液を混ぜた24時間後に2細胞胚を数えた結果、+/+マウスは49.6±16.4%、M/Mマウスでは8.4±11.2%となり、

遺伝型間で有意差 (P=0.0012) があつた (図3)。体外受精に用いた精子の形態観察の結果、遺伝型間で差は見られなかった。



今回の ENU 変異マウスライブラリーを用いた *Slc39a6* 遺伝子の雄性妊性能解析ではナンセンス型変異のみに雄性妊性能に異常が見られた。エクソーム解析の結果からは他の ENU 変異は確認されておらず、バッククロスも進んでいることから、*Slc39a6* 遺伝子の欠損が雄性妊性能の不全を引き起こしていると思われる。体外受精の結果から、ナンセンス変異型の精子には受精能が低下していることが明らかとなった。しかし、精子の形状には異常がなく、濃度、運動能ともに野生型ホモマウス由来の精子と比較し、異常はみられていない。マウス精巣で亜鉛不足により、精子形成に若干の異常がみられるとの報告もあるが、今回の観察からは明瞭な差を見出すことはかなわなかった。精巣や精子形態の更なる詳細な解析や、食物からの亜鉛の過剰摂取によりナンセンス変異型マウスの雄性妊性能に変化が生じるか、今後の課題である。

##### 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)

[雑誌論文] (計 3 件)

①Shibata N, Fukumura R (12 名中 3 番目), Comprehensive gene expression analyses in pluripotent stem cells of a planarian, *Dugesia japonica*, *Int J Dev Biol*, 査読有り 56:93-102, 2012.

②Gondo Y, Fukumura R (5 名中 4 番目), Mouse mutagenesis and disease models for neuropsychiatric disorders. *Curr Topics in Behavioral Neurosci*, 査読有り 7: 1-35, 2011.

③Lazar N, Gondo Y, Fukumura R, (8 名中 6 番目), Missense mutation of the reticulon-4 receptor alters spatial memory and social interaction in mice. *Behavioural Brain Research*, 査読有り 224: 73-79, 2011.

[学会発表] (計 2 件)

①Fukumura R, Gondo Y *et al.* (6 名中 1 番目), Assessment of exome resequencing by NGS to detect genomewide heterozygous point mutations in the mouse. 9th Int' l Workshop on Advanced Genomics (AGW) Tokyo Japan, 2011 年 7 月 12-14 日. 国際会議

②Fukumura R, Gondo Y *et al.* (7 名中 1 番目), Novel mutation discovery on ENU mouse mutagenesis by exome targeted re-sequencing. Mouse Genetics 2011, Washington, DC USA, 2011 年 6 月 24 日. 国際会議

[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

福村 龍太郎 (FUKUMURA RYUTARO)

独立行政法人理化学研究所・新規変異マウス

研究開発チーム・開発研究員

研究者番号: 9 0 3 9 2 2 4 0

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし