

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700430

研究課題名(和文) 遺伝子組換え動物を用いた精巣特異的 GPI アンカータンパク質の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of male germ cell specific GPI-anchored proteins using gene-manipulated mice

研究代表者

藤原 祥高 (Fujihara, Yoshitaka)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：70578848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞は次世代へと遺伝情報を伝えることができる唯一の細胞である。申請者は、雄の生殖細胞特異的な発現を示す GPI アンカータンパク質に着目して、これらの生理的機能を明らかにすることを目的に研究を行った。

申請者は研究期間内に、2つの GPI アンカータンパク質複合体 TEX101/LY6K が精子受精能において必須の因子であることを明らかにした(PNAS. 2013, BOR. 2014)。また、TEX101/LY6K 複合体が、精子受精能に必須の膜タンパク質 ADAM3 と精巣内で相互作用すること、そして LY6K が ADAM3 以外の精子受精能を司る因子との関与が示唆されたことが今後の研究において好材料となる。

研究成果の概要(英文)：Germ cells are the only cells that can carry genetic information on to the next generation. I focused on the male germ cell specific glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein complexes, TEX101 and LY6K, and studied their physiological functions using gene-manipulated mice. I showed that these GPI-anchored protein complexes are required for sperm migrating ability into the oviduct and subsequent male fertility (PNAS. 2013, BOR. 2014). TEX101 and LY6K protein complexes interacted with the sperm membrane protein ADAM3 in mouse testes. However, spermatozoa from LY6K-deficient mice had no aberrance in ADAM3. Thus, the no effect on ADAM3 in LY6K-deficient mice is indicative of an as yet undefined pathway in the mouse.

研究分野：生殖生物学、発生工学、実験動物学

キーワード：雄性生殖細胞 GPI アンカータンパク質 精子受精能 遺伝子組換えマウス

1. 研究開始当初の背景

生命誕生の重要なイベントである受精研究は、古くから行われてきた研究分野である。近年、遺伝子欠損(KO)動物を用いた個体レベルでの解析によって、受精の分子メカニズムが少しずつ明らかになりつつある。その中でも、ACE (angiotensin I converting enzyme)-KO マウス精子ではGPI アンカータンパク質の切断が起きないことで雄性不妊となることから、受精における GPI アンカータンパク質の関与が報告されていたが(Kondoh et al, *Nat Med.* 2005)、その詳細については明らかになっていなかった。

そこで、申請者は雄性生殖細胞特異的な発現を示す GPI アンカータンパク質 TEX101 (testis expressed gene 101)に着目して、KO マウスの作製及び表現型解析を行った。その結果、TEX101-KO マウスは雄性不妊を示し、その原因は KO 精子の雌の子宮-卵管結合部 (UTJ, uterotubal junction)の通過不全であることが分かった。そして、同様の表現型を示す精子受精能に必須の膜タンパク質 ADAM3 (a disintegrin and metallopeptidase domain 3)が TEX101-KO 精子上から消失していることが明らかになった。

さらに、精巣内で TEX101 と共役する GPI アンカータンパク質 LY6K (lymphocyte antigen 6 complex, locus K)が、TEX101-KO 精巣において消失していることも発見した。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が作製した雄性不妊を示す TEX101-KO マウスを用いて、精子受精能における GPI アンカータンパク質の役割を明らかにすること、さらには GPI アンカータンパク質の切断活性 (GPIase 活性) を持つ ACE との関連を調べた。

そして、TEX101 と相互作用する GPI アンカータンパク質 LY6K が TEX101-KO マウスで消失していたことから、LY6K-KO マウスを作製し表現型解析を行った。その際、TEX101-KO マウスとの表現型の違いや LY6K-KO マウスでの TEX101, ADAM3 の局在などに注目して解析を行った。

3. 研究の方法

本研究では、申請者が作製した TEX101-, LY6K-KO マウスを解析の中心に置き、さらに解析を正確かつ効率的に行うことができるトランスジェニック(Tg)マウスや KO マウスを用いた個体レベルでの解析を行った。本研究では、以下の4つのテーマに絞って解析を進めた。(1)LY6K-KO マウスの作製と表現型解析、(2)LY6K-KO マウスを用いた TEX101, ADAM3 の局在、(3)LY6K/TEX101 タンパク質複合体と ACE-GPIase 活性との関連、(4)TEX101-KO, LY6K-KO マウスを用いた新規受精関連因子の探索

4. 研究成果

(1) LY6K-KO マウスの作製と表現型解析

TEX101 と共役し、TEX101-KO マウスにおいて消失していた GPI アンカータンパク質 LY6K の KO マウス作製に成功した。LY6K-KO マウスの生殖能力を調べたところ、TEX101-KO マウスと同様に雄性不妊を示すことが明らかになった。しかし、LY6K-KO マウスの精巣重量、精子形成、精子形態そして体外受精能については、野生型との大きな違いは見られなかったにも関わらず、LY6K-KO 精子は卵透明帯への結合能が顕著に低下していた。そこで、LY6K-KO マウスの雄性不妊の原因を調べるために、蛍光タンパク質を持つ精子 (尾部に RFP) を産生する Tg マウスと LY6K-KO マウスとを掛け合わせたマウスを用いた結果、LY6K-KO マウスも TEX101-KO マウスと同じく、KO 精子の UTJ 移行障害であることが分かった (図1)。

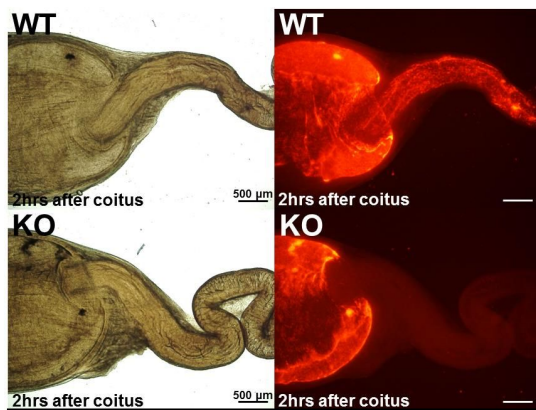


図1 . LY6K-KO マウスの雄性不妊の原因は、KO 精子の UTJ 移行障害であった。

(2) LY6K-KO マウスを用いた TEX101, ADAM3 の局在

前述の通り、TEX101-KO マウスでは LY6K が消失していた。一方、作製した LY6K-KO マウスでは TEX101 タンパク質の減少は見られなかったが、消失はしていなかった (図2)。

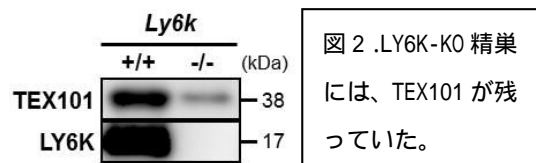


図2 .LY6K-KO 精巣には、TEX101 が残っていた。

つまり、TEX101-KO と LY6K-KO マウスでは、相互作用の様式が少し異なることが明らかになった。次に、雄性不妊の原因である KO 精子の UTJ 移行障害の表現型は、両者で一致していたことから、KO 精子における ADAM3 の局在について調べた。その結果、TEX101-KO 精子では ADAM3 が消失していたが、驚くべきことに LY6K-KO 精子では ADAM3 が存在していた (図3)。

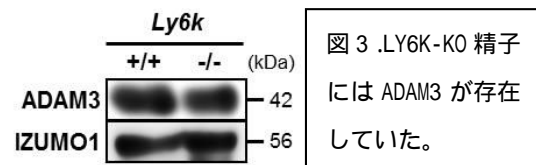


図3 .LY6K-KO 精子には ADAM3 が存在していた。

これまで 10 遺伝子以上の KO マウスにおいて、ADAM3 の消失が雄性不妊の原因と考えられてきたことから、ADAM3 が精子受精能の最重要因子と考えられてきた。しかし、LY6K-KO マウスの結果は、ADAM3 以外の精子受精能を司る因子の存在を示唆する結果となった。

(3) LY6K/TEX101 タンパク質複合体と ACE-GPIase 活性との関連

KO マウス解析より、LY6K/TEX101 タンパク質複合体は、精子受精能において必須であり、どちらが欠けても KO マウスは雄性不妊を示すことが分かった。次に、これまでの報告から、ACE-GPIase 活性によって GPI アンカータンパク質が切断され精子上から無くなることで精子は受精能を持つと考えられていたが、肝心の ACE のターゲットとなる GPI アンカータンパク質は見つかっていなかった。そこで、ACE-KO マウスを用いて、KO 精子における TEX101, LY6K の局在を調べた。TEX101, LY6K はどちらも精巣でのみ存在し、精巣上体精子には存在しないにも関わらず、ACE-KO 精巣上体精子上に TEX101, LY6K のどちらも存在することが明らかになった(図 4)。つまり、LY6K/TEX101 複合体は精巣内で ACE-GPIase 活性によって、精巣精子上から切断・消失することが示唆された。

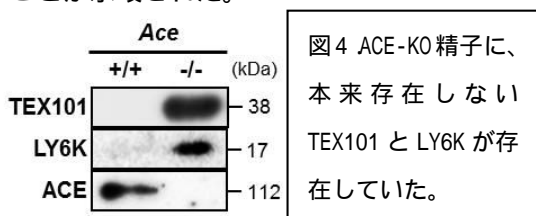


図 4 ACE-KO 精子に、本来存在しない TEX101 と LY6K が存在していた。

(4) TEX101-KO, LY6K-KO マウスを用いた新規受精関連因子の探索

LY6K-KO マウスの解析から、精子受精能を制御する因子が ADAM3 以外にも存在することが明らかになったことから、野生型と LY6K-KO マウス精子タンパク質を iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) 法により網羅的発現・比較定量解析を行った。その結果、LY6K-KO 精子で発現が有意に減少しているタンパク質を新たに見つけることができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 16 件)

Itou D, Shiromoto Y, Shin-Ya Y, Ishii C, Nishimura T, Ogonuki N, Ogura A, Hasuwa H, Fujihara Y, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T. Induction of DNA methylation by artificial piRNA production in male germ cells. *Curr Biol*. 査読有、25、2015、901-906.

doi:10.1016/j.cub.2015.01.060.

藤原 祥高、伊川 正人、マウス個体でのゲノム編集(2) 簡便かつ迅速な遺伝子改変マウス作製法について、*医学のあゆみ*、査読無、252、2015、165-169.

Fujihara Y, Ikawa M.

CRISPR/Cas9-based genome editing in mice by single plasmid injection. *Methods Enzymol*. 査読有、546、2014、319-336.

doi:10.1016/B978-0-12-801185-0.00015-5.

Soma M, Fujihara Y, Okabe M, Ishino F, Kobayashi S. Ftx is dispensable for imprinted X-chromosome inactivation in preimplantation mouse embryos. *Sci Rep*. 査読有、4、2014、5181.

doi:10.1038/srep05181.

藤原 祥高、伊川 正人、マウスのゲノム編集がもたらす可能性、*実験医学*、査読無、32、2014、1709-1714.

Fujihara Y, Okabe M, Ikawa M.

GPI-anchored protein complex, LY6K/TEX101, is required for sperm migration into the oviduct and male fertility in mice. *Biol Reprod*. 査読有、90、2014、60.

doi:10.1095/biolreprod.113.112888.

Mashiko D, Young SA, Muto M, Kato H, Nozawa K, Ogawa M, Noda T, Kim YJ, Satouh Y, Fujihara Y, Ikawa M.

Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas9 plasmid into zygotes. *Dev Growth Differ*. 査読有、56、2014、122-129.

doi:10.1111/dgd.12113.

Morioka Y, Fujihara Y, Okabe M.

Generation of precise point mutation mice by footprintless genome modification. *Genesis*. 査読有、52、2014、68-77. doi:10.1002/dvg.22727.

藤原 祥高、伊川 正人、マウスにおける CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子改変、*実験医学別冊最強のステップ UP シリーズ* 今すぐ始めるゲノム編集、査読無、40、2014、95-107.

藤原 祥高、伊川 正人、精子と透明帯の相互作用、*細胞工学*、査読無、33、2014、380-385.

Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M.

Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep*. 査読有、3、2013、3355. doi:10.1038/srep03355.

Kobayashi S, Totoki Y, Soma M, Matsumoto K, Fujihara Y, Toyoda A, Sakaki Y, Okabe M, Ishino F.

Identification of an imprinted gene cluster in the X-inactivation center. *PLoS One*. 査読有、8、2013、e71222.

doi:10.1371/journal.pone.0071222.

Fujihara Y, Tokuhiro K, Muro Y, Kondoh G, Araki Y, Ikawa M, Okabe M.

Expression of TEX101, regulated by ACE, is essential for the production of fertile mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有、110、2013、8111-8116.

doi:10.1073/pnas.1222166110.

Fujihara Y, Kaseda K, Inoue N, Ikawa M, Okabe M. Production of mouse pups from germline transmission-failed knockout chimeras. *Transgenic Res*. 査読有、22、2013、195-200.

doi:10.1007/s11248-012-9635-x.

Fujihara Y, Satouh Y, Inoue N, Isotani A, Ikawa M, Okabe M. SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia.

Development. 査読有、139、2012、3583-3589. doi:10.1242/dev.081778.

Yamaguchi R, Fujihara Y, Ikawa M, Okabe M. Mice expressing aberrant sperm-specific protein PMIS2 produce normal-looking but

fertilization-incompetent

spermatozoa. *Mol Biol Cell*. 査読有、23、2012、2671-2679.

doi:10.1091/mbc.E11-12-1025.

[学会発表](計14件)

藤原 祥高、CRISPR/Cas システムを使った遺伝子改変マウス作製法の開発、第2回阪大微研 x 慶応先端生命研合同研究会、2015年3月5日、大阪大学微生物病研究所

藤原 祥高、CRISPR/Cas システムを使った遺伝子改変マウス作製、日本実験動物技術者協会関西支部秋季大会(招待講演)、2014年11月29日、サテライトキャンパスひろしま

藤原 祥高、増子大輔、西岡佐紀、江崎陽子、伊川正人、CRISPR/Cas9 環状プラスミドの前核注入による変異マウス作製、第61回日本実験動物学会総会、2014年5月15日、札幌コンベンションセンター

藤原 祥高、雄性生殖細胞特異的な発現を示す GPI アンカータンパク質の精子受精能における役割、第45回精子研究会・神戸大学研究重点チーム学術講演会、2014年1月11日、神戸大学総合研究拠点コンベンションホール

Yoshitaka Fujihara, Germ cell-specific GPI-anchored proteins are required for sperm fertilizing ability in mice. 第36回日本分子生物学会年会、2013年12月5日、神戸ポートアイランド

藤原 祥高、CRISPR/Cas システムを用いたマウスゲノム編集、第3回ゲノム編集研究会、2013年10月26日、広島大学理学部

Yoshitaka Fujihara, SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia. 第8回研究所ネットワーク国際シンポジウム、2013年6月27日、京大医学部紫蘭会館

藤原 祥高、ノックアウトマウス作製の効率化を目指した C57BL/6 由来 ES 細胞の樹立とその応用、第60回日本実験動物学会総会、2013年5月15~17日、つくば国際会議場

藤原 祥高、ノックアウトマウス作製の効率化を目指した C57/BL6 由来 ES 細胞の樹立とその応用、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月14日、福岡国際会議場

藤原 祥高、TEX101, testis specific GPI-anchored protein, is required for sperm fertility in mouse. 第2回新学術領域アロ認証国際シンポジウム、2012年11月14日、ホテル名古屋ガーデンパレス

藤原 祥高、精巣内生殖細胞特異的な発現を示す Tex101 欠損マウスの機能解析、第105回日本繁殖生物学会大会、2012年9月6日、筑波大学大会会館

藤原 祥高、TEX101, testis specific GPI-anchored protein, is required for sperm fertility in mice. 特定領域生殖サイクル若手勉強会 2012、2012年7月27日、秋保リゾートホテルクレセント

藤原 祥高、マウス精子頭部に局在する SPESP1 欠損マウスの作製と機能解析、第31回日本アンドロロジー学会学術大会、2012年6月29日、神戸ポートピアホテル

藤原 祥高、精巣内生殖細胞特異的な発現を示す Tex101 欠損マウスの機能解析、第59回日本実験動物学会総会、2012年5月26日、別府国際コンベンションセンター

[その他]

大阪大学研究者総覧

<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&u=6639>

研究室ホームページ

http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/information/yoshitaka_fujihara.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 祥高 (FUJIHARA, Yoshitaka)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：70578848

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：