

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450465

研究課題名(和文) 精巣特異的ホメオドメインタンパク質による遺伝子発現制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanism of gene expression regulation by testis-specific homeodomain protein

研究代表者

浅野 淳 (ASANO, Atsushi)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授

研究者番号：90312404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：精子形成における転写調節因子による転写調節機構を明らかにするため、精巣特異的に発現することが推定されたホメオドメインタンパク質Nkx2-6の発現と機能について解析を行った。その結果、マウスではNkx2-6は精巣で最も高発現が見られ、特に精子細胞で発現している事が示唆された。また、Prm1およびAkap3遺伝子はNkx2-6によって転写調節される可能性が示唆された。本研究により、Nkx2-6による雄性生殖細胞の分化に伴う遺伝子発現の調節機構の一端が明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of transcription factors in the control of gene expression in spermatogenesis, we analyzed expression and function of a homeodomain protein, Nkx2-6, that was estimated to be a testis-specific expressed protein. We found that Nkx2-6 was mainly expressed in testis, and that spermatids highly expressed this protein. In addition, we found that Nkx2-6 had potential as a gene-expression regulator of testis-specific genes, Prm1 and Akap3. In this study, we show part of the function of Nkx2-6 in regulation gene expression associated with spermatogenesis.

研究分野：実験動物学

キーワード：精子形成 ホメオドメインタンパク質 転写調節

1. 研究開始当初の背景

(1) 有性生殖を行うことは、動物の種の繁栄に必須の生命現象である。精巣に分布する雄性生殖細胞では、数多くの遺伝子が時期特異的に発現する。その結果、体細胞分裂・減数分裂・形態変化という複雑な過程が順序立てて行われ、雄性配偶子である精子が産生される。

(2) 遺伝子発現の制御は、転写因子タンパク質が特定の DNA 配列に結合して転写調節を行うことによって行われる。これまで、数多くの転写因子が雄性生殖細胞において発現していることが報告されている (Hermo, L. et al., *Microsc. Res. Techniq.* 2010)。しかし、これらの転写因子の多くは転写制御を行う標的の遺伝子が未だ同定されておらず、雄性生殖細胞の分化・増殖に関わる種々の転写因子の役割は不明な点が数多く残されている。

2. 研究の目的

(1) 我々はこれまでに、精子形成における遺伝子の発現調節機構を明らかにするために、精子細胞の分化に関与する転写因子の候補を、データベース探索を中心に行った。その結果、ホメオドメインタンパク質遺伝子 *Nkx2-4* および *Nkx2-6* が円形精子細胞において強く発現していることが推定された。

(2) *Nkx2-4* と *Nkx2-6* は、発現部位が一致している雄性生殖細胞において代償的に転写調節を行うことで、精子形成に寄与していると考えられる。そこで本研究では、*Nkx2-4* と *Nkx2-6* による雄性生殖細胞の遺伝子発現制御機構を解明するために、精巣における *Nkx2-4* と *Nkx2-6* の発現細胞の同定と比較を行う。さらに、*Nkx2-4* と *Nkx2-6* によって転写調節される標的遺伝子の同定を行う。

3. 研究の方法

(1) 精巣における *Nkx2-4/2-6* の発現細胞の同定と比較を行う。RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法を用いて、マウスの各組織の *Nkx2-4* と *Nkx2-6* の mRNA レベルを測定し、*Nkx2-4/2-6* の精巣における発現を実証する。免疫組織化学および *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、精巣に含まれる生殖細胞 (精原細胞・精母細胞・精子細胞) のうち、どの細胞に *Nkx2-4/2-6* が発現しているのか解析する。*Nkx2-6* 発現部位と *Nkx2-4* 発現部位が一致しているかどうか比較する。

(2) *Nkx2-4/2-6* によって転写制御される遺伝子の予測を行う。ホメオボックスタンパク質の結合 DNA 配列の網羅的解析 (Berger, M. F. et al., *Cell* 2008) によって明らかにされた *Nkx2-4/2-6* の DNA 結合モチーフ配列情報を基に、マウス全ゲノム配列より *Nkx2-4/2-6* 結合配列を近傍に有する遺伝子群を検索する。検索には転写調節配列解析ツール RSAT

(Regulatory Sequence Analysis Tools, Thomas-Chollier, M. et al., *Nucleic Acids Res.* 2011) など、各種データベースを用いる。発現プロファイルデータベース Gene Expression Omnibus (GEO) など遺伝子発現解析データベースを基に、精巣において *Nkx2-4/2-6* と共発現する遺伝子群を検索する。例えば、*Nkx2-6* がみられる精子細胞が形成される時期以降に精巣で発現がみられる遺伝子群を検索する。これらの遺伝子群の集合和を、雄性生殖細胞において *Nkx2-4/2-6* によって転写制御される可能性を有する候補遺伝子とする。

(3) *Nkx2-4/2-6* によって転写制御される遺伝子の特定を行う。候補遺伝子について、*Nkx2-4/2-6* 発現細胞の同定と同様の手法を用いることにより、精巣における発現細胞を特定する。雄性生殖細胞にて *Nkx2-4/2-6* と共発現することが確認された候補遺伝子について、マウス雄性生殖細胞株 (GC-1 spg)、転写調節領域および *Nkx2-4/2-6* 発現プラスミドを用いたレポータージーンアッセイを行い、*Nkx2-4/2-6* 依存性転写調節の有無を検討する。*in vivo* で *Nkx2-4/2-6* が上記候補遺伝子の転写調節領域に結合していることを確認するため、マウス精巣ゲノム DNA を用いてクロマチン免疫沈降法 (ChIP) を行い、回収された DNA 断片を鋳型として PCR 法を用いて上記候補遺伝子の一部が増幅されるかどうか解析する。

4. 研究成果

(1) マウス組織における *Nkx2-4/2-6* の発現
① マウス組織における *Nkx2-4/2-6* の発現を検討するため、8 週齢のマウスの臓器から RNA を精製し、RT-PCR 法を用いて *Nkx2-4* および *Nkx2-6* mRNA の検出を行った。その結果、*Nkx2-6* mRNA は数多くの組織で検出されたものの、精巣で最も強い発現が観察された。一方、*Nkx2-4* mRNA は精巣を含む各組織の発現レベルが低く、検出が困難であった。さらに、mRNA 発現レベルを定量化するために、リアルタイム RT-PCR 法を用いた解析を行った。精巣の *Nkx2-6* mRNA レベルは、他の組織に比約 100-1000 倍高いことがわかった (図 1)。

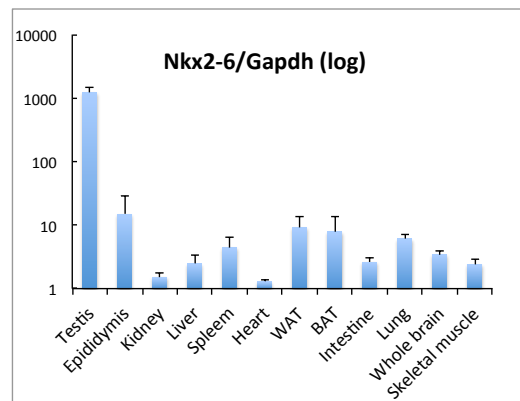


図 1 マウス組織の *Nkx2-6* mRNA レベル

②精巣における Nkx2-6 タンパク質の発現部位を解析するため、市販の抗 Nkx2-6 抗体を利用した成熟マウス精巣切片の免疫組織化学を行った。その結果、Nkx2-6 タンパク質はおもに後期円形精子細胞、伸長精子細胞 (矢印)、および間質細胞 (アスタリスク) に発現し、精原細胞・精母細胞 (矢頭) にも弱い発現が見られることがわかった (図 2)。

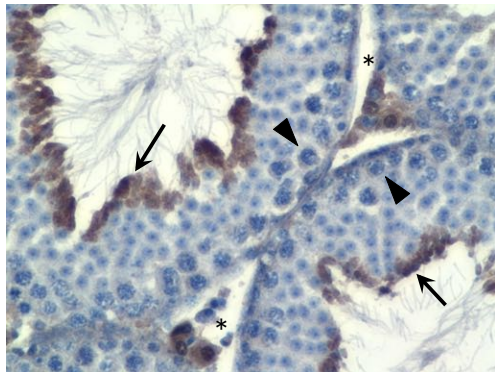


図2 マウス精巣における Nkx2-6 タンパク質の発現部位

(2) Nkx2-6 によって転写制御される遺伝子の予測

発現細胞の解析から、Nkx2-6 は分化した雄性生殖細胞の遺伝子発現を調節していると考えられた。そこで、データベースを利用し、A 型及び B 型精原細胞と比較して、より分化したパキテン期精母細胞で発現が増加 (3 倍以上の増加) していた遺伝子と、上流域 1000 bp 以内に Nkx2-6 が認識し結合すると予測された遺伝子の集合和を求め、精巣において Nkx2-6 によって転写制御される遺伝子の候補とした (図 3)。その結果、*Prm1*, *Akap3* など 94 遺伝子を候補遺伝子とした。

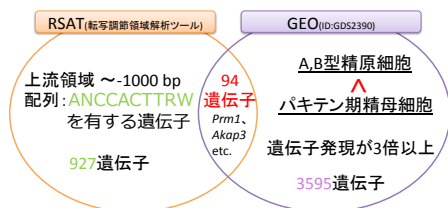
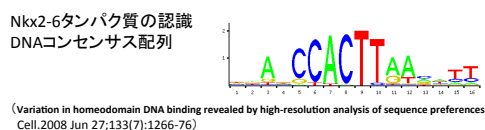


図3 精巣において Nkx2-6 によって転写制御されると予想される遺伝子の検索

(3) Nkx2-6 による遺伝子発現制御機構の解析

① Nkx2-6 には 3 つの保存された機能ドメイン (TN ドメイン [TN]、ホメオボックス [Hox]、NK-2 specific ドメイン [SD]) があり、遺伝子転写制御に関与すると考えられているが、現在までその構造と転写制御機能との関連性は報告されておらず、また Nkx2-6 によ

て転写が制御されている遺伝子の報告もなかった。そこでまず、Nkx2-6 の各ドメインの欠損変異体と GFP タンパク質の融合タンパク質を発現するためのプラスミドベクターを作製し、293T 細胞に導入して発現させ、細胞内での局在を調べた。その結果、Hox ドメインの欠損体のみが核外で発現した (図 4)。

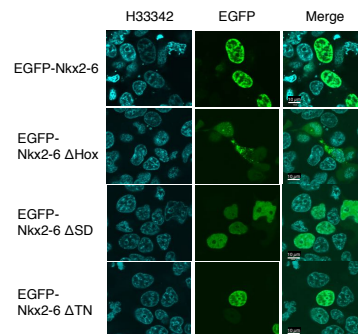


図4 Nkx2-6 変異体の細胞内局在

② マウス *Prm1* および *Akap3* 遺伝子上流域 (-300~-400 塩基) の DNA 断片をルシフェラーゼアッセイ用プラスミド pGL3-Basic に挿入した。さらに、各上流域に含まれる Nkx2-6 予想結合配列を変異させた DNA 断片もそれぞれ pGL3-Basic に挿入した (図 5 A)。これらのプラスミドを Nkx2-6 発現プラスミドと共に GC-1 spg 細胞に導入した後、細胞溶解液を用いてルシフェラーゼ活性を測定した (図 5 B)。その結果、変異型上流域を有するルシフェラーゼアッセイ用プラスミドと Nkx2-6 発現プラスミドを共に導入した細胞は、ルシフェラーゼアッセイ用プラスミドのみ導入した細胞や Nkx2-6 発現プラスミドのみ導入した細胞とほぼ同程度のルシフェラーゼ活性しか示さなかったが、野生型上流域を有するルシフェラーゼアッセイ用プラスミドと Nkx2-6 発現プラスミドを共に導入した細胞は約 2~5 倍のルシフェラーゼ活性の誘導が見られた。

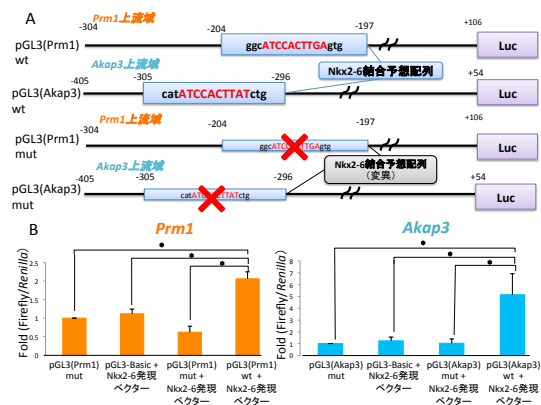


図5 *Prm1* および *Akap3* 遺伝子上流域に対する Nkx2-6 の転写調節機構の解析

③ Nkx2-6 の各ドメインの欠損変異タンパク質発現プラスミドと、*Prm1* もしくは *Akap3* 野

生型上流域を有するルシフェラーゼアッセイ用プラスミドを GC-1 spg 細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った (図 6)。Nkx2-6 の各ドメイン欠失変異タンパク質発現ベクターと、*Prm1* もしくは *Akap3* 野生型上流域を有するルシフェラーゼアッセイ用プラスミドを共導入してもルシフェラーゼ活性の誘導は見られなかった。①～③の結果から、Nkx2-6 は *Prm1* および *Akap3* 遺伝子の転写を誘導することが示唆された。さらに、Hox ドメインは核内移行に重要な役割を果たすことが示唆された。TN ドメインおよび SD ドメインは Nkx2-6 タンパク質の核内移行には寄与しないものの、遺伝子の転写活性化に何らかの役割を有することが示唆された。本研究により、精巣特異的に発現するホメオドメインタンパク質 Nkx2-6 の遺伝子発現制御に関する役割の一旦を明らかにすることが出来た。さらに、Nkx2-6 タンパク質の構造上の特徴と、遺伝子転写調節機能との関連性についても明らかにすることが出来た。

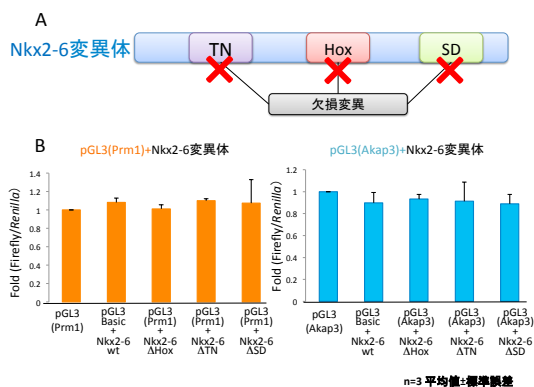


図 6 *Prm1* および *Akap3* 遺伝子上流域に対する Nkx2-6 変異体の転写調節機構の解析

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

① 小山崇裕、中村有孝、保坂善真、竹内崇師、浅野淳、山野好章：マウス精巣における Nkx2-6 の発現と転写調節機能の解析、第 158 回日本獣医学会 (十和田)、2015.9

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 淳 (ASANO, Atsushi)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授

研究者番号：90312404

(2) 研究分担者

山野 好章 (YAMANO, Yoshiaki)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：00182593

竹内 崇師 (TAKEUCHI, Takashi)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：10325061

(3) 連携研究者

()

研究者番号：