

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19580350
 研究課題名（和文）微小管結合蛋白質 Spag5 の機能解析と精巢形成不全症の遺伝子導入による救済実験
 研究課題名（英文）The functional analysis of microtubule-associated protein, Spag5, and the rescue experiment of hypogonadic phenotype by gene transfer of wild type Spag5 cDNA.
 研究代表者
 鈴木 浩悦（SUZUKI HIROETSU）
 日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授
 研究者番号：50277662

研究成果の概要（和文）：微小管結合蛋白質 Spag5 は細胞分裂中期の進行において必要であると信じられているが、そのノックアウトマウスは正常であったと報告されている。Spag5 の生体内での機能を明らかにするために、精巢のセルトリ細胞の増殖が障害され不妊となる Spag5 突然変異ラット（hgn/hgn）に、Spag5 cDNA-トランスジェニックラットを交配することで、Spag5 cDNA を導入した。これにより生殖能は改善し、Spag5 が精巢の発達に必須であることが示された。

研究成果の概要（英文）：Microtubule-associated protein Spag5 is believed to be required for the progression of mitotic metaphase. However, it has been reported that Spag5-knockout mice had normal phenotype. To reveal in vivo-function of Spag5, we made Spag5-transgenic rats, and mated them to the rats from hypogonadic (hgn) strain. The hgn/hgn phenotype is associated with spontaneous mutation of Spag5. Male hgn/hgn is infertile, and abnormal mitosis is found in Sertoli cells of their testes. The hgn/hgn males with Spag5 transgene showed normal testis and fertility. Therefore, Spag5 is required for normal testicular development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生理学、遺伝学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：遺伝、不妊、精巢、細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

精巢形成不全症（hgn/hgn）ラットは精巢形成不全による不妊と腎臓の低形成症によ

る進行性の腎不全を呈する自然発症の突然変異体で、日本獣医生命科学大学獣医生理学教室で発見および系統化された。病態解析により、精巢の異常は胎生期から

生後初期のセルトリ細胞の増殖異常により精細管の伸長が重篤に障害され、セルトリ細胞による支持を失った生殖細胞の多くが減数分裂開始以前に死滅することが明らかとなった。腎臓の異常に関しては、胎生期から生後初期のネフロン形成が障害され、正常の約 20%のネフロンしか形成されないために、生後糸球体の高濾過や肥大を呈し、糸球体硬化から進行性の慢性腎不全に至ることが明らかとなった。また、雌においては卵母細胞が少ないために、早期に不妊となることが明らかとなっている。

遺伝解析では、リンケージ解析により原因遺伝子を第 10 染色体の領域に位置づけ、候補遺伝子解析により、Spag5 遺伝子の第 6 エクソンにおいて 25 塩基の挿入変異を同定した。この変異は理論的には、フレームシフト変異を引き起こし、終止コドンが挿入されるため、Spag5 蛋白質の微小管に局在するために必要な部分を欠損することが判明した。

一方、人培養細胞で研究を進めていた研究グループは astrin が体細胞分裂の中期において正常な染色体の分配に必須であることを示しており、後に、astrin が Spag5 と相同であることが判明した。Spag5 は最初ラットの精巣で見出され、精子形成における Spag5 の機能を証明しようとしたグループによって、Spag5 のノックアウトマウスが作製された。しかし、同グループの報告によれば、ノックアウトマウスの生殖性は全く正常であり、その他の臓器の異常も見出されなかったということである。

これらの Spag5 に関する研究では、培養系と in vivo のデータに矛盾を生じており、我々のデータとノックアウトマウスのデータも矛盾を生じている。最近になって、ノックアウトマウスの報告をした研究グループは、Spag5 には多数のバリエーションが存在し、彼らのノックアウトマウスでは Spag5 の全ての機能を欠損できていない可能性があると推論している。

2. 研究の目的

現状で Spag5/astrin 遺伝子に異常を有する動物は、我々の hgn/hgn ラット以外に報告されていない。Spag5/astrin に関する現状の矛盾を打破するには、hgn/hgn ラットを利用することが有効である。まず、hgn/hgn の精巣や腎臓の病理発生と Spag5 の時空間的な発現分布を関連させることで、Spag5 の生理機能を考察できる可能性がある。さらに、hgn/hgn ラットに Spag5 cDNA を導入して表現型が救済されることを確認すれば、Spag5 遺伝子の in vivo の機能に関して、hgn/hgn で異常の見られる臓器の発生における役割を立証できる可能性がある。

3. 研究の方法

胎生期の特に関心する精巣の病理発生を調査し、さらに正常ラットで Spag5 蛋白質の組織分布を調査する。さらに、野生型ラットの精巣から Spag5 の cDNA を単離し、CAG ベクターにつないで、全身臓器で強制発現するようにコンストラクトを作製する。簡易的な試験で導入遺伝子が細胞で発現することを確認した後、正常のウィスターラットの受精卵に遺伝子導入し、トランスジェニック (Tg) ラットを作製する。導入遺伝子を有する個体を選抜し、HGN 系統のラットと交配する。hgn/hgn の雌は繁殖性を有するので、雄の Tg ラットは同雌に、雌の Tg ラットは雄の +hgn と交配し、数世代を経て、hgn/hgn の状態で導入の cDNA Spag5 を有するラットを作製し、その表現型、特に生殖性の解析や精巣と腎臓の組織学的検索を行う。

4. 研究成果

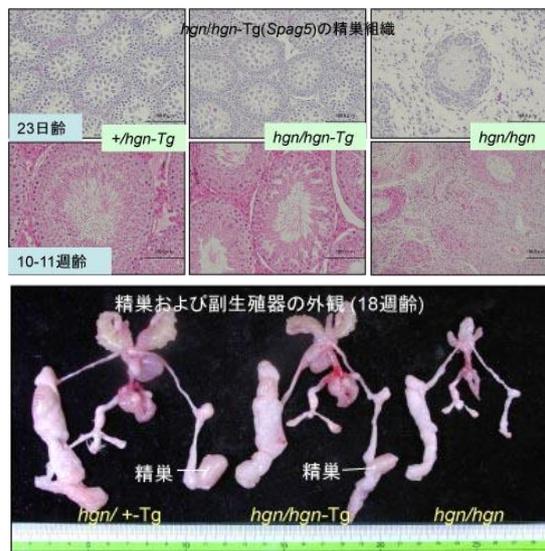
Spag5 に対する市販の抗体や新たに作製した抗体により、免疫ブロットや免疫染色を行った。同分子には多数のバリエーションが存在することが判明し、免疫染色において、特異的に Spag5 を局在化する抗体が見出せず、臓器および細胞での分布を明らかにすることができなかった。

一方、救済実験では、野生型 Spag5 cDNA を導入した hgn/hgn-Tg ラットにおいて、その表現型が救済された。腎臓の重量およびネフロン数はほぼ正常と同等にまで回復し、組織学的検索でも異常を示さなかった。

精巣形成不全に関しては、hgn/hgn の精巣の重量が正常の約 1%であるのに対して、hgn/hgn-Tg では正常の約 30%の重量まで回復した。生後初期の最初の精子形成が遅延し、成熟では精細管断面積が正常より小さい傾向があったが、正常な精子形成が見られ、精巣上体にも形態学的に正常な精子が確認された。hgn/hgn-Tg では副生殖器の重量も回復していた (次頁の図を参照)。雌との交配では、正常な交尾行動を示し、交配後膈垢に精子が見られた。交配のための同居回数に対する交尾の成功率や妊娠率は正常と同等であった。交尾後雌は正常に分娩し、産子数も正常であった。

以上のことから、hgn/hgn の主要な表現型である腎臓の低形成と雄性不妊は Spag5 cDNA の導入により救済された。精巣の重量が正常より小さいことは、Spag5 にバリエーションがあり、hgn/hgn で欠損している全ての蛋白を救済できていない可能性があること、並びにベクターの特性や導入された染色体領域の影響で、発現細胞や発現時期が制御され

ていないことに起因するのかもしれない。現在、この原因を明らかにするために、*hgn/hgn* で導入の *Spag5* cDNA 遺伝子を保有するラットの系統化に着手している。



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 10 件)

- ① 鈴木浩悦、日獣大オリジナルの自然発症性突然変異ラットを用いた病態モデルの開発と遺伝子機能の解析、日本獣医生命科学大学研究報告 (査読有)、第 58 号、2009、pp.78-86.
- ② Katayama K, Miyamoto S, Furuno A, Akiyama K, Takahashi S, Suzuki H, Tsuji T, Kunieda T. Characterization of the chromosomal inversion associated with the Koa mutation in the mouse revealed the cause of skeletal abnormalities. BMC genetics (査読有) 10, 2009, 60.
- ③ Suzuki H, Katayama K, Motoo T, Amakasu K, Saito K, Suzuki K. A spontaneous mutation of the *Wwox* gene and audiogenic seizure in rats with lethal dwarfism and epilepsy. Genes, Brain and Behavior (査読有) 8(7), 2009, pp.650-660.
- ④ Amakasu K, Suzuki K, Suzuki H. The Unilateral Urogenital Anomalies (UUA) rat: a new mutant strain associated with unilateral renal agenesis, cryptorchidism, and malformations of reproductive organs restricted in the left side. Comparative Medicine (査読有) 59 (3), 2009, pp.249-256.
- ⑤ Takanosu M, Takanosu T, Suzuki H,

Suzuki K. Incomplete dominant osteochondrodysplasia in heterozygous Scottish Fold cats. Journal of Small Animal Practice (査読有) 49 (4), 2008, pp.197-199

- ⑥ Chiba J, Suzuki K, Suzuki H. The petit rat (*pet/pet*), a new semilethal mutant dwarf rat with thymic and testicular anomalies. Comparative Medicine (査読有) 58 (6), 2008, pp.1-9.
- ⑦ Takenaka M, Yagi M, Suzuki K, and Suzuki H. Retarded differentiation of Leydig cells and increased apoptosis of germ cells in the initial round of spermatogenesis of rats with lethal dwarf and epilepsy (*Ide/Ide*). Journal of Andrology (査読有), 29, 2008, pp.669-678.
- ⑧ Yagi M, Takenaka M, Suzuki K, Suzuki H. Reduced Mitotic Activity and Increased Apoptosis of Fetal Sertoli Cells in Rat Hypogonadic (*hgn/hgn*) Testes. Journal of Reproduction and Development (査読有) 53(3), 2007, pp.581-589.
- ⑨ Suzuki H, Takenaka M, Suzuki K. Phenotypic characterization of spontaneously mutated rats showing lethal dwarfism and epilepsy. Comparative Medicine (査読有) 57, 2007, pp.360-369.
- ⑩ Suzuki H, Yagi M, Suzuki K. Embryonic pathogenesis of hypogonadism and renal hypoplasia in *hgn/hgn* rats characterized by male sterility, reduced female fertility, and progressive renal insufficiency. Congenital Anomalies (査読有) 47 (1), 2007, pp.34-44

[学会発表] (計 14 件)

- ① 片山健太郎、精巣形成不全および腎低形成を呈する HGN ラットの *Spag5* cDNA 導入 (*Spag5* トランスジェニックラット) による救済実験、第 149 回日本獣医学会学術集会、2010 年 3 月 26 日、日本獣医生命科学大学
- ② 中井里香、てんかん発作を伴う矮小ラット (*Ide/Ide*) のウエスタンブロット解析と脳病変異関する組織学的観察、第 149 回日本獣医学会学術集会、2010 年 3 月 26 日、日本獣医生命科学大学
- ③ 茂木巡太郎、両側性腎低形成症ラット (*hgn/hgn*) の変則的出による影響の評価、第 149 回日本獣医学会学術集会、2010 年 3 月 26 日、日本獣医生命科学大学
- ④ 片山健太郎、骨軟骨形成不全症 (OCD) ラットはゴルジ体蛋白 Giantin をコードす

る Golgb1 遺伝子に挿入突然変異を持つ、
日本動物遺伝育種学会第 10 回記念大会、
2009 年 11 月 9 日、群馬会館

- ⑤ 後藤匠、骨軟骨形成不全症 (OCD) ラットの胎生期における大腿骨の病理解析、第 148 回日本獣医学会学術集会、2009 年 9 月 25 日、鳥取市民会館
- ⑥ 稲垣将治、精巣形成不全および両側性腎低形成症を呈するラット (hgn/hgn) の骨形態計測の所見、第 147 回日本獣医学会学術集会、2009 年 4 月 4 日 栃木県総合文化センター
- ⑦ 鈴木浩悦、てんかん発作を伴う矮小ラット (lde/lde) の原因遺伝子は WWOX である、第 147 回日本獣医学会学術集会、2009 年 4 月 4 日 栃木県総合文化センター
- ⑧ 片山健太等、骨軟骨形成不全症 (OCD) ラットの Golgb1 遺伝子における 10bp の挿入突然変異の同定
- ⑨ 鈴木浩悦、てんかんを伴う致死性の矮小ラットにおける精巣病態と遺伝解析、日本アンドロロジー学会第 27 回学術集会、2008 年 7 月 4 日、先斗町歌舞練場
- ⑩ 甘粕晃平、先天性片側精巣下降不全ラットの精巣についての内分泌学的検討、第 146 回日本獣医学会学術集会、2008 年 9 月 24 日、ワールドコンベンショナルサミット (シーガイア)
- ⑪ 甘粕晃平、先天性片側性腎欠損ラットの残存腎における細胞増殖活性の評価、第 145 回日本獣医学会学術集会、2008 年 3 月 30 日、麻布大学
- ⑫ 齊藤賢一、Theodur 経口投与によるマウス脳波の変化、日本てんかん学会第 41 回大会、2007 年 11 月 2 日、福岡国際会議場
- ⑬ 齊藤賢一、電磁波が胎生期マウスの発生に与える影響の研究、第 2 報、日本先天異常学会第 47 回大会、2007 年 7 月 7 日、名古屋国際会議場
- ⑭ 齊藤賢一、てんかんモデル動物 (El マウス) における Valproate 投与による interictal 脳波の変化、日本先天異常学会第 47 回大会、2007 年 7 月 7 日、名古屋国際会議場

[図書] (計 1 件)

林裕造、大野泰雄編集、丸善、食品安全ハンドブック、2009 年、分担：コナゾール、pp.161-162.

[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：

鈴木浩悦 (SUZUKI HIROETSU)
日本獣医生命科学大学・獣医生理学教室・准教授

研究者番号：50277662

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：