

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870006

研究課題名（和文）

ユビキチンリガーゼ β -TrCP の生殖細胞系譜における恒常性維持機構の解明

研究課題名（英文）

The role of β -TrCP in spermatogenesis.

研究代表者

中野 星児 (NAKANO SEIJI)

東北大学・大学院医学系研究科・助手

研究者番号：00529448

研究成果の概要（和文）：

精原細胞特異的 β -TrCP 欠失マウス (Stra8-Cre) では、精巣が縮小し、重量はコントロールマウスの 30%にまで減少しており、形態学的には精巣に空洞化が認められた。一方、セルトリ細胞特異的 β -TrCP 欠失マウス (Amh-Cre) では、精巣の重量や形態にはほとんど影響は認められなかった。この結果は、精子形成過程において β -TrCP はセルトリ細胞ではなく精原細胞において重要な機能を担い、正常な生殖細胞の発生・分化に必要であることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

Spermatogonia-specific β -TrCP knockout mice showed impairment of spermatogenesis. I observed reduction of the weight of testis to less than 30% compared to that of control mice and histopathological abnormality with cavitation. On the other hand, sertoli cells specific knockout mice showed little effect on spermatogenesis. These data suggest that β -TrCP play a critical role during spermatogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：ユビキチンリガーゼ、生殖細胞、ノックアウトマウス、不妊

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質分解は、3種類の酵素群 (E1；ユビキチン活性化酵素、E2；ユビキチン結合酵素、E3；ユビキチンリガーゼ) の働きによりユビキチンが標的タンパク質に多数結合し、この形成されたポリユビキチン鎖がプロテアソームによって特異的に識別され、速やかに分解される過程をいう。このユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質分解の基質

特異性を決定しているのは、E3 ユビキチンリガーゼである。

E3 ユビキチンリガーゼ機能をもつ β -TrCP は研究代表者が所属する研究室で最初に報告された F-box タンパク質で、SCF 複合体を構成し、WD40 ドメインを介して標的タンパク質を認識しユビキチン化する。標的基質としては β -catenin、I κ B α を含む数十に及ぶ分子が報告されており、細胞レベルではシグナル伝達や刺激に対する応答、個体レベルでは発

生や器官形成、概日リズムなどその関与は多岐にわたる。

β -TrCP には 2 種類のホモログ β -TrCP1 と β -TrCP2 があり、そのアミノ酸配列の相同性は約 80% と高く、生化学的な実験結果から機能的な差異は報告されていない。しかし、当研究室ではこれまでに発生工学的手法を用いて β -TrCP1 ノックアウトマウス (β -TrCP1 KO マウス)、 β -TrCP2 ノックアウトマウス (β -TrCP2 KO マウス)、 β -TrCP1 と β -TrCP2 両方を欠失させた β -TrCP ダブルノックアウトマウス (β -TrCP DKO マウス) を作製したところ、 β -TrCP1 KO マウスは正常に生まれ生命予後に異常なくかつ正常に子孫を維持できたが、 β -TrCP2 KO マウスは胎生 8.5 日で胎生致死となった。さらに、 β -TrCP DKO マウスは β -TrCP2 KO マウスよりも表現型がより重篤になり、胎生 7.5 日で胎生致死となった。このノックアウトマウスの表現型は β -TrCP1 と β -TrCP2 の間に生物学的な違いがあることを示唆している。

β -TrCP1 KO マウスの経時的観察から生殖能力の減退が観察されること、 β -TrCP DKO マウス作製過程において β -TrCP1 KO、 β -TrCP2 +/- の雄が不妊を示唆する予備的な実験結果を得ている。また、 β -TrCP の mRNA の発現は精巣で非常に高いことなどから β -TrCP が精子幹細胞維持や精子形成過程に関与していることが示唆される。しかし、 β -TrCP2 KO マウスおよび β -TrCPDKO マウスは胎生致死であり、生殖細胞系列における β -TrCP の機能やその分子メカニズムは明らかにされていない。

2. 研究の目的

生殖細胞系列のどの分化段階で β -TrCP が機能しているかを明らかにするため、生殖細胞系列特異的かつ発生時期特異的に β -TrCP を欠損させることにより生殖細胞の発生・分化・増殖・維持への影響を分子レベル・細胞レベル・さらには個体レベルで解析し、 β -TrCP によるタンパク質分解が生殖細胞の発生や幹細胞維持にどのように関与するかを解析する。

3. 研究の方法

発生工学的手法を用いて作製した β -TrCP2 KO マウス、 β -TrCP1 と β -TrCP2 両方を欠失させた β -TrCP DKO マウスどちらも胎生致死を示したため、このマウスでは初期発生における β -TrCP の機能解析はできるが、生殖細胞系列の実験を行うことが不可能である。これを克服するため、Cre-loxP システムを用いた。loxP と呼ばれる短い配列を標的遺伝子のエクソン領域を含むようゲノムに挿入し、マウスを作製する。このコンディショナルノック

アウトマウスは野生型と同等の発現制御が保たれているが、このマウスに P1 フェージ由来の組換え酵素 Cre リコンビナーゼを発現させることで loxP 配列に挟まれたゲノム領域を Cre リコンビナーゼが発現した細胞のみ除くことができる。つまり、発現させるプロモーターを選択することで時期特異的または細胞や組織特異的に標的遺伝子の欠失を誘導することが可能となる。

β -TrCP2 コンディショナルノックアウトマウス (CKO マウス) ならびに、既に作製済みの β -TrCP1 KO マウスと交配させ β -TrCP1KO・ β -TrCP2 CKO マウス (β -TrCPdCKO) を作製し、これらマウスと 3 種類の生殖細胞特異的 Cre 発現マウスと交配させることで発生時期および異なる生殖細胞系列における影響を評価する。

3 種類の生殖細胞特異的 Cre 発現マウスには (1) 始原生殖細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する TNAP-Cre マウス、(2) 出生後 3 日目から生殖細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Stra8-Cre マウス (3) セルトリ細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Amh-Cre マウスを用いた (図 1)。

図 1. 本研究課題の概略図

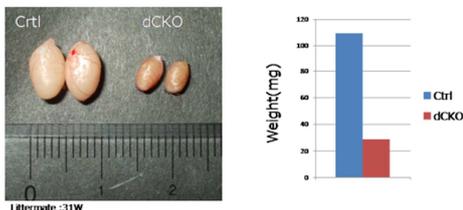


これら 3 種類の Cre リコンビナーゼ発現マウスと β -TrCP1 KO マウス、 β -TrCP2 CKO マウス、 β -TrCP dCKO マウスを用いて、交配による生殖能力評価、精巣の大きさ・重量・精子の運動能といった形態学的観察、組織学的・病理学的解析による精細管の構造解析から異常を示す細胞および時期を特定し、 β -TrCP の標的基質の蓄積を中心に細胞レベル・個体レベルで解析する。

4. 研究成果

β -TrCP1 と β -TrCP2 の発生過程における生物学的な違いを我々はノックアウトマウスで示したが、結晶構造や機能の類似が報告されていることから機能的重複により表現型が現れないことも想定された。そこで、図1で示すように出生後3日目から減数分裂前の精原細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するStra8-Creマウスを用いて生殖細胞で β -TrCP1 と β -TrCP2 両方を欠失した β -TrCP dCKO マウスを作製し解析を行ったところ、図2の写真に示すように雄マウスの精巣の大きさが非常に小さくなっており、その重量を測定してみるとコントロールの30%程度にまで減少していた(図2)。

図2. Stra8-Creマウスの精巣



また、パラフィン切片を作製し、HE染色による形態学的解析を行ったところ、図3に示すように本来精子形成が行われている領域が空洞化していた(図3)。

図3. HE染色

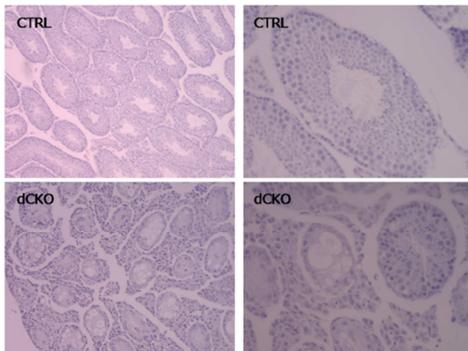
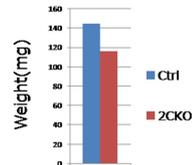


図3の右下の写真からわかるように、一部には正常の形態を示す精巣もあるが、これはCre-recombinaseの発現が不十分であり β -TrCP遺伝子の欠失を誘導できていないことによると推察された。出生後3日目以降の精原細胞の正常な精子形成には β -TrCPが関与していることが示唆された。

生殖細胞が正常に分化・生存するには精細管内にあるセルトリ細胞とのクロストークが重要であることが知られている。次に、セルトリ細胞特異的にCreを発現するAMH-Creマウスと交配し(図1)、セルトリ細胞特異的 β -TrCP2KOマウスを作製した。このマウスで

はセルトリ細胞が生殖細胞を支持することができない結果、不妊や精子幹細胞維持に異常をきたしていると推測したが、図4に示すように重量は野生型と比較して若干減少傾向にはあるものの、顕著な変化は観察されなかった。また、パラフィン切片を作製し、HE染色による形態学的解析を行ったが、重量同様野生型と比較して大きな異常は観察されなかった。

図4. Amh-Creマウスの精巣



これまでの結果からユビキチンリガーゼ β -TrCPがセルトリ細胞ではなく精原細胞において精子分化に重要な機能を担っており、精原細胞から精子への分化過程において β -TrCPによる標的基質の分解が正常な生殖細胞の発生に必要であることが示唆された。

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)

1. Kunimoto Y, Nakano S, Kataoka H, Shimada Y, Oshimura M, Kitano H.; Deleted in Esophageal Cancer 1 (DEC1) is down regulated and contributes to migration in HNSCC cell lines. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 73:17-23. 2010 (査読有)

[学会発表] (計5件)

1. Seiji Nakano, Yousuke Sasaki, Hozumi Motohashi, Keiko Nakayama.; Geminin deletion in hematopoietic stem cells promotes differentiation of megakaryocytes and platelets. Winter Camp of GCOE 2011, 2011年2月5日~2011年2月6日、仙台
2. 中野星児、佐々木陽丞、本橋ほづみ、中山啓子 Geminin deletion in hematopoietic stem cells promotes differentiation of megakaryocytes and platelets. 第33回日本分子生物学会年会、2010年12月7日~2010年12月10日、神戸
3. 中野星児、山田秀俊、村井寛子、佐竹正延、中山啓子 Defect of T-cell differentiation and proliferation in Geminin gene-deleted mouse. 第32回日

本分子生物学会年会、2009年12月9日
～2009年12月12日、横浜

4. 池田信人、森川久未、中野星児、久留一
郎、白吉安昭 Chromobox homologue 3 is
a essential modulator of endodermal
and mesodermal differentiation in F9
cells. 第32回日本分子生物学会年会、
2009年12月9日～2009年12月12日、
横浜
5. Seiji Nakano, Hidetoshi Yamada, Hiroko
Murai, Masanobu Satake, Keiko
Nakayama.; Defect of T-cell
differentiation and proliferation in
Geminin gene-deleted mouse. 東北大学
グローバル COE NetworkMedicine 創生拠
点国際シンポジウム、2009年12月7日
～2009年12月8日、仙台

[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

東北大学医学系研究科細胞増殖制御分野
<http://www.devgen.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 星児 (NAKANO SEIJI)

東北大学・大学院医学系研究科・助手

研究者番号: 00529448

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号: