

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22880002

研究課題名（和文）Exo1 の精子形成過程におけるアポトーシス制御機構の解明

研究課題名（英文）Role of Exo1 in germ cell apoptosis during spermatogenesis

研究代表

並木 由佳（NAMIKI YUKA）

北海道大学・大学院獣医学研究科・特任助教

研究者番号：20590417

研究成果の概要（和文）：MRL/MpJ マウス精巣は減数分裂中期特異的にアポトーシスを引き起こす（msa）。以前の研究において、msa は第一染色体 81.9cM に位置する Exo1 遺伝子の変異によるものだというを示した。そこで本研究において、①MRL マウス由来の msa を持つ B6 の遺伝子背景を持ったコンジェニックマウス（Cg1）をさくせいした。また、②Cg1 および B6 マウスの精巣（6 週齢）から RNA を抽出し、マイクロアレイを行うことより mRNA の発現を比較することにより、アポトーシスに関与する遺伝子を検出することを試みた。

研究成果の概要（英文）：MRL/MpJ mouse testes have metaphase-specific apoptosis(msa) in meiotic spermatocytes. In our previous study, msa occurs due to mutation of the *exonuclease 1 (Exo1)* located on Chr1 of 81.9 cM. In this study, in order to find practical factors in msa, ①we created B6 background congenic mice (Cg1) carrying msa loci derived from MRL mice. ② I made purified RNA sample for microarray to know mRNA expression level of apoptosis related genes in testes from Cg1 and B6 mice as a control (6 weeks of age).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：減数分裂、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

有性生殖を行う生物において、減数分裂は生命を次世代に繋いでいくための必須の過程である。しかしながら減数分裂期の1過程である相同DNA組換えは機構的に高頻度の遺伝的組換えを伴うことから、ミスマッチ修復機構などのDNA修復機構により厳密に監視されている。DNAミスマッチ修復機構は、バクテリアからヒトに至るまできわめて多くの生物

種に共通して存在するゲノム監視のシステムで、個々の塩基置換、欠失・挿入、複製のズレがプルーフリーディング機能をもつポリメラーゼにより正確な塩基配列へと置換される過程である。このような過程を経てもなおDNA損傷をもつ不良細胞の多くは最終的にアポトーシスを起こし排除されるが、時に癌を誘発することも知られている。

自己免疫疾患（シェーグレン症候群）モデ

ルマウス MRL マウスは 1) 精巣が他系統に比較し小型であること、2) 減数分裂中期特異的アポトーシスを多数出現させること (Kon et al, *Cell Tissue Res*1999)、3) 熱ショック耐性精母細胞の存在すること (Kon et al, *Mol Reprod Dev* 2001)、4) 卵母細胞様細胞の出現すること (Otsuka et al. *Biol Reprod* 2008) 等が知られている。

申請者はその原因遺伝子を探索し、減数分裂中期特異的アポトーシスを誘発する因子としてポリメラーゼ酵素群の一つに数えられる Exonuclease 1 (*Exo1*) の変異を発見した (Namiki et al, *Mol Reprod Dev* 2003)。さらに詳細な塩基配列の解析により、MRL/MpJ マウスにおいて *Exo1* の第 8 イントロンのことを明らかにした (Namiki et al, *Mol Reprod Dev* 2003)。in vitro mRNA splicing 実験により、*Exo1* の第 8 イントロン branch site が T の場合正常にスプライスが起り、A の場合半数以上がスプライスされなかった (Namiki et al, *Jpn J Vet Res* 2004)。第 9 エクソンには核移行シグナルが存在する。よって、これが欠失したことにより、本来働くべき核内での *Exo1* の発現が低下したことにより正常な機能が失われた可能性が考えられた。実際、正常な *Exo1* および 381 残基および 830 残基の異常 *Exo1* 蛋白質を GFP 融合蛋白質として mouse3T3 cell において過剰発現し、その細胞内における局在を観察した結果、正常細胞が核内に移行していることが確認された。一方、異常蛋白質は細胞内における局在が見られなかった。以上の結果から、MRL/MpJ マウスにおいて第 8 イントロン内のただ 1 つの塩基置換により引き起こされるスプライス機構の不安定性により、*Exo1* が核移行活性を失ったことによるものと考えられた。

そこで本研究では MRL/MpJ マウスの減数分裂中期特異的アポトーシスに起因する因子として *Exo1* に注目し、*Exo1* の異常がどのようにしてアポトーシスを引き起こすのかを明らかにすることを目的とした。具体的にはまず MRL/MpJ マウス型の第一染色体 (81.9 cM) を有する異常 *Exo1* コンジェニックマウス (Cg1) ならびに異常 *Exo1* ノックインマウス (B6.MRLKI) を作製する。Cg1 マウスならびに B6.MRLKI マウスは MRL/MpJ マウスと同じ表現型を有しながら C57BL/6 に極めて近い遺伝子背景を持つ。この特性を利用し、Cg1 マウス、異常 *Exo1* マウスと野生型 C57BL/6 マウスを比較することで、精巣で有意に発現量等が異なる因子をマイクロアレイ法などにより同定する。

## 2. 研究の目的

精子形成過程において第一減数分裂中期特異的アポトーシスを多数出現させるマウス系統; MRL/MpJ は *Exo1* 遺伝子に異常がみられる。本研究では、*Exo1* 遺伝子異常を再現したコンジェニックマウスを確立しその精巣内における遺伝子発現レベルを解析することにより、減数分裂中期特異的アポトーシス実行因子の同定を行うことを目的とする。本研究により不良精子の排除機構を解明することが出来れば、生殖細胞の過剰なアポトーシスにより引き起こされる不妊症への応用が期待される。また遺伝子損傷修復異常は癌の原因となることが知られており、その治療法の確立に重要な知見を与えるものと期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) ① コンジェニックマウスの作製

MRL マウスは減数分裂中期特異的アポトーシス表現型をもつ (Kon et al, *Cell Tissue Res* 1999)。この表現型について染色体マッピング法を行った結果、その原因が第 1 染色体 100cM 周辺に位置する exonuclease I (*Exo1*) 遺伝子の変異によることを明らかにした (Namiki et al, *Mol Reprod Dev* 2003)。*Exo1* 変異によって異常な状態で増殖した精母細胞が減数分裂中期に存在するセルトリ細胞依存性チェックポイントを通過できずにアポトーシスに至ると考えられるが、その証明には遺伝的バックグラウンドを同一にしたコンジェニックマウスでの解析を待たねばならない。よって上述した生殖細胞排除機構が減数分裂異常で説明できるか否かを検討するため、以下の実験計画を進める。第 1 染色体の原因遺伝子座 (81.9cM) を持つコンジェニックマウス (Cg1) を作出し、形態的特徴の精査をする。具体的には MRL マウスと C57BL/6 とを交配させ、F1 を作製しさらに C57BL/6 へと交配させることで Cg1 を作製する。交配は 10 世代以上行い、そのスクリーニングには染色体マッピングによって *Exo1* と組み換えなく存在するマイクロサテライトマーカー (D1Mit403) を利用する。D1Mit403 は 555 例のバッククロス個体のスクリーニングで *Exo1* の近傍に存在することが証明されている。コンジェニックマウスの作出は 1 年以内に完了する予定である。

### ② ノックインマウスの作製

コンジェニックマウス作成と同時並行し、MRL マウス型 *Exo1*、すなわち *Exo1* の第 8 イントロンにおいて特異的なポイントミューテーション (T→A) をもつノックインマウスを作製する。

ノックインマウスを作製する場合、通常 1.5 から 2 年を要するため、この手法はコンジェニックマウス作製に困難が生じた場合のバックアップとして行う。遺伝的バックグラウンドをすでに全ゲノムシーケンスの明ら

かになっている C57BL/6 の ES 細胞を用いる。

③コンジェニックマウス (Cg1) およびノックインマウス (B6. MRLKI) の解析

#### 形態学的証明

作製したマウス個体を精巣並びに全身および形態学的に観察し、Exo1 の異常によって精巣特異的に影響を及ぼすのか、それ以外の臓器にも変化を起こすのかを調べる。また、これらのマウスにおいて MRL マウスと同様に減数分裂中期特異的アポトーシスが観察されるか否かを確かめる。その手法として、TUNEL 染色、電子顕微鏡で精査する。

#### SNP の検出

Exo1 はミスマッチ修復蛋白質と共に働き、DNA 損傷修復を行う。Exo1 の変異により DNA 損傷修復が正常に行われず、細胞内において DNA 変異が蓄積し、その結果アポトーシスが誘導されることが考えられる。MRL マウスならびに B6. MRLcg、B6. MRLKI の精巣において SNP 検出試薬を用い、実際にミスマッチ DNA の蓄積が見られるか検出する。

(2) Cg1 および B6. MRLKI 精巣を用いたマイクロアレイ法、リアルタイム PCR 法

Cg1 および B6. MRLKI 精巣を用いたマイクロアレイ解析からアポトーシスを起こす実行因子を特定する。Cg1 および B6. MRLKI の精巣を正常な精巣を持つ C57BL/6 と比較し、コンジェニックマウスにおいて高発現するもの、もしくは発現量の減少する遺伝子を検出し、これらについてその発現量をリアルタイム PCR 法により比較する。精巣の DNA をサンプルとして用いるが、特に、精細管ステージ XII をテンプレートとすることにより、Exo1 とアポトーシスの関連因子を抽出することが可能となると考える。またこの際、PCR array を用いてアポトーシス関連遺伝子の検出を特異的にすることも検討する。

(3) pull down assay

また Exo1 の異常が引き起こす DNA 損傷を受けた細胞 (Cg1 および B6. MRLKI 精巣の細胞ライセート) を、GST ラベルした Exo1 またはマイクロアレイにより検出されたアポトーシス関連因子を用いて pull down assay を行う。共沈タンパク質はマスマスプロトタイプ法、ウェスタンブロット法などを用いることで同定し、アポトーシスを起こす関連蛋白質を特定する。

#### 4. 研究成果

(1)

① コンジェニックマウスの作製

第 1 染色体の原因遺伝子座 (81.9cM) を持つコンジェニックマウス (Cg1) を作出し、形態的特徴の精査をした。具体的には MRL マウスと C57BL/6 とを交配させ、F1 を作製しさらに C57BL/6 へと交配させることで Cg1 を作製した。交配は 10 世代以上行い、そのス

クリーニングには染色体マッピングによって Exo1 と組み換えなく存在するマイクロサテライトマーカー (D1Mit403) を利用した。

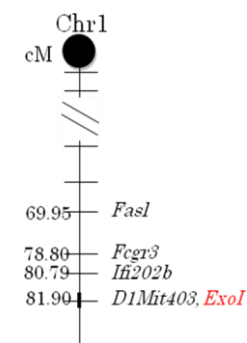


図 1. Cg1 の第一染色体地図

Cg1 は 81.9cM の位置に示す太黒バーの領域のみを MRL 型、それ以外の全ての領域を C57BL/6 型の遺伝子背景を持つ。

② ノックインマウスの作製

この手法はコンジェニックマウス作製に困難が生じた場合のバックアップとして行う予定であったが、以下に示す③の結果よりコンジェニックマウス作製が成功したことより、ノックインマウスを作製する必要がなくなった。

③ コンジェニックマウス (Cg1) の解析

#### 形態学的証明

作製したマウス個体を精巣並びに全身および形態学的に観察し、Exo1 の異常によって精巣特異的に影響を及ぼすのか、それ以外の臓器にも変化を起こすのかを調べた。HE 染色による観察の結果、精巣のみ多数のアポトーシス像がみられ、その精巣重量はコントロールマウス精巣と比較し、40%減少していた。また ssDNA 像により、これらのマウスにおいて MRL マウスと同様に減数分裂中期特異的アポトーシスが観察された。

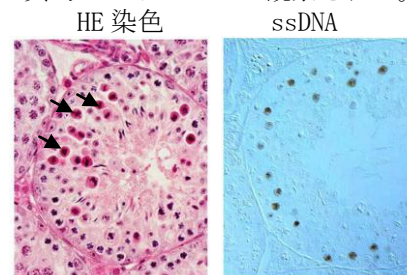


図 2. Cg1 精巣における第一減数分裂中期の組織像

HE 染色により、Cg1 精巣において、精母細胞は減少し、矢印で示すアポトーシス像が観察された。また、精子細胞、精子は観察されなかった。ssDNA を検出した結果、精母細胞においてアポトーシス像が観察された。

#### SNP の検出

現在の段階では、コンジェニックマウス精巣、

および C57BL/6 精巢より SNP 検出キットによる検出のための DNA サンプルを調整中である。検出キットは GNC 社製 Immobilized Mismatch Binding Protein (IMBP) Plate Kit を使用する。

(2) Cg1 精巢を用いたマイクロアレイ法、リアルタイム PCR 法

Cg1 精巢を用いたマイクロアレイ解析からアポトーシスを起こす実行因子を特定する。

Cg1 精巢を正常な精巢を持つ C57BL/6 と比較した。コントロールと比較し発現が増加した遺伝子、および減少した遺伝子について表にした。

表 1. Cg1 において発現の増加した遺伝子

	Chr	symbol	Cg1/B6 ratio
1	chr19: 23 cM	Fas	10.4
2	chr17: 45.9 cM	Msh2	9.6
3	chr9 A2	Birc3	4
4, 5, 6	chr2 F3-G1	Bcl2l11	4
7	chr10 B4	Sirt1	2.4
8	chr7 23.0 cM	Bax	2.4

表 2. Cg1 において発現の減少した遺伝子

	Chr	symbol	Cg1/B6 ratio
1	chr1 C5	Spata3	-1.8
2, 3, 4	chr7 E3	Dnajb13	-3.2
5, 6, 7	chr1 90cM	Dedd	-2.4
8	chr8 B3.1	Spata4	-1.2

この結果より、発現の増加した遺伝子について最も高いものである Fas は Fas リガンドが結合すると細胞にアポトーシスを誘導することから Cg1 精巢におけるアポトーシス実行因子として重要であると考えられる。また、Msh2 は生殖細胞におけるマイクロサテライト不安定性に関与する遺伝子であることから、ミスマッチリペア関連遺伝子である ExoI と協働してアポトーシスを誘導する可能性が十分に考えられた。また、Birc3, Bcl2l11, Sirt1, Bax もアポトーシス関連遺伝子として知られており、これらの遺伝子とのネットワークに関して精査することが今後の課題となる。

また、表 2 における発現の減少した遺伝子に関して、Spata3, Spata4 は精子形成に関与し、また、DNAJB13 は精子の成熟に関与する遺伝

子で鞭毛形成に重要だという報告があることから減数分裂中期特異的にアポトーシスを引き起こすステージを決定する因子としての可能性が考えられる。Dedd は細胞死シグナルに関与することから、これもアポトーシスを引き起こす原因因子として考えられた。

(3) pull down assay

(2) でおこなったマイクロアレイの結果を精査し、実際にアポトーシスを引き起こす協働因子であることを確認したうえで今後実験を行う予定である。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

並木 由佳 (NAMIKI YUKA)

北海道大学・大学院獣医学研究科・特任助教

研究者番号：20590417