

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20133

研究課題名(和文) 精巣特異的アクチンキャッピングプロテインの解析

研究課題名(英文) Analysis of germ cell specific actin capping protein

研究代表者

惣田 哲次 (Tetsuji, Soda)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：20722656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：精巣生検組織を用いアクチンキャッピングプロテイン(CP 3および CP 3の生殖細胞の精子形成各段階におけるダイナミックな局在変化を免疫組織学的染色にて確認した。また、共免疫沈降により CP 3および CP 3のタンパク相互関係を示した。男性不妊症との関連を解析するため、正常ボランティアと男性不妊症患者から得られた精液検体を用い、CP 3およびCP 3の発現解析を行った。異常染色精子の割合は有意に不妊群において高く、さらに正常形態精子に限り解析を行うと、同様に不妊群において異常染色精子の割合が高かった。精子の受精能や受精後の妊孕能に関わる機能が推測された。ノックアウトマウスの作成計画は現在も進行中である。

研究成果の概要(英文)：By the use of testicular specimen obtained from testicular biopsy, the cellular localization of CP 3 changed dynamically at each step during spermatogenesis. Double-staining analysis revealed that CP 3 localization was identical to CP 3 at every step in the spermatogenic cells. Co-IP assay with recombinant protein showed that CP 3 and CP 3 form a protein complex. Spermatozoa from the normal group were stained homogeneously by both CP 3 and CP 3. In contrast, significantly more spermatozoa in the group of oligozoospermia or asthenozoospermia showed heterogeneous or lack of staining for either CP 3 or CP 3. Even by confining the observations to morphologically normal spermatozoa, the percentage of abnormal staining was still higher in the oligozoospermia or asthenozoospermia group. In conclusion, CP 3 in conjunction with CP 3 seemed to play an important role in spermatogenesis and may be associated with male infertility.

研究分野：生殖医療

キーワード：アクチンキャッピングプロテイン 精巣特異的 男性不妊症

### 1. 研究開始当初の背景

男性不妊症はその多くが原因不明であり、原因究明が強く望まれている。最も重症な男性不妊症である非閉塞性無精子症患者では、精子形成が著しく障害を受けており、これまでも原因タンパクの同定が試みられてきた。我々はヒト生殖細胞においてアクチンキャッピングプロテイン (CP) のサブユニットである CP3 および CP3 の単離に成功し、これらが精巣特異的に発現していることを見出してきた。また、これらは生殖細胞の精子成熟過程において、細胞の形態形成に重要な役割を担っていることが推測された。さらに男性不妊症患者の精液検体を用いた免疫染色にて、CP3 と CP3 のタンパク局在が不均一であることから、男性不妊症との関与が推測されている。

### 2. 研究の目的

臨床検体を用いて CP3 の詳細な発現解析を行った上で、CP3 および CP3 の男性不妊症との関与を明らかにすることを目的とする。また、CP3 に主に着目し、ノックアウトマウスを作成した後に CP3 の機能解析を行うことを目的とする。

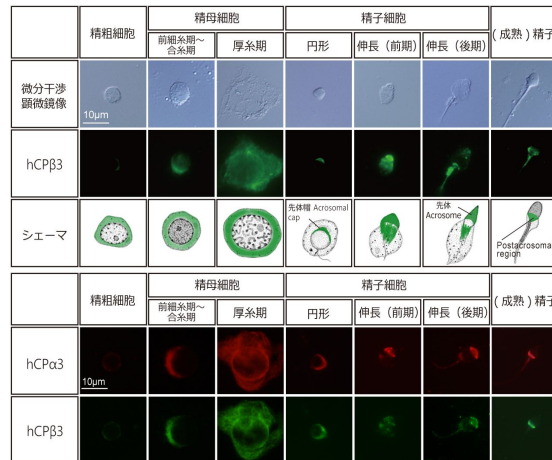
### 3. 研究の方法

精子形成が正常と考えられる閉塞性無精子症患者から得られた精巣生検組織を用いて、免疫組織学的染色により生殖細胞の精子形成過程各段階における CP3 の発現解析を行う。リコンビナントタンパクを作成し、CP3 と CP3 のタンパク相互関係を解析する。妊孕性の確認されている健常人ボランティアおよび男性不妊患者の精液を用い、CP3 および CP3 のタンパク発現量および局在の不均衡等を検討する。CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトマウスを作成し、得られた精子の運動能や受精能について解析する。

### 4. 研究成果

精巣生検組織を用いた免疫組織学的染色にて、CP3 は精子形成各段階においてダイナミックに局在変化しており、さらにその局在は CP3 と完全に一致していた (図1)。また、リコンビナントタンパク CP3-EGFP および CP3-mRFP1 が細胞内で同時発現するベクターを作成し、HEK293 細胞へ Lipofection 法による遺伝子導入の後タンパク抽出を行った。抗 GFP 抗体を用いた共免疫沈降により、これらリコンビナントタンパクがタンパク複合体を形成していることが示され、CP3 と CP3 がタンパク複合体を形成することが示唆された。

図 1



次に、CP3 および CP3 の男性不妊症との関連を解析するため、妊孕性の確認された正常ボランティア (正常群 (Normo 群) n=20) と乏精子症あるいは精子無力症と診断された男性不妊症患者 (不妊群 (0+A 群) n=21) から得られた精液検体を用い、CP3 および CP3 の発現解析を行った。異常染色精子の割合は正常群、不妊群各々  $31.2 \pm 2.5\%$ 、 $52.4 \pm 3.0\%$  ( $P < 0.001$ ) で、不妊群において有意に異常染色精子の割合が高かった (図2)。また、いずれの検体においても CP3 および CP3 のタンパク発現はおおむね一致しており、これら両タンパクは相互依存の関係にあることが推測された。

さらに、CP3 および CP3 の形態形成以外に関わる機能を解析するため、正常形態精

子に限り解析を行うと、異常染色精子の割合は正常群、不妊群各々  $22.5 \pm 2.1\%$ 、 $39.9 \pm 2.9\%$  ( $P < 0.001$ ) (図3)であった。ここから、CP 3 および CP 3 は精子の形態形成だけでなく、精子の受精能や受精後の妊孕能などに関わる機能が推測された。

CP 3 の機能解析を行うためのノックアウトマウスの作成計画については現在も進行中である。

以上から、CP 3 は CP 3 とタンパク複合体を形成しながら、精子の形態形成のみならず妊孕能に関わる精子機能に参与していることが示唆された。今後は精子の妊孕能を予測する新たなバイオマーカーとして用いることなどが期待される。

図2

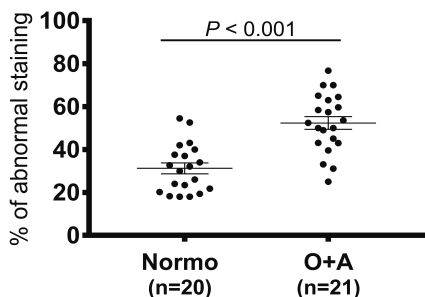
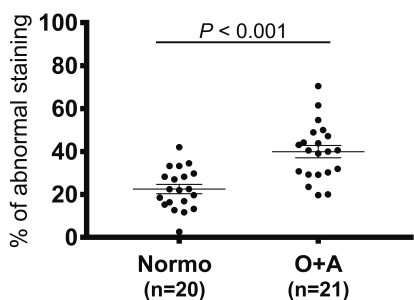


図3



#### 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)

T Soda, Y Miyagawa, N Ueda, 他 10 名, Human Reproduction, 査読有, Vol. 32, Issue 3, pp. 514-522  
DOI: 10.1093/humrep/dew353.

[学会発表](計 6 件)

惣田哲次, 他8名, ヒト男性生殖細胞におけるアクチンキャッピングプロテインの発現解析 キャッピングプロテイン 3と 3は精母細胞以後に共発現し形態形成に関わっている, 第104回日本泌尿器科学会総会, 2016年4月23日, 仙台

Tetsuji Soda, 他7名, Human capping protein 3, a novel isoform of testis-specific actin capping protein 3 subunit; the dynamic transcriptional profiles during spermatogenesis and possible implications of male infertility, AUA2016 (国際学会), 2016年5月9日, アメリカ サンディエゴ

T Soda, 他7名, Dynamic transcriptional profiles of human testis-specific actin capping protein 3 and its possible implication of male infertility, ESHRE Annual Meeting (国際学会), 2016年2016年7月3日~2016年7月6日, フィンランド ヘルシンキ

惣田哲次, 他9名, ヒト精巣特異的アクチンキャッピングプロテイン 3 の系統的解析と男性不妊症の新規バイオマーカーとしての可能性, 第26回泌尿器科分子・細胞研究会, 2017年3月11日, 大分

惣田哲次, 他7名, 精巣特異的アクチンキャッピングプロテインは精巣の妊孕能を予測する新たな診断マーカーになりうる, 第105回日本泌尿器科学会総会, 2017年4月21日, 鹿児島

惣田哲次, 精巣生殖細胞特異的遺伝子の単離・解析と臨床応用に向けて, 日本アンドロロジー学会第36回学術大会(招待講演), 2017年6月30日, 倉敷

[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

惣田 哲次 (SODA, Tetsuji)  
大阪大学大学院医学系研究科・招へい教員  
研究者番号：20722656

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )