

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：平成 19 年度～平成 20 年度
 課題番号：19500371
 研究課題名（和文） 骨粗鬆症および不妊症モデルとしての TZF 遺伝子欠損マウスの確立
 研究課題名（英文） Establishment of TZF gene-deficient mouse as osteoporosis and/or sterility model

研究代表者
 萩原 啓実（HAGIWARA HIROMI）
 桐蔭横浜大学・医用工学部・教授
 研究者番号：90189465

研究成果の概要：TZF は、精巣に局在するアンドロゲン受容体の転写調節に関わる Zinc finger タンパク質である。そこで、TZF と男性ホルモンテストステロンのかかわりについて検討した。TZF は、テストステロンや FSH によりその発現が制御されておらず、テストステロン産生やインヒビン発現にも関わっていないことが判明した。TZF 遺伝子欠損マウスを作製しその表現型の解析を行なった。(1) TZF は骨芽細胞から発見した遺伝子なので骨への影響を軟 X 線 CT スキャン装置により調べたが、大腿骨骨密度への影響は観察されなかった。身長への影響もなかった。(2) 生殖への影響を調べたところ、ホモ接合体で雌性不妊が確認された。DNA アレイ法によりホモ接合体と野生型で精巣に発現する遺伝子の差を検討中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：病態モデル

1. 研究開始当初の背景

Zinc Finger タンパク質 TZF (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**:398-403, 2000) とそのアイソフォーム TZF-L (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **301**:1079-1085, 2003) は私たちが骨芽細胞株 MC3T3-E1 から発見した (図 1)。これらの mRNA は精巣の核内に高発現している。

作用点を探る一環として核内受容体との

相互作用を調べたところ男性ホルモンに依存して男性ホルモン受容体 AR と局在が一致することが確認されている (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **331**: 1025-1031, 2005) (図 2)。さらに、AR の転写活性への TZF と TZF-L の作用を詳細に調べたところ TZF ホモダイマーで AR 転写活性を抑制し、TZF と TZF-L のヘテロダイマー及び TZF-L のホモダイマーでは AR の転写活性を促進すること

を発見している (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **341**:515-521, 2006; *Mol. Cellular Endocrinol.*, **247**:150-165, 2006) (図3)。

以上のように、私たちが発見したTZF及びTZF-Lは、新規のAR転写活性の調節因子である。さらに、生体内でのTZFの機能を明らかにするために私たちはTZF遺伝子欠損マウスの作製に取り組んだ。その結果、遺伝子欠損マウス作製に使用した2種類のマウス系統129SVJとC57BL/6のキメラTZF遺伝子欠損マウスにおいて大腿骨骨密度の減少と雄性不妊の傾向が確認された。そこで、2系統の純系TZF遺伝子欠損マウスを作製し、さらなる表現型の解析とその作用メカニズムの解析を試みている。

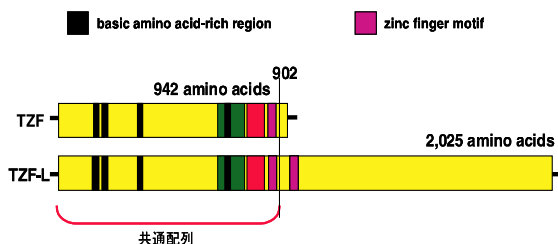


図1. TZFとTZF-Lのタンパク質の一次構造

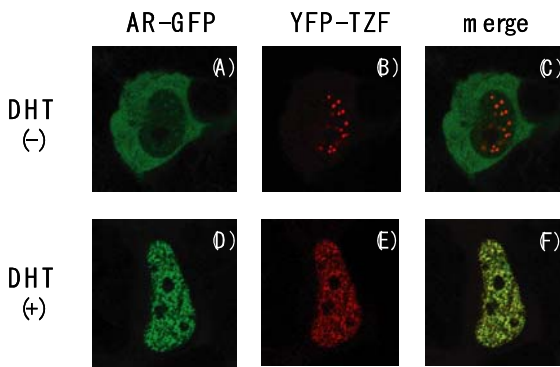


図2. TZFとARの局在の一致
DHT (男性ホルモン) の存在下で AR (D) と TZF (E) の局在が一致している (F)。

2. 研究の目的

私たちは骨芽細胞株 MC3T3-E1 より新規 Zinc Finger タンパク質 TZF (Testicular Zinc Finger Protein) を発見し、その機能解析を行なっている。TZF 遺伝子を欠損させたマウスを作製したところ予備的な表現型として骨密度の減少と雄性不妊が現れている。そこで、本研究では、TZF 遺伝子を欠損した純系マウスを作製することにより骨密度減少と雄性不妊を確定し、そのメカニズムを明らかにすることにより、これからの医療に有用な骨粗鬆症モデルマウスあるいは不妊モデルマウスを確立することを目的とする。

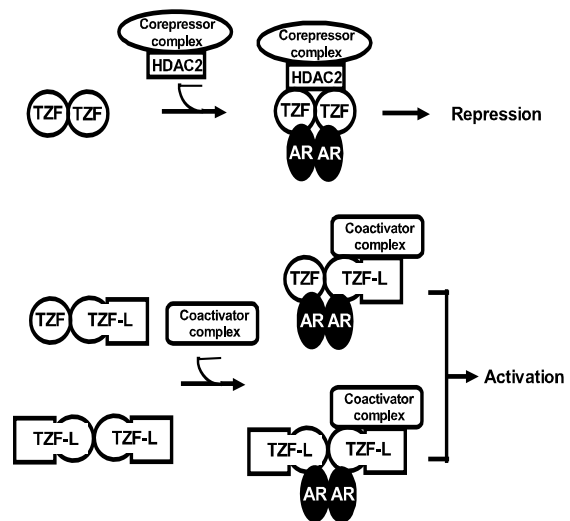


図3. TZFとTZF-LのAR転写活性への寄与

3. 研究の方法

研究期間内に TZF 遺伝子を欠損した 129SVJ と C57BL/6 のそれぞれの純系マウスにおける大腿骨骨密度の減少と雄性不妊を確定し、その発現メカニズムを解明する。さらに、これらのマウスが骨粗鬆症モデルあるいは不妊症モデルマウスとしてヒトの疾患のモデルとして有用であることを明らかにするためにヒトの疾患原因との相関について検討を行なう。

(1) TZF の発現制御

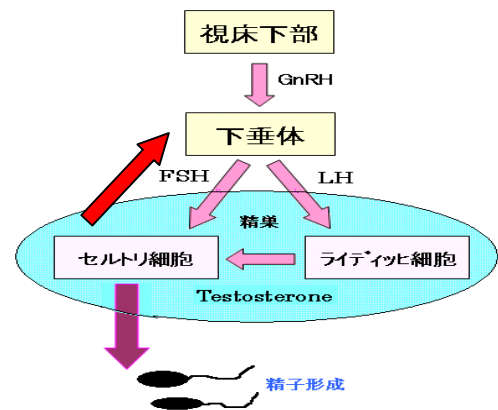


図4. 精子形成のホルモンライン

精子形成に関わるホルモンラインの因子類 (図4) と TZF との関連を探るために以下の実験を行う。

①上流解析: 6週齢 d d Y マウスにテストステロンは3日おきに4回(5 mg/kg), FSHは7日間毎日(0.76unit/kg)皮下投与した後、精巣での TZF 及び TZF-LmRNA の発現量を PCR により検討した。

②下流解析: TZF 遺伝子欠損マウスの血中テ

テストステロン量を EIA キットを用いて調べる。また、精巣でのインヒビン mRNA 発現量を PCR で調べる。

(2)TZF 遺伝子欠損マウスの骨への影響

ホモ接合体、ヘテロ接合体、野生型の雌雄各群10匹のマウスを準備し、X線CTスキャン装置（アロカ社製ラシータ）を用いて経時的（35日、70日、140日）に麻酔下のマウスの大腿骨骨密度を測定する。各群間の海面骨と皮質骨の骨密度を比較検討する。TZF 遺伝子欠損のキメラマウスではホモ接合体の雌マウスの海面骨で骨密度の減少が確認されている。

骨密度の減少が確認されたときには次の事項を検討する。

①大腿骨の病理切片を作製し、von Kossa染色により石灰化の程度、破骨細胞に特異的な TRAP（酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ）の染色により破骨細胞の動態を調べ骨密度の低下が骨代謝に関するどの細胞（骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞）に由来するかを確定する。

②各ジェノタイプのマウスより、骨芽細胞、破骨細胞あるいは軟骨細胞を培養する。これらの培養細胞を用いてTZF以後のシグナル伝達メカニズムを解析する。申請者らは既にマウスからこれら初代培養細胞を作製する技術を習得している。

③各ジェノタイプのマウス大腿骨の骨髄あるいは頭頂骨より mRNA を調製し、骨形成に関与するマーカー遺伝子（コラーゲン、アルカリホスファターゼ、オステオカルシン、M-CSF、RANKLなど）の発現量をリアルタイム PCR（ロシュ社製）を用いて検討する。

(3)TZF 遺伝子欠損マウスの生殖への影響

ホモ接合体、ヘテロ接合体、野生型の雌雄マウスに4匹ずつ野生型マウスを交配し妊娠するか否か、妊娠した場合は産仔数を調べる。TZF 遺伝子欠損キメラマウスではホモ接合体において雄性不妊の傾向が確認されているので、同様な結果が確認された場合には精子形成数、精子の形態を調べる。さらに、精巣の病理切片を作製し、精子形成のどのステージで異常が発生しているかを検討する。

以上が確認されたときには以下の事項を検討する。

①精子形成は精巣の中で精原細胞から精母細胞、さらに精細胞・精子へと様々なステージを経て行なわれる。TZF 欠損が精子形成のどのステージで異常を生じさせるかが判明したときには、細胞分化に関連する遺伝子・タンパク質の発現を調べるとともに TZF の強

制発現実験などを行い TZF の精子形成における役割を詳細に検討する。

②各ジェノタイプのマウス精巣より mRNA を調製し、DNAマイクロアレイ法により TZF に関与して発現している遺伝子を同定する。DNAマイクロアレイ法は自動車研究所（筑波）との共同研究により既にいくつかのプロジェクトが始動している。DNAマイクロアレイ法により得られた候補因子からリアルタイム PCR（ロシュ社製）を用いて擬陽性を排除し、候補因子を絞る。

候補因子の不妊（精子形成）との関連をデータベースを用いて検討すると共に、興味深い因子の場合は RNA i により細胞でのタンパク質発現の抑制や遺伝子欠損マウスの作製のプロジェクトを立ち上げる。

4. 研究成果

(1) TZF の上流と下流の発現制御メカニズム上流解析：テストステロンと FSH をマウスに投与した後に精巣を採取し mRNA を精製した。PCR により TZF と TZF-L の mRNA 発現量を比較したところテストステロンも FSH も発現に影響していなかった（図5と6）。

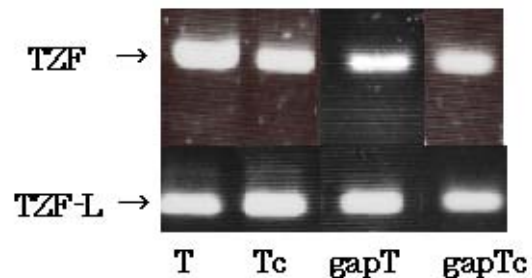


図5：テストステロン投与後の mRNA

T：Testosterone を投与したマウス

Tc：コントロールマウス

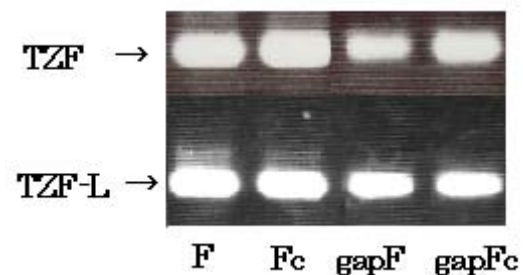


図6：FSH 投与後の mRNA

F：FSH を投与したマウス

Fc：コントロールマウス

下流解析：ホモ接合体と野生型のテストステロンの血中濃度に差はなかった（図7）。イ

ンヒビンmRNA の発現量にも両者で差はなかった(図8)。

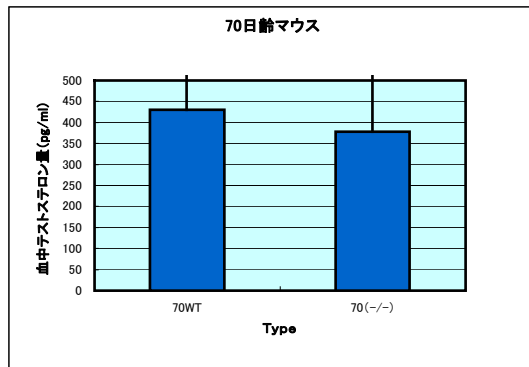


図7. 血中テストステロン量

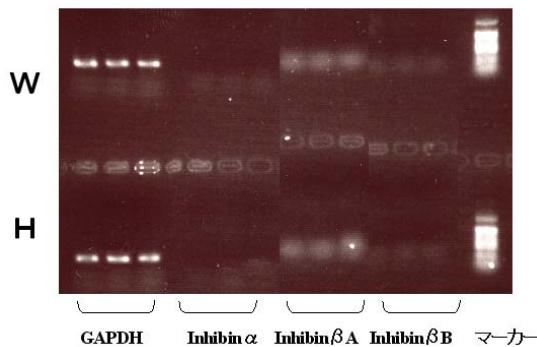


図8. TZF 遺伝子欠損マウスのインヒビンの発現

GAPDH : 21 cycle, その他 : 35 cycle

(2)TZF 遺伝子欠損マウスの骨への影響

ホモ接合体, ヘテロ接合体, 野生型の雄, 雌の70日齢と140日齢を各10匹ずつ準備し軟X線CTスキャン装置で大体骨骨密度を解析したところ各群に差は認められなかった。コンジェニックマウスを作製することにより, 大腿骨骨密度の差は消失してしまった。身長への影響も観察されなかった。

(3)TZF 遺伝子欠損マウスの精巣への影響

①TZF 遺伝子欠損マウスの雄で不妊が確認された(図9)。

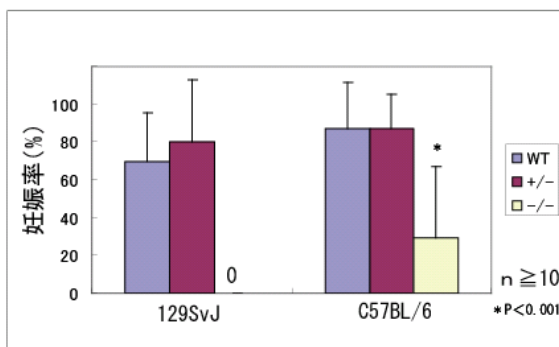


図9. TZF 遺伝子欠損コンジェニックマウスの妊娠率

ホモ接合体, ヘテロ接合体, 野生型の雄1匹にd d Y マウス5匹を交配した。n=10

②DNA マイクロアレイ法によりホモ接合体と野生型マウスの精巣で発現する遺伝子の差を調べたところ, mRNA の発現に差のある候補遺伝子が幾つか観察された。現在, 候補を絞って疑陽性でないことをPCRにより確認している。以下に候補遺伝子の幾つかとその確認PCR用プライマーを示す。

1. AK_122196

LEFT PRIMER tgcttcgcctgtacaatctg

RIGHT PRIMER aggaccttcccacaggactt

2. TNP2

LEFT PRIMER tcgacactcacctgcaagac

RIGHT PRIMER cctggagtgcgtcacttgta

3. protamine 1

LEFT PRIMER agcaaaagcaggagcagatg

RIGHT PRIMER agatgtggcagatgctcctt

4. protamine 2

LEFT PRIMER gagcgcgtagaggactatgg

RIGHT PRIMER acctgcatctcctcctcctt

5. TNP1

LEFT PRIMER gtctggctccatgaagggtg

RIGHT PRIMER aagaaccgagctcctcacao

6. NM_019931

LEFT PRIMER ggcaagaccacctcactcat

RIGHT PRIMER agtggctggacagagaagga

結論として, TZF 遺伝子欠損コンジェニックマウスは骨への影響はなかったので骨粗鬆症モデルマウスにはなりえなかったが, 雄性不妊が確認されたのでさらに精査することにより不妊モデルマウスとして確立できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

①山崎加奈子, 弓山紘美, 萩原啓美

AR コリプレッサー-TZF はアンドロゲンによる発現制御を受けずアンドロゲン産生にも影響しない。

第31回日本分子生物学会年会・第81回日

本生化学会大会合同大会，2008 年 12 月 9
日～12 日，神戸ポートアイランド

〔その他〕

ホームページ：

<http://www.cc.toin.ac.jp/sc/hagiwara/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 啓実 (HAGIWARA HIROMI)

桐蔭横浜大学・医用工学部・教授

研究者番号：90189465