

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15日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590193

研究課題名（和文） マウス精巣上体の生後発達と部位別機能分化の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of postnatal development and topographical functional differentiation of the epididymis in mice.

研究代表者

小宮山 政敏 (KOMIYAMA MASATOSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：70175339

研究成果の概要（和文）：精巣上体における部位特有の管腔内環境形成の分子機構を明らかにするために、マウスの精巣上体における遺伝子発現について解析を行った。その結果、精巣上体でのみ発現している遺伝子を6種類明らかにした。また精巣上体のなかでは頭で強く発現する遺伝子5種類、体で強く発現する遺伝子2種類、尾で強く発現する遺伝子1種類、頭と尾で強く発現する遺伝子1種類を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Gene expression was analyzed in mouse epididymis to clarify molecular mechanisms of topographical functional differentiation of the epididymis. Results were as follows; 6 genes were identified as epididymis specific genes, 6 genes were identified as caput specific genes, 2 genes were identified as corpus specific genes, 1 gene was identified as a cauda specific gene, and 1 gene was identified as a caput and cauda specific gene.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：発生学・形態形成学

1. 研究開始当初の背景

精巣上体は精子が成熟し、受精能を獲得するために必要な器官である。これは形態学的に頭部、体部、尾部により構成され、各部位ごとに特有な精巣上体管上皮の分泌・再吸収機能により、それぞれ独自の管腔内環境が保たれている。このような部位ごとの機能的分

化は般に生後から思春期までの間に獲得される。マウスやラットでは生後10日から40日までがこのような分化期に相当し、さらに生後60日まで精巣上体の成長が続く。

精巣上体の生後分化に関しては、現象的なことはある程度明らかになってきている。しかし、その分子機構に関してはほとんど分か

っていない。精子成熟の複雑な過程を理解し、化学物質や薬物による男性不妊のメカニズムを解明するには、精巣上体の部位特異的な管腔内環境の形成と維持の分子機構やその制御機構を明らかにすることが極めて重要と考えられた。

精巣上体で部位特異的に発現する遺伝子は約40種ほど明らかになっていた。しかし、精巣上体に特異的に発現する遺伝子に関する情報は非常に乏しかった。

2. 研究の目的

マウス精巣上体の cDNA ライブラリーをもとに作製されたマイクロアレイにより、精巣上体で特異的に発現することや、精巣上体の部位により異なる発現パターンを示すことが予想された遺伝子を対象に、臓器別の発現や精巣上体の部位ごとの発現を定量的に比較し、確実なものに絞込むとともに、生後発達過程の精巣上体における発現変化パターンを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験動物には ICR 系の雄マウス（生後1週齢、3週齢、5週齢、8週齢）を用いた。それらから精巣上体を摘出し、精巣上体の全体から、あるいは頭、体、尾に分けた後それぞれから RNeasy キットを用いて RNA を抽出した。また、8週齢のマウスより脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、骨格筋、精巣、精管を摘出し、同様に RNA を抽出した。

遺伝子発現状況の解析は RT-PCR 法およびリアルタイム RT-PCR 法により行った。RT-PCR には SuperScript III One-Step RT-PCR System (Invitrogen) を使い、リアルタイム RT-PCR には QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用いた。

4. 研究成果

(1) まず、マイクロアレイ解析により精巣上体で高レベルの発現が確認されている遺伝子のうち、Tmco7、Ppme1、BB583831 [EST]、Mapklip1、Mbn13、BAC clone RP23-387J8、Gstm7、Pyroxd2、Rnf185 に着目し、これらが精巣上体以外の臓器でも発現するのか否かを RT-PCR 法により解析した。臓器は8週齢の雄マウスより摘出した。また精巣上体以外の臓器としては、精巣、精管、骨格筋、脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、小腸を対象とした。

解析の結果、調べた遺伝子はすべての臓器において発現していることが確認された。一方で、いくつかの遺伝子には RT-PCR 結果に特徴がみられた。まず、精巣上体における BB583831 [EST] の PCR 産物は他の臓器のものより 100 bp ほど短く、精巣上体では他とは違うアイソフォームが発現しているのではないかと考えられた。また、Mbn13 は精巣上

体および腎臓以外では副産物を生じた。逆に BAC clone RP23-387J8 は精巣上体、精管、脳および骨格筋において、さらに Pyroxd2 は精巣上体、精管、脳、肺において、期待する PCR 産物の他に副産物を生じた。これらの副産物が複数のアイソフォームの発現を示すものか否かは現段階では不明である。

今後は精巣上体に特徴的な PCR 産物を生じた BB583831 [EST] についてさらなる発現パターン解析を行うとともに、新たな精巣上体特異遺伝子の検索を継続し、精巣上体の部位別の発現解析および発育段階別の発現解析を行う予定である。

(2) 平成22年度は15種類の遺伝子 (Gm6792, Rnase9, Spag11a, Wfdc6a, Scel, Lcn12, Serpinalf-v1, Serpinalf-v2, D730048I06Rik, 9230103M23Rik, 9230104L09Rik, 9230102M18Rik, 9230005D20Rik, Defb42, 9230110F15Rik) について発現を臓器間で比較した。その結果6種類 (Gm6792, Rnase9, Spag11a, Serpinalf-v2, D730048I06Rik, 9230103M23Rik) は精巣上体のみで発現することが明らかになった。他の6種類 (Serpinalf-v1, 9230104L09Rik, Wfdc6a, 9230102M18Rik, Scel, Lcn12) は泌尿器系臓器で強く、9230005D20Rik は精巣上体と泌尿器系以外の臓器で、Defb42 および 9230110F15Rik はすべての臓器で発現していることが明らかになった。

次に、昨年解析したものを含む16種類の遺伝子について、頭・体・尾の間で発現を比較したところ、頭～体で優位なものは Mbn13、Rnase9、Lcn12、9230001H03Rik、9230103M23、Gm6792 であった。体～尾で優位なものは Scel、9230005D20、体のみで優位なものは BAC clone RP23-387J8、頭と尾で優位なものは D730048I06Rik であった。一方、部位別の局在が不明瞭なものは 9230102M18Rik、Serpinalf-v1、Serpinalf-v2、Spag11a、Wfdc6a、Pyroxd2 であった。局在が明らかなのうち、Lcn12、9230001H03Rik、Gm6792 については他の部位では長さの異なるバンドが見られたことから、別のアイソフォームが発現している可能性が考えられた。

(3) 平成23年度は、精巣上体の部位により発現の異なることが RT-PCR 法により確認された遺伝子 (Mbn13, Rnase9, Lcn12, 9230001H03Rik, 9230103M23, Gm6792, Scel, 9230005D20, BAC clone RP23-387J8, D730048I06Rik など) について、リアルタイム RT-PCR 法により定量化を行った。

その結果、これまでの RT-PCR 法による結果がほぼそのまま確認された (図1)。

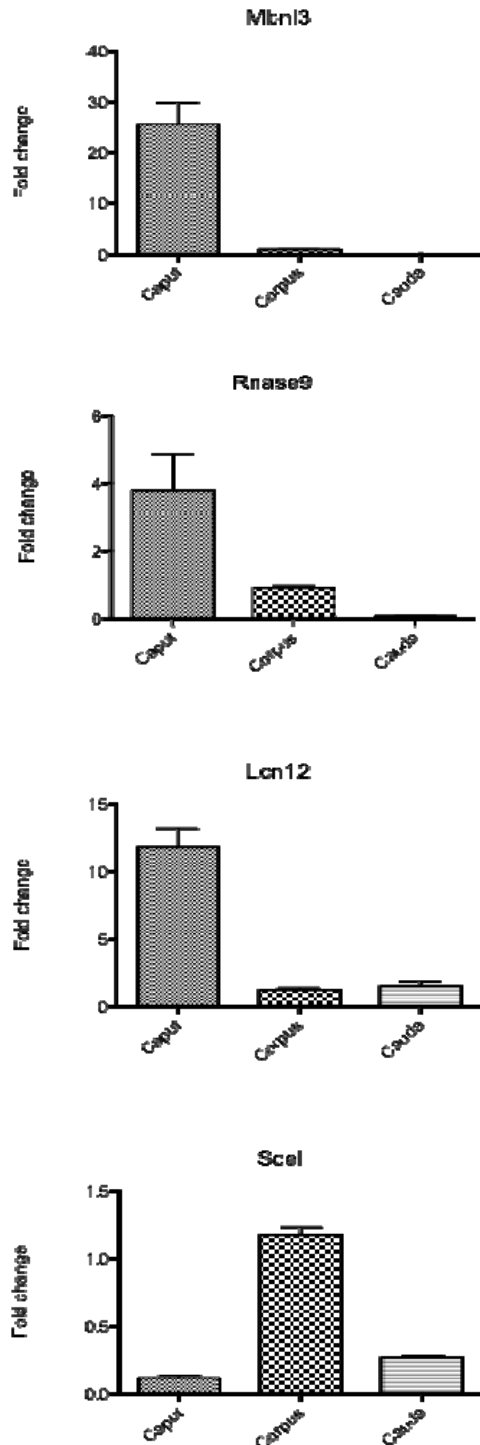


図 1. 精巣上体の頭 (Caput)、体 (Corpus)、尾 (Cauda) における Mbn13、Rnase9、Lcn12 および Scel1 の発現状況。リアルタイム RT-PCR による解析。Fold change はハウスキーピング遺伝子である β -actin に対する発現比を示す。

例えば精巣上体の頭から体にかけて優位に発現すると想定される Mbn13、Rnase9、Lcn12 に関しては、ハウスキーピング遺伝子である β -actin との発現比で表すと、それぞれ頭・体・尾の順に Mbn13 では 25.5、0.951、0.0769 であり、Rnase9 では 3.79、0.885、0.0748、また Lcn12 では 11.9、1.27、1.54 であった。すなわち、Mbn13 および Rnase9 では頭において発現が著しく高く、体においては β -actin と同程度であり、尾においてはほとんど発現しないことが明らかになった。Lcn12 については、前二者と同様に頭において強く発現し、体において β -actin と同程度の発現があるが、さらに尾においても β -actin と同程度に発現することが明らかとなった。

また、体から尾にかけて優位に発現すると想定された Scel1 に関しては、 β -actin との発現比は頭・体・尾の順に 0.119、1.18、0.271 であった。すなわち Scel1 は精巣上体の体において β -actin と同程度あるいはやや強く発現し、尾においてはその 1/4 程度、頭においては体の 1/10 程度の強さで発現することが明らかになった。

(4) 以上のように、本研究では、調べた臓器のなかでは精巣上体でのみ発現している遺伝子を 6 種類 (Gm6792, Rnase9, Spag11a, Serpinalf-v2, D730048I06Rik, 9230103M23Rik) 明らかにした。そのうち Gm6792、Rnase9、9230001H03Rik は頭において、また D730048I06Rik は頭と尾で特異的に発現することを明らかにした。

さらに、精巣上体特異的な遺伝子というわけではないが、精巣上体においては頭で発現の強いもの 3 種類 (Mbn13, Lcn12, 9230103M23)、体で発現の強いもの 2 種類 (Scel1, BAC clone RP23-387J8)、尾で発現の強いもの 1 種類 (9230005D20) を明らかにした。

今後は、これらの遺伝子が精巣上体の部位特有の管腔内環境の形成にどのように関わっているのかを明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Miyaso H, Komiyama M, Matsuno Y, Naito M, Hirai S, Itoh M and Mori C, The changes of cortactin p80/85 isoform profiles and tyrosine phosphorylation status during spermatogenesis in the mouse testis. J. Androl. 査読有, Vol. 31, 2010, 507-518.

[学会発表] (計6件)

- ① 宮宗秀伸、中村典子、松野義晴、小宮山政敏、落合伸伍、井越有香、森千里、新生児期デカブロモジフェニルエーテル投与がマウス精巣上体の精子数にあたる影響、第117回日本解剖学会総会・全国学術集会、2012年3月26日～28日、山梨大学甲府キャンパス
- ② H. Miyaso, N. Nakamura, Y. Kawashiro, Y. Matsuno, M. Komiyama, S. Ochiai, Y. Igoshi and C. Mori. Neonatal exposure to decabromodiphenyl ether disrupts apical ectoplasmic specialization in mouse testes by increasing cortactin tyrosine phosphorylation. SSR 44th Annual Meeting, July 31-August 4, 2011, Portland, Oregon, USA.
- ③ 宮宗秀伸、中村典子、松野義晴、小宮山政敏、落合伸伍、井越有香、森千里、デカブロモジフェニルエーテルがマウス精巣におけるコートアクチンに与える影響の解析、日本アンドロロジー学会第30回学術大会および第17回精子形成・精巣毒性研究会 共同開催学会、2011年7月22日～23日、都市センターホテル、東京都千代田区。
- ④ 中本真、宮宗秀伸、中村典子、松野義晴、小宮山政敏、落合伸伍、井越有香、森千里、デカブロモジフェニルエーテルがマウス精巣上体の遺伝子発現に与える影響、日本アンドロロジー学会第30回学術大会および第17回精子形成・精巣毒性研究会 共同開催学会、2011年7月22日～23日、都市センターホテル、東京都千代田区。
- ⑤ 宮宗秀伸、松野義晴、小宮山政敏、落合伸伍、井越有香、森千里、新生児期デカブロモジフェニルエーテル投与が精子形成におよぼす影響、第88回日本生理学会大会および第116回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会、2011年3月28日～30日、パシフィコ横浜・会議センター、神奈川県横浜市。
- ⑥ H. Miyaso, Y. Matsuno, M. Komiyama, S. Ochiai, Y. Igoshi and C. Mori. The effects of neonatal exposure to decabrominated diphenyl ether on apical ectoplasmic specialization in mouse testis. Society of Toxicology 50th Anniversary Annual Meeting, March 6-10, 2011, Washington D. C., USA.

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小宮山 政敏 (KOMIYAMA MASATOSHI)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：70175339

(2) 研究分担者

森 千里 (MORI CHISATO)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：90174375