

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 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580100

研究課題名（和文） 精巣上体特異的カルボキシエステラーゼ（CES4）の生理機能と発現調節機構

研究課題名（英文） Biological function and gene regulation of epididymal-specific carboxylesterase (CES4)

研究代表者

山下 哲郎（YAMASHITA TETSURO）

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：20202377

研究成果の概要（和文）：遺伝子欠損マウスを用いて精巣上体に特異的に発現しているカルボキシエステラーゼである CES4 の生理機能の解析を行った。メタボローム解析により CES4 変異マウスの精巣上体において酸化環境にあることが示された。また、酸化ストレスに応答して発現が誘導されるヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)の発現亢進が検出され、変異マウスの精巣上体が酸化ストレスに曝されていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The biological function of an epididymal-specific carboxylesterase, CES4, was studied using *Ces4* knock out mouse. The metabolome analysis of epididymal cell extracts revealed that the most of the glutathione was identified as oxidative form in the epididymis of KO mouse. The expression of oxidative stress-responsive heme oxygenase-1 (HO-1) was also increased in the KO mouse tissue. These data indicated that the epididymis of KO mouse was exposed by oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：精巣上体、エステラーゼ、酵素

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、健康な成ネコの尿中に分子量約 70 k のタンパク質が高濃度に存在していることを発見し、このタンパク質は血清由来のものではなく、腎臓の尿細管細胞で合成され尿中に分泌されていることを明らかにした。コーキシンと命名したこのタンパク質はネコ尿に特異的なアミノ酸であるフェリニンの生合成に関わるエステラーゼ酵素であることが分かっているが、ネコ以外のほ乳類においてもコーキシンと近縁の遺伝子（CES4）

があることが明らかになっている。ネコ以外のほ乳動物においては、CES4 は雄の精巣上体で特異的に発現し、精巣上体分泌液に存在することが示されているが、CES4 の生理機能は全く不明である。

2. 研究の目的

精巣上体は、長さ数十メートルにおよぶ細管からなり、その中を精子が通過する過程で成熟運動能力を持つようになる。精巣上体に特異的に発現しているタンパク質は、精子の

成熟や酸化障害からの保護の役割をするものが多く同定されている。精子の成熟に関わる精巣上体の機能不全が男性不妊の原因の一つであると考えられているが、その詳細については不明である。CES の生理的な役割のひとつと考えられている脂質代謝に着目すると、精子の受精能獲得(capacitation)の際に、精子表面のコレステロールが除去されることがよく知られており、また、精子の運動性が低下することにより不妊になる精子無力症では、精液や精子のリン脂質の組成が健全な精子と異なっていることが報告されている。本研究により CES4 と精子成熟の関連が明らかになれば、精巣上体における精子成熟の分子機構の解明に寄与する極めて重要な知見をもたらすことができる。さらに、不妊動物モデルとして CES4 ノックアウトマウスが利用できると期待され、雌性不妊治療研究に応用することも可能となると考えられる。本研究では、精巣上体の CES4 の生理機能を明らかにする目的で、我々が作製した *Ces4* ノックアウトマウスを用いて、遺伝子欠損による表現型の解析や組織特異的発現部位の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) *Ces4* ノックアウトマウスの表現型の解析

精巣上体における CES4 の機能を明らかにするため、①オスホモ変異個体の生殖能力の解析や、②精子の形態や運動性の観察、③遺伝子欠損による精巣上体分泌液および精子自体の構成成分の組成変化の解析を行った。CES4 の基質としては、脂肪酸エステルやアミド化合物、グルタチオン抱合体等が候補に挙げられるので、精巣上体抽出液および精子におけるこれらの物質やその代謝成分の組成変化について GC/MS や LC/MS を用いて解析した。

(2) マウスにおける *Ces4* 発現部位の解析
機能未知遺伝子の発現部位と発現の時期特異性を解析することにより、機能解明のための重要な知見が得られると考えられる。*Ces4* ノックアウトマウスは、*Ces4* エクソン(exon1 および exon2)と GFP 遺伝子が相同置換するように設計されており、マウスにおける CES4 の発現部位を蛍光顕微鏡によって観察することが可能である。そこで、発生段階や生後の CES4 の発現部位を、組織切片や実体蛍光顕微鏡による全体像の GFP 蛍光観察を行った。

4. 研究成果

(1) *Ces4* ノックアウトマウスの表現型の

解析

①オスホモ変異個体の生殖能力の解析

精巣上体は精子の成熟に関わる臓器であり、精巣上体を通る過程において、精子は潜在的な運動能と受精能を獲得していく。そこで、CES4 と雄性生殖能の関連について明らかにする目的で、雄の *Ces4* 遺伝子欠損マウスと野生型マウスで、野生型雌と交配させた際の産仔数の比較を行った。生後 3 カ月から 12 カ月まで継時的に野生型と欠損マウスそれぞれ 4 頭を用いて解析を行ったところ、統計的に有意な平均産仔数の違いは見られず、*Ces4* 変異による生殖能への影響は認められなかった (図 1)。

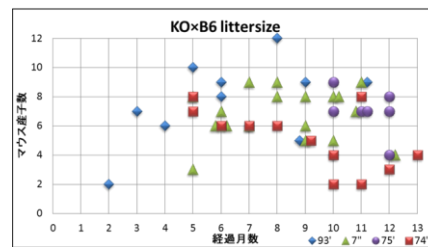


図 1. *Ces4* 欠損雄マウス 4 頭と野生型雌を交配させた場合の産仔数の変化

②精子の形態や運動性の観察

Ces4 欠損雄マウスと野生型マウスの精巣上体から精子を採取し、樹脂に包埋後、切片の電子顕微鏡観察を行った。その結果、頭部、尾部ともに欠損マウスと野生型マウスの間で形態的な違いは見られず、精子の形態形成において CES4 は関与しないと考えられた。精子の運動性に関しても、生理食塩水中における精子の運動性を目視で観察したところ、欠損型マウスの精子が野生型の精子に比べて、運動性が若干劣るように見えたが、顕著な差は見られず、①の結果と併せて考えると、*Ces4* 欠損によって精子の受精能は影響を受けないことが強く示唆された。

③遺伝子欠損による精巣上体分泌液および精子自体の構成成分の組成変化

精巣上体抽出物のメタボローム解析により CES4 変異マウス の精巣上体において還元型グルタチオンが減少した酸化環境にあることが示されたため(図 2)、酸化ストレスに応答して発現が誘導されるヘムオキシゲナーゼ -1(HO-1)のタンパク質量の差異について、ウエスタンブロッティング法を用いて解析を行った。その結果、精巣上体中の HO-1 の発現亢進が検出され、変異マウスの精巣上体が酸化ストレスに曝されていることが示唆された。

野生型マウスと変異マウスの精巣上体か

ら脂質を抽出し、GCMS を用いて脂質組成の比較を行った。その結果、CES4 変異マウスにおいて、オレイン酸とリノール酸が有意に減少しており、CES4 が脂質代謝に関与している可能性が示唆された。また、遊離脂肪酸については、両者で差異が認められなかったため、CES はモノグリセリドの分解には関与していないと考えられる。

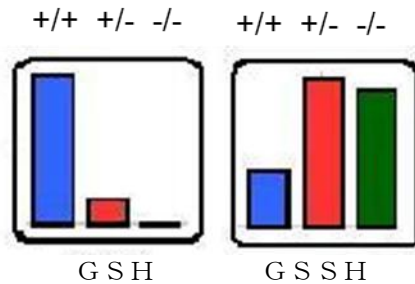


図2. 野生型 (青)、ヘテロ (赤)、KO (緑) の精巣上部尾部抽出液中の還元型グルタチオン (GSH) と酸化型グルタチオン二量体 (GSSG)

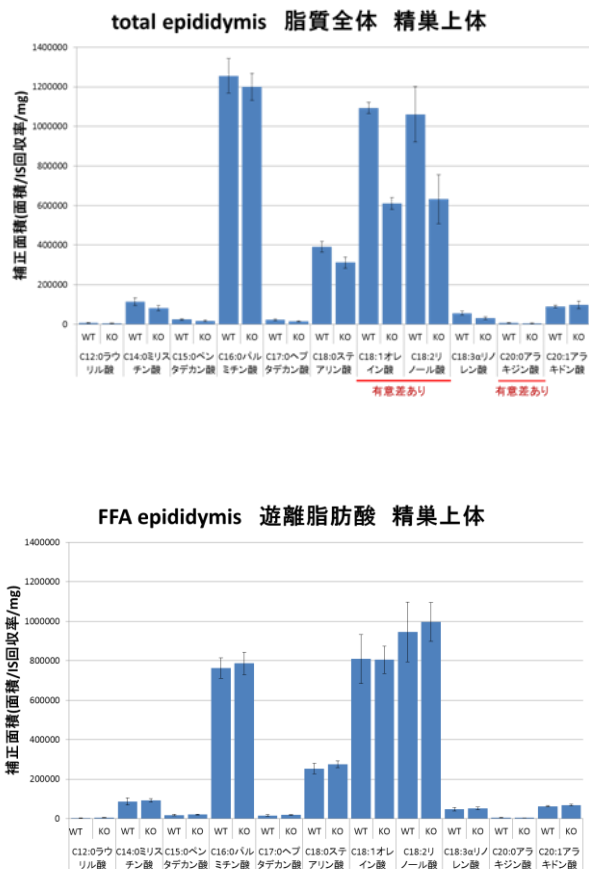


図3. 精巣上部の脂質全体 (上図) および遊離脂肪酸 (下図) の比較

次いで、精巣上部のタンパク質の網羅的解析により、CES4 変異による生理的・生化学的影響について解析を行った。野生型マウスと変異マウスの精巣上部尾部よりタンパク質を抽出し、2次元電気泳動を行った後、蛍光色素で発色させたタンパク質スポットのパターンを解析した。存在量に差のあるスポットをゲルから切り出し、ナノ LC-MS/MS 分析により、タンパク質の同定を行った。その結果、sorbitol dehydrogenase が CES4 変異マウスにおいて亢進していることが明らかになった。精漿中にはソルビトールおよび sorbitol dehydrogenase が存在しており、ソルビトールをフルクトースに変換することで、精子運動のエネルギー源を提供すると考えられている。sorbitol dehydrogenase が変異マウスで発現亢進していたことから、何らかの理由で、変異マウスの精巣上部尾部内精子の運動性が野生型マウスの精子よりも高まっている可能性や、精巣上部内でエネルギー供給不足が生じている可能性が考えられた。また、精子の鞭毛や先体部分を構成するタンパク質である outer dense fiber protein や sperm acrosome membrane associated protein が変異マウスで減少していたことから、変異マウスにおいて精子数が減少している可能性が示された。

(2) マウスにおける *Ces4* 発現部位の解析 遺伝子変異マウスの *Ces4* 発現部位を同定する目的で変異マウスの精巣上部組織切片の GFP 蛍光像を観察したが、生後 3 カ月以上の雄マウスにおいても、コントロールとして用いた GFP を発現していない野生型と変化がなく、何らかの理由で GFP が発現できなくなったか、発現量が少なく蛍光像が得られなかった可能性が考えられる。

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 2 件)

- ① Miyazaki, M., Miyazaki, T., Toyonaga, M., Tsutsui, T., Taira, H., Yamashita, T. and Suzuki, A., Characterisation of the carboxylesterase enzyme cauxin in the seminal fluid of the cat. The Veterinary Journal, 査読有、Vol. 190、2011、pp. 378-382
- ② Holmes, R., Wright, M., Laulederkind, S., Cox, L., Hosokawa, M., Imai, T., Ishibashi, S., Lehner, R., Miyazaki, M., Perkins, E., Potter, P., Redinbo, M., Robert, J., Satoh, T., Yamashita, T.

Yan, B., Yokoi, T., Zechner, R. and Maltais, L. J., Recommended nomenclature for five mammalian carboxylesterase gene families: human, mouse, and rat genes and proteins. Mammalian Genome, 査読有、Vol. 21、2010、pp. 427-441

〔学会発表〕(計2件)

- ① 山下哲郎、金成瑞穂、松館光人、宮崎雅雄、森松正美、遺伝子欠損マウスを用いた精巣特異的カルボキシルエステラーゼ(CES4)の機能解析、第85回日本生化学会大会、2012.12.16、福岡国際会議場(福岡県)
- ② 山下哲郎、ネコ尿タンパク質コーキシンと尿臭生成機構、平成23年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会(招待講演)、2011.2.3、札幌コンベンションセンター(北海道)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 哲郎 (YAMASHITA TETSURO)
岩手大学・農学部・准教授
研究者番号：20202377

(2) 研究分担者

森松 正美 (MORIMATSU MASAMI)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授
研究者番号：70241370