

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659713

研究課題名(和文)生殖細胞特異的に反応するTRA98の抗原遺伝子の同定とその解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of antigen for TRA98 which specifically recognizes germ cells

研究代表者

木内 寛 (HIROSHI, KIUCHI)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70403053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞核を特異的に認識するTRA98は、国内外の多くの研究者によって、生殖細胞のマーカーとして用いられてきたが、その抗体で認識される核抗原分子(GENA)は不明であった。私たちはTRA98を認識する抗原をコードする遺伝子の同定を進め、その遺伝子をクローニングすることに成功した。GENA抗原遺伝子をコードする遺伝子の破壊マウスを検討したところ、雌では妊孕性が確認されたが、雄では精原細胞も確認できず、雄性不妊を示した。今回得られた遺伝子破壊マウスは生殖細胞の研究において非常に重要な疾患モデルマウスであることがわかった。

研究成果の概要(英文)：TRA98, which specifically recognizes the germ cell nucleus, has been used as a marker of germ cells by many researchers at home and abroad. Nuclear antigen molecule that is recognized by the antibody (GENA) was unknown. We proceeded to identify the gene encoding the antigen recognized by the TRA98, and succeeded in cloning the gene. We examined knockout mice of the gene encoding the GENA antigen gene. In the female, fertility has been confirmed, but males showed infertility without spermatogonia. We found that the gene knockout mice are very important male infertility mice model.

研究分野：アンドロロジー

キーワード：Germ Cell Spermatogonia Sperm Spermatogenesis Spermatocyte Spermatid PGC ES

### 1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は、次世代に遺伝情報を伝承する役目を担っており、種の保存、繁殖に必須である。そのため、高度に分化・特殊化した体細胞系列とは、大きく異なる特異的な性質を有し、その一つとして、世代を越えて生存し、個体全体を作りうる全能性を保有している点が挙げられる。

申請者は、1997年、生殖細胞の核を特異的に認識するモノクローナル抗体 TRA104/98 をクローニングし発表を行った。抗体で認識される核抗原分子 (GENA) は、生殖細胞のほとんど全ての分化ステージで発現が確認されている。このことから、GENA は、生殖細胞系列の決定や全能性の維持と深い関係があると考えられる。さらに、樹立された F9, ES細胞でその発現を調べた結果、コロニー内部の一部の細胞に発現が見られることが明らかになった。その後、モノクローナル抗体 TRA98 は、世界の多くの研究者からリクエストされることから、商業的に販売を行い、現在でも多くの研究者に用いられている。それから15年後の本年、遺伝子のクローニングに成功した。今回得られた遺伝子の解析は、TRA98 を用いた研究を背景に、基礎研究から臨床研究にまで生殖細胞分化のメカニズムの解析に多くの情報を与えることが期待される。

### 2. 研究の目的

生殖細胞は、次世代に遺伝情報を伝承する役目を担っており、種の保存、繁殖に必須である。そのため、高度に分化・特殊化した体細胞系列とは、大きく異なる性質を有し、その一つとして、世代を越えて生存し、個体全体を作りうる全能性を保有している点が挙げられる。

我々は、1997年、生殖細胞の核を特異的に認識するモノクローナル抗体 TRA104/98 をクローニングした。その抗体で認識される核抗原分子 (GENA) は、生殖細胞のほとんど全ての分化ステージで発現が確認されている。このことから、GENA は、生殖細胞系列の決定や全能性の維持と深い関係があると考えられ、現在も世界的な関心が寄せられている。

しかしながら、現在までに GENA 遺伝子の同定には至っていなかった。今回我々はヒトプロテインアレイチップを用いて、GENA 遺伝子の同定に成功した。そこで、得られた遺伝子の解析を進めることを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 免疫組織学的染色、Western blotting  
TRA98 が認識するタンパクである Nkapl に対する抗体を作成し、その発現が精巣特異であることを確かめるために、マウス精巣に対する免疫組織学的染色と様々な組織のタンパクを抽出し、Nkapl に対する抗体で Western

blotting を行った。

#### (2) Nkapl 破壊マウスの作成

Nkapl 破壊マウスはすでに作製され報告されているが、胚性致死である。そのためコンディショナル遺伝子破壊マウス胚を取り寄せ、生殖細胞特異的に CRE を発現するマウスと掛け合わせ、形質を解析した。

#### (3) Nkapl 破壊マウス

Nkapl 破壊マウスの形質を解析するために、雄性 Nkapl 破壊マウスの精巣、精巣上体を摘出した。また、それらの組織から HE 標本を作成し、造精機能障害について観察した。雌性 Nkapl 破壊マウスの妊孕性についても検討した。

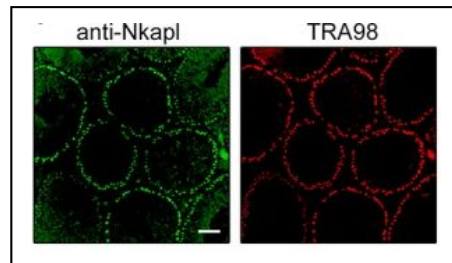
#### (4) Notch シグナルの検討

生殖における Notch シグナルを検討するために Nkapl 破壊マウスの Notch1-4 について定量的 RT-PCR を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) Nkapl のタンパク発現

Nkapl のマウス精巣における発現は精母細胞、精子細胞の一部に認められ、これは TRA98 の局所発現と同一であった。さらに Western blotting でも精巣のみに発現を認め、他の組織では発現が認められなかった。

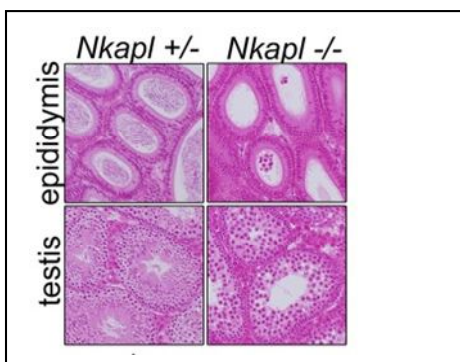
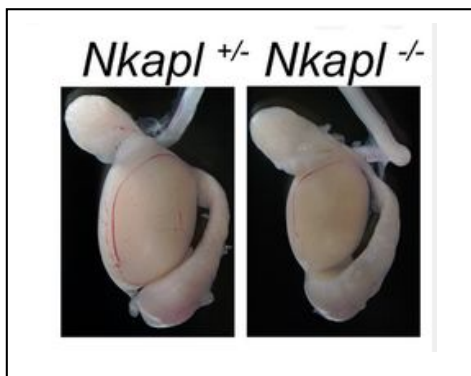


#### (2) Nkapl 遺伝子破壊マウスにおける精巣、精巣上体の形質

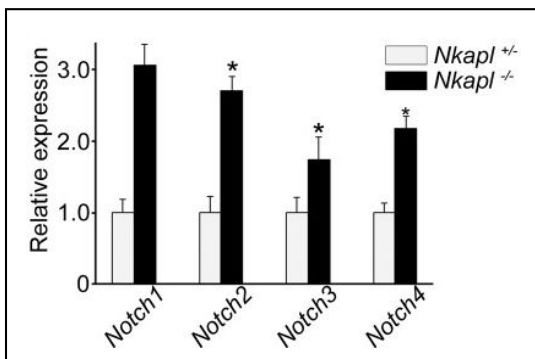
GENA 抗原遺伝子をコードする遺伝子を解析した結果、GENA をコードする遺伝子には、ホモログ存在し、どちらか一方、もしくは両方の遺伝子産物を TRA98 が認識するのか不明である。初めに一方の遺伝子破壊マウスを作製した。その結果、精子形成不全で雄性不妊であった。このことは、GENA 遺伝子が精子形成に必須であることを示している。しかしながら、遺伝子破壊マウスに観察された精原細胞に、TRA98 によって認識されるシグナルを観察することができた。

そこで、GENA 遺伝子をコードするもう一方遺伝子破壊マウスの作製を進めた。遺伝子破壊マウスはすでに作製され報告されているが、胚性致死であることから、精子形成に関する解析はなされていない。そこで、作成者に共

同研究を持ちかけ、報告済みのコンディショナル遺伝子破壊マウス胚を取り寄せた。さらに、生殖細胞特異的に CRE を発現するマウスと掛け合わせ、形質を解析した。その結果、Nkapl 破壊マウスは雌では妊孕性が確認されたが、雄では精巣、精巣上体ともに小さく、精原細胞も確認できず、雄性不妊を示した。



(4) Nkapl 破壊マウスにおける精巣 Notch signaling の発現解析  
 GENA は、Notch signaling に関与していることが明らかにされている。本研究によって、生殖細胞において Notch Signaling は、非常に重要であることが明らかになった。



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)

Okuda H, Kiuchi H, Takao T, Miyagawa Y, Tsujimura A, Nonomura N, Miyata H, Okabe M, Ikawa M, Kawakami K, Goshima N, Wada M, Tanaka H. A novel transcriptional factor Nkapl is a germ cell-specific suppressor of Notch signaling and is indispensable for spermatogenesis. PLoS One, In press.

〔学会発表〕(計 1 件)

今年の 8 月に  
 「The Annual Scientific Meeting of the Endocrine Society of Australia and the Society for Reproductive Biology 2015」  
 で発表予定

〔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：  
 出願年月日：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
 ホームページ等学会

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木内 寛 (Kiuchi, Hiroshi)  
 大阪大学・医学系研究科・講師  
 研究者番号：70403053

### (2) 研究分担者

田中 宏光 (Tanaka, Hiromitsu)  
 長崎国際大学・薬学部・准教授  
 研究者番号：10263310

辻村 晃 (Tsujimura, Akira)  
 順天堂大学・医学部・准教授  
 研究者番号：40294053

宮川 康 (Miyagawa, Yasushi)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：70362704