

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25890013

研究課題名(和文) 遺伝子改変動物を用いた精子成熟過程におけるPATE4の機能解析

研究課題名(英文) Functional analyses of PATE4 in sperm maturation using genetically modified mice

研究代表者

野田 大地 (NODA, Taichi)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員(常勤)

研究者番号：50712551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：体外受精では、精巣で作られて精巣上体尾部に貯蔵された精子(尾部精子)が一般的に使われている。一方、体内受精では、尾部精子に副生殖腺(特に精嚢腺)分泌成分が付加された精子が子宮内へ射出される。体内受精における精嚢腺分泌成分の役割を明らかにするため、精嚢腺除去マウスを作製して野生型雌と交配させたところ、雄の妊孕性低下が観察された。次に、精嚢腺で大量に存在するPATE4の機能解析を試みた。Pate4欠損(KO)マウスを作製して、KO雄と野生型雌を同居させたところ、この雌からはほとんど産仔が得られなかった。Pate4 KO雄が不妊傾向にある原因については、現在詳細な表現型解析をしている。

研究成果の概要(英文)：In general, cauda epididymal sperm are used for in vitro fertilization. However, in vivo, seminal vesicle secretions (SVSs) are attached to epididymal sperm when those sperm are ejaculated. To reveal the function of SVSs in vivo, male mice removed the seminal vesicle were made. Those males led to the decrease in male reproductive performance, suggesting the importance of the seminal vesicle in male fertility. Next, the function of an SVS called PATE4 (prostate and testis expression 4) was analyzed using genetically modified mice. Pate4 KO mice were created with a gene targeting method and then WT females cohabited with Pate4 KO males barely delivered newborns, indicating that Pate4 KO males tended towards subfertility. The cause of the phenotype in the Pate4 KO male will be analyzed in detail.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精嚢腺

1. 研究開始当初の背景

精巣で作られた精子は、精巣の隣の管組織（精巣上部）を通過して終末部（尾部）に貯蔵される。射出時に、尾部に蓄えられた精子（尾部精子）表面に副生殖腺（主に精嚢腺、前立腺および凝固腺）由来のタンパク質が付加され、精子は子宮内へと射出される。実験的に射出前の尾部精子を体外に回収して子宮内に人工授精すると、精子は卵子と受精できることから (Watson *et al.*, BOR, 17, 1977), 副生殖腺タンパク質の精子への付加は体内受精に必須ではないと考えられてきた。一方で、精嚢腺タンパク質を付着させた精子では、鞭毛の運動様式が変化し (Peitz and Olds-Clarke, BOR, 35, 1986; Peitz, J Reprod Fert, 83, 1988), さらに子宮内人工授精の授精率も向上すると報告された (Kawano *et al.*, PNAS, 111, 2014)。また Kawano らは、精嚢腺由来の SVS2 (seminal vesicle secretion 2) は子宮の殺精子作用（子宮内での精子に対する白血球の攻撃）から精子を保護する機能を持つと報告している。このように、異なった結果が存在するため、副生殖腺（特に精嚢腺）タンパク質が体内受精に及ぼす影響について改めて検討する必要性が浮上した。

2. 研究の目的

本研究の目標は、副生殖腺、特に精嚢腺分泌タンパク質の体内受精における役割を明らかにすることである。そこで、申請者は精嚢腺除去が雄の妊孕性に及ぼす影響を調べた後、射出時に精子へと付着して精子受精能力の向上に關与することが示唆されている精嚢腺分泌タンパク質 PATE4 (prostate and testis expression 4) の機能解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 【副生殖腺タンパク質の機能解析】

副生殖腺タンパク質の体内受精における役割を調べるために、副生殖腺のうち凝固腺あるいは精嚢腺を外科的に除去したマウスを既報に従って作製した (Pang *et al.*, J Reprod Fert, 56, 129-132, 1979)。手術から数ヶ月経過した後、それらの雄マウスを野生型 (WT) 雌と交配させた。

副生殖腺タンパク質の精子への付着が体外受精に与える影響を観察するために、実験的に射出精子の採取を行った。具体的には、直腸にプローブを挿入して、ファンクションジェネレーターを使った電気刺激による人工射精を試みた。直腸プローブの作製は Tecirlioglu らの報告を参考にした (Reprod Fertil Dev, 14, 363-371, 2002)。電気刺激は 0.25 V から 0.5 dB ずつ上昇させて、2.94 V になるまで行った (刺激時間 1 s, インターバル 10 s, 60 Hz の正弦波を各電圧に対して 4 サイクル行った)。

精嚢腺分泌タンパク質の尾部精子への付着が精子の体内受精能力の向上に与える影

響を既存の人工授精法 (Kawano *et al.*, PNAS, 111, 2014) により検討した。具体的には、WT 精巣上部尾部から精子を採取して、PBS 中で懸濁後、精嚢腺分泌液とともに子宮内に人工授精した。

(2) 【マウス PATE4 の発現解析】

マウス PATE4 (アクセッション No. AAI20765) の 52 番目から 69 番目のアミノ酸配列 (CSTVSHFVGTKHVYSKQM) を抗原として、ウサギを免疫動物としてポリクローナル抗体 (抗マウス PATE4 抗体) を作製し、WT 雄マウスから採取した各組織由来のタンパク質を使ってウェスタンブロット解析を行った。

(3) 【Pate4 欠損 (KO) マウスの作製】

KOMP から購入したターゲティングベクター (Project ID: CSD36005, 図 1) をエレクトロポレーション法により ES 細胞へ導入した。薬剤選択により耐性クローンをピックアップして、ゲノム DNA を抽出した。そのゲノム DNA を鋳型とした PCR により相同組換えを起こした ES 細胞クローンをスクリーニングした。核型が正常な ES 細胞クローンを 8 細胞期胚へ注入し、その後受精卵を仮親の子宮内に移植した。得られたキメラマウスを WT 雌と交配させて、生殖系列への寄与を確認した。3 種類のプライマー (図 1 の矢印 A-C) を使った PCR により産仔のジェノタイプングを決定し、得られた Pate4 ヘテロ欠損マウス同士を交配させて Pate4 KO マウスを作出した。

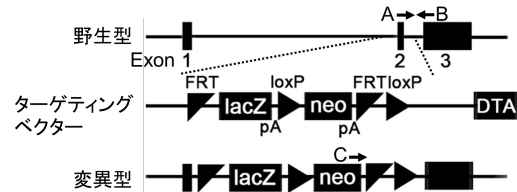


図1. Pate4 KOマウス作製に使用したターゲティングベクター 矢印はジェノタイプング用のプライマーの位置を示す。

(4) 【Pate4 KO マウスの表現型解析】

Pate4 KO 雄マウスを WT 雌マウスと交配させて、KO 雄マウスの妊孕性を調べた。そして、WT と Pate4 KO の雄マウスから精巣上部尾部をそれぞれ採取して、尾部に含まれる精子の濃度、鞭毛運動、形態および受精能力を CASA や体外受精試験により調べた。

4. 研究成果

(1) 【副生殖腺タンパク質の機能解析】

自然交配試験を 2 か月行ったところ、凝固腺ではなく精嚢腺を除去した雄マウスで妊孕性の低下が観察された。この結果から、少なくとも精嚢腺が体内受精に重要な役割を果たすことが示唆された。精嚢腺除去マウスの不妊傾向の原因については、現在詳細な表現型解析を進めている。

次に、副生殖腺タンパク質の尾部精子への付加が体外受精に及ぼす影響を調べるために、電気刺激を用いた射出精子の採取を試み

た。具体的には、作製した直腸プローブ (図 2A) を WT 雄マウスの直腸に挿入して、電気刺激を行った。その結果、射出精子を含む精液が得られたが (図 2B と C)、精液に含まれる精子数は少なく、血液および尿の混入も観察された。以上の結果から、この手法で採取できる射出精子は質が悪いため、副生殖腺タンパク質の尾部精子への付加が精子体外受精能力に与える影響を調べることはできなかった。そこで、体外で尾部精子に精囊腺分泌タンパク質を付着させて子宮内人工授精した。しかし、Kawano らが報告した手法では精子の子宮内人工授精が難しく授精率が低いために、精囊腺分泌タンパク質の精子への付着が体内受精能力の向上に及ぼす影響を正確に判定できなかった。

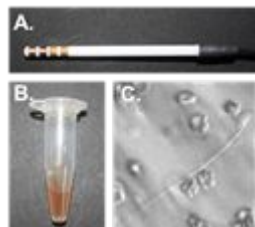


図2. 電気刺激による射出精子の採取 A) 作製した直腸プローブ, B) 得られた精液, C) 精液に含まれた精子

本検討項目により、少なくとも精囊腺の雄性繁殖能力における重要性が示唆されたので、申請者は精囊腺で大量に存在する PATE4 に注目し、以下の検討項目で PATE4 の特性解析を試みた。

(2) 【マウス PATE4 の発現解析】

WT 雄マウスの精巣、精巣上部、前立腺、凝固腺および精囊腺由来のタンパク質を使ったウェスタンブロット解析により、PATE4 は精囊腺で大量に存在することが分かった。次に、精囊腺を筋組織と上皮細胞の混合物、および分泌液に分けて、タンパク質を抽出しウェスタンブロット解析を行ったところ、筋組織と上皮細胞の混合物では 11 kDa の分子マスにおいて、分泌液では 11 kDa と 15 kDa の分子マスにおいて PATE4 の存在を示すバンドが検出された (図 3)。また、WT 雄と交配した直後の雌子宮内液タンパク質を用いたウェスタンブロット解析では、精囊腺分泌液と同様の分子量でバンドが検出された。

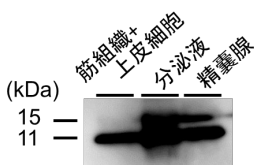


図3. マウス精囊腺における PATE4 の発現 筋組織と上皮細胞の混合物、精囊腺分泌液、および精囊腺からタンパク質を抽出してWBIに使用した。

以上の結果から、マウス PATE4 は精囊腺の上皮細胞で合成・分泌された後、射出時に精子と混合されて雌の子宮内へと輸送されることが明らかになった。

(3) 【Pate4 KO マウスの作製】

相同組換え ES 細胞を得るために、96 クロンのゲノム DNA を用いて 5' 側、3' 側 PCR を行い、相同組換え体のスクリーニングを行った。その結果、96 クロンの 20 クロンの

正しい相同組換えを起こしたことが分かった。20 クローン中 6 クロンの核型を解析し、正常だった 3 クロンを 8 細胞期胚に注入して、キメラマウスを作製した。得られたキメラマウスを WT 雌と交配させて、1 クロンの生殖系列へ寄与した。次に、Pate4 ヘテロ欠損マウス同士を交配させて、Pate4 KO マウスを作出した。KO 精囊腺タンパク質を使ったウェスタンブロット解析により、KO マウスにおける PATE4 タンパク質の消失を確認した (図 4)。

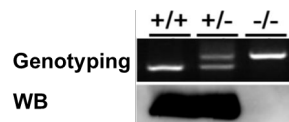


図4. Pate4 KOマウスの作製 +/+はWT, +/-はヘテロ, -/-はKOを示す

(4) 【Pate4 KO マウスの表現型解析】

WT と Pate4 KO の精巣上部尾部に存在する精子数、尾部精子の運動能力や形態を比較したが、WT と KO の間で差はなかった。また、WT と Pate4 KO の尾部精子を WT の未受精卵に媒精したところ (体外受精試験)、体外受精率に差はなかった。しかしながら、Pate4 KO 雄マウスと同居させた WT 雌からはほとんど産子が得られなかった。現在、申請者は Pate4 KO 雄の不好傾向の原因について調べている。

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 6 件)

野田大地, 伊川正人, 一般社団法人生産技術振興協会, CRISPR/Cas システムを用いた遺伝子改変マウスの作製とその応用, 生産と技術, 査読なし, 2015 (印刷中, 掲載決定済み)。

野田大地, 伊川正人, 金芳堂, 哺乳類におけるゲノム編集の現状と今後の展望, 脳 21, 査読なし, 18 巻, 2015, pp 104-109.

Mizuno Y, Isono A, Kojima A, Arai MM, Noda T, Sakase M, Fukushima M, Harayama H, Distinct segment-specific functions of calyculin A-sensitive protein phosphatases in the regulation of cAMP-triggered events in ejaculated bull spermatozoa, Molecular Reproduction and Development, 査読あり, 82 巻, 2015, pp 232-250.

DOI: 10.1002/mrd.22465

Kojima A, Matsushita Y, Ogura Y, Ishikawa S, Noda T, Murase T, Harayama H, Roles of extracellular Ca²⁺ in the occurrence of full-type hyperactivation in boar ejaculated spermatozoa pre-incubated to induce the cAMP-triggered events, Andrology, 査読あり, 3 巻, 2015, pp 321-331.

DOI: 10.1111/andr.12005

Noda T, Minami K, Kojima A, Mizuno Y,

Isono A, Sakase M, Fukushima M, Harayama H, Expression patterns of the activator type of cAMP responsive element modulator (CREM) in testicular germ cells of Japanese Black bulls, Theriogenology, 査読あり, 81 巻, 2014, pp 1012-1020.

DOI:10.1016/j.theriogenology.2014.01.014.

Mashiko D, Young SA, Muto M, Kato H, Nozawa K, Ogawa M, Noda T, Kim YJ, Satouh Y, Fujihara Y, Ikawa M, Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes, Development, growth & differentiation, 査読あり, 56 巻, 2014, pp 122-129.

DOI: 10.1111/dgd.12113

〔学会発表〕(計1件)

野田大地, 南健太, 坂瀬充洋, 福島護之, 原山洋, ウシ精巣における cAMP 依存性転写調節因子 CREM の発現パターンの解析, 第107回日本繁殖生物学会大会, 2014年8月21日, 帯広畜産大学 (北海道)

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学 研究者総覧:

<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&u=10000987&sm=affiliation&sl=ja&sp=2>

大阪大学 微生物病研究所 遺伝子機能解析分野:

<http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/information/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

野田 大地 (NODA Taichi)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員 (常勤)

研究者番号: 50712551