

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03566

研究課題名(和文) 胚発生と配偶子形成におけるExoc1遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Exoc1 gene involved in embryonic development and gametogenesis

研究代表者

八神 健一 (Yagami, Ken-ichi)

筑波大学・医学医療系・特命教授

研究者番号：40166476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：小胞輸送や細胞骨格制御に重要なエキソシスト複合体(Exocyst Complex)の構成因子であるExoc1の機能を解明することを目的とした。

精原細胞特異的にExoc1を欠損させたExoc1cKOマウスでは精子形成が阻害され、精細管内に多核細胞が観察され、これは一次減数分裂前期の精母細胞であった。また、輸送小胞と細胞膜との膜融合を促進するSNAREタンパクがExoc1と相互作用すること、SNARE欠損KOマウスにおいても、同様な表現型を示すことが明らかとなった。以上の結果から、Exoc1はSNAREタンパクとの相互作用を介して精子形成に必須な役割を演じていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先進国において不妊カップルの増加は確実に進行しているが、その原因は多様であり十分には解明されていない。本研究では、胚性致死を示す自然変異マウスの解析から胚発生や配偶子形成に小胞輸送や細胞骨格制御に重要なエキソシスト複合体(Exocyst Complex)の構成因子であるExoc1の関与を疑い、その構成因子であるExoc1が精子形成に必須であることを示し、その主要なメカニズムを解明した。今後、ヒトにおいても同様の不妊形質を示せば、不妊治療においてExoc1の変異を診断や治療方法の開発に応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the function of Exoc1, a constituent of the Exocyst Complex, which is important for vesicle transport and cytoskeletal regulation.

Spermatogenesis was inhibited and multinucleated cells were observed in seminiferous tubules in Exoc1c KO mice. In addition, it was revealed that the SNARE proteins that promotes membrane fusion between transport vesicles and cell membrane interact with Exoc1, and that SNARE-deficient KO mice also show a similar phenotype. These results suggest that Exoc1 plays an essential role in spermatogenesis through its interaction with the SNARE proteins.

研究分野：実験動物学

キーワード：Exoc1 精子形成 卵子形成 マウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先進国における社会構造の変化や初婚年齢の高齢化に伴い不妊カップルの増加は確実に進行しているが、その原因は多様であり十分には解明されていない。いっぽう、生命科学研究の進展に伴い頻りに開発される遺伝子改変マウスや自然変異マウスには不妊となる例が稀ではないが、ほとんどは不妊の機序が解明されておらず、バイオリソースとして活用されていない。研究代表者らは、マウス繁殖群中に見出した胚性致死を示す自然変異マウス (WS マウス) がホモ変異で着床障害を起こすこと、第 5 染色体上に広範囲なゲノム領域欠失を生じていることを明らかにし、さらに、平成 2014~2016 年度科研費基盤研究 (B) により、この領域に位置する *Exoc1* 遺伝子が受精卵の着床及び胚の発生に必須であることを明らかにした。さらに雌雄の配偶子 (精子及び卵子) の形成過程でも何らかの役割をもつことが示唆された。

2. 研究の目的

エキソシスト複合体 (Exocyst Complex) は、8 つの異なるタンパク質 (*Exoc1*~*Exoc8*) で構成され、小胞輸送やゲノム DNA の安定性において重要な機能をもつことが知られている。しかしながら、生体 (in vivo) における機能解析はほとんど行われていない。研究代表者らは、先行研究において、胚性致死となる自然発症変異マウスの解析より *Exocyst Complex* の構成因子の一つである *Exoc1* が受精卵の発達に必須であることを明らかにした。更に、雌雄の両配偶子 (卵子と精子) の形成過程においても何らかの役割を演じていることが強く示唆された。そこで、本研究では条件付きノックアウトマウスモデルを用いることで、配偶子形成における *Exoc1* の機能とその分子メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス

本研究において使用した主なマウスは、以下のとおりである。

- ① *Exoc1*-LacZ-KI マウス: EUCOMM より購入した変異 ES 細胞株 (*Exoc1^{tm1a (EUCOMM)Hngv}*) を用いてキメラ法により作出した。
- ② *Exoc1*-floxed マウス: *Exoc1* 遺伝子の第 4 エクソンを loxP で挟んだ *Exoc1*-flox マウスは、*Exoc1^{tm1a (EUCOMM)Hngv}* アレルをもつマウスと全身性に Flpe を発現する B6;SJL-Tg (ACTFLPe) 9205Dym/J マウス (熊本大学より導入) を交配して得た。
- ③ *Exoc1cK0* マウス: *Exoc1*-floxed マウスと雄性生殖細胞特異的に Cre を発現する *Nanos3*-Cre driver マウスを交配して得られた *Exoc1flox/flox::Nanos3 Cre* マウスを使用した。

(2) 組織解析

マウスより採取した各組織を、目的に応じて X-gal 染色、HE 染色、免疫蛍光染色に供した。

4. 研究成果

(1) 成体における *Exoc1* の発現

はじめに、成体における *Exoc1* の発現部位を明らかにするため、*Exoc1* 遺伝子座に LacZ 遺伝子をノックインした *Exoc1*-LacZ-KI マウス成体から採取した組織を X-gal 染色し観察した。その結果、大脳皮質・脾臓のランゲルハンス島・皮膚・精巣・卵巣でシグナルが得られた。

各組織での機能を解析するために *Exoc1*-floxed マウスと中枢神経で特異的に Cre を発現するマウスと交配した結果、生後 1 週間程度で致死を示した。一方、 β 細胞で特異的に Cre を発現するマウスと交配したマウスでは異常な表現型が観察されなかった。

(2) *Exoc1cK0* マウスにおける精子形成不全

精原細胞で Cre を発現する *Nanos3*-Cre driver マウスと *Exoc1*-floxed マウスの交配により得た *Exoc1cK0* マウスを用いて、成体での精子形成における *Exoc1* の機能を解析した。その結果、精巣において精子先体マーカーである PNA-lectin がほとんど検出されなかった。また、*Exoc1cK0* マウスの精細管内で巨大な多核細胞が観察された (図 1 矢頭)。走査型電子顕微鏡による観察では、Control マウスで細胞間架橋が観察された。一方で、*Exoc1cK0* マウスでは架橋構造を欠いた多核細胞が観察された。次に、各分化段階の雄性生殖細胞マーカーを用いて蛍光免疫染色を行ったところ、多核細胞の核内で一次減数分裂前期 (パキテン期) の精母細胞マーカーである γ H2AX が検出された (図 2)。このことから、*Exoc1cK0* マウスで見られた巨大な多核細胞は一次減数分裂前期の精母細胞であることが明らかとなった。

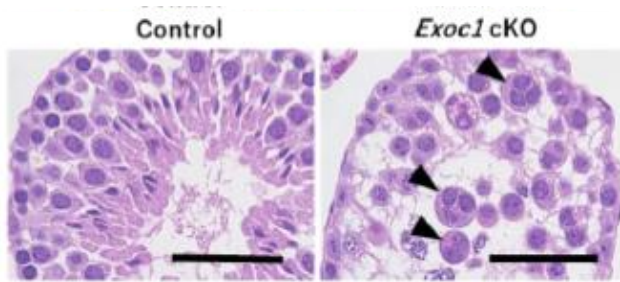


図1. Exoc1cKO マウス精管内における多核細胞の形成
スケールバー：100 μm

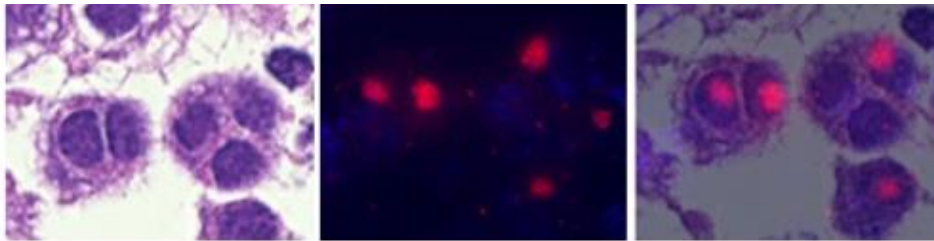


図2. Exoc1cKO マウス精巢の蛍光免疫染色
 γ H2AX: 一次減数分裂前期（パキテン期）の精母細胞マーカー

(3) Exoc1 は精母細胞の正常な合胞体の形成または維持に必要である

次に、各分化段階の雄性生殖細胞マーカーを用いて蛍光免疫染色を行ったところ、多核細胞の核内で一次減数分裂前期（パキテン期）の精母細胞マーカーである γ H2AX が検出された。このことから、Exoc1cKO マウスで見られた巨大な多核細胞（凝集合胞体）は一次減数分裂前期の精母細胞であることが明らかとなった。生後第1回目の精子形成である first wave を観察するため、精母細胞が多く存在する生後 15 日～18 日の精巢を観察したところ、Exoc1cKO マウスでは生後 18 日に初めて凝集合胞体が観察され、凝集合胞体の核内で γ H2AX のシグナルが検出された。以上の結果より、Exoc1 cKO マウスで観察された凝集合胞体は一次減数分裂前期の精母細胞から出現することが明らかになった。したがって、Exoc1 は精母細胞の合胞体の形成または維持に必要であることが示唆された。

(4) Exoc1 欠損精母細胞の減数分裂において対合は正常である

一次減数分裂前期は染色体の対合が起こる時期である。そこで、凝集した精母細胞において正常に対合が行われているかどうかを検討するため、対合した染色体領域に形成されるシナプトネマ複合体の構成因子である SYCP1 と SYCP3 に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。その結果、Exoc1cKO マウスの精母細胞の性染色体を除く 19 本の常染色体対で SYCP1 と SYCP3 のシグナルが共局在しており、Exoc1 欠損精母細胞において減数分裂が対合までは正常に進行していることが確認された。

(5) EXOC1 と SNARE タンパクの in vitro での相互作用

Exoc1cKO マウスで観察された精母細胞の凝集は、SNARE タンパクである Stx2 の null 変異体である Stx2repro34 自然突然変異マウスでも報告されており、また、酵母において SEC3 (Exoc1 のホモログ) は SSO2 (Stx2 のホモログ) と直接結合し、別の SNARE タンパクである SEC9 と SSO2 の結合を促すことで、輸送小胞と細胞膜との膜融合を促進する。このことから、EXOC1 と STX2 を介した繫留から膜融合の一連の流れが精母細胞の正常な合胞体形成に必要であるという仮説を立て、当初の研究計画にはなかったが、Exoc1 と SNARE タンパクの相互作用を in vitro で確認した。また、SNARE タンパクを欠損させたノックアウトマウスにおいても、精母細胞の合胞体形成が阻害されることが明らかとなった。さらに、Exoc1 は精子幹細胞の分化の途中で、適切な細胞形態を維持することができなくなるために致死すること、そのメカニズムに SNARE タンパクが関与するも明らかとなった。

以上、Exoc1 の精子形成における機能を明らかにし、そのメカニズムに SNARE タンパクが関与することが示唆された。これらの成果は、現在、国際誌に投稿中である。

(6) 卵巣における Exoc1 の機能解析

Exoc1-floxed マウスと卵母細胞特異的に Cre を発現する Gdf9-Cre マウスとの交配により得た Exoc1cKO マウスを用いて、卵子形成における Exoc1 の機能を解析した。その結果、8 週齢以降の Exoc1cKO マウスでは卵母細胞の数が著しく減少し、顆粒膜細胞が多層化していた (図 3)。また、2 次卵胞以降の段階の卵母細胞がほとんど見られなかったことから、Exoc1 の欠損により卵母細胞

胞は一次卵胞以降のステージに発育することができず、二次卵胞以前に異常が生じる可能性が示唆された。引き続き、卵母細胞の発生、分化において *Exoc1* と相互作用する分子の特定とメカニズムの解明を進めている。

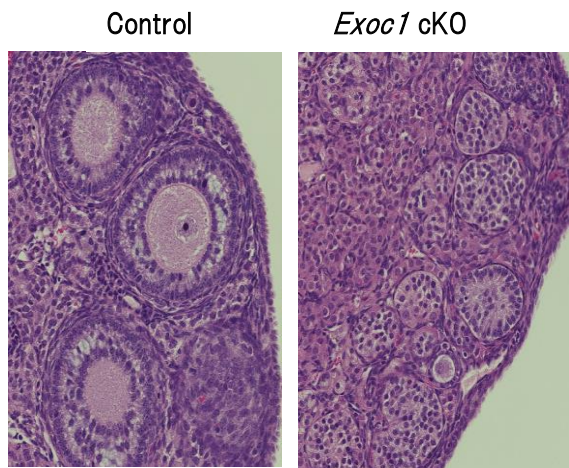


図3. *Exoc1*cKO マウス卵巣内における多核細胞の形成

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大澤 優生、Elzeftawy Abdelaziz、大徳 陽子、長谷川 賀一、八神健一、水野 聖哉、杉山文博
2. 発表標題 マウス精子形成におけるfirst wave解析方法の確立
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大澤 優生、Elzeftawy Abdelaziz、八神健一、水野 聖哉、杉山文博
2. 発表標題 マウス精子形成におけるExocyst複合体の機能解析
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大澤 優生、Elzeftawy Abdelaziz、大徳 陽子、長谷川 賀一、八神健一、水野 聖哉、杉山文博
2. 発表標題 マウス精子形成におけるfirst wave解析方法の確立
3. 学会等名 第64回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	水野 聖哉 (Mizuno Seiya) (10633141)	筑波大学・医学医療系・助教 (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	杉山 文博 (Sugiyama Fumihiro) (90226481)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
研究 分 担 者	水野 沙織（飯島沙織） (Mizuno-Iijima Saori) (80732106)	筑波大学・医学医療系・研究員 (12102)	