

プロテアソーム制御因子欠損マウスが雄性不妊であることの原因を探る！

～PA200と Ecm29の機能および関連性の解明を目指して～

風穴 彰洋 (筑波大学 生物学類)

指導教員：千葉 智樹 (筑波大学 生命環境系)

◆目的・背景◆

プロテアソームはタンパク質分解を行う巨大な複合体であり、すべての真核生物において高度に保存されている。その中でも26Sプロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を認識して分解することが知られており、これはプロテアーゼ活性を持つ20Sとポリユビキチン鎖を認識する19Sの複合体である。また、19Sの他にも20Sと結合し、タンパク質分解を制御する因子としてPA200、Ecm29などが知られている。

PA200は核に局在してDNA損傷修復に関与していること、精巣においては約90%のプロテアソームがPA200と結合した状態で存在しており、PA200-20S-PA200型やPA200-20S-19Sのハイブリッド型が存在するということが報告されている。また、精子形成時にPA200はアセチル化コアヒストンを認識して分解するということが報告されている。また、精子形成時にPA200はアセチル化コアヒストンを認識して分解するということが報告されている。また、精子形成時にPA200はアセチル化コアヒストンを認識して分解するということが報告されている。

Ecm29に関しては、20S-19Sのアダプターとして機能することや、26Sプロテアソームに結合してATPase活性を抑制することが報告されている。なおEcm29はPA200と同様に精巣において発現量が多いことが先行研究により判明している。

PA200とEcm29はHEAT様リピート配列を有しているという構造的類似性があり、酵母においてBlm10 (PA200のオーソログ)とEcm29の両方を欠失した変異株は、単独変異株よりも高温とカナバニンに対する感受性が高まることが報告されている。したがって、哺乳類においてもPA200およびEcm29が機能的な面で補完的な機能を有している可能性が考えられる。

そこで本研究ではPA200およびEcm29を欠損した二重遺伝子欠損マウスを作製し、その表現型を解析することで、PA200およびEcm29の補完的な機能およびその関連性を解明することを目的とした。まず各単独遺伝子欠損マウスは繁殖可能であったが、PA200およびEcm29の双方を欠いた二重遺伝子欠損マウスは雄性不妊であった。そこで、精子形成や精子成熟を調べるために精巣および精巣上体の組織学的解析を行った。

◆方法・材料◆

●組織固定・パラフィン組織切片作製

Bouin 固定液 (ピクリン酸：ホルマリン：酢酸=15:5:1) または4%PFA/PBS 固定液を用いて精巣および精巣上体を固定し、エタノール脱水、キシレン浸透、パラフィン浸透後パラフィン包埋し、組織切片を作製した。

●PAS 染色

パラフィン組織切片からパラフィンを除去し、過ヨウ素酸とシッフ試薬に反応させ多糖類を染色し、亜硫酸水で洗浄した。ヘマトキシリンで核染色し、顕微鏡で観察した。

●免疫染色

パラフィン組織切片からパラフィンを除去し、抗原賦活化を行い、ブロッキング後、目的タンパク質の1次抗体を反応させた。洗浄後、蛍光物質の結合した2次抗体を反応させ、蛍光像を観察した。

◆結果・考察◆

●PA200とEcm29の二重欠損マウスが雄性不妊である可能性があったため、精巣および精巣上体のパラフィン組織切片を作製し、PAS染色によって観察した。この結果、精巣では一部の精原細胞が欠落し、精巣上体では精子が非常に少ないことが分かった。このことから、PA200およびEcm29はともに精子形成に重要であり、精子形成過程において分解される必要のあるタンパク質を認識して分解する可能性が考えられた。また分解されるべきタンパク質が分解されずに残ることによって精子形成に異常が起こると考えられた。精巣上体において精子が少なかった理由は、精子が形成されなかった可能性のほか、セルトリ細胞が異常な精細胞を貪食した可能性が考えられた。

●増殖細胞マーカーとしてPCNA抗体を用い、精巣の免疫染色を行い、精原細胞を観察した。この結果、精巣においてPCNA陽性の細胞は、二重遺伝子欠損マウスで著しく減少していることが分かった。このため、精原細胞が増殖を止めるまたはアポトーシスを起こした可能性が考えられた。

◆まとめ・今後の展望◆

プロテアソーム制御因子の二重遺伝子欠損マウスについて解析を行った結果、雄性不妊の原因は精巣で精原細胞が減少したためと考えられる。

精子形成には、セルトリ細胞からのエネルギー供給やライディッヒ細胞のホルモン放出などが密接に関与する。そのため、今後はセルトリ細胞やライディッヒ細胞についての解析も行うほか、PA200およびEcm29に共通した基質タンパク質の同定を行い、両因子の機能と関連性を解明する。