174. 精巣型 Prx4 の精子形成過程における役割の解明

本間　拓二郎

山形大学 大学院医学系研究科 生化学分子生物学講座

Key words：Prx4，小胞体ストレス，精子形成

緒　言

酸素は生命維持に必須であるが、過剰な酸化反応は老化の促進や疾患の増悪などの原因となり、負の側面を有する。タンパク質分子が、細胞内に比べて酸化的な細胞外で細胞間の物質運搬や情報伝達に働くためには、システインのチオール（SH）基にジスルフィド結合が正しく形成される必要がある。小胞体は、細胞がタンパク質を分泌する前に酸化的折畳みを行う細胞小器官であり、そこでは ER oxidoreductin 1（Ero1）が酸素を用いて Protein disulfide isomerase（PDI）を酸化し、その後 PDI が分泌タンパク質にジスルフィド結合を導入する。近年、Ero1 に加えて、小胞体に局在する Peroxiredoxin（Prx）ファミリーの Prx4 が、活性酸素シグナルの制御を担うだけではなく、過酸化水素を用いてチオールオキシダーゼとして作用することが分かった。このように Prx4 は、Ero1 の作用で生じた過酸化水素を消去しながらタンパク質の酸化的折畳みを行う抗酸化レドックス因子である。タンパク質の酸化的折畳みに異常を来すと小胞体ストレスが惹起され、それが神経変性疾患や 2 型糖尿病といった疾患の原因となることから、広く注目を集めている。

Prx4 には、全身に発現するタイプの Prx4（＝Prx4 ubiquitous : Prx4u）と精巣特異的 Prx4（＝Prx4 testis : Prx4t）が存在する。我々が所属する研究室で作製された *Prx4u* 欠損マウスの精巣では、性成熟すると高分子の位置に Prx4t の発現が認められることがその後の解析で分かった。これは全身性に発現するプロモーター／エキソン 1 の 5'上流に位置する精巣特異的プロモーター／エキソン 1 から転写が起こり、精巣特異的 Prx4（＝Prx4t）が発現するためである。

全身型 Prx4（Prx4u）のエキソン 1 は疎水性の分泌シグナル配列をコードするが、Prx4t では代わりに親水性の配列をコードし、細胞質／核に局在する。精子形成細胞が精子に分化する過程で、核の中ではヒストンがプロタミンに置き換わり、その後プロタミンのシステインが酸化架橋される。この Prx4t の役割については、小胞体におけるチオールオキシダーゼの観点から、図 2 のように推測している。すなわち、精子形成過程では、クロマチンを構成するヒストンが精巣特異的塩基性タンパク質のプロタミンに置換される。システインをほとんど含まないヒストンと異なり、プロタミンはシステインを大量に含有する。精子形成の過程でこのシステインはジスルフィドに酸化され、それがプロタミンの架橋による精子頭部のパッケージングとクロマチン構造の安定化に働く。このプロタミンの酸化的折畳みに関与する主要な因子は未だ同定されていない。また、Prx4u が小胞体でタンパク質の酸化的折畳みの際にチオールオキシダーゼとして働くのに必要なドメインは精巣型にも保持されていることから、Prx4t も同様にチオールオキシダーゼとしての機能を有すると考えられる。Prx4t がタンパク質の酸化的折畳みに関与し、性成熟した精巣にのみ発現し、核に局在することを考慮すると、Prx4t はプロタミンの酸化的折畳みに関わる可能性がある。*Prx4u* 欠損マウスでは受精能のある精子はできるものの、精子形成が遅れ、その時期は Prx4t の発現に一致することは、この仮説の裏付けとなる。上記で述べたように、Prx4 には全身の細胞に発現する分泌／小胞体型のほかに、精巣型 Prx4（Prx4t）があり、精子形成の過程でヒストンに代わってクロマチンを形成するプロタミンの酸化的折畳みに Prx4t が関与すると考えられる。

そこで、本研究では、Prx4t の精子形成過程における役割を解明することを目的とし検討を行った。

方法および結果

1. CRISPR/Cas9 システムによる *Prx4t* 遺伝子のノックアウトマウスの樹立

C57BL/6N マウス由来の受精卵前核に精巣特異的エキソン 1 を標的とした guide RNA および Cas9 mRNA をインジェクションし、仮親に移植して仔マウスを誕生させた。遺伝子配列解析の結果、標的エキソンの 11 塩基欠損および 1 塩基挿入の *Prx4t* ノックアウトマウスを樹立した。以下、それぞれ Line 37 および Line 38 とする。

2. 精子数と精子機能の比較

まず、精子形成能について検討するために、性的に成熟した約 12 週齢のマウスの精巣上体尾部より採取した精子数を測定した。その結果、野生型（WT）マウスと *Prx4t* 欠損マウス（Line 37、Line 38）の精子数に差は認められなかった（図 1A）。また、同様に、体重当たりの精巣重量を測定した結果、有意な差は認められなかった（図 1B）。

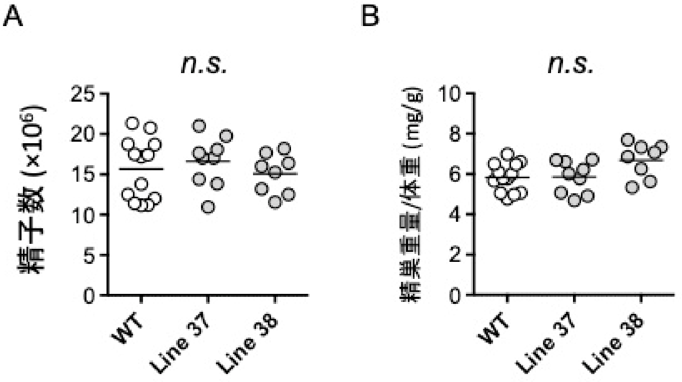

図 1. 精子数と精子機能の比較

野生型（WT）マウスおよび *Prx4t* 欠損マウス（Line 37、Line 38）での（A）精子数 および（B）体重当たりの精巣重量を測定した。図中の丸はマウス各個体を示す。多重比較 （Tukey's test）において有意な差は認められなかった。n.s., not significant.

次に精子の受精能が低下している可能性を考え、*in vitro* における受精実験により、精子の受精能を評価した。野生型と *Prx4t* 欠損の雄マウス（約 12 週齢）の精巣上体から精子を採取し、野生型の雌マウス（約 12 週齢）から得た卵子と体外受精（IVF）を行った。その結果、雄マウスの遺伝子型で受精率（2 細胞率）の差は認められなかった（図 2）。

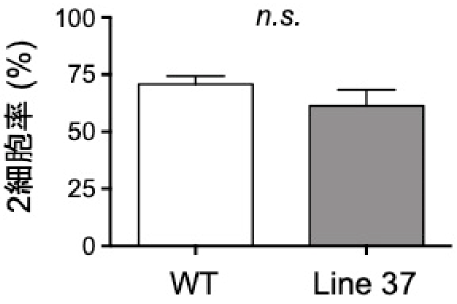

図 2. *Prx4t* 欠損による体外受精（IVF）への影響

野生型（WT）マウスおよび *Prx4t* 欠損マウス（Line 37）由来の精子を用いて体外受精を行った（各 n = 5）。スチューデントの t 検定において有意な差を認めなかった。n.s., not significant.

3. 野生型と*Prx4t*欠損マウスの生殖能力に関する検討

また、*Prx4t*欠損が雄マウスの生殖能力に個体レベルでどのような影響を与えるかを検討した。野生型と*Prx4t*欠損雄マウス1匹に対して約12週齢の野生型の雌マウス1匹を1週間同居させた後、雄マウスを隔離した。その後、雌マウスから生まれる産仔数を測定し、雄マウスの生殖能力を評価した。その結果、産仔数に有意な差は認められなかった（図3）。

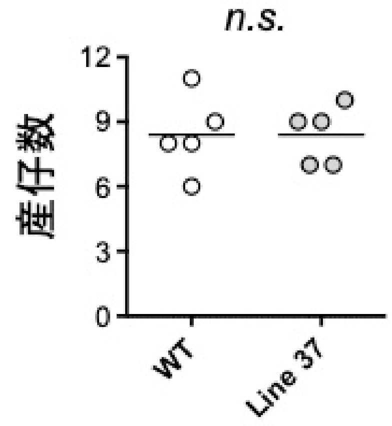

図3. *Prx4t*欠損によるマウス産仔数への影響

野生型（WT）および*Prx4t*欠損雄マウス（Line 37）と野生型雌マウスを交配させ、産仔数を算出した（各n＝5）。図中の丸はマウス各個体を示す。スチューデントのt検定において有意な差を認めなかった。n.s., not significant.

考　察

IVFの結果から、*Prx4t*欠損マウスの精子はほぼ正常に機能することが示された。また、個体レベルでも*Prx4t*遺伝子の欠損による生殖能力の異常を認めなかった。

近年、Prx4tを培養細胞で過剰発現させると主に細胞質に局在し、抗酸化機能の亢進が認められたという報告がなされた［1］。しかしながら、*in vivo*での保護効果の有無は明らかではない。今後は、樹立した*Prx4t*ノックアウトマウスを用いて生殖毒性モデルを構築することにより、Prx4tが精巣における各種ストレスに対して保護的に機能するかどうかについて検討する必要がある。

共同研究者・謝辞

*Prx4t*欠損マウスは、山形大学動物実験委員会および遺伝子組換え実験安全委員会の承認のもと、山形大学遺伝子解析センターにて樹立を行った。また、本研究の共同研究者は、山形大学大学院農学研究科生殖生物学・動物生殖工学分野の木村直子教授である。

文　献

1） Tasaki E, Matsumoto S, Tada H, Kurahashi T, Zhang X, Fujii J, Utsumi T, Iuchi Y. Protective role of testis-specific peroxiredoxin 4 against cellular oxidative stress. J Clin Biochem Nutr. 2017 May;60(3):156-161. Epub 2017 May 1. PMID: 28584396 DOI: 10.3164/jcbn.16-96.