Osaka University Knowledge Archive

Title	PGAP1 Knock-out Mice Show Otocephaly and Male Infertility
Author(s)	植田, 康敬
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49014
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【25】

氏　　名	植　田　康　敬（うえだ やすたか）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２１８１５　号
学位授与年月日	平成 20 年３月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学　位　論　文　名	PGAP1 Knock-out Mice Show Otocephaly and Male Infertility （PGAP1 ノックアウトマウスは耳頭症と雄性不妊を示す）
論文審査委員	（主査） 教　授　木下タロウ （副査） 教　授　岡田　雅人　　教　授　竹田　潤二

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

多くの細胞で Glycosylphosphatidylinositol（GPI）のイノシトール部分に付与されたパルミチン酸は、GPI に蛋白が結合した後すぐに小胞体で除去される。以前我々はこのパルミチン酸を除去する酵素として PGAP1（Post GPI Attachment to Proteins 1）を同定した。PGAP1 の欠損は Chinese hamster ovary cell（CHO cell）において GPI アンカー型蛋白（GPI-APs）の小胞体から細胞表面への輸送を遅らせるが、細胞表面での発現量自体は正常であった。にもかかわらず、ほとんどの細胞で GPI-APs はそのパルミトイル基が除去される。その生理学的な意義を調べるため、PGAP1 ノックアウトマウスを作成し解析を行った。

〔　方法ならびに成績　〕

Homologous recombination により PGAP1 を欠失させた embryonic stem cell を野生型マウス blastocyst に移植し、キメラマウスを作成した。このキメラマウスを野生型マウスと交配することでヘテロマウスを得、ヘテロマウス同士を交配することで PGAP1(－/－) マウスを得た。PGAP1(－/－) マウスは末梢血細胞上の GPI-APs の phosphatidylinositol-specific phospholipase C に対する抵抗性から、PGAP1 を欠損し、GPI のアシル基が残存していることが確認できた。交配により得られたマウス genotype は、メンデル法則から予測される数と大きく異なっていた（PGAP1＋/＋PGAP1＋/－：PGAP1－/－＝55（26%）：122（57%）：36（17%））。PGAP1(－/－) マウスの多くは周産期致死を示し、その半数以上には顔面形成異常である耳頭症（otocephaly）が認められた。36 匹中生き残った５匹の PGAP1(－/－) マウスは成長の遅延を示したが、血液検査や一般的な行動での異常は認められなかった。

オスの PGAP1(－/－) マウスを野生型のメス C57 BL/6 J マウス３匹と８週間交配したところ、膣栓の形成にもかかわらずメスを妊娠させることが出来なかった。そこで野生型メスマウスを過排卵状態にし、オス PGAP1(－/－) マウスのメス性器内への射精を確認した２時間後に子宮・卵管移行部を４％ paraformaldehyde で固定し、凍結切片を作成、hematoxylin と eosin で染色後観察した。野生型オスマウスとの交配ではメスの子宮内、子宮から輸卵管への移行部（uterotubal junction）共に精子の存在が確認できたが、PGAP1(－/－) マウスとの交配では子宮内に多量の精子が存在するにもかかわらず、uterotubal junction 内には精子が認められなかった。次に精子と卵の透明帯への in

vitro での付着実験を行ったところ、PGAP1(−/−) マウスの精子はほとんど透明帯に付着しなかった。これらのことから雄性不妊の原因は PGAP1(−/−) マウスの精子が輸卵管を上昇できないことと、卵が透明帯に付着できないことによることが分かった。Calmegin、ADAM1a (fertilin α)、ADAM2 (fertilin β)、ADAM3 (cyritestin)、testis-specific ACE のノックアウトマウスが同様の雄性不妊を示すことから、精子に於けるこれらの蛋白の発現の有無を Western blotting にて確認した。PGAP1(−/−) マウスの精巣と精巣上体の精子いずれに於てもこれらの蛋白の発現はほぼ正常であったが、精巣上体の精子では GPI-APs である CD55 と CD52 の発現が野生型の精子に比べて増大していた。精子と透明帯の付着を阻害する何らかの GPI-APs が精子上に増加した、あるいは除去されなかった可能性が示唆された。

〔 総　　括 〕

PGAP1 ノックアウトマウスの多くは周産期致死を示し、一部の生き延びたものは成長の遅延は示すもののほぼ正常に発育した。このうちオスのノックアウトマウスは不妊であった。これは精子が子宮より輸卵管に上れないことと、精子が卵の透明帯に付着できないことによるものであると考えられた。その分子メカニズムは今後の研究が待たれるところであり、ホモのノックアウトマウス精子の、精巣上体における一部 GPI アンカー型蛋白の発現増加との関連についても検討が必要である。GPI アンカーの切断が精子の妊性獲得に重要であるという報告もあり、PGAP1 ノックアウトマウスにおけるパルミチン酸の残存が GPI アンカー型タンパクの精子上における分布や機能に影響を与えた可能性が示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

GPI アンカーはその生合成の過程でフォスファチジルイノシトールにパルミチン酸が結合するが、蛋白が GPI アンカーに結合した直後に除去される。この酵素として PGAP1 が同定されており、ほとんど全ての細胞上で GPI アンカーは脱アシル化された状態で発現している。その生理学的な意義を解析するために申請者は PGAP1 ノックアウトマウスを作成、解析した。結果 PGAP1 ノックアウトマウスには耳頭症（otocephaly）を伴う周産期致死が見られ、生存したノックアウトマウスにも成長遅延と雄性不妊を認めた。GPI アンカーのアシル基の違いが胎児の発生に影響した可能性を示し、GPI アンカー型タンパクの発現量増加の雄性不妊への関与が示唆された点で、本研究は学位に値するものと考えられる。