

蛋白リン酸化酵素 P A S K 欠失マウスの性状解析

宇城啓至

Characterization of Protein Kinase PASK-deficient Mouse

Hiroshi USHIRO

1 はじめに

蛋白リン酸化酵素は、人間の細胞でも数千種類存在する一群の酵素であり、ATPのリン酸基を各々の酵素に応じた蛋白質に結合させるはたらきをもつ。蛋白質はリン酸化されることで活性化されたり抑制されたりするので、蛋白リン酸化酵素は細胞の機能制御において謂わばスイッチの役割をはたしている。蛋白リン酸化酵素PASKはそのうちの一つであるが、ほかの酵素にはみられない特徴的な組織分布を示し、脳の脈絡叢上皮細胞や胃底腺壁細胞など、電解質輸送の活発な細胞に強く発現している(1)。このような特徴から、PASKは体液のイオン組成の調節に関与している可能性が考えられている。

PASKの生理的な機能はまだはっきりと分かっていないが、PASKがF-アクチン結合能をもち、高温や高張NaClなどの細胞ストレス刺激に応じて、PASKがサイトゾルから細胞骨格画分へ移行することから、細胞ストレス応答時の細胞骨格制御に関与していることが考えられている(2)。一方、PASK(SPAKとも呼称されているを)が、ナトリウムイオン、カリウムイオン、塩素イオンの輸送に関わるNa-K-2Cl共輸送体(NKCC1)に結合して、その機能を制御していることが最近明らかにされ(3)、PASKが細胞のかたちとイオン濃度の調節に関与している可能性が示唆されている。

PASKの生理的な機能を知るためには、PASKによってリン酸化される標的蛋白質を明らかにし、リン酸化された蛋白質の機能がどのように制御されるかを明らかにすることがもっとも重要である。しかしながら、そのような標的蛋白質を同定すること

は困難なこともあり、また、生体内では組織によって異なる蛋白質と相互作用することもある。そこで、著者らは遺伝子ターゲティング法によってPASK遺伝子を破壊し、PASKを欠失したマウスにどのような異常が現れるかを解析して、PASKの生理的な機能を明らかにすることを試みている。本稿では、PASK欠失マウスにみられた、オス生殖能の低下について報告する。

2 PASK欠失マウスの作成

PASK欠失マウスの作成は、図1に示すように行った。PASKのキナーゼドメイン中のaとbの部分ペプチドに対応するエキソン近傍の遺伝子をクローニングし、エキソンaの中ほどにネオマイシン耐性遺伝子を挿入したターゲティングベクターを作成した。このベクターDNAをマウス胎生幹細胞(ES細胞)に取り込ませ、図1B下段のように遺伝子組換えを起こした細胞を選別した。

選別した変異ES細胞を正常マウス初期胚に注入して、ES細胞と野生型細胞が混じったキメラマウスを発生させ、その成長後、正常マウスと交配させた。ES細胞が精子に分化した個体では、変異遺伝子が次世代(F1)に伝えられるので、F1マウスDNAのサザンブロッティングを行い、変異遺伝子をうけ継いだマウスを選別した(図2A)。ホモ変異体は、ヘテロ変異体同士の交配から四分の一の確率で生まれ、遺伝子が破壊されてPASK蛋白を発現していないことが期待される。そこで、図2Bに示すように、それぞれの精巣から蛋白を抽出してウェスタンブロットにて解析し、PASK変異遺伝子ホ

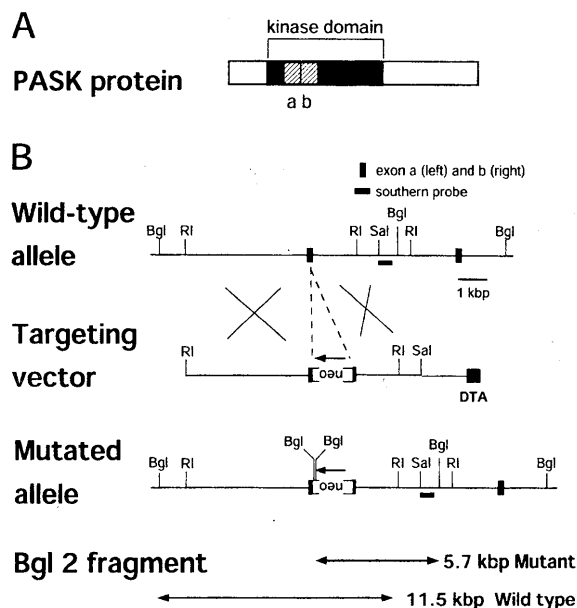


図1. 遺伝子ターゲティングによるマウス PASK 遺伝子の破壊. A, PASK 蛋白構造の模式図. a と b はキナーゼドメイン (黒塗り) 中の部分ペプチド. B, 遺伝子ターゲティングの方法. a と b ペプチドに対応するエクソン近傍の染色体遺伝子 (上段) と, エクソン a の真ん中にネオマイシン耐性遺伝子 (neo, 矢印の向きが mRNA に転写される方向) を挿入させた変異遺伝子導入用ベクター (中段), 変異が導入され PASK 遺伝子が破壊された遺伝子 (下段) の構造を示している. Bgl, RI, Sal は, それぞれ制限酵素 Bgl II, EcoRI, Sal I によって切断される箇所. 黒四角のサザンプローブを使って Bgl II で消化した染色体 DNA のサザンブロットを行うと, 野生型遺伝子をもつもの 11.5 kbp (キロ塩基対) の DNA 断片が検出されるが, 変異型遺伝子をもつものでは 5.7 kbp の断片が検出される.

モ接合体の個体はたしかに PASK 蛋白を欠失していることを確認した.

動物実験では, 個体差による実験結果のばらつきを抑えるため, 個体間の遺伝的な違いがほとんど無い純系マウスを用いるのが普通である. 本研究でも C57BL/6 系統のマウスを使っているが, ES 細胞が別系統のマウス由来であるので, マウスの遺伝的背

景を C57BL/6 マウスにそろえておく必要がある. 具体的には, ヘテロ変異 F1 個体を C57BL/6 純系マウスとくり返し交配させる戻し交配 (backcross) を 10 回行えば, 遺伝的に均一とみなしてよいとされている. 今回の報告は, 実質的に均一とみなしてよいとされている, 8 回戻し交配後の F1 個体同士を交配させて生まれた F2 個体によるものである.

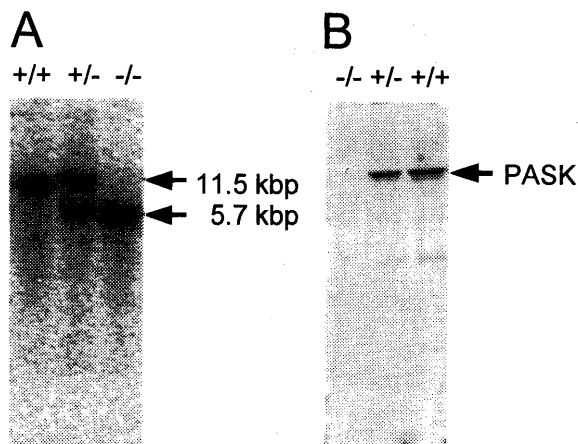


図2. サザンブロッティング (A) とウェスタンブロッティング (B). A, マウス尾 DNA を制限酵素 Bgl II で消化し, 図1に示したプローブ DNA を 32 P 標識してサザンブロッティングを行った. B, 抗 PASK 抗体を用いて, マウス精巣蛋白のウェスタンブロッティングを行った. +/+, 野生型マウス; +/-, ヘテロ変異マウス; -/-, ホモ変異マウス.

3. PASK 欠失マウスの性状

離乳時の 21 日齢 PASK 欠失マウスは体重 5.63 g (± 0.85 g) で, 野生型マウスの体重 7.25 g (± 0.81 g) よりも小さかった. しかし, 離乳後の成長には差が無く, 20 週齢では, PASK 欠失マウスと野生型マウスの体重差はみられなかった.

臓器の重量では一部の臓器に差がみられ, PASK 欠失オスマウスの精巣, 心臓, 腎臓, 精巣上体, 脳の重量が, 野生型マウスに比べて, それぞれ 27%, 16%, 10%, 9%, 8% 小さかった. メスマウスでも, 心臓, 腎臓, 脳の重量に同様の差がみられた. しかしながら, ヘマトキシリン・エオジンで染色した組織切片では, PASK 欠失マウスと野生型

表1. オス生殖能試験.

オス 遺伝子	例 数	平均 出産数	平均 仔数
-/-	5	2.2	9.5
+/+	3	5.0	9.0

8～20週齢のオスマウスをメスマウスと20週間交配させた. 繁殖ケージを毎日モニターし, 出産回数と仔数を記録した.

マウスの間に大きな差はみられなかった.

オスの生殖能試験を行ったところ, 5匹のPASK欠失マウスのうち2匹は雄性不妊を示し, 20週間の交配期間中メスマウスをはらまえることができなかった. 残りの3匹のPASK欠失マウスでは, 観察期間中, それぞれ1回, 4回, 6回の出産がみられた. その間, 野生型のオスの繁殖ケージでは, それぞれ4回, 5回, 6回の出産がみられた. 表1には平均した数値を示したが, PASK欠失によって, 極端に生殖能の低下したオスマウスが生じることが明らかとなった.

PASKは精巣に強く発現しており, PASK欠失によって精巣が30%弱萎縮していたこと, また, 男性ホルモンの細胞内シグナル伝達経路に関与している(4)という報告もあり, PASKが精子形成に関与している可能性がある. しかしながら, 雄性不妊を示したPASK欠失マウスの精巣組織切片であっても, 野生型オスマウスの精巣との違いは顕著でなく, 精子の形成もみられた. したがって, PASK欠失オスマウスにみられた雄性不妊は, 精子形成以外の異常による可能性もある. PASKは精巣上体管にも強く発現していることから, 精液組成に異常がある可能性もあり, さらに, 性行動が異常である可能性も考えられる. そこで, 今後, 生殖試験時の行動の観察もふくめて, PASK欠失による生殖能の低下の原因を探っていきたい.

図3は, PASKを強く発現している組織を文献5にまとめたものを再掲した. 今回, 精巣の他に心臓, 腎臓, 脳がPASK欠失によって有意に小さくなったという結果が得られた. 心臓と腎臓, 脳は, 精巣に次いでPASK含有量が多い臓器であること(1)を考えると, オスマウスの生殖能低下と同様

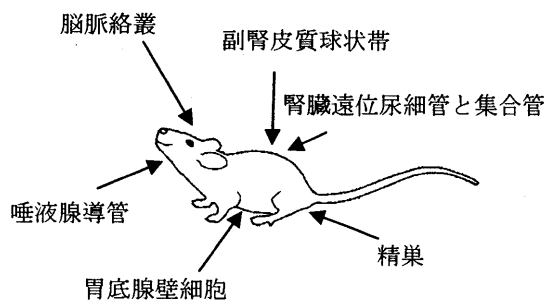


図3. PASKの組織分布 (文献5から).

に, それらの機能を精査すれば, 何らかの異常が見つかる可能性がある.

4. おわりに

PASK欠失マウスでは, 精巣, 心臓, 腎臓, 精巣上体, 脳が小さく, 半数の個体で雄性不妊となることを述べた. PASK欠失によって生殖能の異常が出現する機構は明らかではなく, 今後, より多くの例数にあたって雄性不妊の頻度を確定し, その原因を明らかにしたい.

5. 文献

1. Ushiro, H., Tsutsumi, T., Suzuki, K., Kayahara, T., and Nakano, K. (1998) *Arch. Biochem. Biophys.* 355, 233-240
2. Tsutsumi, T., Ushiro, H., Kosaka, T., Kayahara, T., and Nakano, K. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 9157-9162
3. Piechotta, K., Lu, J., and Delpire, E. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 50812-50819
4. Qi, H., Labrie, Y., Grenier, J., Fournier, A., Fillion, C., and Labrie, C. (2001) *Mol. Cell. Endocrinol.* 182, 181-192
5. 宇城啓至 (2006) 三重短大紀要 54, 9-12