

学位論文（博士）

Testicular localization of activating transcription factor 1
and its potential function during spermatogenesis

(精子形成過程における活性化転写因子 1 の精巣内
局在と機能の検討)

氏名 田原 正則

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 泌尿器科学講座

令和 3 年 12 月

目 次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	3
3. 目的	3
4. 方法	4～7
(1) 対象	4
(2) 方法	4～7
(3) 解析	7
5. 結果	7～9
6. 考察	9～12
7. 結語	13
8. 謝辞	13
9. 参考文献	13～16

1. 要旨

活性化転写因子 1 (ATF1) は、CREB/ATF ファミリーの転写因子に属し、精巣で高発現している。しかし、精子形成における ATF1 の役割は未だ確立されていない。本研究では、精子形成における ATF1 の影響を解明することを目的として、マウスにおける ATF1 の発現パターンとマウス精巣における ATF1 ノックダウンの影響を調べた。その結果、ATF1 はさまざまな臓器で発現しており、精巣では非常に高いレベルで発現していることがわかった。免疫染色により、ATF1 は spermatogonia の核に局在し、増殖細胞核抗原 (PCNA) と共局在することがわかった。ATF1 欠損マウスでは、精巣の精細管にはすべての発生段階の細胞が存在していたが、spermatocyte 以降の分化段階の細胞数は減少していた。同様に PCNA の発現が低下していた。一方で、精細管におけるアポトーシス細胞はほとんど見られなかった。これらの結果は、ATF1 が男性生殖細胞の増殖と精子の生成に関与していることを示している。また、男性不妊症における乏精子症、無精子症の発症機序解明の可能性を示唆した。

2. 研究の背景

精子形成の細胞増殖と分化は、spermatogonia が一倍体の精子へと変化するように行われる。この分化過程には、有糸分裂、減数分裂、形態変化など様々な変化が伴う。精細管基底層では、spermatogonia が有糸分裂し、spermatocyte が減数分裂し、spermatid が成熟した精子へと形態変化する。spermatogonia の自己複製から成熟精子形成までの過程は、様々な遺伝子や転写因子、さらには熱ショック転写因子 (HSF) や熱ショックタンパク質 (HSP) などのシャペロンによって厳密に制御されている [1-4]。それにより質の高い精子が繰り返し大量に生産される。このプロセスは、さまざまなストレス因子や変異によって損なわれて変化するため、当研究室ではさまざまなストレスから細胞を守る HSF1 や HSP の役割に注目してきた [1, 2, 4]。

哺乳類の CREB/ATF ファミリーは、bZIP 転写因子群に属し、細胞のホメオスタシス維持やさまざまなストレス条件への対応など、多様な生理機能を持つ [5, 6]。このファミリーのメンバーは、cAMP 応答要素 (CRE) に結合し、複数の遺伝子の制御を調整している [7, 8]。CREB/ATF ファミリーには、ユビキタスに発現するメンバーと組織特異的に発現するメンバーが存在し、後者は細胞特異的な遺伝子転写パターンを制御する。CREB は、精巣を含む様々な組織において cAMP の標的としてよく知られており、生殖細胞の適切な分化に不可欠な遺伝子の転写を活性化する [9]。このファミリーのメンバーである cAMP responsive element modulator (CREM) は精巣で高発現しており、減数分裂後の遺伝子の転写活性化を介して精子形成に必要である [10]。卵形成においては、CREB は卵巣細胞の増殖、アポトーシス、ステロイドホルモン分泌の制御に関与しているが [11]、CREM の特異的な機能は確立されていない [9]。

CREB/ATF ファミリーに属する活性化転写因子 1 (ATF1) は精巣で高発現している。ATF1 は、細胞の生存、増殖、および腫瘍形成を促進する [12-14]。我々は、マウス胚性線維芽細胞を用いて、ATF1、HSF1、および HSP70 の関係を報告 [15] しており、ATF1 は HSF1 の転写複合体形成や熱ショック条件下での HSP70 の誘導に影響を与えることを示している。ATF1 は精巣で高発現しており [16]、HSP は正常な精子形成に必要である [3, 17, 18]。以上より、ATF1 は、HSP 発現および精子形成との関連が予想されるにもかかわらず、ATF1 欠損マウスの精巣特異的表現型は不明である。

3. 目的

本研究では、ATF1 KO マウスを用いて ATF1 の恒常条件下での機能を明らかにし、正常な精子形成における ATF1 の機能を明らかにすることである。

4. 方法

(1) 対象

ATF1(-/-)マウスは、German Cancer Research Center Public Law Foundation から購入し、C57Bl6J と 6 世代にわたって戻し交配した。ATF1 KO マウスの遺伝的背景は、Bleckmann らによって報告されている[16]。彼らは、deletion vector strategy を用いて、胚性幹 (ES) 細胞の ATF1 遺伝子を破壊した。この欠失により、遺伝子が破壊され、プロテインキナーゼ A ドメインとロイシンジッパードメインの両方のコード情報 (cDNA 配列の 200 残基から 1380 残基) が削除された。ATF1(+/+)マウスおよび ATF1(-/-)マウスは、12 時間の明暗サイクル (08:00 から 20:00 まで点灯) のもと、24°C で標準的なケージに収容し (1 ケージあたり $n < 10$)、水と標準的なげっ歯類用の飼料を与えた。

(2) 方法

臓器の準備

マウスは 1、2、4、6、8、10、12 週齢で頸椎脱臼により安楽死させた。脳、心臓、筋肉、肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣を摘出し、結合組織と脂肪織を除去した。ウエスタンブロッティングのために、これらの臓器を直ちに液体窒素で凍結し、さらに処理するまで -80°C で保存した。出生後の ATF1 発現推移を評価する場合を除き、8 週齢のマウスを使用し実験を施行した。

免疫染色および蛍光免疫染色のために、マウス精巣を Bouin 固定液を用いて 24°C で 24 時間固定し、パラフィンに包埋した。これらの研究には、2 週齢マウスの免疫化学的解析を除き、すべて 8 週齢マウスを使用した。

ウエスタンブロッティング

CREB/ATF ファミリーメンバーの臓器発現を確認するために、ATF1(+/+)マウスと ATF1(-/-)マウスをそれぞれ 1 匹ずつ使用した。精巣における CREB/ATF ファミリーメンバーの発現推移を確認するために、マウス精巣が小さかったため、1~2 週齢の 5 匹のマウス精巣ホモジネート液を使用し、4~12 週齢のマウスの場合は、1 匹のマウス精巣ホモジネート液を使用した。HSP の発現を確認するために、それぞれ 4 匹のマウス臓器を用いた。マウス組織のホモジネート液は、RIPA バッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM sodium chloride、0.5 w/v% sodium deoxycholate、0.1 w/v% sodium dodecyl sulfate、and 1.0 w/v% NP-40 substitute) をプロテアーゼ阻害剤 (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、1 μ g/mL leupeptin、and 1 μ g/mL pepstatin) を含む溶液に入れ、13,200 \times g で 10 分間遠心分離した。上清を分離し、再び 70,000 \times g で 10 分間遠心分離した。上清中のタンパク質濃度を Bradford 法で測定した。タンパク質サンプルを 1M ジチオスレイトールとともに 95°C で 10 分間インキュベートした。等量の可溶性タンパク質 (20~300 μ g/lane) を 10%または 12%アクリルアミドゲルに載せ、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、水槽システムでニトロセルロース膜に転写した。転写した膜は、5%ミルク PBS で 30 分間ブロッキングし、ATF1、CREB、CREM、HSP110、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40、 β -アクチンの一次抗体と 4°C で一晩インキュベートした (抗体の詳細は補足抗体表 S1 に記

載)。β-アクチンは内部コントロールとして、HSP60 はタンパク質がロードされていることを確認するために使用した。免疫特異的バンドは ImageJ (バージョン 1.51; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて定量した。定量値は、β-アクチンを用いて補正した。

組織染色、免疫染色、蛍光免疫染色

サンプルの準備

パラフィン包埋切片を 3μm または 5μm の厚さで作成し、脱パラフィン後、キシレンとアルコールで再水和した後、組織染色、免疫染色または蛍光免疫染色を行った。組織染色または免疫染色のための対比染色は、ヘマトキシリンまたは PAS-H 染色を用いて行った。

ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色

再水和した切片を、Mayer's hematoxylin で 25°C で 1 分間インキュベートした後、流水で 1 分間洗浄した。その後、エオシン Y で 5 分間インキュベートし、流水で 5 分間洗浄した。

PAS-H 染色

再水和した切片または免疫染色した切片を、0.5%過ヨウ素酸中で 25°C で 10 分間インキュベートした後、流水で 10 分間洗浄した。その後、Schiff 試薬で 15 分間インキュベートし、流水で 10 分間洗浄した後、Mayer's hematoxylin で 1 分間染色した。

免疫染色および蛍光免疫染色

免疫染色および蛍光免疫染色には、再水和した切片を用い、内因性ペルオキシダーゼを 3%過酸化水素で 10 分間ブロックした。クエン酸緩衝液 (pH6.0) 下にマイクロ波で煮沸し、抗原の賦活化を行った。IMMUNO SHOT (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) でブロックした後、ATF1 および PCNA に対する一次抗体と 4°C で一晩インキュベートし、続いて二次抗体 (抗体の詳細は補足抗体表 S1 に記載) と 30 分または 60 分インキュベートした。免疫染色では、3, 3'-ジアミノベンジジン (Cat# 415172; Nichirei Biosciences) で検出を行い、切片を Mayer's hematoxylin または PAS-H 染色で 1 分間対比染色した。画像は、免疫染色には正立顕微鏡 (BX51; Olympus, Tokyo, Japan) を、免疫蛍光には共焦点顕微鏡 (LSM510, META; Zeiss, Jena, Germany) を用いて撮影した。

また、アポトーシス細胞を検出するために、TUNEL 染色を行った。Apoptosis In Situ Detection Kit (No. 293-71501; Wako, Osaka, Japan) を用いて、製造者の指示に従ってアポトーシス細胞を検出した。

定量的組織学的解析

5μm の PAS-H 染色パラフィン切片 (組織染色および免疫染色) において、近似の円として観察される精細管を、精子形成サイクル内の細胞分化段階に応じて germinal stage (I-XII) 分類した。精細管内の生殖細胞は、spermatogonia、preleptotene spermatocyte、leptotene spermatocyte、zygotene spermatocyte、pachytene spermatocyte、diplotene spermatocyte、meiotic division phase、round spermatid と spermatozoa として同定した。germinal stage および精細管内の生殖細胞の同定は、Ahmed ら [19] の記載に従って行った。切片は 2~4 枚のスライドで観察し、スライド間は少なくとも 100 μm 離れた断面を使用した。ATF1 の免疫染色と PAS-H 染色を行

った後、4つの ATF1(+/-)マウス精巣において、germinal stage I、VI、VIII、X、XIIの精細管を10個ずつ同定した。各精細管でATF1陽性細胞を計測した。PCNAの染色とPAS-H染色した後、ATF1(+/-)マウスとATF1(-/-)マウスの精巣各10個について、精管の生殖段階を3つのグループ(germinal stage VII-VIII、IX-X、XI-XII)に分類した。各グループでは、10個の精細管を評価し、PCNA陽性細胞を計測した。germinal stage I-VIではPCNA陽性細胞数が大きく変動するため、これらのgerminal stageは除外した。PAS-H染色にてgerminal stageを4つのグループ(germinal stage I-VI、VII-VIII、IX-X、XI-XII)に分類し、精細管内細胞数を計測した。各グループでは、ATF1(+/-)マウスとATF1(-/-)マウスの精巣をそれぞれ10個ずつ評価し、精細管内のspermatocyteとspermatidを計測した。内部コントロールとして、germinal stage Iのspermatogoniaを計測した。

精巣上体精子数と精子形態

精子溶液の調製

精巣上体精子分析のために、8週齢のマウスの精巣上体を分離した。精子濃度と運動性評価のために精巣上体より切除した精巣上体尾部を、37°CのTYH溶液(248238; LSIメディエンス、東京、日本)1.5mLの中で、形態解析のためにPBS1.0mLの中で、細断した[20]。この溶液を懸濁し、37°Cで5分間インキュベートした。溶液を再度懸濁し、80 μ mのナイロンメッシュでろ過した。

精子濃度と運動性の評価

ATF1(+/-)マウスおよびATF1(-/-)マウスそれぞれについて10個の精巣上体尾部の精子溶液を作成した。Makler counting chamberを用いて、各スライドを200倍に拡大して精子濃度と運動性を測定した。運動精子と非運動精子をすべてのグリッドでカウントした。カウントは各2回、各精子溶液について3回行った。濃度と運動性の算出には平均値を用いた。精子の濃度は、1mlあたりの精子数で表し、精子の運動性は、全精子に対する運動精子の割合で表した。

精子形態の評価

ATF1(+/-)マウスおよびATF1(-/-)マウスについて、6個の精巣上体尾部の精子溶液を作成した。精子溶液1滴を顕微鏡スライドに絞り出し、風乾させた。サンプルを99.8%メタノールで固定し、エオシンYで染色した。精子の形態は、各スライドについて400倍の倍率で少なくとも1000個の精子細胞について正常または異常[21]として検出した。

妊孕性評価

ATF1(+/-)およびATF1(-/-)の雄の生殖能力を評価するため、8週齢のATF1(+/-)およびATF1(-/-)の雄マウス5匹を、それぞれ2匹のATF1(+/-)の雌と3ヶ月間交配した。3ヶ月間の交配期間において、各雄グループが産んだ子孫の数を評価した。

マウス精巣の熱ストレスによる影響の評価

マウスに25mg/kgのソムノペンチル(共立製薬株式会社、東京、日本)を腹腔内注射して麻酔し、陰嚢部を43°Cの水浴に15分間浸した。熱ストレスの0、1、3、5、7時間後に精巣を取り出し、液体窒素で凍結し、精巣におけるHSP70の発現をウエスタン

ブロットイングで評価した。精巢上体精子数の変化は、熱ストレス後の4週間と8週間に行った。

Animal study approval

すべての動物実験は、動物の人道的治療に関する国のガイドラインに従って実施され、山口大学の施設内動物管理使用委員会（IACUC）によって承認されました。

(3) 統計

得られたデータは平均値±標準誤差で表した。統計解析は SPSS 12 ソフトウェア（SPSS、Chicago、IL、USA）を用いて行った。2群間の比較は、対応のない Student-t 検定を用いて行った。p<0.05 の値を有意と判定した。

5. 結果

(1) 各種臓器および出生後の発達過程における ATF1 の発現

ATF1 は、脳、心臓、肺、脾臓、精巢に発現しており、その発現量は脾臓と精巢で他の臓器よりも高かった（図 1A）。肝臓では ATF1 の弱い発現が検出されたが、腎臓では検出されなかった。CREB は、脳、心臓、肺、脾臓、精巢に発現していた。CREB の発現レベルは肺と脾臓で高かったが、ATF1 (+/+) マウスと ATF1 (-/-) マウスの精巢では低レベルの発現であった。CREM は精巢で発現していた。ATF1 (+/+) マウスの精巢と ATF1 (-/-) マウスの精巢では、CREB と CREM の発現量に明らかな違いは認めなかった（図 1A）。ATF1、CREB、CREM の出生後発現量の推移を調べた（図 1B）。ATF1 の発現量は1週齢のマウスで最も高く、週齢とともに減少し、8週齢以降は一定であった。CREB の発現は、ATF1 と同様に1週齢から検出されたが、徐々に減少し、8週齢以降は極端に少なくなった。CREM のアイソフォームの発現は、過去に示されている通り [22]、生後2週間から生後4週間にかけて増加した。

(2) ATF1 と HSP の関係性

HSP70 の誘導は HSF1 と ATF1 によって密接に制御されている [15] ため、ATF1 の発現に関連して、主要な HSP の発現レベルの変化をウエスタンブロットイングで調べた。精巢と脾臓では、ATF1 の発現が著しく高かったものの、ATF1 (+/+) マウスと ATF1 (-/-) マウス間では、HSP の発現レベルに違いは見られなかった（図 2）。一部を除いて他の臓器では、脾臓や精巢と同様に HSP の発現量に違いを認めなかった（data not shown）。しかし、肝臓の HSP40 レベルと腎臓の HSP110 レベルは、ATF1 (-/-) マウスが ATF1 (+/+) マウスに比べ有意に高い発現を示した（それぞれ p < 0.01、p < 0.01）（図 2）。これらの結果は、ATF1 が恒常条件下において HSP の発現に影響を与えていることを示した。

(3) ATF1 の局在

ATF1 (-/-) が精子形成に及ぼす影響を調べるため、肉眼および顕微鏡下での分析を行った。ATF1 (-/-) 雄マウスは正常な精細管構造を示したが（図 3A、B）、ATF1 (-/-) マ

ウスの精巣と精巣上体の重量は、ATF1(+/+)マウスに比べて有意に低かった（それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ ）（表 1）。精巣重量の体重補正後も同様のパターンが見られた（data not shown）。精巣切片の HE 染色では、ATF1(+/+)マウスと ATF1(-/-)マウスの間で、生殖細胞の分化、germinal stage、精細管の直径と厚さに明らかな違いは見られなかった（図 3C、D）。精巣における ATF1 の局在を評価するため、ATF1 の免疫染色を行った。ATF1(+/+)マウスの精管の基底層には、2 週齢と 8 週齢の両方で ATF1 陽性細胞が検出されたが（図 3E、G）、ATF1(-/-)マウスでは検出されなかった（図 3F、H）。セルトリ細胞、ライディッヒ細胞、その他の精巣体細胞の細胞質に非特異的染色が認められた。セルトリ細胞、ライディッヒ細胞、その他の精巣体細胞における ATF1 の免疫染色では、ATF1(+/+)マウスと ATF1(-/-)マウスの精巣の間に違いは見られなかった。結論として、ATF1 は若い精巣と成体の精巣で発現しており、ATF1 陽性細胞の分布は両世代で同様であった。精管内の局在と形態的特徴から、ATF1 は A 型、中間型、B 型 spermatogonia 核に発現していた（図 3I-N）。

(4) ATF1 の germinal stage 依存的発現

ATF1 の germinal stage 依存的な発現を評価するために、免疫染色を行い、germinal stage 判別後、精細管内 ATF1 陽性細胞を計測した。すべての germinal stage に ATF1 陽性細胞が存在し、その数は germinal stage I から VI になるにつれて増加した。そして、germinal stage VIII からは、ATF1 陽性細胞の数が急激に減少した（図 4A-F）。germinal stage VII では、精細管には ATF1 の発現が弱い、あるいは全くない preleptotene spermatocyte が混在していた（図 4G、H）。上述のように、ATF1 は spermatogonia に発現していたが、ほとんどの spermatocyte は ATF1 を発現していなかった。以上の結果から、germinal stage VII の preleptotene spermatocyte において ATF1 の発現が低下することが示された。

(5) アポトーシスに対する ATF1 KO の影響

ATF1 の KO がアポトーシスに与える影響を評価するため、TUNEL 染色を行った。ATF1(+/+)（図 5A）と ATF1(-/-)（図 5B）の両精細管で TUNEL 陽性細胞が検出されたが、その細胞数は非常に少なかった。この結果により、ATF1 の欠損がアポトーシス誘導しないことが示された。

(6) 細胞増殖に対する ATF1 KO の影響

PCNA は ATF1(+/+)および ATF1(-/-)マウスの精細管において、spermatogonia から早期の pachytene spermatocyte で検出された。図 5C は、連続裂片における ATF1(+/+)マウスの germinal stage VI の精細管の PCNA と ATF1 の発現細胞を示している。PCNA と ATF1 は、蛍光免疫染色においても、spermatogonia で共局在していた（図 5D）。精細管あたりの PCNA 陽性細胞の数は、ATF1(-/-)精巣では ATF1(+/+)精巣に比べて有意に少なかった（ $p < 0.0001$ ）（図 5E）。ウエスタンブロッティングでは、ATF1(+/+)と ATF1(-/-)の精巣全体で PCNA の発現に有意な差は見られなかった（図 5F）。しかし、ATF1(-/-)の精巣では、ATF1(+/+)の精巣に比べて PCNA の発現が低い傾向が見られた（ $p = 0.05$ ）。これらの結果から、ATF1KO は PCNA の発現を低下させることが示された。

(7) 定量的組織学的分析と精巣上体精子分析

精子形成における ATF1 のメカニズムと役割を評価するために、精細管の定量的組織学的分析、精巣上体精子数評価および形態評価を行った。germinal stage I の精細管における spermatogonia 数は、ATF1(+/-) と ATF1(-/-) の精巣では差がなかったが、精細管における preleptotene spermatocyte の数は ATF1 (-/-) で有意に減少していた ($p < 0.0001$) (図 6)。その他の spermatocyte ($p < 0.0001$) や spermatid ($p < 0.05$) においても同様であった (図 6)。さらに、ATF1(-/-) マウスでは、精巣上体精子数が有意に減少していた ($p < 0.01$) (表 2A)。ATF1(+/-) マウスと ATF1(-/-) マウスでは、精子の運動性や形態に有意な差は認められなかった (表 2A)。以上より、ATF1 (-/-) マウス精巣における細胞数、精子数は、preleptotene spermatocyte を境に減少することが示された。

(8) 妊孕性評価

精巣上体精子数の減少が妊孕性に及ぼす影響を評価するために、交配試験を行った。ATF1(-/-) マウスは妊孕性を有し、平均産仔数および仔重量は ATF1(+/-) と有意な差は認められなかった (表 2B)。これらの結果から、ATF1 の除去は精子形成を抑制するが、生殖能力は ATF1(+/-) マウスと ATF1(-/-) マウスで差がないことが示された。

(9) マウス精巣の熱ストレスへの暴露

ATF1 と HSP70 の関係性を評価するために、ATF1(+/-) マウスと ATF1(-/-) マウスの精巣を熱ストレスを加えた。熱ストレス後、ATF1(+/-) マウスと ATF1(-/-) マウスの HSP70 の誘導は、時間とともに上昇した。しかし、熱ストレスから 3 時間後、ATF1(-/-) マウスの精巣では、ATF1(+/-) マウスの精巣と比較して、HSP70 の誘導がアップレギュレートされなかった。これらの差は有意ではなかった (補足図 C)。熱ストレス後 4 週の精巣上体精子数の減少は、ATF1(-/-) マウスでは ATF1(+/-) マウスに比べて有意に低かった。熱ストレス後 8 週の精巣上体精子数の回復は、ATF1(+/-) マウスと ATF1(-/-) マウスの両方で観察され、ATF1(+/-) の精巣上体精子数は ATF1(-/-) のそれよりも高かった。しかし、その差は有意ではなかった (補足図 D)。

6. 考察

精子形成は、さまざまな転写因子が関与する複雑な経路によって制御されている。このプロセスは、単一の遺伝子の有無だけでは説明できない。私たちの研究室では、精子形成時のストレス応答を解明するために、HSF1、ATF1、HSP の役割に注目した。我々はこれまでに、HSF1 と雄性生殖細胞のアポトーシスによる細胞死との関係 [1、2]、ライディッヒ細胞における HSF1 と熱耐性の関係 [4]、マウス胚線維芽細胞の熱ショックによる HSP70 の誘導についての HSF1 と ATF1 の関係 [15] を解析してきた。これらの知見は、ATF1 が本質的に細胞の生存、増殖、および腫瘍形成を促進することを裏付けている [12-14]。ATF1 は、マウスの精巣で高発現しており (図 1A)、生殖細胞の増殖、分化、精子機能に関与していることが示唆された。本研究は、精子形成における ATF1 の役割を検証した初めての報告である。私たちは、ATF1(-/-) が spermatogonia の分裂

と増殖を阻害することで（図 5、6）、精子形成機能が抑制され、精子産生量が有意に減少することを示した（表 2A）。これらの知見は、男性不妊症、特に大部分が特発性のままである非閉塞性無精子症や乏精子症の病態解明に貢献すると考えられる。

これまでの報告では、ATF1 はマウスの精巣で高発現していることが示されていたが [16]、我々はこれらの結果を再確認し、ATF1 の発現はより若年で始まることを示した（図 1A、B）。さらに、本研究では、A 型、中間型、B 型の spermatogonia の核に発現していることを示した（図 3I-N）。本研究では、ATF1 を発現している spermatogonia の数は、germinal stage I 期から VI 期にかけて増加し、第 VII 期の preleptotene spermatocyte では減少した。精子形成のプロセスは、未分化な細胞から分化した細胞へと進行するため、ATF1 が下流の細胞である spermatocyte、spermatid、sperm に影響を与える可能性があると考えられる。胚の発生過程において、ATF1 は初期に高発現し、その後減少し、その局在も時間とともに変化する [16]。CREB の欠損下では、初期の胚発生は停止するが、ATF1 の存在により発生がある程度進行することから、ATF1 が増殖や分化などの発生過程に影響を与えていることが示されている。今回の結果と総合すると、ATF1 は、幹細胞のような未熟な体細胞や活発に分裂している体細胞に発現し、細胞の増殖を促し、分裂を促進することで結果的に未熟な細胞からより多くの分化した細胞を生み出す働きを有している可能性が示唆された。

ATF1 によって制御される下流因子の中で、HSP は最も重要なターゲットである。HSP はもともと、細胞毒性物質や環境変化などに対応するストレス応答タンパク質としての機能が示されており、また、さまざまな細胞内イベントにも関与している [23]。我々は以前、ATF1 が熱ストレス時に HSF1 転写複合体の形成に影響を与え、HSP70 の発現を促進することを報告した [15]。したがって、ATF1 は HSP の誘導に関与していると考えられた。複数の HSP は、正常な発生や分化に関与しており、ATF1 (-/-) マウスでは、HSP の発現が変化している可能性が考えられた。本研究では、ATF1 (+/+) マウスの肝臓と腎臓では ATF1 の高い発現は検出されなかった（図 1A）が、ATF1 (-/-) マウスの肝臓と腎臓において、無刺激状態でいくつかの HSP の発現を変化させていることを示した（図 2）。これらの臓器での ATF1 の発現は以前に報告されている [16]。以上のことから、恒常条件下でも、ATF1 は臓器または細胞特異的に HSP の発現に影響を与えていると考えられた。精子形成における HSP の重要性は以前から報告されている [3、17、18]。HSP70 は、spermatocyte 以降に出現する [24]。我々の以前の研究 [15] と合わせて考えると、spermatogonia で高発現している ATF1 が、後の分化段階での HSP70 ファミリーの発現に影響を与えている可能性が考えられる。しかし、精巣全体では、ウエスタンブロッティングによる HSP 発現の有意な差は認められなかった（図 2）。そのため、germinal stage や細胞特異的な HSP の発現を評価するために、ATF1 (+/+) マウスと ATF1 (-/-) マウス精巣のパラフィン切片と凍結切片の蛍光免疫染色を行ったが、核の自家蛍光や非特異的なシグナル、抗体の反応性により、HSP の発現を定量的に評価することはできなかった（data not shown）。以上より、ATF1 (-/-) の精巣での、HSP の発現の違いは同定できなかった。これは、傷ついた細胞や機能不全を起こした細胞が直ちにセルトリ細胞による貪食を受けるといった精子形成の複雑さから説明できるかもしれない [25]。したがって、ATF1 が欠損した状態で精巣全体を用いて HSP 発現の変化を検出することは困難であると考えられる。生殖細胞と体細胞を分離し、ウエスタンブロッティングや蛍光免疫染色の異なるプロトコルを用いて *in vitro* で検討するなど、ATF1 のさらなる機能解析が必要である。

精子形成における ATF1 の機能を調べることは、本研究の最も重要な目的の 1 つである。CREB/ATF ファミリーに属する分子は、構造的に類似しており [26]、いくつかの

因子に反応して活性化され、プロモーター領域の CRE 配列を介して、多数の標的遺伝子の発現を促進する [27]。これらの中には、サイクリン D や A などの細胞周期遺伝子や、細胞の成長、増殖、神経細胞の活動に関連する遺伝子が含まれている [28、29]。CREB/ATF ファミリーメンバー欠損に関連する生殖系の異常は、生殖細胞の分化の停止やアポトーシスの増加を引き起こす [10、30]。ATF1 (-/-) 精巣ではこれらの異常は評価されていないが、ATF1 は細胞の生存、増殖、腫瘍化を促進するため、関連が疑われた [12-14]。本研究では、精細管においてアポトーシス細胞はほとんど見られなかったが、ATF1 (-/-) 精巣では、spermatocyte と spermatid が有意に減少し (図 6)、精巣上体精子数も減少していた (表 2A)。したがって、生殖細胞生存に対する ATF1 の影響は弱く、ATF1 を除去してもアポトーシスの増加は誘発されないと考えられた。言い換えれば、ATF1 (-/-) マウスの精細管細胞および精巣上体精子数の減少は、アポトーシスによるものではなく、細胞の分裂と増殖の障害によって生じた可能性が示された。また、ATF1 は、PCNA のプロモーター活性を制御することも示されている [31]。本研究では、ATF1 (+/+) 精巣の spermatogonia で ATF1 と PCNA が共局在しており (図 5C、D)、ATF1 (-/-) 精巣では PCNA の発現がやや減少していた (図 5E、F)。PCNA は、spermatogonia や spermatocyte の増殖の同定に使用されているが [32]、本実験でも、PCNA が spermatogonia および初期の spermatocyte で発現していることを確認した。精巣全体では、ATF1 (-/-) 精巣で、PCNA 発現の有意な減少を示すことはできなかったが、ATF1 (+/+) と比較して ATF1 (-/-) 精巣では PCNA 発現が低下する傾向が見られた ($p=0.05$)。精子形成は、精子形成細胞の分裂/増殖、分化、成熟のカスケードであり、最初の spermatogonia の増殖の低下が、最終的な精子の数に大きな違いをもたらす。本研究では、精巣上体精子数は約 30% の減少を示したが、spermatogonia から分化する spermatocyte 数の減少は、精巣上体精子数の減少から推定されるよりも小さいと考えられる。したがって、ATF1 (+/+) と ATF1 (-/-) の精巣の間での spermatocyte の減少の差は、精巣上体精子数の減少に差と比較して小さく、その結果、ATF1 (-/-) の精巣では PCNA の発現が低くなる傾向にとどまったと結論づけた。さらに、ATF1 (-/-) マウスの精細管細胞数および精巣上体精子数の減少は、spermatogonia の DNA 合成、細胞分裂、増殖の低下によるものと考えられた。これらの結果は、ATF1 欠損による胸腺由来の T 細胞の減少に関するこれまでの報告 [33] から支持される。

他の ATF 分子も、生殖器系での役割が報告されている。これらは多様な機能を持ち、精巣の形態形成や血管新生、セルトリ細胞の機能、ライディッヒ細胞におけるステロイド発現の調節に関与している [34-36]。ATF2 は、c-Jun や c-Fos を含む他の転写因子を制御し、それらとヘテロ二量体を形成する。ATF2 の活性化には、通常、JNK、ERK、p38 MAPK などの他のキナーゼによるリン酸化が必要である。ATF2 の標的には、細胞周期関連タンパク質のようないくつかの生存促進分子が含まれる [37]。ATF3 は、細胞周期の進行を促進または抑制し、JNK、p38 MAPK、その他のシグナル伝達経路によって制御されている [38]。しかし、これらの分子の spermatogonia における役割は報告されておらず、ATF2 については、結合コンセンサス配列が異なり、ATF1 の機能を直接代替できない可能性がある。ATF1 では、GDNF が ATF1 とそのファミリーメンバーのリン酸化を誘導し、Ras/ERK1/2 経路を介して c-Fos 転写をアップレギュレートし、サイクリン A と CDK を介してマウス spermatogonial stem cell の増殖を促進することが示されている [39]。この役割は、幹細胞の自己再生であり、A 型、中間型、B 型 spermatogonia への分裂/分化という点で異なるが、ATF1 はそれらの増殖を介して促進する役割を担っていると考えられる。CREB や CREM は ATF1 と類似性が高く、その相補性も報告 [16、40、41] されており、また、類似の分子による他の経路の相補性も考えられ、ATF1 単独

のノックアウトでは、精子形成を完全には停止できない可能性が考えられた。

CREB/ATF1 ファミリーの多くは刺激誘導型の転写因子であることから、停留精巣や精索静脈瘤によって引き起こされるようなストレスが増大した場合、ATF1(-/-)マウスの精子形成は大きく影響を受ける可能性がある。私たちの研究室では、精巣の熱ショック応答について報告している[1、2]。そこで、本研究では、精子形成における ATF1 の役割を解明するために、ATF1 と HSP70 の誘導との関係[15]に基づいて、同様の熱ストレス実験を行い、熱ショック応答を調べた。その結果、ATF1(-/-)マウスの精巣では、ATF1(+/-)マウスに比べて、熱ショック後 3 時間で HSP70 誘導が遅延することがわかったが、この遅延は有意でなかった(補足図 C)。このように、マウス胚性線維芽細胞で示された ATF1 と HSP70 の関係を、生体内で十分に確認することはできなかった[15]。HSP70 が細胞分裂に関与していることは以前に示されており[42]、HSP70 の誘導が遅延するという小さな違いが、spermatogonia の増殖の低下を誘発する可能性も示唆された。遺伝子改変マウスの不妊症の大多数は無精子症により引き起こされるが、ヒト男性の不妊症の大多数は無精子症ではなく乏精子症により男性不妊症を呈する。不妊症における乏精子症についての研究は、無精子症に関するものに比べてはるかに遅れている。ATF1 のように精巣で高発現し、他の臓器では異常を起こさない遺伝子を調べることは非常に重要と考えられる。このような遺伝子は、精巣特異的な機能しか持たない場合や、CREB/ATF ファミリーのような他の代替経路によって補完される場合があるため、発見・同定が困難である。

ATF1 KO 雄マウスでは、精巣上体精子数の減少にかかわらず、生殖能力を有していた。精子形成遺伝子が不活性化されたいくつかの変異マウスでは、成熟精子数が通常の 20%減少し、精子運動性に中程度の障害が生じて、雄マウスは妊孕性があることが確認されている[43]。したがって、ATF1 は、無精子症のような重度の状態ではなく、乏精子症のような軽度の機能障害に関与している可能性が示唆される。ATF1(-/-)マウスは、ATF1(+/-)マウスに比べて、熱ストレス後 4 週間の精巣上体精子数の減少が有意に少ないことが示された(補足図 D)。HSF1 は雄性生殖細胞の質管理に関与しており、この機能は、傷害を受けた細胞のアポトーシスを誘導し、未熟な細胞を保護している[44、45]。我々の以前の報告[15]にあるように、HSF1 と ATF1 の転写複合体は熱ストレス時に形成され、ATF1 を介して転写因子を呼び込む。ATF1(-/-)マウスの精巣上体精子数の減少は、HSF1 によるアポトーシスが抑制されたためであると考えられる。また、有意ではないが、精巣での熱ストレス時に HSP70 の誘導が遅れることから、精巣 HSF1 と ATF1 の関係が疑われる(補足図 C)。以上のことから、ストレス応答時に HSF1 による ATF1 を介した精子の質を制御するシステムが、弱いながらも存在する可能性がある。しかし、非ストレス時には、ATF1(+/-)マウス精巣と ATF1(-/-)マウス精巣の間にアポトーシスの違いは見られなかった。つまり、ATF1 と HSF1 の関係が疑われるものの、非ストレス時の精巣上体精子数の制御への HSF1 の関与は弱いと考えられた。

この研究にはいくつかのリミテーションがある。まず、セルトリ細胞とライディッヒ細胞、および内分泌学的パラメータが評価されていない。これらの細胞の精子形成における役割は重要である。しかし、これらの細胞タイプでは ATF1 の発現が見られなかったことから、内分泌因子と ATF1 の発現の間に直接的な関連性はないと考えられた。第二に、他の経路の評価は行われていない。ATF1(+/-)マウスと ATF1(-/-)マウスの間で CREB と CREM に明らかな違いは見られなかったが、ATF1 に関連する相補的な因子が存在することが推測されている。したがって、さらに *in vitro* の研究をデザインして実施する必要があり、分子経路を解明するためのさらなる研究が必要である。

7. 結語

ATF1 は、精巢 spermatogonia 核に高発現しており、そのノックアウトにより、spermatogonia の増殖と分化を抑制し、精巢上体精子数の減少を引き起こすことを初めて示した。これは、男性不妊症における乏精子症、無精子症の発症機序解明に寄与する可能性が示唆された。

8. 謝辞

本研究を進めるにあたり、技術支援をいただいた医化学講座教授の中井 彰先生、准教授の藤本 充章先生、講師の瀧井 良祐先生、大学院生の Arpit Katiyar さん、Pratibha Srivastava さん、岡田 真理子さん、泌尿器科学講座教授の松山 豪泰先生、准教授の白石 晃司先生、大学院生の松隈 悠さん、共焦点顕微鏡の使用に関して技術的な支援をしてくださった理工学研究科准教授の有働 公一先生に感謝いたします。

9. 参考文献

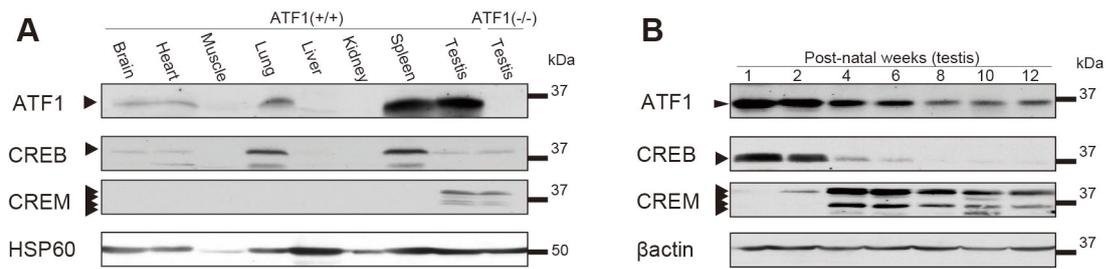
- 1.) Izu H、 Inouye S、 Fujimoto M、 Shiraishi K、 Naito K、 Nakai A. Heat shock transcription factor 1 is involved in quality-control mechanisms in male germ cells. *Biol Reprod* 2004; 70:18–24.
- 2.) Nakai A、 Suzuki M、 Tanabe M. Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. *EMBO J* 2000; 19:1545–1554.
- 3.) Nixon B、 Bromfield EG、 Cui J、 De Iuliis GN. Heat shock protein A2 (HSPA2): regulatory roles in germ cell development and sperm function. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2017; 222:67–93.
- 4.) Oka S、 Shiraishi K、 Fujimoto M、 Katiyar A、 Takii R、 Nakai A、 Matsuyama H. Role of heat shock factor 1 in conserving cholesterol transportation in Leydig cell steroidogenesis via steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology* 2017; 158:2648–2658.
- 5.) Hai T、 Hartman MG. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: Activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 2001; 273:1–11.
- 6.) Persengiev SP、 Green MR. The role of ATF/CREB family members in cell growth, survival and apoptosis. *Apoptosis* 2003; 8:225–228.
- 7.) Deutsch PJ、 Hoeffler JP、 Jameson JL、 Lin JC、 Habener JF. Structural determinants for transcriptional activation by cAMP-responsive DNA elements. *J Biol Chem* 1988; 263:18466–18472.
- 8.) Montminy MR、 Bilezikjian LM. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 1988; 328:175–178.
- 9.) Don J、 Stelzer G. The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187:115–124.
- 10.) Nantel F、 Monaco L、 Foulkes NS、 Masquillier D、 LeMeur M、 Henriksen K、 Dierich A、 Parvinen M、 Sassone-Corsi C. Spermiogenesis deficiency and germ-cell

- apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature* 1996; 380:159–162.
- 11.) Sirotkin AV, Benčo A, Mlynček M, Harrath AH, Alwasel S, Kotwica J. The involvement of the phosphorylatable and nonphosphorylatable transcription factor CREB-1 in the control of human ovarian cell functions. *Comptes Rendus - Biol* 2019; 342:90–96.
 - 12.) Hsueh YP, Lai MZ. Overexpression of activation transcriptional factor 1 in lymphomas and in activated lymphocytes. *J Immunol* 1995; 154:5675–5683.
 - 13.) Jean D, Tellez C, Huang S, Davis DW, Bruns CJ, McConkey DJ, Hinrichs SH, Bar-Eli M. Inhibition of tumor growth and metastasis of human melanoma by intracellular anti-ATF-1 single chain Fv fragment. *Oncogene* 2000; 19:2721–2730.
 - 14.) Brown AD, Lopez-Terrada D, Denny C, Lee KAW. Promoters containing ATF-binding sites are de-regulated in cells that express the EWS/ATF1 oncogene. *Oncogene* 1995; 10:1749–1756.
 - 15.) Takii R, Fujimoto M, Tan K, Takaki E, Hayashida N, Nakato R, Shirahige K, Nakai A. ATF1 modulates the heat shock response by regulating the stress-inducible heat shock factor 1 transcription complex. *Mol Cell Biol* 2015; 35:11–25.
 - 16.) Bleckmann SC, Blendy JA, Rudolph D, Monaghan AP, Schmid W, Schütz G. Activating transcription factor 1 and CREB are important for cell survival during early mouse development. *Mol Cell Biol* 2002; 22:1919–1925.
 - 17.) Kajiwara C, Kondo S, Uda S, Dai L, Ichiyanagi T, Chiba T, Ishido S, Koji T, Udono H. Spermatogenesis arrest caused by conditional deletion of Hsp90 α in adult mice. *Biol Open* 2012; 1:977–982.
 - 18.) Ogi S, Tanji N, Iseda T, Yokoyama M. Expression of heat shock proteins in developing and degenerating rat testes. *Arch Androl* 1999; 43:163–171.
 - 19.) Ahmed EA, de Rooij DG. Staging of mouse seminiferous tubule cross-sections. In: Keeney S (ed). *Meiosis. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol. 558. Totowa, NJ: Humana Press; 2009:263–277.
 - 20.) Oshio S, Yazaki T, Umeda T, Ozaki S, Ohkawa I, Tajima T, Yamada T, Mohri H. Effects of mecobalamin on testicular dysfunction induced by X-ray irradiation in mice. *Folia Pharmacol Jpn* 1991; 98:483–490.
 - 21.) Wyrobek AJ, Bruce WR. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72:4425–4429.
 - 22.) Krausz C, Sassone-Corsi P. Genetic control of spermiogenesis: Insights from the CREM gene and implications for human infertility. *Reprod Biomed Online* 2005; 10:64–71.
 - 23.) Richter K, Haslbeck M, Buchner J. The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell* 2010; 40:253–266.
 - 24.) Sarge KD, Cullen KE. Regulation of hsp expression during rodent spermatogenesis. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53:191–197.

- 25.) Shiratsuchi A、 Nakanishi Y. Role of class B scavenger receptor type I in phagocytosis of apoptotic cells. *Seikagaku* 2001; 73:187–190.
- 26.) Mayr B、 Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor creb. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:599–609.
- 27.) Liu F、 Thompson MA、 Wagner S、 Greenberg ME、 Green MR. Activating transcription factor-1 can mediate Ca²⁺- and cAMP-inducible transcriptional activation. *J Biol Chem* 1993; 268:6714–6720.
- 28.) Impey S、 McCorkle SR、 Cha-Molstad H、 Dwyer JM、 Yochum GS、 Boss JM、 McWeeney S、 Dunn JJ、 Mandel G、 Goodman RH. Defining the CREB regulon: A genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell* 2004; 119:1041–1054.
- 29.) Zhang X、 Odom DT、 Koo SH、 Conkright MD、 Canettieri G、 Best J、 Chen H、 Jenner R、 Herbolsheimer E、 Jacobsen E、 Kadam S、 Ecker JR、 et al. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy、 phosphorylation、 and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:4459–4464.
- 30.) Adham IM、 Eck TJ、 Mierau K、 Müller N、 Sallam MA、 Paprotta I、 Schubert S、 Hoyer-Fender S、 Engel W. Reduction of spermatogenesis but not fertility in Creb3l4-deficient mice. *Mol Cell Biol* 2005; 25:7657–7664.
- 31.) Liu YC、 Chang HW、 Lai YC、 Ding ST、 Ho JL. Serum responsiveness of the rat PCNA promoter involves the proximal ATF and AP-1 sites. *FEBS Lett* 1998; 441:200–204.
- 32.) Steger K、 Aleithe I、 Behre H、 Bergmann M. The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:227–233.
- 33.) Baumann S、 Kyewski B、 Bleckmann SC、 Greiner E、 Rudolph D、 Schmid W、 Ramsay RG、 Krammer PH、 Schütz G、 Mantamadiotis T. CREB function is required for normal thymic cellularity and post-irradiation recovery. *Eur J Immunol* 2004; 34:1961–1971.
- 34.) Qiu L、 Qian Y、 Liu Z、 Wang C、 Qu J、 Wang X、 Wang S. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) disrupts blood-testis barrier by down-regulating junction proteins via p38 MAPK/ATF2/MMP9 signaling pathway. *Toxicology* 2016; 373:1–12.
- 35.) Fischer C、 Johnson J、 Stillwell B、 Conner J、 Cerovac Z、 Wilson-Rawls J、 Rawls A. Activating transcription factor 4 is required for the differentiation of the lamina propria layer of the vas deferens. *Biol Reprod* 2004; 70:371–378.
- 36.) Park SJ、 Kim TS、 Park CK、 Lee SH、 Kim JM、 Lee KS、 Lee IK、 Park JW、 Lawson MA、 Lee DS. hCG-induced endoplasmic reticulum stress triggers apoptosis and reduces steroidogenic enzyme expression through activating transcription factor 6

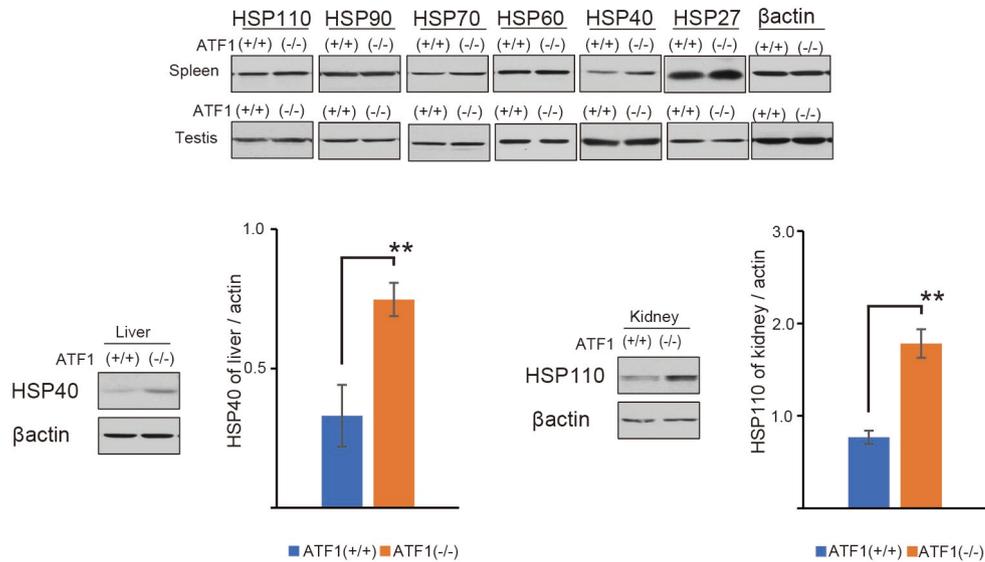
- in Leydig cells of the testis. *J Mol Endocrinol* 2013; 50:151–166.
- 37.) An JJ, Shi KJ, Wei W, Hua FY, Ci YL, Jiang Q, Li F, Wu P, Hui KY, Yang Y, Xu CM. The ROS/JNK/ATF2 pathway mediates selenite-induced leukemia NB4 cell cycle arrest and apoptosis in vitro and in vivo. *Cell Death Dis* 2013; 4:e973.
 - 38.) Hai T. The ATF Transcription Factors in Cellular Adaptive Responses. *Gene Expression and Regulation*. 2007. p. 329–40.
 - 39.) He Z, Jiang J, Kokkinaki M, Golestaneh N, Hofmann MC, Dym M. Gdnf upregulates c-Fos transcription via the Ras/Erk1/2 pathway to promote mouse spermatogonial stem cell proliferation. *Stem Cells* 2008; 26:266–278.
 - 40.) Jin XL, O’Neill C. The presence and activation of two essential transcription factors (cAMP response element-binding protein and cAMP-dependent transcription factor ATF1) in the two-cell mouse embryo. *Biol Reprod* 2010; 82:459–468.
 - 41.) Mantamadiotis T, Lemberger T, Bleckmann SC, Kern H, Kretz O, Villalba AM, Tronche F, Kellendonk C, Gau D, Kapfhammer J, Otto C, Schmid W, et al. Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nat Genet* 2002; 31:47–54.
 - 42.) Fang CT, Kuo HH, Hsu SC, Yih LH. HSP70 is required for the proper assembly of pericentriolar material and function of mitotic centrosomes. *Cell Div* 2019; 14:4.
 - 43.) Cohen, PE, Chisholm O, Arceci RJ, Stanley ER, Pollard JW. Absence of colony-stimulating factor-1 in osteopetrotic (csfmop/csfmop) mice results in male fertility defects. *Biol Reprod* 1996; 55:310–317.
 - 44.) Izu H, Inouye S, Fujimoto M, Shiraishi K, Naito K, Nakai A. Heat shock transcription factor 1 is involved in quality-control mechanisms in male germ cells. *Biol Reprod* 2004; 70:18–24.
 - 45.) Salmand PA, Jungas T, Fernandez M, Conter A, Christians ES. Mouse heat-shock factor 1 (HSF1) is involved in testicular response to genotoxic stress induced by doxorubicin. *Biol Reprod* 2008; 79:1092–1101.

図1 マウスにおける CREB/ATF ファミリーの発現レベル。



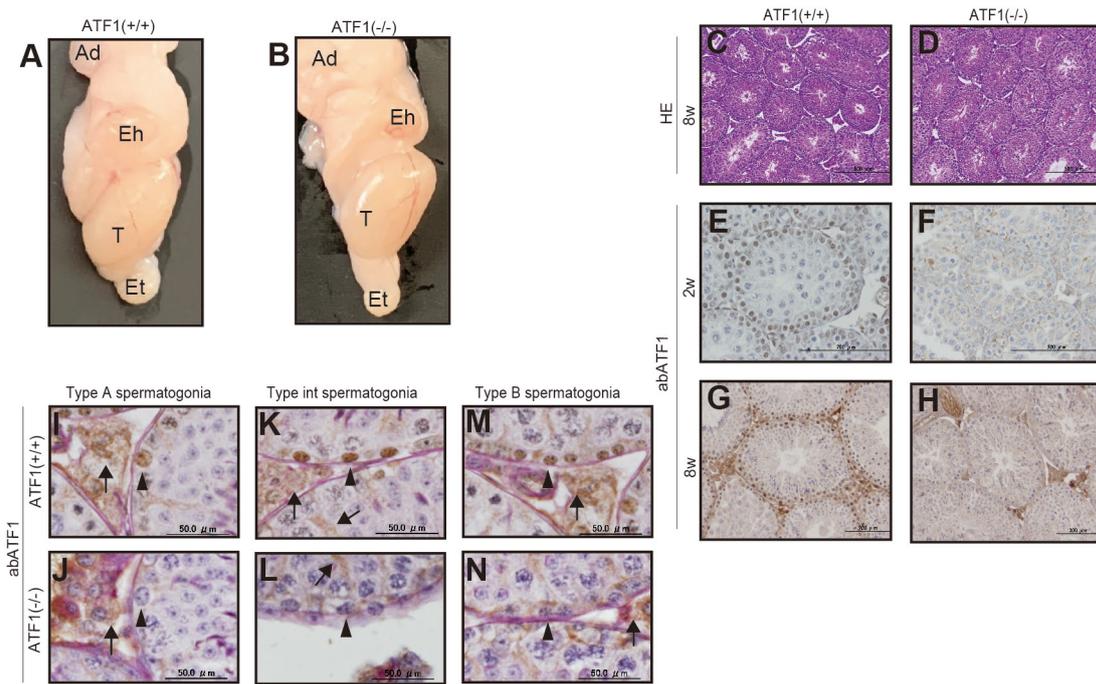
ATF1(+/+)マウスの主要臓器および ATF1(-/-)マウスの精巣における CREB/ATF ファミリーの発現レベル(A)、および出生後の ATF1(+/+)マウスの精巣における CREB/ATF ファミリーの発現レベル(B)をウエスタンブロッティングにより示した。

図2 定常状態におけるマウスの HSP 発現における ATF1 の役割。



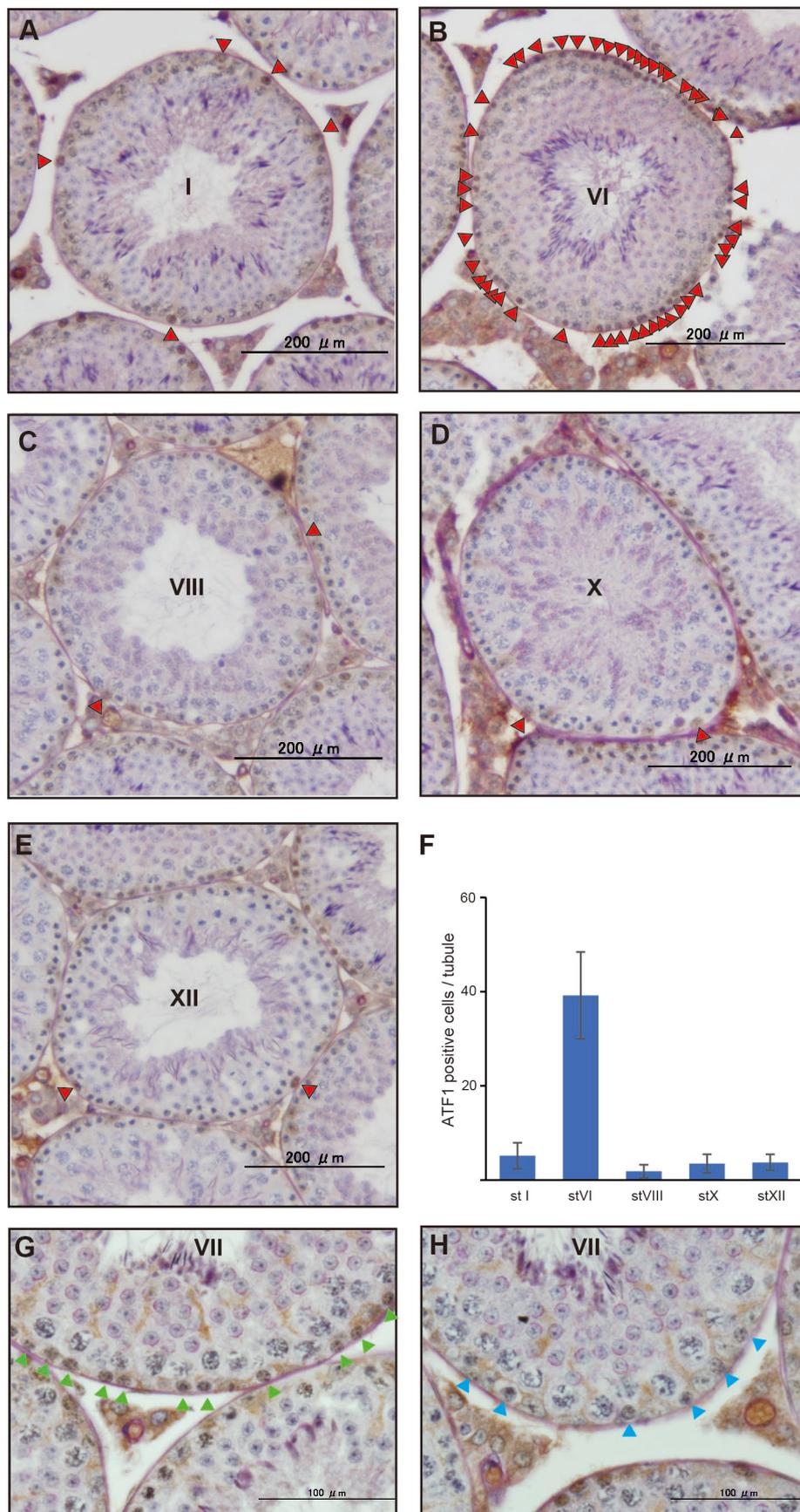
ATF1(+/+)マウスと ATF1(-/-)マウスの HSP 発現レベルのウエスタンブロットによる比較を示す代表的な画像。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

図3 男性生殖器の外観と組織像、精細管における ATF1 の局在。



8週齢の雄性生殖器の肉眼的外観 (A, B)。Tは精巣、Ehは精巣上部の頭部、Etは精巣上部の尾部、Adは脂肪組織。精巣の断面をHE染色したもの (C, D)。精巣切片のヘマトキシリン染色によるATF1の免疫染色 (E-H)。2週齢 (E) と8週齢 (G) のATF1 (+/+) 精管の基底層にATF1陽性細胞が検出。精巣切片のPAS-H染色によるATF1の免疫染色 (I-N)。ATF1はA型、中間型、B型の精原細胞の核に発現していた (I, K, M) (矢印)。セルトリ細胞およびライディッヒ細胞 (I-N) の細胞質には非特異的な染色が認められた (矢印)。

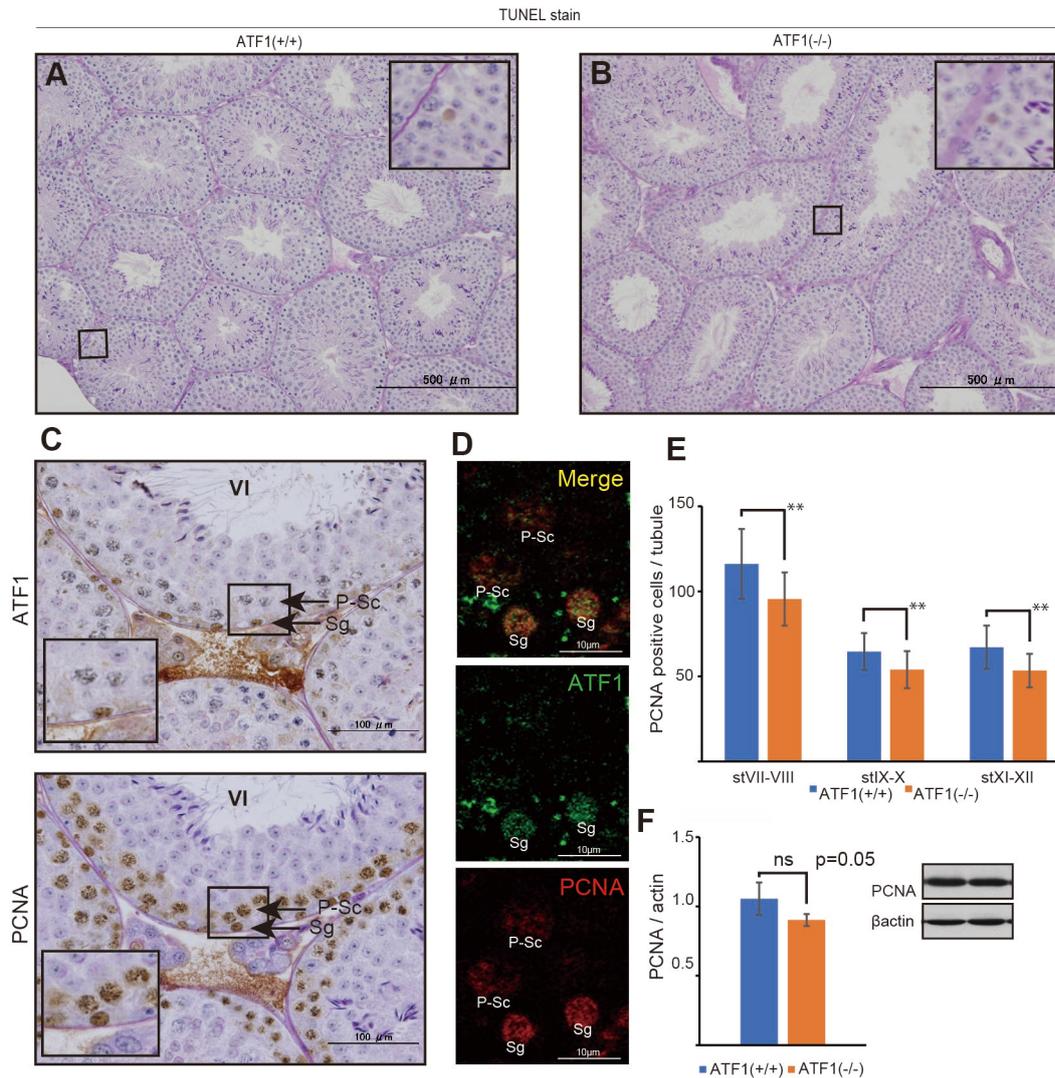
図4 germinal stage VII の preleptotene spermatocyte における ATF1 の発現低下。



精巣切片のPAS-H染色によるATF1免疫染色と、精細管内のATF1陽性細胞数(A-E、G、H)。ATF1発現細胞はgerminal stage I(A)、VI(B)、VIII(C)、X(D)、XII(E)で検出さ

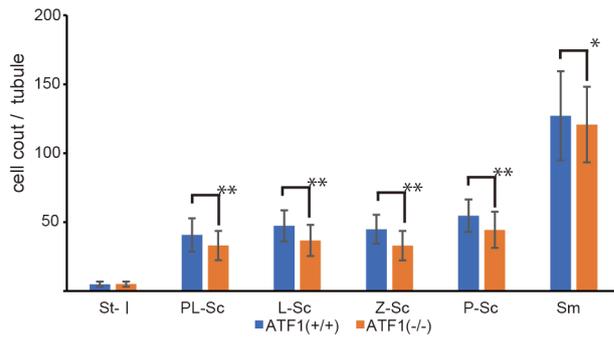
れた（赤矢印）。ATF1 陽性細胞数は、germinal stage I から VI にかけて増加していた（F）。VII 期の精細管では、ATF1 発現の低下した preleptotene spermatocyte（G）（緑の矢頭）と陰性の preleptotene spermatocyte（H）（青の矢頭）が混在して出現した。

図5 TUNEL 染色と PCNA の発現。



ATF1 (+/+) (A)および ATF1 (-/-) (B)の精細管における TUNEL 染色。ATF1 と PCNA の免疫染色と共局在 (C)。免疫蛍光顕微鏡による PCNA と ATF1 の共局在(D)。Sg は精原細胞、P-Sc は spermatocyte。生殖細胞のステージごとに分類されたステージ依存性の PCNA 発現 (E)。ATF1(+/+)精巣と ATF1(-/-)精巣でのウェスタンブロッティングによる PCNA 発現 (F) . ns, no significant.

図 6 生殖細胞の数に対する ATF1 の役割。



各生殖細胞を PAS-H 染色でカウントし、精管毎の数で表した。St I-Sg は geminal stage I の spermatogonia、PL-Sc は preleptotene spermatocyte、L-Sc は leptotene spermatocyte、Z-Sc は zygotene spermatocyte、P-Sc は pachytene spermatocyte、Sm は spermatid。p < 0.05 (*)、p < 0.01 (**)。

表 1. Body and reproductive organs weight

	Body (g)	Testis (mg)	Epididymis (mg)
ATF1(+/+)	23.2 ± 1.5	80.4 ± 8.1**	29.7 ± 2.6*
ATF1(-/-)	22.2 ± 1.2	68.1 ± 6.2	26.1 ± 6.2

Ten reproductive organs from five male mice.

Data are the means ±SD and analyzed by Student's t-test. p < 0.05 (*), p < 0.01 (**)

表 2

A. ATF1(+/+)および ATF1(-/-)マウスの精巣上体精子数および形態

Parameter	No. with indicated genotype		p-Value
	(+/+)	(-/-)	
No. of sperm in cauda epididymis (10^7 /ml)	1.88 ± 0.5 (10) ^a	1.32 ± 0.4 (10)	0.008**
Sperm motility (%)	75.5 ± 7.8 (10)	69.5 ± 10.3 (10)	0.156
Normal sperm (%)	92.8 ± 1.4 (6)	93.2 ± 1.7 (6)	0.554
Abnormal sperm (%)	7.0 ± 1.2 (6)	6.7 ± 1.8 (6)	0.768

^aParentheses mean number of samples.

Data are the means ±SD and analyzed by Student's t-test. p<0.01 (**)

B. ATF1(+/+)および ATF1(-/-)の妊孕性

mal e × female	No. of mice born	No. of mice in average litter	Mean body weight of mice
ATF1(+/+) × ATF1(+/+)	191	7.64±3.01	1.29±0.12
ATF1(-/-) × ATF1(+/+)	218	8.53±3.22	1.29±0.14

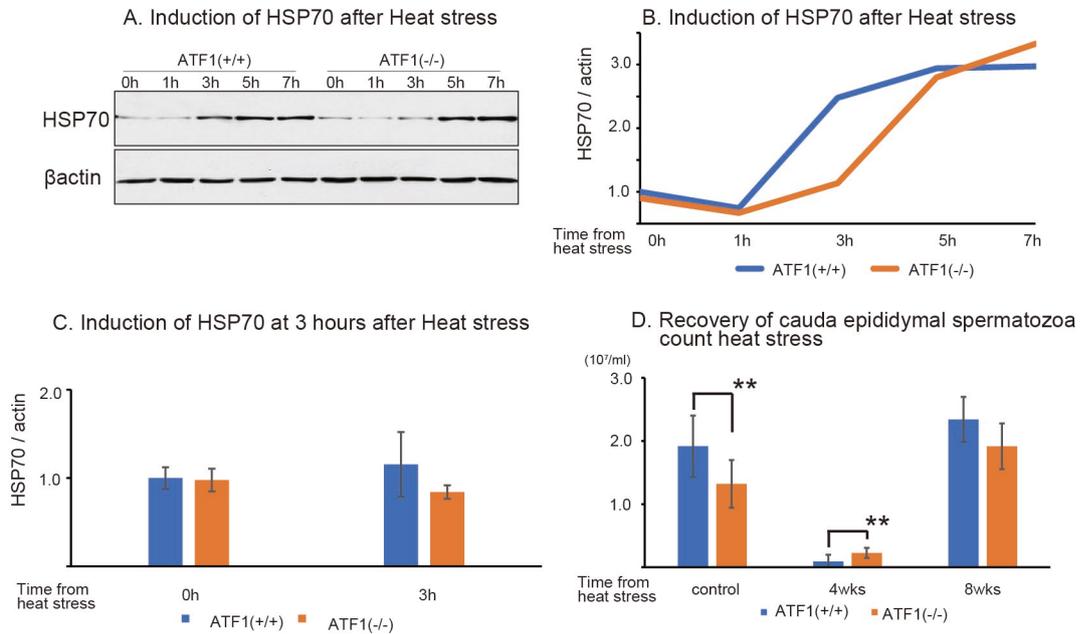
Ten males and twenty females were mated.

補足抗体表 S1

Supplementary Antibody Table S1							
Peptide /protein Target	Antigen Sequence (if known)	Name of Antibody	Supplier /Catalog number(CatNo.)	Species Raised in; Monoclonal	specific use n	Dilutio Used	Research Resouerce Identifier
ATF1 (mouse origin)	full	ATF1	*ANLY /CatNo. mATF1-1	rabbit; polyclonal	WB,IHC,IF	1:1000	
CREB (human origin)		CREB	Santa Cruz Biotechnology /CatNo.sc-186	rabbit; polyclonal	WB	1:200	AB_2086021
CREM (mouse origin)		CREM	Santa Cruz Biotechnology /CatNo.sc-440	rabbit; polyclonal	WB	1:200	AB_673599
HSP110 (mouse origin)	aa577-877	HSP110	*ANLY /CatNo. 1.1mHSP110b	rabbit; polyclonal	WB	1:500	AB_2650591
HSP90 (human origin)	aa333-732	HSP90	*ANLY /CatNo. hHSP90d	rabbit; polyclonal	WB	1:1000	
HSP70 (human origin)		HSP70	Santa Cruz Biotechnology /CatNo.sc-24	mouse; monoclonal	WB	1:1000	AB_627760
HSP60 (mouse origin)	aa358-884	HSP60	*ANLY /CatNo. mHSP60-1	rabbit; polyclonal	WB	1:1000	
HSP40 (human origin)	full	HSP40	*ANLY /CatNo. hHSP40-1	rabbit; polyclonal	WB	1:1000	
HSP27 (mouse origin)	full	HSP27	*ANLY /CatNo. mHSP27-c	rabbit; polyclonal	WB	1:500	AB_2650593
PCNA (rat origin)		PCNA	Santa Cruz Biotechnology /CatNo.sc-56	mouse; monoclonal	WB,IHC,IF	1:200	AB_628110
βactin (human origin)		βactin	Abcam /ab6276	mouse; monoclonal	WB	1:1000	AB_2223210
rabbit IgG(whole)		Anti-rabbit IgG	MP Bio /CatNo.0855689	goat; polyclonal	WB	1:1000	AB_2334597
mouse IgG(H+L)		Anti-mouse IgG	Jackson ImmunoResearch Labs /CatNo.115-035-003	goat; polyclonal	WB	1:1000	AB_10015289
mouse and rabbit IgG		Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI) antibody	Nichirei Biosciences /CatNo. 424152	goat; polyclonal	IHC	1:1	
rabbit IgG(H+L)		Alexa Fluor 488	Cell Signaling Technology /CatNo. 4412	goat; unknown	IF for ATF1	1:1000	AB_1904025
mouse IgG (H+L)		Alexa Fluor 568	Thermo Fisher Scientific /CatNo. A-11004	goat; polyclonal	IF for PCNA	1:5000	AB_2534072

*ANLY: Akira Nakai Lab, Yamaguchi University School of Medicine

補足図



熱ストレスによる HSP70 の発現量の変化 (A、B)。熱ストレス後の 0 時間と 3 時間における HSP70 の発現量(C)(n=3)。熱ストレス後 4 週間 (ATF1(+/-)は n=10、ATF1(-/-)は n=8) および 8 週間 (それぞれ n=10) における精巣上体精子数の変化。 $p < 0.05$ (*)、 $p < 0.01$ (**)。