

厚生労働科学研究費補助金  
(こころの健康科学研究事業)

神経変性疾患の根本的治療の実現を  
めざした新規モデル動物での  
先端的治療法の開発と確立に関する研究  
(H15-こころ-023)

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 和田 圭司  
平成18(2006)年3月

## 目 次

I. 総括研究報告書		
神経変性疾患の根本的治療の実現	—————	1
をめざした新規モデル動物での 先端的治療法の開発と確立に 関する研究		
和田圭司		
II. 分担研究報告書		
ハンチントン病の遺伝子発現制御	—————	8
に関する研究		
北條浩彦		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	—————	12
IV. 研究成果の刊行物・印刷	—————	15

神経変性疾患の根本的治療の実現をめざした新規モデル動物での  
先端的治療法の開発と確立(H15-こころ-023)

主任研究者 和田 圭司 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部長

本研究は有効な治療法の乏しい難治性神経変性疾患に対してよりヒト病態に近いモデル動物を提供し、その解析を通して先端的かつ臨床応用が十分可能な治療法を開発することを目標とする。その達成にむけて今回はこれまで研究を続けてきたパーキンソン病とハンチントン病に焦点を当て、申請した3年間の研究期間中に、モデル動物で原因遺伝子産物の除去による蛋白質の凝集・不溶化防止と蛋白質分解系の適正な活性化を通じた神経機能不全の補正を行う。さらに病態時の神経幹細胞の動態解明とその動員法を確立しニューロンの潜在的修復・再生能を利用した再生治療の基盤技術を具体化する。研究3年目の今年度は昨年度ハンチントン病原因遺伝子に対して開発した siRNA をもとに shRNA 発現ベクターを開発し、その投与がモデル動物の病態の進行を siRNA よりもより良く抑制することを見いだした。またパーキンソン病では自家開発した新規モデルの解析から脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 の変異原性獲得がリソソームにおける UCH-L1 の不溶性充進を誘導し、パーキンソン病関連蛋白質の蓄積を誘導することを見出した。ついで、病態と UCH-L1 の構造相関性を発見した。さらに、神経幹細胞の運動性・接着性を vivo で制御する G 蛋白質共役型受容体リガンドを複数同定した。

分担研究者 北條浩彦 国立精神・神経センター  
神経研究所  
遺伝子工学研究部

transduction domain である TAT 配列を付加した治療用蛋白質の動物脳内導入に成功してきた。また、ハンチントン病モデルマウスを米国より導入し、さらに既存モデルよりも優れた点を多々有する新規パーキンソン病モデルマウス(I93M UCH-L1 発現マウス)を自家開発した。本研究ではこれらの成果をもとに、神経細胞の変性防止と再生を小型モデル動物で確立することを目標とする。具体的には、神経細胞の変性防止については治療用核酸・蛋白質の導入や化合物を用いた structure based knockdown などの手法で標的分子特異的治療の確立をめざすとともに、神経幹細胞に高発現する G 蛋白質共役型受容体の解析を通して神経幹細胞の増殖、運動性、ニューロンへの分化性を制御する新技術を開発する。

#### A. 研究目的

本研究では、これまで難治性とされていた神経変性疾患(パーキンソン病とハンチントン病など)の根本的治療法を開発することをめざす。神経変性疾患では蛋白質の不溶化・凝集が細胞変性の本態と考えられており、そのため原因遺伝子産物の除去、神経機能不全の修復、変性ニューロンの再生が根本治療への扉を開くと考えられる。我々はこれまでに siRNA を用いた変異遺伝子の発現抑制技術ならびに神経幹細胞からニューロンへの効果的分化促進技術を細胞レベルで開発し、また protein

今年度はハンチントン病原因遺伝子 huntingtin に

対する shRNA 発現ベクターの有効性をモデル動物を用いて検討し、またパーキンソン病では自家開発した新規モデルを用いて発症機序を解析した。さらに神経幹細胞を用いた再生医療実現のため、神経幹細胞で高発現する GPCR のリガンドの薬理作用を個体で検討した。

## B. 研究方法

### (1)パーキンソン病モデルを用いた研究

UCH-L1 発現トランスジェニックマウスにおける UCH-L1 蛋白質の性状、ならびに UCH-L1 導入培養細胞における UCH-L1、パーキンソン病関連蛋白質の性状については western blot 法などで解析した。UCH-L1 の水溶液中の構造解析は中性子小角散乱法を使用した。

### (2)ハンチントン病モデルを用いた研究

生後2日のハンチントン病モデルマウスに shRNA 発現プラスミドベクター200 ng を含む ExGen500 溶液5マイクロリットルを注入し、一定期間の後行動学的評価と寿命の検討を行った。

### (3)神経幹細胞に関する研究

成体マウスの終脳から神経上皮細胞を得て培養を行った。これらの神経上皮細胞培養系における GPCR 遺伝子の発現レベルを SYBR green を用いた定量的 PCR 法にて解析した。また GPCR に対する特異的リガンドを生体脳室内へ持続投与した際の増殖、分化、運動への影響を特異的分子マーカーを用いて解析した。

### (倫理面への配慮)

動物を使用する研究計画はすべて国立精神・神経センター神経研究所動物実験倫理問題検討委員会で審議され承認を受けた。実際の動物使用に当たっては国の法律・指針並びに米国 NIH の基準を守り動物が受ける苦痛を最小限に留めた。ヒト標本を用いた研究は実施しなかった。

## C. 研究結果

### (1)パーキンソン病モデルを用いた研究

脱ユビキチン化酵素 UCH-L1 において I93M 変異がパーキンソン病家系で報告されたことに関し我々は独自に UCH-L1 の当該変異が UCH-L1 の不溶性亢進を誘導しリソソーム系で UCH-L1 の蓄積が生じることを見出した。この結果はユビキチン系とリソソーム系の連関を示すものであったが、さらに我々は UCH-L1 の不溶性亢進がパーキンソン病関連蛋白質の蓄積に寄与することを見いだした。また、水溶液中における UCH-L1 の構造解析を行い、発症度と UCH-L1 構造の間に相関性があることを世界で初めて見いだした。

### (2)ハンチントン病モデルを用いた研究

ハンチントン病原因遺伝子である huntingtin に特異的な siRNA を開発し、その直接投与がモデル動物の延命に効果があることを見出したが、今年度は該当する siRNA を元に shRNA 発現ベクターを開発し生直後のマウス脳内に直接投与することでその治療効果の有無を検討した。shRNA 発現ベクターを脳内投与されたモデルマウスは対照に比べ発症時期が遅れ、延命に関しては昨年度報告した siRNA 処置マウスよりもさらに延命した。

### (3)神経幹細胞に関する研究

成体脳由来培養神経幹細胞に高発現する G 蛋白質共役型受容体の解析を行い、神経幹細胞に最も高発現する G 蛋白質共役型受容体を同定した。当該 GPCR に作用するリガンドの脳内注入により神経幹細胞の運動性、増殖性を解析したところいくつかのリガンドで効果を認めた。

## D. 考察

パーキンソン病、ハンチントン病など神経変性疾患については近年の分子遺伝学的解析から家族性疾患を中心にいくつもの病因遺伝子が同定された。数多くの孤発性については病因の特定はいまだだなされていないが家族性の成果を進展させることで、対症療法の高度化だけでなく根本的治療法開発も展望できるとの期待が高まっている。成因に関して

は国内外における研究から、蛋白質の構造変化、凝集、蓄積と神経細胞死・神経変性との関連が示されており conformation 病の概念確立とともに、アポトーシスに加えて神経細胞機能不全も神経変性の主因として位置づけられるようになってきた。このような世界の潮流の中で我々の最終到達目標は、現時点では有効な治療法の乏しい難治性神経変性疾患に対してよりヒト病態に近いモデル動物を提供し、その解析を通して先端的かつ臨床応用が十分可能な治療法を開発することである。その達成にむけこれまで研究を続けてきたパーキンソン病とハンチントン病に焦点を当て、ハンチントン病モデルマウス (B6CBA-TgN(Hd exon1)62Gpb/J) や我々が独自に開発した I93M UCH-L1 Tg マウスを導入した。具体的には申請した3年間の研究期間中に、マウス個体レベルで原因遺伝子産物の除去による蛋白質の凝集・不溶化防止と蛋白質分解系の適正な活性化を通じた神経機能不全の補正を行う。さらに病態時の神経幹細胞の動態解明とその動員法を確立しニューロンの潜在的修復・再生能を利用した再生治療の基盤技術を具体化する。またそれらの成果を元に、よりヒト病態に近い臨床像を呈することが予想されるモデルとして中型動物や小型霊長類で将来モデルを作製する基盤を築き、先端的治疗法開発に向けて応用することをめざす。これらの研究はパーキンソン病、ハンチントン病の根本的治療法開発をめざす上で必須のものであり、その研究計画の達成は他の神経変性疾患にも応用可能な治療技術を提供し広く神経難病の克服に貢献する。

我々は独自に I93M UCH-L1 が野生型 UCH-L1 に比べ凝集性が高いことを突き止め I93M UCH-L1 発現トランスジェニックマウスを作製したところ、既存のパーキンソン病モデル動物に比べ優れた点を多々有している新規モデルであることを見出した。平成 15 年 8 月 27 日に特許出願を行った。今年度当該モデルマウスを用いて I93M UCH-L1 の不溶性亢進がリソソーム系で生じ、パーキンソン病関連蛋白質の蓄積に寄与することを見出した。この意義は

特に大きく、UCH-L1 から見たパーキンソン病発症の分子機序が明らかにされたことを意味する。

他方、ハンチントン病についても大きな成果を上げることができた。すなわち、培養細胞において発現抑制効果のあるハンチントン病遺伝子特異的 siRNA が開発できたのに続き、当該 siRNA を元に shRNA を開発し、その脳内直接投与がハンチントン病モデルマウスの延命に siRNA よりもより効果のあることを見出した。ハンチントン病に限らず gain of toxicity で発症する神経変性疾患の根本治療に RNAi 法は極めて有望であると考えられる。

また再生医療に関しても、神経幹細胞に高発現する G 蛋白質共役型受容体の解析を通して神経幹細胞の増殖、運動性、ニューロンへの分化を促進するリガンドを数種同定したが、今回そのうちのいくつかが生体において神経幹細胞の運動性あるいは増殖性を制御することを世界で初めて見出した。GPCR はゲノム上に数千個コードされる最大のファミリー分子群であり、創薬の上でも効率の良い有効なターゲット分子群であると考えられている。市販薬の約 60% がこれら GPCR ファミリー分子群のいずれかに作用することでその薬理効果を発揮していることが知られており、GPCR は薬理学上最も重要かつ創薬の上でも効率の良い有効なターゲット分子群であると考えられている。近年、GPCR から MAP キナーゼ・PI3 キナーゼへいたるシグナル伝達系が神経幹細胞の増殖を促進しうることが発見された。これらの知見から、損傷を受けた中枢神経系を GPCR 作用薬により修復を目指す新しい治療方法開発の可能性が考えられる。今回得られた結果は GPCR を利用した神経幹細胞・神経前駆細胞の増殖・分化制御系を開発する上で有用な情報を提供すると思われる。

## E. 結論

ハンチントン病原因遺伝子に対する shRNA を開発し、モデル動物個体においてその効果を確認した。

UCH-L1 の凝集性がもたらすパーキンソン病発症

の分岐所を明らかにした。

神経幹細胞の運動性・接着性を vivo で制御する G 蛋白質共役型受容体リガンドを同定した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kwon, J., Mochida, K., Wang, Y.L., Sekiguchi, S., Sankai, T., Aoki, S., Ogura A., Yoshikawa, Y. and Wada, K. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 is essential for the early apoptotic wave of germinal cells and for sperm quality control during spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 73, 29-35, 2005

Wang, Y.L., Liu, W., Wada, E., Murata, M., Wada, K. Kanazawa, I., Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA. *Neurosci. Res.*, 53, 241-249, 2005

Wang, Y.L., Liu, W., Sun, Y.J., Kwon, J., Setsuie, R., Osaka, H., Noda, M., Aoki, S., Yoshikawa, Y., Wada, K. Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 arrests spermatogenesis in transgenic mice. *Mol. Reprod. Dev.*, 73, 40-49, 2006

Naito S, Mochizuki H, Yasuda T, Mizuno Y, Furusaka M, Ikeda S, Adachi T, Shimizu HM, Suzuki J, Fujiwara S, Okada T, Nishikawa K, Aoki S, Wada K. Characterization of multimetric variants of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 in water by small-angle neutron scattering. *Biochem Biophys Res Commun.* 339, 717-725, 2006

Sakurai, M., Ayukawa, K., Setsuie, R., Nishikawa, K., Hara, Y., Ohashi, H., Nishimoto, M., Abe, T., Kudo, Y., Sekiguchi, M., Sato, Y., Aoki, S., Noda, M., Wada, K. Ubiquitin C-terminal

hydrolase L1 regulates the morphology of neural progenitor cells and modulates their differentiation. *J. Cell Sci.*, 119(Pt1), 162-171, 2006

Kwon, J., Sekiguchi, S., Wang, Y.L., Setsuie, R., Yoshikawa, Y. and Wada, K. The region-specific functions of two ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes along the epididymis. *Exp. Anim.*, 55(1), 35-43, 2006

Ohnishi Y., Tokunaga K., Kaneko K., and Hohjoh H. Assessment of allele-specific gene silencing by RNA interference with mutant and wild-type reporter alleles. *J. RNAi Gene silencing*, (in press), 2006.

##### 2. 学会発表

(国際学会)

Noda M, Kosai Y, Kido MA, Tanaka T, Wada K. "AMPA-type of glutamate receptors in microglia" Gordon Research Conference on Glial Biology: Functional Interaction between Glia & Neuron. Ventura, California, USA. March 16, 2005

Noda, M., Kariura, Y., Kosai, Y., Pannasch, U., Wang, L., Kettenmann, H., Nishikawa, K., Okada, T., Aoki, S., Wada, K. "Anti-inflammatory effects of kinins via microglia in the central nervous system" 1<sup>st</sup> International Conference Exploring the Future of Local Vascular and Inflammatory Mediators. Lund, Sweden. May 28, 2005

Wang, B., Pannasch, U., Hatano, Y., Aoki, S., Kettenmann, H., Wada, K., Noda, M. "Characters of KCNQ channels in microglia." The Fifth Japan-Korea Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. Kitakyushu, Japan. July 23, 2005

Noda, M., Kariura, Y., Pannasch, U., Wang, L., Ifuku,

- M., Nolte, C., Nishikawa, K., Wang, B., Aoki, S., Kettenmann, H., Wada, K. "Anti-inflammatory effects of BK in microglia" The Fifth Japan-Korea Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. Kitakyushu, Japan. July 24, 2005
- Wada, K., Yamauchi, R., Sakurai, M., Furuta, A., Wada, E., Sekiguchi, M., Aoki, S., "Novel therapeutic targets in glia-neuron interaction: G-Protein coupled receptors and deubiquitinating enzymes" International Society for Neurochemistry jointly with the European Society for Neurochemistry. 20<sup>th</sup> Biennial Meeting. August 22, 2005
- Skiguchi, M., Zushida, K., Yoshida, M., Kamichi, S., Yuko Santo-Yamada, Kumanogo, H., Yokosuka, H., Sahara, Y., Nakamura, S., Yuasa, S., and Wada, K., "Deficit of dystrophin facilitates mouse defensive behavior" Society for Neuroscience 35<sup>th</sup> Annual Meeting, Washington DC, November 12-16, 2005
- Zushida, K., Wada, K., and Sekiguchi, M., "A potentiator of AMPA receptors, PEPA, accelerates the decay of conditioned fear responses in mice" Society for Neuroscience 35<sup>th</sup> Annual Meeting, Washington DC, November 12-16, 2005
- Noda, M., Sato, A., Manago, Y., Nishikawa, K., Amano, T., Aoki, K., Wada, E., Osaka, H., Setsuie, R., Sakurai, M., Aoki, S., Wada, K., "A possible role of parkin in neurotransmission; potentiation of P2X receptor channels." Society for Neuroscience 35<sup>th</sup> Annual Meeting, Washington DC, November 12-16, 2005
- Noda, M., Ifuku, M., Farber, K., Seike, T., Wang, B., Kettenmann, H., Wada, K. "Protective effects of kinins via microglia in the brain" Asian Symposium for Pharmaceutical Science in JSPS Asian Core Program. Fukuoka, Japan. January 26, 2006
- Noda, M., Ifuku, M., Farber, K., Kettenmann, H., Wada, K. "Kinin-induced microglial migration and anti-inflammatory effects in the central nervous system" 37<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry. Portland, USA. March 12-13, 2006
- Ohnishi Y., Tokunaga K., Kaneko K., and Hohjoh H. (2005) "Evaluation system for siRNA duplexes conferring allele-specific gene silencing." 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Salt Lake City, Utah, USA.
- Kawashima M., Tamiya G., Hohjoh H., Juji T., Ebisawa T., Honda Y., Inoko H., Tokunaga K. (2005) "A new resistant gene candidate for human narcolepsy identified by a genome-wide association study" 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Salt Lake City, Utah, USA.
- (国内学会)
- 関口正幸、圖子田 康、吉田瑞子、上地さり、山田 祐子、佐原資謹、和田圭司：「Dystrophin のマウス中枢における機能についての研究」第46回日本神経学会総会、鹿児島 2005.5.25
- 和田圭一郎、山田正典、安田徹、平井幸彦、小坂 仁、望月秀樹、島田隆、和田圭司、水野美邦：「AAVベクターを用いたUCHL-1過剰発現系における神経細胞死の検討」第46回日本神経学会総会、鹿児島 2005.5.26
- 安田徹、仁平友子、和田圭一郎、和田圭司、水野美邦、望月秀樹：「UCH-L1 transgenic マウスにおける  $\alpha$ -synuclein の過剰発現」第46回日本神経学会総会、鹿児島 2005.5.26
- Wang, Y., Setsuie, R., Mochizuki, H., Osaka, H., Hayakawa, H., Ichihara, N., Noda, M., Mizuno,

- Y., Aoki, S., and Wada, K., “UCH-L1I93M Tg mice is an useful model of Parkinson’s disease” 第28回日本神経科学学会大会、パシフィコ横浜 2005.7.26
- Sakurai, M., Ayukawa, K., Setsuie, R., Nishikawa, K., Aoki, S., Noda, M., Wada, K., “UCH-L1 Regulates the Morphology of Neural Progenitor Cells and Modulates their Differentiation” 第28回日本神経科学学会大会、パシフィコ横浜 2005.7.26
- Sekiguchi, M., Zushida, K., Yoshida, M., Kamichi, S., Santo-Yamada, Y., Kumanogo, H., Yokosuka, M., Sahara, Y., Nakamura, S., and Wada, K., “Deficit of dystrophin facilitates mouse defensive behavior” 第28回日本神経科学大会、横浜 2005.7.28
- Zushida, K., Wada, K., and Sekiguchi, M., “A potentiator of AMPA receptors, PEPA, accelerates the extinction of fear memory through AMPA receptors” 第28回日本神経科学大会、横浜 2005.7.27
- Aoki, S., Nishikawa, K., Sun, YJ, Wang, YL., Osaka, H., Wada, K., “Solo, a membrane-associated Trio isoform, regulates early endosomes in Purkinje neurons” 第28回日本神経科学大会、横浜 2005.7.27
- 和田圭司: 「たんぱく質分解の破綻と神経疾患 ユビキチン代謝異常と神経変性」第35回 新潟神経学夏期セミナー 2005.8.4
- 有村由貴子、佐藤あゆみ、西川香里、青木公三子、和田恵津子、青木俊介、和田圭司、野田百美。 「P2X 受容体反応に及ぼすパーキンソン病原因遺伝子パーキンおよび alpha-シヌクレインの影響」 生理学研究所研究会:「生理機能制御および病態におけるプリン作動性シグナリングの役割とその分子機構」於 岡崎生理学研究所 2005.9.1
- 王 冰、パナシュ・ウルリケ、波田野佳子、青木俊介、ケテンマン・ヘルマト、和田圭司、野田百美 “Expression and function of KCNQ channels in microglia” 第48回日本神経化学学会(福岡)大会 2005.9.28
- 安田徹、仁平友子、和田圭一郎、和田圭司、水野美邦、望月秀樹 “Analysis for functional interaction between alfa-synuclein and UCH-L1 proteins in vivo” 第48回日本神経化学学会(福岡)大会 2005.9.28
- 野田百美、真子 好正、佐藤あゆみ、西川香里、天野大樹、青木公三子、和田恵津子、小坂仁、節家理恵子、櫻井省花子、王 玉来、青木俊介、和田圭司 “A possible role of parkin and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 in neurotransmission; potentiation of P2X receptor channels” 第48回日本神経化学学会(福岡)大会 2005.9.28
- Naito, S., Mochizuki, H., Yasuda, T., Mizuno, Y., Furusaka, M., Ikeda, S., M Hirohiko Shimizu, Adachi, T., Suzuki, J., Fujiwara, S., Okada, T., Nishikawa, K., Aoki, S., Wada, K., “Characterization of multimetric variants related to Parkinson’s disease of Ubiquitin carboxyl-Terminal hydrolase L1 in water by small - Angle neutron scattering” 第78回日本生化学会大会、神戸 2005.10.19-22
- 井 福正隆、Katrin Farber、王 冰、Helmut Kettenmann、和田圭司、野田百美。 「ブラジキニン B<sub>1</sub> 受容体を介したミクログリアの運動性・移動性増加とその要因解析」第10回グリア研究会、大阪 2005.10.22
- 和田圭司: 「神経変性と脱ユビキチン化酵素」 “The ubiquitin system and neural cell function: Functional role of a deubiquitinating isozyme, UCH-L1, in neurogenesis and neurodegeneration.” 蛋白質研究所セミナー 「脳神経疾患の最前線」 大阪 2005.11.25
- 和田圭司: 「パーキンソン病とユビキチンシステム



「UCH-L1 の役割」第21回 Wako ワークショップ「神経疾患その病態解明と治療法の開発」  
2005.11.30

西川香里、青木俊介、孫 英傑、王 玉来、小坂仁、和田圭司 “Modulation of neurite elongation by Purkinje neuron-specific guanine nucleotide exchange factor” 「小脳プルキニエ細胞特異的に発現するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF)の神経突起伸長に関する機能解析」第28回日本分子生物学会年会 2005.12.7

後藤章子、王玉来、節家理恵子、小坂仁、櫻井省花子、株田智弘、澤 明、石浦章一、和田圭司: Gracile Axonal Dystrophy (GAD) マウス坐骨神経のプロテオーム解析 “Role of Ubiquitin Carboxy Terminal Hydrolase - L1 in sciatic nerve” 第28回日本分子生物学会年会 2005.12.8

大橋洋輝、君和田友美、西川香里、青木俊介、和田圭司: 成熟個体脳由来の神経系前駆細胞におけるG蛋白質共役型受容体の発現解析 “Expression profile of G-protein coupled receptor genes on adult mouse brain-derived neural progenitor cells.” 第28回日本分子生物学会年会 2005.12.9

Amano, T., Wada, E., Noda, M. Wada, K., Sekiguchi, M. “Enhancement of amygdala LTP in neurotensin receptor type-1 knockout mice; participation of the dopamine system” 第4回ニューロサイエンスワークショップ in 九州 於福岡 2005.12.9

井福正隆、Katrin Farber、王冰、和田圭司、Helmut Kettenmann、野田百美. 「ブラジキニン B<sub>1</sub> 受容体を介したミクログリアの遊走性増加および化学走性とそのメカニズム解明」第126年会日本薬学会 於仙台 2006.3.28

田村美子、功刀浩、金子清俊、北條浩彦. (2005) 「ヒト RELN 遺伝子の DNA メチル化と遺伝子発現レベルの解析」第28回日本分子生物学会、

福岡.

大西悠亮、徳永勝士、徳永勝士、金子清俊、北條浩彦. (2005) 「対立遺伝子特異的 RNAi 効果をヘテロ接合体下で評価するアッセイ系の確立」第28回日本分子生物学会、福岡.

山本真央、高須美和、徳永勝士、数藤由美子、平井百樹、北條浩彦、功刀浩、上野美華子、南光進一郎. (2005) 「均衡型染色体転座部位における双極性障害疾患感受性遺伝子探索」第28回日本分子生物学会、福岡.

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

(審査請求中)

特許出願番号:2003-303370

発明の名称:ユビキチンC末端水解酵素発現マウス  
発明者:和田圭司他4名

特許出願人:国立精神・神経センター、科学技術振興事業団

出願年月日:平成15年8月27日

特許出願番号: 2005-116177

発明者:北條浩彦

発明の名称:「対立遺伝子に対する特異的 RNAi の評価方法」

出願人:財団法人ヒューマンサイエンス振興財団とプロメガ株式会社との共同出願

出願日:平成17年4月13日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ハンチントン病の遺伝子発現制御に関する研究

分担研究者 北條 浩彦 国立精神・神経センター神経研究所 室長

研究要旨：平成15、16年度の研究から、RNA interference (RNAi)を用いて正常マウス *Huntingtin* 遺伝子を機能阻害(ノックダウン)させた場合、RNAiを誘導したマウス細胞に細胞増殖の顕著な減少が観察された。この結果は、正常 *Huntingtin* の機能が細胞増殖に重要であることを示唆している。したがって、RNAi 技術を使って変異型 *Huntingtin* 遺伝子の機能阻害を誘導させる場合、正常型 *Huntingtin* 遺伝子に影響の少ない RNAi 誘導法が望まれる。つまり、正常型、異常型遺伝子を識別して発現抑制させる対立遺伝子（アレル）特異的 RNAi 誘導法が有用であると考えられる。しかしながら、その実現のためには、正確な評価方法の確立が不可欠である。そこで本年度は、アレル特異的 RNAi 誘導を簡便かつ正確に評価する方法の確立を試みた。

A. 研究の目的

ハンチントン病 (MIM143100) の原因遺伝子である *Huntingtin* 遺伝子の機能については、未だ不明の点が多い。*Huntingtin* 遺伝子のノックアウトマウスは胎生致死となり、コンディショナル・ノックアウトマウスにおいても神経細胞にアポトーシスが誘導され、異常な神経症状を示すことが知られている。また、神経培養細胞を用いた研究からも、正常型 *Huntingtin* がアポトーシスを抑制することが報告されている。これらの報告は、異常型 *Huntingtin* による機能異常ばかりでなく、正常型 *Huntingtin* の機能喪失も病態と深く関係している可能性を示唆している。一昨年そして昨年度において、RNA interference (RNAi) を用いた *Huntingtin* 遺伝子ノックダウンによる細胞への影響を検討してきた結果、正常型 *Huntingtin* 遺伝子をノックダウンした場合、細胞増殖の顕著な減少が観察されることが分

かった。この結果は、正常型 *Huntingtin* の機能が細胞増殖に重要であることを示唆している。したがって、RNAi 技術を用いて変異型 *Huntingtin* 遺伝子をノックダウンする場合、正常型 *huntingtin* 遺伝子には影響しない RNAi 誘導法でなければならない。つまり、正常型、異常型遺伝子を識別して発現抑制させる対立遺伝子（アレル）特異的 RNAi 誘導法でなければならない。しかしながら、その実現のためには、異常型、正常型アレルを識別する siRNA の設計が必要であり、さらにその siRNA を用いたアレル特異的 RNAi 活性の評価法の確立が不可欠である。そこで今回、遺伝子変異を持った対立遺伝子（変異対立遺伝子）だけをノックダウンするアレル特異的 RNAi 誘導法の評価方法の確立を試みた。

B. 研究方法

1) ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子とウミ

シイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子をそれぞれコードした発現プラスミドを利用してレポーターアリルを構築した。まず、変異アリル、正常アリルに相当するオリゴDNAを合成し、それらをそれぞれのレポーター遺伝子の3'非翻訳領域に挿入して変異レポーターアリルそして正常レポーターアリルを構築した。

2) 変異アリルをターゲットとする合成 siRNA を作製し、正常、変異レポーターアリルをそれぞれ含んだプラスミド DNA とベクター・ガラクトシダーゼ遺伝子を含んだ発現プラスミド DNA (コントロールとして用いた) をリポフェクタミン 2000 試薬 (Invitrogen 社) を用いたリポフェクションによってヒト HeLa 細胞に導入し、24 時間後、細胞抽出液を調製した。

3) 得られた細胞抽出液を用いて、発現した両ルシフェラーゼ活性そしてコントロールのベクター・ガラクトシダーゼ活性を測定した。そして、ベクター・ガラクトシダーゼの活性値を基に両ルシフェラーゼの活性量 (発現量) を正常化し、テストした siRNA の変異アリルに対するノックダウン効果と正常アリルに対する影響を評価した。

4) 今回、本研究は評価システムの確立を第一の目標とした。そこで、様々な検討を容易に行うために、すでに十分研究されている amyloid precursor protein (APP) 遺伝子の Swedish 型変異 (アミノ酸変化を伴う 2 塩基変異) と London 型変異 (アミノ酸変化を伴う 1 塩基変異) をモデル変異アリルとしてシステムの確立を試みた。

### C. 研究結果

1) Swedish 型変異に対する siRNA の効果を検討した結果 (図 1)、設計した一つの siRNA [siAPP(T12/C13)] を除いて変異アリルに対する発現抑制が観察された。一方、それらの

siRNA の正常型アリルに対する影響は、ほとんど影響を与えないものから中程度 (40% 程) の発現抑制を誘導するものと様々な影響が観察された。

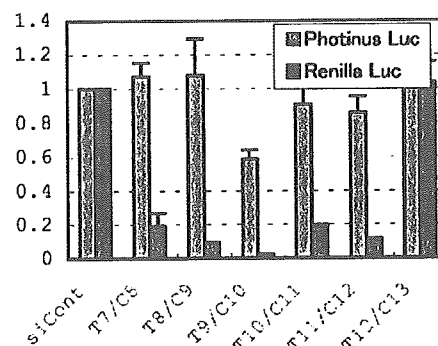


図 1 (正常型:P.Luc ; 変異型:R.Luc)

London 型変異をモデル変異アリルとして解析した結果、V717I, V717F タイプの London 型変異をターゲットとする siRNA では、変異型アリルを 60~70% ノックダウンする siRNA が観察されたが、V717G タイプの London 型変異をターゲットとする siRNA では、極わずかしか発現抑制が誘導されなかった。Swedish 型変異の結果と比べて、全体的に変異アリルと正常アリルとの間に大きな発現量の差を生じさせる、すなわち、アリル特異的な発現抑制効果は観察されなかった。

我々はさらに、改良型 siRNA を用いて、アリル特異的 RNAi 誘導が改善されるか否かについても検討した。今回テストした改良型 siRNA は、Fork-siRNA で、センス鎖の 3' 末端に mismatches を導入しアンチセンス鎖とのアニーリングを阻害した siRNA 二量体である。この Fork 型 siRNA は従来型の siRNA と比べて RNAi を強く誘導することが知られている。この Fork-siRNA を用いて Swedish 型, London 型変異アリルに対する発現抑制効果の亢進、そして、正常型アリルに対するオフターゲット効果の減少が誘導されるか否かを調べた。その結

果、Swedish型変異アリルでは全体的にアリル特異的 RNAi 活性が高まり、さらに、従来型の siRNA では RNAi 活性を誘導することができなかった siAPP(T12/C13)においても、Fork型にすることでアリル特異的 RNAi 活性が誘導された。

London型変異アリルに対しても、Fork型 siRNA を用いることで、アリル特異的 RNAi 活性の改善が観察されたが、その程度は Swedish型変異と比べて小さく、また、変異のタイプによって異なっていた。

2) 正常型そして Swedish型の完全長 cDNA を持った APP 発現プラスミドと、上記で解析した Swedish型変異に対する siRNA を Cos-7 細胞に導入し同様の解析を行った。ウエスタンブロット法、ELISA法を用いて解析した結果、レポーターアリルを用いて評価した結果とほぼ同様の結果が得られた。さらに、正常型、Swedish型の両方が発現するヘテロの条件下で、アリル特異性を示す siRNA は、APP タンパク質の発現量に変化を与えずにベータ・アミロイドの産生を減少させることが観察された。

#### D. 考察

1) 本研究で行ったアリル特異的 RNAi 活性を評価する新システムの開発とその評価の結果、ルシフェラーゼレポーター遺伝子をレポーター対立遺伝子として利用することでアリル特異的 RNAi 活性を評価できることが示された。しかも今回開発した新システムは、簡便かつ短時間で結果の得られるシステムであり、さらに、従来の方法では解析不可能であった正常型/変異型アリルがヘテロで存在する条件下でもそれぞれのアリルに対する RNAi 効果を検討することが可能であることも分かった。

2) 新しいシステムを用いたアリル特異的 RNAi 活性の評価の結果、二塩基置換と比べて

一塩基置換による変異アリルを正常アリルと識別することが困難であることが分かった。さらに、塩基置換のタイプによってもアリル特異的 RNAi 効果が異なることも明らかになった。

3) 改良型 siRNA によるアリル特異的 RNAi 活性の改善効果を検討した結果、程度の差はあるものアリル特異的 RNAi 活性が高まることが観察された。しかしながら、変異の種類によってはその効果が十分ではなく、この点を改善するような新たな siRNA の化学修飾などを今後検討しなければならないと考える。

#### E. 結論

ホタル、ウミシイタケ・ルシフェラーゼレポーター遺伝子をリポーターアリルとして、アリル特異的 RNAi 効果を評価するシステムの確立を行った。確立したシステムは、従来の方法では解析が不可能であった正常型/変異型アリルがヘテロで存在する条件下で、変異アリルに対する RNAi 発現抑制効果と正常アリルに与える影響を同時に評価することができる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ohnishi Y., Tokunaga K., Kaneko K., and Hohjoh H. Assessment of allele-specific gene silencing by RNA interference with mutant and wild-type reporter alleles. *J. RNAi Gene silencing*, (in press), 2006.
- 2) Ohnishi Y., Tokunaga K., Hohjoh H. Influence of assembly of siRNA elements into RNA-induced silencing complex (RISC) by fork-siRNA duplex carrying nucleotide mismatches at the 3' or 5'-end of the sense-stranded siRNA element. *BBRC*, 329: 516-521, 2005

- 3) Tamura Y., Sakasegawa Y., Omi K., Kishida H., Asada T., Kimura H., Tokunaga K., Hachiya N.S., Kaneko K., Hohjoh H. Association study of the chemokine, CXC motif, ligand 1 (CXCL1) gene with sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population. *Neurosci. Letters*, 379: 149-151, 2005

## 2. 総説

- 1) 北條浩彦. RNAi 効果の評価法. *バイオテクノロジー ジャーナル*, 6: 51-57, 2006

## 3. 学会発表

- 1) Ohnishi Y., Tokunaga K., Kaneko K., and Hohjoh H. (2005) "Evaluation system for siRNA duplexes conferring allele-specific gene silencing." 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Salt Lake City, Utah, USA.
- 2) Kawashima M., Tamiya G., Hohjoh H., Juji T., Ebisawa T., Honda Y., Inoko H., Tokunaga K. (2005) "A new resistant gene candidate for human narcolepsy identified by a genome-wide association study" 55<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Salt Lake City, Utah, USA.
- 3) 田村美子、功刀浩、金子清俊、北條浩彦. (2005) 「ヒト RELN 遺伝子の DNA メチル化と遺伝子発現レベルの解析」 第 28 回日本分子生物学会、福岡.
- 4) 大西悠亮、徳永勝士、徳永勝士、金子清俊、北條浩彦. (2005) 「対立遺伝子特異的

RNAi 効果をヘテロ接合体下で評価するアッセイ系の確立」 第 28 回日本分子生物学会、福岡.

- 5) 山本真央、高須美和、徳永勝士、数藤由美子、平井百樹、北條浩彦、功刀浩、上野美華子、南光進一郎. (2005) 「均衡型染色体転座部位における双極性障害疾患感受性遺伝子探索」 第 28 回日本分子生物学会、福岡.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願番号： 2005-116177

発明者：北條浩彦

発明の名称：「対立遺伝子に対する特異的 RNAi の評価方法」

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団とプロメガ株式会社との共同出願

出願日：平成 17 年 4 月 13 日

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kwon, J., Mochida, K., Wang, Y.L., Sekiguchi, S., Sankai, T., Aoki, S., Ogura A., Yoshikawa, Y. and Wada, K.	Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 is essential for the early apoptotic wave of germinal cells and for sperm quality control during spermatogenesis.	<b>Biol. Reprod.</b>	73	29-35	2005
Wang, Y.L., Liu, W., Wada, E., Murata, M., Wada, K. Kanazawa, I.	Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA.	<b>Neurosci. Res.</b>	53	241-249	2005
Wang, Y.L., Liu, W., Sun, Y.J., Kwon, J., Setsuie, R., Osaka, H., Noda, M., Aoki, S., Yoshikawa, Y., Wada, K.	Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 arrests spermatogenesis in transgenic mice.	<b>Mol. Reprod. Dev.</b>	73,	40-49	2006
Naito S, Mochizuki H, Yasuda T, Mizuno Y, Furusaka M, Ikeda S, Adachi T, Shimizu HM, Suzuki J, Fujiwara S, Okada T, Nishikawa K, Aoki S, Wada K.	Characterization of multimetric variants of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 in water by small-angle neutron scattering.	<b>Biochem Biophys Res Commun.</b>	339	717-725	2006
Sakurai, M., Ayukawa, K., Setsuie, R., Nishikawa, K., Hara, Y., Ohashi, H., Nishimoto, M., Abe, T., Kudo, Y., Sekiguchi, M., Sato, Y, Aoki, S., Noda, M., Wada, K.	Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 regulates the morphology of neural progenitor cells and modulates their differentiation.	<b>J. Cell Sci.</b>	119(Pt1)	162-171	2006
Kwon, J., Sekiguchi, S., Wang, Y.L., Setsuie, R., Yoshikawa, Y. and Wada, K.	The region-specific functions of two ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes along the epididymis.	<b>Exp. Anim.</b>	55(1),	35-43	2006
Tamura, Y., Sakasegawa, Y., Omi, K., Kishida, H., Asada, T., Kimura, H., Tokunaga, K., Hachiya, S N., Kaneko, K., Hohjoh, H.	Association study of the chemokine, CXC motif, ligand 1(CXCL1) gene with sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population.	<b>Neurosci. Lett.</b>	379	149-151	2005
Ohnishi Y., Tokunaga K., Kaneko K., and Hohjoh H.	Assessment of allele-specific gene silencing by RNA interference with mutant and wild-type reporter alleles.	<b>J. RNAi Gene silencing</b>		in press	2006

北條浩彦	RNAi 効果の評価法～本当に RNAi が起きているのか？	バイオテクノロジージャーナル	1-2	51-57	2006
------	--------------------------------	----------------	-----	-------	------

研究成果の刊行物・印刷



## Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L-1 Is Essential for the Early Apoptotic Wave of Germinal Cells and for Sperm Quality Control During Spermatogenesis<sup>1</sup>

Jungkee Kwon,<sup>3,4</sup> Keiji Mochida,<sup>5</sup> Yu-Lai Wang,<sup>3</sup> Satoshi Sekiguchi,<sup>4</sup> Tadashi Sankai,<sup>6</sup> Shunsuke Aoki,<sup>3</sup> Atsuo Ogura,<sup>5</sup> Yasuhiro Yoshikawa,<sup>4</sup> and Keiji Wada<sup>2,3</sup>

Department of Degenerative Neurological Disease,<sup>3</sup> National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan

Department of Biomedical Science,<sup>4</sup> Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

Bioresource Engineering Division,<sup>5</sup> Bioresource Center, Riken, Tsukuba, Ibaraki 305-0074, Japan

Tsukuba Primate Center,<sup>6</sup> National Institute of Infectious Diseases, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan

### ABSTRACT

Ubiquitination is required throughout all developmental stages of mammalian spermatogenesis. Ubiquitin C-terminal hydrolase (UCH) L1 is thought to associate with monoubiquitin to control ubiquitin levels. Previously, we found that UCHL1-deficient testes of *gad* mice have reduced ubiquitin levels and are resistant to cryptorchid stress-related injury. Here, we analyzed the function of UCHL1 during the first round of spermatogenesis and during sperm maturation, both of which are known to require ubiquitin-mediated proteolysis. Testicular germ cells in the immature testes of *gad* mice were resistant to the early apoptotic wave that occurs during the first round of spermatogenesis. TUNEL staining and cell quantitation demonstrated decreased germ cell apoptosis and increased numbers of premeiotic germ cells in *gad* mice between Postnatal Days 7 and 14. Expression of the apoptotic proteins TRP53, Bax, and caspase-3 was also significantly lower in the immature testes of *gad* mice. In adult *gad* mice, cauda epididymidis weight, sperm number in the epididymis, and sperm motility were reduced. Moreover, the number of defective spermatozoa was significantly increased; however, complete infertility was not detected. These data indicate that UCHL1 is required for normal spermatogenesis and sperm quality control and demonstrate the importance of UCHL1-dependent apoptosis in spermatogonial cell and sperm maturation.

*apoptosis, early apoptotic wave, epididymis, gad mouse, sperm, spermatogenesis, sperm quality, testis, UCHL1*

### INTRODUCTION

Ubiquitin and ubiquitin-dependent proteolysis are involved in a variety of cellular processes, such as cell cycle progression, degradation of intracellular proteins, programmed cell death, and membrane receptor endocytosis

[1–5]. In spermatogenesis, the ubiquitin-proteasome system is required for the degradation of numerous proteins throughout the mitotic, meiotic, and postmeiotic developmental phases [4, 6, 7]. Ubiquitin C-terminal hydrolases (UCHs) control the cellular ubiquitin balance by releasing ubiquitin from tandemly conjugated ubiquitin monomers (*Ubb*, *Ubc*) and small adducts or unfolded polypeptides [4, 8–10]. UCHL1 is expressed at high levels in both testis and epididymis and may play an important role in the regulation of spermatogenesis [11–14]. In addition to its hydrolase activity [15], UCHL1 has a variety of functions, including dimerization-dependent ubiquitin ligase activity, and association with and stabilization of monoubiquitin in neuronal cells [16–18]. Furthermore, it has been suggested that UCHL1 also functions as a regulator of apoptosis [19]. The gracile axonal dystrophy (*gad*) mouse is an autosomal recessive spontaneous mutant carrying an intragenic deletion of the gene encoding *Uchl1* [21]. We recently found that testes of *gad* mice, which lack UCHL1 expression [18, 20, 21], have reduced ubiquitin levels and are resistant to cryptorchid injury-mediated germ cell apoptosis [22].

During prepubertal development, an early and massive wave of germinal cell apoptosis occurs in mouse testis [23, 24]. This early germ cell apoptotic wave affects mainly spermatogonia and spermatocytes and appears to be essential for functional spermatogenesis in adulthood. Decreased apoptosis has been reported in the early phase of spermatogenesis in transgenic mice overexpressing the antiapoptotic proteins *Bcl2* or *Bcl-xL* [23, 25] and in mice deficient in the apoptotic protein *Bax* [26]. This reduction in apoptosis is associated with the disruption of normal spermatogenesis and infertility. Our previous work demonstrated that *gad* mice exhibit pathological changes such as progressively decreasing spermatogonial stem cell proliferation [13] and increased expression of the antiapoptotic proteins *Bcl2* and *Bcl-xL* in response to apoptotic stress [19, 22]. Furthermore, we showed that UCHL1 functions during prepubertal development to effect normal spermatogenesis and to modulates germ cell apoptosis [22]. However, the mechanism by which UCHL1 regulates apoptosis during prepubertal development remains unclear. To further investigate the role of UCHL1 in immature testes, we evaluated the function of UCHL1 during early spermatogenesis. Here, we show that immature testes of *gad* mice accumulate premeiotic germ cells and are resistant to the massive wave of germinal cell apoptosis during the first round of spermatogenesis, eventually leading to alterations in sperm produc-

<sup>1</sup>Supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan; Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan; a grant from the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency of Japan; and a grant from Japan Science and Technology Agency.

<sup>2</sup>Correspondence: Keiji Wada, Department of Degenerative Neurological Disease, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan.  
FAX: 81 42 341 1745; e-mail: wada@ncnp.go.jp

Received: 16 October 2004.

First decision: 16 December 2004.

Accepted: 21 February 2005.

© 2005 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.

ISSN: 0006-3363. <http://www.biolreprod.org>

tion, motility, and morphology in adult mice. Our data suggest that UCHL1-dependent apoptosis is essential for normal spermatogenesis.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

We used male *gad* (CBA/RFM) mice [21] at 7, 14, 21, 28, and 35 days and 10 wk of age. The *gad* mouse is an autosomal-recessive mutant that was produced by crossing CBA and RFM mice. The *gad* line was maintained by intercrossing for more than 20 generations. This strain was maintained at our institute. Animal care and handling were in accordance with institutional regulations and were approved by the Animal Investigation Committee of the National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry.

### Histological and Immunohistochemical Assessment of Testes

Testes were embedded in paraffin wax after fixation in 4% paraformaldehyde, sectioned at 4- $\mu$ m thickness, and stained with hematoxylin for counting [13]. Light microscopy was used for routine observations. For immunohistochemical staining, the sections were incubated with 10% goat serum for 1 h at room temperature followed by incubation overnight at 4°C with a rabbit polyclonal antibody against UCHL1 (1:1000 dilution; peptide antibody) [20] in PBS containing 1% BSA. Sections were then incubated for 1 h with biotin-conjugated anti-rabbit IgG diluted 1:200 in PBS, followed by Vectorstain ABC-PO (Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 30 min at room temperature. Sections were developed using 3,3'-diaminobenzidine and counterstained with hematoxylin.

Apoptotic cells in testicular tissues were identified by terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated nick end labeling (TUNEL) using the DeadEnd Fluorometric TUNEL system (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions.

### Quantitative Analysis of Testicular Cell Number

The total number of cells was determined by counting the testicular cells including Sertoli cells of seminiferous tubules. Quantitative determinations were made using four each of wild-type and *gad* mice at 7 and 14 days of age. Five sections from each mouse were processed in parallel for counterstaining with hematoxylin. Twenty circular seminiferous tubules in each section were then selected by randomly from those tubules, and 400 circular seminiferous tubules were measured using the 400 $\times$  lens of a Zeiss Axioplan microscope. The total cell number was not determined by dividing cell types such as testicular germ cells and Sertoli cells because it was difficult to determine the difference of cell types [26]. There were no significant differences in nuclear size in either of the group studies. Thus, the total number of cells reflected all cell types of seminiferous tubules.

### Quantitative Analysis of Apoptotic Germ Cells

Quantification was performed using four each of wild-type and *gad* mice at 7, 14, 21, 28, and 35 days of age. The total number of apoptotic cells was determined by counting the positively stained nuclei in 20 circular seminiferous tubules in each section [22]. Five sections from each mouse and a total 400 circular seminiferous tubules per each group were processed.

### Germ Cell Isolation, Culture, and Viability Measurement

Germ cells from wild-type and *gad* mice were prepared using a modification of the procedure described by Kwon et al. [20]. Briefly, testes from three 2-wk-old mice were incubated twice for 30 min at 25°C in Dulbecco Modified Eagle medium (DMEM)-F12 medium containing 0.5 mg/ml collagenase IV-S (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and then digested for 60 min at 25°C in DMEM-F12 medium containing 1 mg/ml trypsin (Sigma-Aldrich). The cell suspension was digested and washed several times to eliminate testicular somatic cells. The cells were then counted and cultured at  $2.0 \times 10^5$  cells/ml in DMEM-F12 medium containing 10% fetal bovine serum (FBS). The cells were harvested at each day for 5 days, and viability was assessed using the Vi-Cell XR cell viability analyzer (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

### Quantitative mRNA Analysis of Uchl1 and Uchl3 Genes by Real-Time PCR

SYBR Green-based real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR; PRISM 7700 Sequence detection system, ABI, Columbia, MD) was performed [20] in SYBR Green Master mix using the following primers: *Uchl1*, 5'-TTCTGTCAACAACGTTGGACG-3' and 5'-TCACTGGAAAGGGCATTTCG-3'; *Uchl3*, 5'-TGAAGGTCAGACTGAGGCACC-3' and 5'-AATTGGAAATGGTTTCCGTCC-3';  $\beta$ -actin, 5'-CGTGCCTGACATCAAAGAGAA-3' and 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'. To compare *Uchl1* and *Uchl3* gene expression in the first round of spermatogenesis, the formula  $2^{-ddCt}$  was used to calculate relative expression compared with testes of 7-day-old mice.

### Western Blotting

Western blots were performed as previously reported [19, 22]. Total protein (5  $\mu$ g/lane) was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using 15% gels (Perfect NT Gel, DRC, Japan). Proteins were electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad, Hercules, CA) and blocked with 5% nonfat milk in TBS-T (50 mM Tris base, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% [w/v] Tween-20). The membranes were incubated individually with one or more primary antibodies to UCHL1 and UCHL3 (1:1000 dilution; peptide antibodies) [20], Bcl-xL, Bax, TRP53, and inactive caspase-3 (1:1000 dilution; all from Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Blots were further incubated with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG or goat anti-rabbit IgG (1:5000 dilution; Pierce, Rockford, IL) for 1 h at room temperature. Immunoreactions were visualized using the SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce) and analyzed using a ChemImager (Alpha Innotech, San Leandro, CA).

### Sperm Motility, Morphology, and Immunohistochemical Assessments

Sperm were collected from the right cauda epididymidis [27] of 10-wk-old wild-type and *gad* mice in 400  $\mu$ l human tubal fluid medium containing 0.5% bovine serum albumin and then incubated at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in air for 1–2 h. Using a computer-assisted semen analysis system (TOX IVOS, Hamilton Throne Research, Beverly, MA) [28], sperm were analyzed for the following motion parameters: percentage of motile sperm (MSP), percentage of progressively motile sperm (PMP), average path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), lateral head displacement (ALH), linearity (VSL/VCL  $\times$  100), and straightness (VSL/VAP  $\times$  100). All procedures were performed at 37°C. To study the spermatozoa morphology, sperm were smeared and then evaluated for defects in the head, midpiece, and principal piece and for head detachment. For immunocytochemical staining, the sections were incubated with antibodies against UCHL1 (1:1000 dilution; peptide antibody) [20] and ubiquitin (1:500 dilution; DakoCytomation, Glostrup, Denmark) overnight at 4°C in PBS containing 1% BSA.

### Statistical Analysis

The mean and standard deviation were calculated for all data (presented as mean  $\pm$  SD). One-way analysis of variance (ANOVA) was used for all statistical analyses.

## RESULTS

### Expression of UCHL1 During the First Round of Spermatogenesis

We used Western blotting to characterize the level of UCHL1 and UCHL3 expression in testes from immature wild-type and *gad* mice (Fig. 1, B and C). In agreement with previous data [20], UCHL1 expression was significantly elevated on Day 14 in testicular lysates obtained from 7-, 14-, 21-, 28-, and 35-day-old wild-type mice. The level of UCHL3 expression increased with age and did not differ between *gad* and wild-type mice (Fig. 1B), suggesting that UCHL3 expression is regulated independently of UCHL1 during the first round of spermatogenesis [20]. We also assessed the expression pattern of *Uchl1* and *Uchl3* genes during juvenile spermatogenesis using SYBR Green-

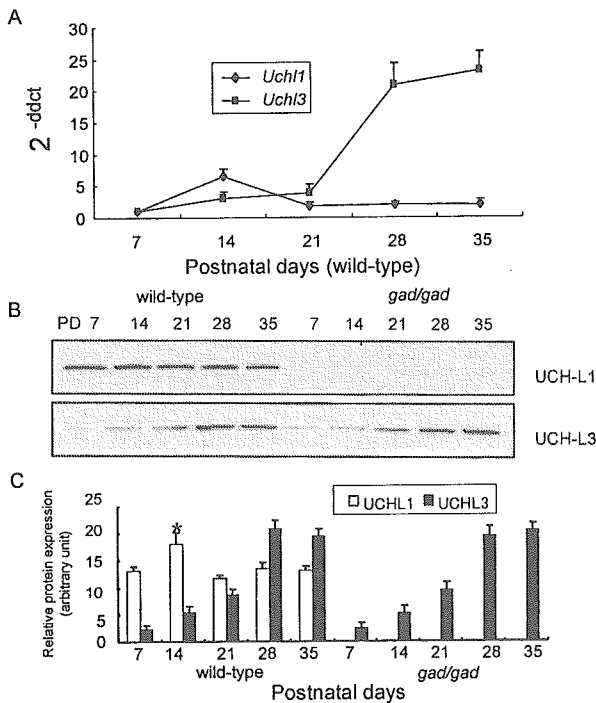


FIG. 1. Expression of UCHL1 and UCHL3 during the first round of spermatogenesis. A) Comparison of *Uchl1* and *Uchl3* gene expression levels ( $2^{-ddct}$ ) by SYBR Green-based real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The value for gene expression from the testes of 7-day-old mice was set to 1.0. B) Comparison of UCHL1 and UCHL3 expression by Western blotting of testicular lysates from wild-type or *gad* mice. Blots were re probed for  $\alpha$ -tubulin, which was used to normalize the protein load. Representative images from four independent experiments are shown. C) Quantitative analysis of changes in UCHL1 and UCHL3 levels by Western blotting. Relative protein expression (optical density) of the bands in panel B, normalized to  $\alpha$ -tubulin. Each data point represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ; \*  $P < 0.05$ ).

based real-time quantitative RT-PCR (Fig. 1A). Despite the fact that the percentage of spermatogonia and Sertoli cells may be diluted by meiotic and postmeiotic germ cells after Day 14 [20], *Uchl1* expression was high in 14-day-old mice, in agreement with our previous findings.

*Immunohistochemistry of UCHL1 and Quantitative Morphometric Assessment*

Immunohistochemical analysis revealed UCHL1 expression in spermatogonia from wild-type mice but not *gad* mice (Fig. 2A). Preliminary examination of tubules from immature testes revealed an overproduction of germ cells in *gad* mice. At 7 and 14 days of age, the number of spermatogonia and preleptotene spermatocytes was significantly increased in *gad* mice compared with wild-type mice (Fig. 2A). The increase in the number of these cell types was further confirmed by quantitative analysis, which showed that the total number of testicular cells, including Sertoli cells, was significantly higher in 7- and 14-day-old *gad* mice (Fig. 2B).

*TUNEL Staining of Apoptotic Germ Cells During the First Round of Spermatogenesis*

To further investigate the mechanism underlying the observed differences in testicular cell numbers between wild-type and *gad* mice during the first round of spermatogen-

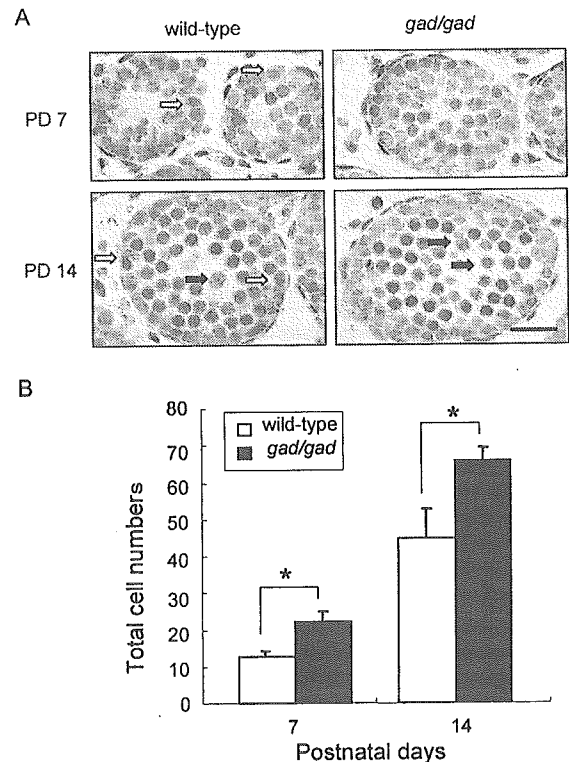


FIG. 2. A) Immunohistochemistry of UCHL1 and testicular morphology during the first round of spermatogenesis. UCHL1-positive germ cells in wild-type mice are indicated by open arrows. Spermatogonia and preleptotene spermatocytes (closed arrows) were more abundant and found further from the basement membrane in Postnatal Day (PD) 7 and 14 *gad* mice. Magnification  $\times 200$ . Bar = 20  $\mu$ m. B) The total number of germ cells in seminiferous tubules was significantly increased in 7- and 14-day-old *gad* mice compared with wild-type mice ( $n = 4$ ; \*  $P < 0.05$ ). Data represent mean  $\pm$  SD.

esis, we examined germ cell apoptosis in tissue sections from mice at 7, 14, 21, 28, and 35 days of age by TUNEL assay. During the first round of spermatogenesis, the total number of apoptotic cells in 20 circular seminiferous tubules decreased significantly ( $n = 4$ ;  $P < 0.05$ ) in *gad* mouse testes as compared with wild-type mice (Fig. 3A). Although germ cell apoptosis significantly increased at Day 14 in the testes of both wild-type and *gad* mice, *gad* mice had significantly fewer apoptotic germ cells ( $n = 4$ ;  $P < 0.05$ ) in seminiferous tubules (Fig. 3B).

*Testicular Germ Cells of gad Mice Are Resistant to Apoptosis-Inducing Conditions In Vitro*

Sertoli cells, which support germ cells, express UCHL1 [12]. To explore the viability of germ cells independently of the effect of Sertoli cells, testicular germ cells from 2-wk-old wild-type and *gad* mice were cultured in suspension for 5 days in the presence of 10% FBS. We then examined the resistance of these in vitro cell culture to apoptosis-inducing conditions. Although both wild-type and *gad* mouse cells were sensitive to apoptosis-inducing conditions, the *gad* mouse cells had comparatively greater viability (Fig. 4). Overall results clearly show that the absence of UCHL1 increase germ cell survival.

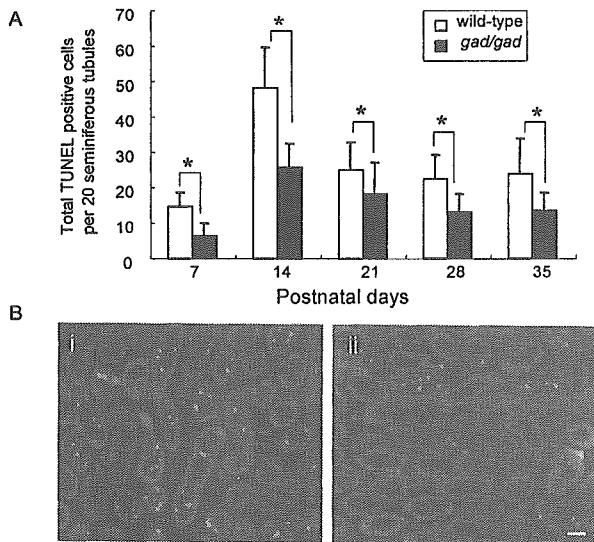


FIG. 3. A) The total TUNEL-positive germinal cells per 20 circular seminiferous tubules in wild-type and *gad* mice on various postnatal days. In each group, the data represent the mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ; \*  $P < 0.05$ ). B) The extent of apoptosis in 2-wk-old mice. i, wild-type mice; ii, *gad* mice. Green fluorescence, TUNEL-positive cells; red fluorescence, nuclei stained with propidium iodide. Magnification  $\times 100$ . Bar = 30  $\mu$ m.

#### Levels of Apoptotic Proteins During the First Round of Spermatogenesis

Germ cell apoptosis involves genes encoding various factors, such as *Trp53*, the *Bcl2* family, and *caspase*, which are targets for ubiquitination [29–31]. Our previous work demonstrated that the expression of antiapoptotic proteins (*Bcl2* family and XIAP) is significantly elevated following cryptorchid stress in *gad* mice [22]. To explore whether the germ cell apoptotic wave is associated with changes in the levels of proteins known to be associated with cell death or survival, Western blot analysis was performed on testicular lysates obtained from 7-, 14-, 21-, 28-, and 35-day-old wild-type and *gad* mice (Fig. 5). Levels of TRP53 and Bax proteins were strikingly elevated in 7-day-old mice but barely detectable on Day 35. Caspase-3 was also strikingly elevated in 7-day-old mice. Since TRP53 modulates Bax expression [22, 32], the observed up-regulation of Bax is consistent with elevated TRP53 levels during the early apoptotic wave. Expression of the antiapoptotic protein Bcl-xL was weaker in immature compared with mature testes. Levels of TRP53, Bax, and caspase-3 proteins were significantly decreased in 7- and 14-day-old *gad* mice relative to the levels observed in wild-type testes (Fig. 5B). By contrast, the level of Bcl-xL protein appeared to be up-regulated earlier in *gad* mice (at 28 days) than in wild-type mice (at 35 days) (Fig. 5B).

#### Assessment of Cauda Epididymidis and Spermatozoa Morphology in *gad* Mice

The cauda epididymidis from wild-type and *gad* mice were weighed, and the sperm were collected and analyzed. The cauda epididymidis from *gad* mice weighed significantly less, likely resulting from the lower sperm concentration measured in *gad* mice ( $19.5 \times 10^6/\text{ml}$ ) compared with wild-type mice ( $23.6 \times 10^6/\text{ml}$ ) (Table 1). Furthermore, abnormal sperm morphology, including head and midpiece defects or a detached head, occurred significantly

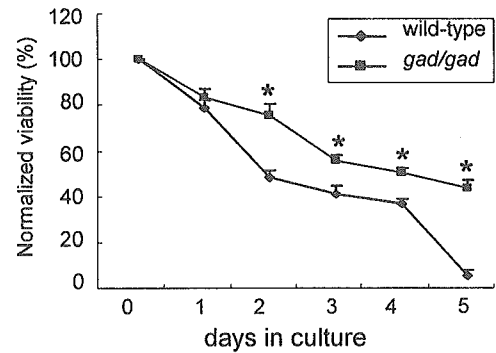


FIG. 4. In vitro survival of testicular germ cells. Testicular germ cells were isolated from wild-type and *gad* mice at 14 days of age. After culture, viability was determined using a Vi-Cell XR cell viability analyzer (Beckman Coulter). Viability at each time point was normalized to that at Day 0. Each data point represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ; \*  $P < 0.05$ ).

more often in *gad* mice (Table 1 and Fig. 6A). Immunocytochemical analysis showed that UCHL1 and ubiquitin were expressed in defective spermatozoa but not in normal spermatozoa (Fig. 6B). Ubiquitin, a marker for sperm abnormalities [33], was detected mainly in defective spermatozoa. However, despite a significantly elevated number of defective spermatozoa, ubiquitin expression in *gad* mouse spermatozoa was similar to that in wild-type mice (data not shown).

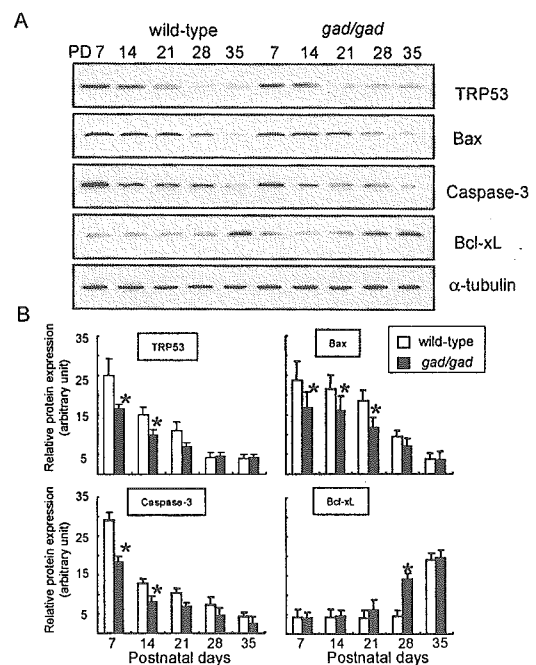


FIG. 5. A) Western blot analyses showing TRP53, Bax, caspase-3, and Bcl-xL levels in wild-type and *gad* mice during the first round of spermatogenesis. Protein (5  $\mu$ g/lane) was prepared from whole testes at 7, 14, 21, 28, and 35 days of age. Blots were reprobed for  $\alpha$ -tubulin to normalize for differences in the amount of protein loaded. Representative images of four independent experiments are shown. B) Quantitative Western blot analysis of changes in TRP53, Bax, caspase-3, and Bcl-xL levels. Relative protein expression (optical density) of the bands in panel A, normalized to  $\alpha$ -tubulin. Each data point represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ; \*  $P < 0.05$ ).