

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09793

研究課題名(和文) 加齢による妊孕性低下とそれを防ぐ分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Declining male fertility with age and the molecular mechanism to suppress age-dependent male fertility

研究代表者

康 宇鎮 (Kang, Woojin)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・研究員

研究者番号：10647978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：不妊症の半数は男性に原因があり、「無精子症」や「乏精子症」が知られている。一方、精子が作られるのに、年齢ともなって進行する男性不妊も知られているが、原因は不明である。本研究ではTCA回路の律速酵素であるクエン酸合成酵素、特に、精子で発現している非ミトコンドリア型クエン酸合成酵素(extra-mitochondrial citrate synthase: eCS)に着目し、その精子での機能消失による、受精時における卵活性化システムの異常、さらに、加齢ともなう男性不妊との関連を明らかにした。eCSの機能解明は、加齢ともなう、生殖能の低下を含めた様々な疾患の原因解明につながると推測した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵活性化機構について研究されているものの、候補因子の数が増えているだけで、研究の大きな進展はなかった。これまで「卵活性化」の精子ファクターはホスファリパーゼCゼータ1(PLC ζ 1)、1つだと考えられていたが「クエン酸合成酵素」も精子ファクターとしての働くことを発見した。さらに、第2の精子ファクターである「クエン酸合成酵素」が加齢によりその働きが弱まり、精子内で合成される「クエン酸」含有量が減少すると男性不妊を発症する可能性があることから、男性不妊の分子基盤の理解に貢献できる。今後、精子に含まれる「クエン酸」の含有量を測定することで男性不妊のリスク要因を評価する方法の開発などが期待される。

研究成果の概要(英文)：One half of infertile couples have male factor causes such as azoospermia and oligozoospermia. However, the mechanism of declining male fertility with age is not well known. In this study, we focused on citrate synthase (CS), which is a core enzyme of the mitochondrial tricarboxylic acid (TCA) cycle, particular, extra-mitochondrial CS (eCS) abundant in the sperm head. We investigated the role of eCS in male fertility by producing eCs-deficient (eCs-KO) mice. The initiation of the first spike of Ca²⁺ oscillation was substantially delayed in eggs fused with eCs-KO sperm, despite normal expression of sperm factor phospholipase C zeta 1. The eCs-KO male mice were initially fertile, but the fertility dropped at 6 months of age (corresponded to about 30 years in human). The data suggest that eCS suppresses age-dependent male infertility, providing insights into the elucidation of the causes of various diseases including the decline of male fertility with age.

研究分野：動物生殖科学

キーワード：クエン酸合成酵素 カルシウムオシレーション 妊孕性 非ミトコンドリア型 eTCA回路

1. 研究開始当初の背景

卵子は精子との融合によって細胞内カルシウム濃度が上昇し、細胞分裂を再開するための最初のステップとして卵活性化が誘導される。卵活性化には、カルシウム濃度の周期的な上昇（カルシウムオシレーション）が必要であり、何らかの精子因子（精子ファクター）が卵に移行することで、イノシトール3リン酸（IP3）受容体を介してカルシウム波が誘起されると考えられている。卵活性化因子の有力候補は、IP3産生酵素であるホスファリパーゼCゼータ（phospholipase C zeta; PLCz）である。近年、*Plcz1*欠損マウスが解析され、予想通りにカルシウム波の頻度に顕著な異常が認められたが、雄性不妊にはならず、PLCz1以外の精子ファクターが存在する可能性が残された。一方、クエン酸合成酵素（Citrate synthase、以下CS）は、イモリでは精子ファクターとして機能することが報告されている。

TCA回路の律速酵素である「クエン酸合成酵素」には非ミトコンドリア型が存在することは知られていない。マウスは、ミトコンドリアに局在するCSとミトコンドリア外に局在するクエン酸酵素（extra-mitochondrial CS、以下eCS）をコードする2つの遺伝子を持っている。先行研究から、eCSもまた重要な役割を担っていることがわかってきた。eCSは精子に発現しており、*eCs* mRNAの注入によってマウスの卵でもカルシウムオシレーションが誘導され、さらに、*eCs*欠損精子との融合では、カルシウムオシレーションの誘導に顕著な異常がみられた（約1時間の開始の遅れ）。さらに興味深いことに、*eCs*欠損雄マウスは加齢にともない妊孕性が顕著に低下することが分かった（若齢の10分の1以下）。

2. 研究の目的

本研究では、受精の細胞の過程である卵活性化に焦点をあて、eCSを中心としたカルシウムオシレーションの誘導メカニズムの解明をめざす。また、不妊を含めた加齢による細胞、組織、器官レベルでの機能低下のメカニズムの解明をめざす。さらに、ミトコンドリア外でのTCA回路の存在を明らかにする。

3. 研究の方法

【課題1 eCSによる卵活性化誘導メカニズムの解明】

①eCSがクエン酸合成酵素活性を持つのかを確かめるため、*eCs*欠損精子を用いてクエン酸合成酵素活性を調べた。

②*eCs*欠損精子を用いてPLCz1の発現量および局在の変化を調べた。

【課題2 eTCA回路が存在することの証明】

①eCS-GFP融合タンパク質の発現ベクターをヒト胎児腎細胞（HEK293細胞）に導入し、eCSの細胞内局在を調べた。

②eCSを強制発現させた細胞からミトコンドリアとミトコンドリアを含まない画分を分離し、ATP生産を比較した。

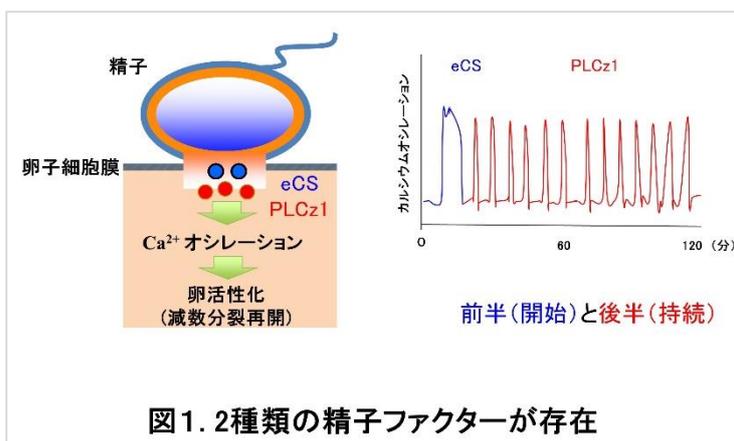
【課題3 加齢による不妊の原因探索】

①加齢による*eCs*欠損マウスの生殖能の低下の原因としてミトコンドリアの機能を調べた。

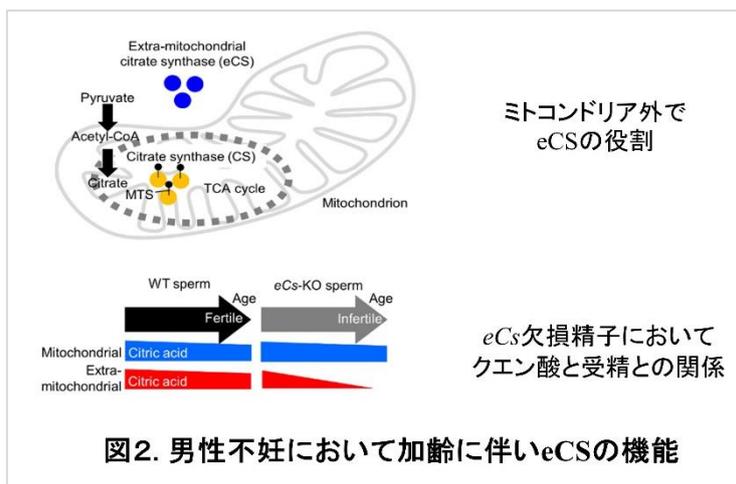
②*eCs*欠損加齢精子におけるメタボローム解析を行い、週齢による違いを調べた。

4. 研究成果

課題1では精子で発現するeCSを介した卵活性化機構の解明と、精子におけるeCSの発現低下、クエン酸合成活性の低下と加齢との関連について検討した。そこで、*eCs*欠損精子では、既知の精子ファクター（PLCz1）が正常に発現しているにもかかわらず、カルシウムオシレーションのパターンが著しく乱れた。特に、カルシウムオシレーションの第一スパイクと頻度が、野生型マウスと比較して有意に低下していることが明らかになっ



た。以上のことから、2種類の精子ファクターが存在し、カルシウムオシレーションには前半（開始）と後半（持続）の2つの過程が存在することが明らかになった（図1）。

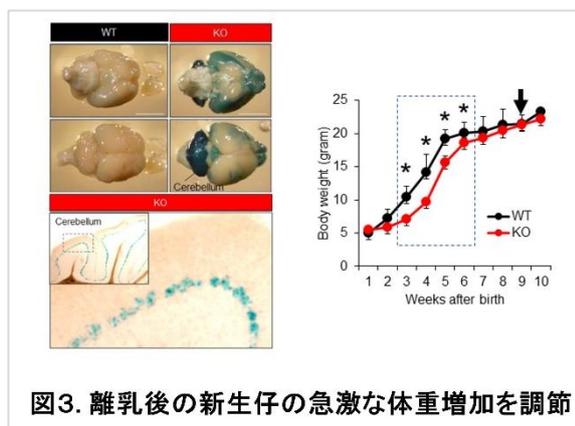


コンドリアを含まない画分でも eCS を強制発現させることによって 3 倍程度の ATP 産生量の増加がみられた。したがって、eCS はミトコンドリアで働く CS とは異なる経路で細胞内でのエネルギー産生に関わっていることが推測された（図2）。

課題3の「加齢による不妊の原因」を調べるため、加齢に伴うミトコンドリアの機能を比較したところ、クエン酸合成酵素活性は年齢と共に働きが弱まるため、年齢を重ねると精子のクエン酸含有量も減っていくことがわかった（図2）。また *eCs* 欠損精子のエネルギー代謝は加齢に伴い TCA 回路が必要以上に活性化していることがわかった。つまり、エネルギー代謝を促進するには TCA 回路の活性化が重要ではなく、他のなんらかの TCA 回路代謝産物との量的バランスが重要であり、一方的な TCA 回路の活性化により代謝バランスが崩れてしまい、逆に妊孕性に負の効果を与えることが推測された。

他にも eCS は生殖細胞に限らず、一部の神経細胞の集団でも発現していることはわかった。神経細胞において eCS の機能を調べたところ、eCS は小脳の主要な出力細胞であるプルキンエ細胞に発現していることが明らかになった。*eCs* 欠損マウスの出生後の新生仔の体重増加が一時的に遅延することから、生殖細胞において卵活性化（カルシウムオシレーション）を誘導する因子として働く eCS が神経細胞でもカルシウムシグナルを誘導する因子として成長調節に関与していることが考えられた（図3）。したがって、eCS は広範な細胞機能の調節に関わっている可能性が示唆された。

課題2の「eTCA回路の存在を証明」するため、ミトコンドリア外で eCS の存在を確認し、ミトコンドリア外での ATP 産生を調べた。まず eCS-GFP 融合タンパク質の発現ベクターをヒト胎児腎細胞 (HEK293 細胞) に導入し、eCS の細胞内局在を調べたところ、CS は主にミトコンドリアに存在しているが、eCS は CS とは異なり、細胞質に広範に局在していることがわかった。さらに、eCS を強制発現させた細胞からミトコンドリアとミトコンドリアを含まない画分を分離し、ATP 産生量を比較したところ、ミト



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 12件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Sato Ban, Kanai Seiya, Sakaguchi Daiki, Yajima Kodai, Matsumoto Yu, Morohoshi Kazunori, Kagaya Shinji, Izumo Nobuo, Ichinose Minoru, Kang Woojin, Miyado Mami, Miyado Kenji, Kawano Natsuko | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Suppressive Role of Lactoferrin in Overweight-Related Female Fertility Problems | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nutrients | 6. 最初と最後の頁 938 ~ 938 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu14050938 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Yamatoya Kenji, Nagai Yuya, Teramoto Naozumi, Kang Woojin, Miyado Kenji, Nakata Kazuya, Yagi Tohru, Miyamoto Yoshitaka | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 Cryopreservation of undifferentiated and differentiated human neuronal cells | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Regenerative Therapy | 6. 最初と最後の頁 58 ~ 68 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2021.12.007 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名 Kang Woojin, Suzuki Miki, Saito Takako, Miyado Kenji | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Emerging Role of TCA Cycle-Related Enzymes in Human Diseases | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 13057 ~ 13057 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222313057 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Morohoshi Kazunori, Yamazaki Takeo, Kito Keiji, Sato Ban, Kang Woojin, Hibino Taku, Yoshida Manabu, Yoshida Kaoru, Iwamoto Teruaki, Yamada Mitsutoshi, Miyado Kenji, Kawano Natsuko | 4. 巻 148 |
| 2. 論文標題 Identification of an antibacterial polypeptide in mouse seminal vesicle secretions | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Reproductive Immunology | 6. 最初と最後の頁 103436 ~ 103436 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jri.2021.103436 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 Miyuki Shindo, Hideki Tsumura, Kenji Miyado, Woojin Kang, Natsuko Kawano, Tomoko Yoshida, Maki Fukami, Mami Miyado | 4. 巻 375 |
| 2. 論文標題 Similar responsiveness between C57BL/6N and C57BL/6J mouse substrains to superovulation | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 microPublication Biology | 6. 最初と最後の頁 375 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17912/micropub.biology.000375 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Ryosuke Akino, Daisuke Matsui, Ryouka Kawahara-Miki, Mitsuyoshi Amita, Kuniko Tatsumi, Eri Ishida, Woojin Kang, Shuji Takada, Kenji Miyado, Akihiko Sekizawa, Takakazu Saito, Tomohiro Kono, Hidekazu Saito | 4. 巻 1 |
| 2. 論文標題 Next-Generation Sequencing Reveals Downregulation of the Wnt Signaling Pathway in Human Dysmature Cumulus Cells as a Hallmark for Evaluating Oocyte Quality | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Reproductive Medicine | 6. 最初と最後の頁 205-215 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/reprodmed1030016 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Junki Kamiya, Woojin Kang, Keiichi Yoshida, Ryota Takagi, Seiya Kanai, Maito Hanai, Akihiro Nakamura, Mitsutoshi Yamada, Yoshitaka Miyamoto, Mami Miyado, Yoko Kuroki, Yoshiki Hayashi, Akihiro Umezawa, Natsuko Kawano, Kenji Miyado | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Suppression of Non-Random Fertilization by MHC Class I Antigens | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 8731 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21228731 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Woojin Kang, Kenji Yamatoya, Kenji Miyado, Mami Miyado, Yoshitaka Miyamoto | 4. 巻 325 |
| 2. 論文標題 Neuronal expression of Ca ²⁺ oscillation initiator is linked to rapid neonatal growth in mice | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 microPublication Biology | 6. 最初と最後の頁 325 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17912/micropub.biology.000325 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Daiki Sakaguchi, Kenji Miyado, Teruaki Iwamoto, Hiroshi Okada, Kaoru Yoshida, Woojin Kang, Miki Suzuki, Manabu Yoshida, Natsuko Kawano | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Human Semenogelin 1 Promotes Sperm Survival in the Mouse Female Reproductive Tract | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 3961 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21113961 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Woojin Kang, Yuichirou Harada, Kenji Yamatoya, Natsuko Kawano, Seiya Kanai, Yoshitaka Miyamoto, Akihiro Nakamura, Mami Miyado, Yoshiki Hayashi, Yoko Kuroki, Hidekazu Saito, Yasuhiro Iwao, Akihiro Umezawa, Kenji Miyado | 4. 巻 100 |
| 2. 論文標題 Extra-mitochondrial citrate synthase initiates calcium oscillation and suppresses age-dependent sperm dysfunction | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Laboratory Investigation | 6. 最初と最後の頁 583-595 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0353-3 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Miyado Mami, Kang Woojin, Kawano Natsuko, Miyado Kenji | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Microexosomes versus exosomes: Shared components but distinct structures | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Regenerative Therapy | 6. 最初と最後の頁 31 ~ 33 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.04.013 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Shindo Miyuki, Inui Masafumi, Kang Woojin, Tamano Moe, Tingwei Cai, Takada Shuji, Hibino Taku, Yoshida Manabu, Yoshida Kaoru, Okada Hiroshi, Iwamoto Teruaki, Miyado Kenji, Kawano Natsuko | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Deletion of a Seminal Gene Cluster Reinforces a Crucial Role of SVS2 in Male Fertility | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 4557 ~ 4557 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20184557 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 康 宇鎮, 宮戸 健二 |
| 2. 発表標題 「卵活性化」の新たな精子ファクターを発見：「精子老化」にはクエン酸が関与する |
| 3. 学会等名 第20回日本生殖工学会シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 康 宇鎮, 大和屋 健二, 原田 裕一郎, 河野 菜摘子, 宮戸 健二 |
| 2. 発表標題 毛色によって男性の生殖能は判別できるのか？ |
| 3. 学会等名 第 42 回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| <p>世界初・「卵活性化」の新たな精子ファクターを発見！ https://www.ncchd.go.jp/press/2020/pr_20200115.html</p> |
|---|

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 河野 菜摘子 (Kawano Natsuko) (00451691) | 明治大学・農学部・専任准教授 (32682) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------------------|---|--|----|
| 研究 分 担 者 | 宮戸 健二 (Miyado Kenji) (60324844) | 国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・室長 (82612) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |