

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06455

研究課題名(和文) Importin-4欠損による精子の構造異常発症機序解明と形態形成の新機構探索

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenic mechanism of structural abnormality of sperm caused by Importin-alpha4 deficiency and search for a new mechanism of sperm morphogenesis

研究代表者

宮本 洋一 (MIYAMOTO, Yoichi)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・サブプロジェクトリーダー

研究者番号：10379084

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)：本研究は、核輸送分子Importin-4の遺伝子ノックアウト(KO)マウスが雄性不妊症を発症する分子機序の解明を目指したものである。KO精子は、頭部や尾部の構造異常に加え、先体反応の低下、運動性の低下、核膜-細胞骨格関連分子の局在異常など複合的な表現型を示す。この理由として、Importin-4欠損により精子の形態形成に重要な分子の発現や局在に影響がでることが原因である可能性が示唆された。本研究により、Importin-4の転写制御機能がマウス精子の正常な形態形成に重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全世界のカップルの約15%が不妊症であり、その原因の解明は国内外を問わず重要な医学的課題である。遺伝子欠損マウスは不妊症研究の良いモデル動物ではあるが、これまで精巣が主な発現部位である遺伝子を欠損させた場合でもマウスが不妊症を発症しないケースが多く報告されている。一方、我々が樹立したImportin-4KOマウスは精子の顕著な構造異常を示すなど不妊症研究に最適なモデルであり、本研究ではこのマウスを用いて雄性不妊症発症機序の一端を解明した。本研究の成果は、Importin-4が精子細胞形成において重要な分子であることを示したものであり、学術的にも社会的にも意義ある研究といえる。

研究成果の概要(英文)： This study aimed to elucidate the molecular mechanism by which the gene knockout (KO) mice of the nuclear transport factor Importin-4 show male infertility. In addition to structural abnormalities of the head and tail, the KO sperm exhibited a complex phenotype including reduced acrosome response, decreased motility, and abnormal localization of nuclear membrane- and cytoskeleton-related molecules. This is suggested to be caused by a defect in Importin-4 that affects the expression and localization of molecules important for sperm morphogenesis. This study demonstrates that transcriptional regulatory functions of Importin-4 are important for normal sperm morphogenesis in mice.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核輸送 Importin 精子細胞形成 雄性不妊症 ノックアウトマウス クロマチン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

Importin- α (別名 KPNA) は、核局在化シグナル (Nuclear Localization Signal: NLS) 受容体として同定され、輸送運搬体 Importin- β 1 と輸送基質とをつなぐアダプター分子として機能する。これまでにマウスで6種類、ヒトで7種類の Importin- α サブタイプが同定され、それぞれが異なる基質特異性や組織や細胞での発現特異性を発揮することで核への効果的な選別輸送に寄与することが分かっている。さらに最近では、紡錘体形成、核膜重合、タンパク質分解など核輸送とは異なる機能を発揮する多機能分子としての側面を持つことも明らかになってきた。実際我々は、細胞がストレスに曝された際、通常は細胞質に多く局在する Importin- α が速やかに核に移行し、クロマチンと結合して転写制御機能を発揮することを世界に先駆けて発見している (Yasuda and Miyamoto et al., *EMBO J.*, 2012)。このことから Importin- α の機能を理解することは複雑な高次生命機能の解明に必須の要素である。これまで複数の Importin- α 遺伝子ノックアウト (KO) マウスが作製されているが、その多くで雌雄配偶子の形成異常に起因した不妊症を発症することが報告されている。このことは本分子が配偶子形成や生殖器発生に重要であることを意味している。

我々は、サブタイプのひとつである Importin- α 4 (KPNA4) の遺伝子 KO マウスが精子の構造異常に起因した不妊症を発症することを見出した。KO マウスは、体重や外見、精巣の解剖学的所見上明確な異常を示さない。一方、精巣上体より回収した精子の受精率、運動性はともに有意に低下していた。加えて、電子顕微鏡による形態解析の結果、精子頭部の異常な湾曲や尾部鞭毛内軸系の複数化など顕著な異常が観察され、これら異常精子の産生が不妊症の原因であることが分かった。注目すべき点は、Importin- α 4 がライディッヒ細胞など体細胞では細胞質に局在するのに対し、精母細胞や円形精子細胞など生殖細胞では顕著な核局在を示すことである。このことは Importin- α 4 が生殖細胞において核輸送とは異なる核内機能を発揮している可能性を示唆している。しかしながら、Importin- α 4 のどのような機能が精子形成に寄与するかは明らかでなかった。

2. 研究の目的

本研究課題は、核輸送分子 Importin- α 4 の遺伝子 KO マウスが雄性不妊症を発症するとする独自の発見を端緒に、Importin- α 4 が関わる新たな機能の探索を通して、精子形成の分子メカニズム解明を目指すものである。特に、Importin- α 4 が精子細胞の核内に局在する特性に着目し、精子細胞分化における転写制御への関わりを明らかにしようとするものである。

3. 研究の方法

まず、Importin- α 4 KO マウスの精巣において発現が変動する分子をプロテオミクスの手法を用いて同定する。同定した分子について、その転写を制御する分子 (転写制御分子と呼ぶ) を ChIP-Atlas により探索し、Importin- α 4 がどのような転写制御分子の核輸送もしくは核内機能に寄与するかを明らかにする。さらに、精子の構造が劇的に変化する円形精子細胞に着目し、その分化ステージで Importin- α 4 の欠損により影響を受ける分子の探索も試みる。これにより、減数分裂後のダイナミックな形態変化時期特異的に発現変動する分子を同定することが可能となる。また、Assay for Transposase-Accessible Chromatin (ATAC) -シーケンシング (ATAC-Seq) によるクロマチンの動態解析も行い、Importin- α 4 の欠損によりどのようなクロマチンの変化が起こるのかを明らかにするとともに、発現変動分子との関係性も明らかにしていく。

我々は以前、Importin- α 4 が精子の変態時期に頭部から頸部へと移行することを見出しており (Young et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 2013)、この過程で一過性に形成されるマンシェットなど核膜と細胞骨格との相互連携に関係していることを推測している。そこで、Importin- α 4 の欠損により精子の核膜や細胞骨格関連分子にどのような影響があるのかを調べていく。具体的には、微小管集積因子、核膜孔複合体構成因子、Linker of Nucleus and Cytoskeleton (LINC) 複合体構成因子に対する抗体を用いて異常精子における発現や局在の変化を解析していくことで、精子の形成過程における Importin- α 4 の核膜 - 細胞骨格制御機能を明らかにする。

4. 研究成果

KO マウスの精子は受精率や運動性が有意に低下していることに加え、頭部の異常な湾曲や尾部鞭毛内軸系の複数化などが見つかっていた。今回、先体反応についても顕著な低下が生じていることがわかったことから、本マウスが示す雄性不妊症状は精子の構造異常、先体反応の低下、運動性の低下など複合的な要因により生じることが明らかとなった。さらに、KO マウス精子の構造異常については、LINC 複合体構成因子 Nesprin-2 (別名 SYNE2) が頭部から軸系へと局在変化を示すことを発見した。これにより、Importin- α 4 が Nesprin-2 の動態を制御することで精子

の形態形成に影響を与えることが示唆された。

KO マウス精巣において発現に影響を受ける分子をプロテオミクス的手法を用いて解析し、計 140 個の発現変動分子を同定した。これら発現変動分子について GO 解析を行った結果、精子の構造や機能に関わるものが大半を占めることが分かった。ChIP-Atlas を用いて転写制御分子を探索したところ、KO マウスの精巣で発現が低下する分子の多くが H3K4me3 や H3K27ac などオープンクロマチンマークの制御下にあること、Taf7l や Tbp1l といった分子の制御下にある可能性が高いことが分かった。

次に、精子の形態がダイナミックに変化する円形精子細胞に焦点を絞り解析を行った。Importin- α 4 は円形精子細胞の核内に局在することが分かっていることから、本研究により転写制御を含む新たな核内機能を明らかにできると考えた。具体的にはまず、精子先体が緑色、ミトコンドリアが赤色の蛍光を示すマウス (Red Body Green Sperm: RBGS マウス) の精子を Importin- α 4 ヘテロマウス卵に顕微導入して Importin- α 4KO/RBGS マウスを作出した。そして、セルソーターによって円形精子細胞のみを高純度に回収した後、RNA-シーケンス (RNA-seq) による遺伝子発現解析を行った。野生型 (WT/RBGS)、ノックアウト (KO/RBGS) マウスそれぞれ 3 匹ずつを用いた RNA-seq の結果、100 以上の発現変動分子を同定した。そして、ChIP-Atlas 解析の結果、精巣プロテオミクス解析で明らかとなった複数の転写制御分子が同様に影響を受けることが明らかとなった。このことは、円形精子細胞の核内に局在する Importin- α 4 の転写制御機能が、マウス精子の形態形成に重要であることを意味している。一方で、RNA-seq による遺伝子発現の変動と ATAC-seq 解析を用いたクロマチン構造の変化との相関関係については明確に関連性を見出すには至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Khandakar Golam Iftakhar, Miyamoto Yoichi, Satoh Ryosuke, Kishimoto Kenta, Xie Mingzuo, Shih Mengyu, Takasaki Teruaki, Tanabe Genzoh, Oka Masahiro, Sugiura Reiko	4. 巻 28
2. 論文標題 ACAGT-007a, an anti-cancer compound that modulates ERK MAPK signaling, induces nuclear enrichment of phosphorylated ERK in T3M4 pancreatic cancer cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 457 ~ 465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13026	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 Wang Wenjing, Miyamoto Yoichi, Chen Biaobang, Shi Juanzi, Diao Feiyang, 他27名	4. 巻 133
2. 論文標題 Karyopherin deficiency contributes to human preimplantation embryo arrest	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 e159951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI159951	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 該当する

1. 著者名 Aomine Yoshiatsu, Sakurai Koki, Macpherson Tom, Ozawa Takaaki, Miyamoto Yoichi, Yoneda Yoshihiro, Oka Masahiro, Hikida Takatoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Importin 3 (KPNA3) Deficiency Augments Effortful Reward-Seeking Behavior in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 905991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2022.905991	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 Miyamoto Yoichi, Itoh Yumi, Suzuki Tatsuya, Tanaka Tomohisa, Sakai Yusuke, Koido Masaru, Hata Chiaki, Wang Cai-Xia, Otani Mayumi, Moriishi Kohji, Tachibana Taro, Kamatani Yoichiro, Yoneda Yoshihiro, Okamoto Toru, Oka Masahiro	4. 巻 5
2. 論文標題 SARS-CoV-2 ORF6 disrupts nucleocytoplasmic trafficking to advance viral replication	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03427-4	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 Nathaniel Benedict、Whiley Penny A.F.、Miyamoto Yoichi、Loveland Kate L.	4. 巻 121
2. 論文標題 Importins: Diverse roles in male fertility	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Seminars in Cell & Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 82 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.semcdb.2021.08.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka Tomohisa、Saito Akatsuki、Suzuki Tatsuya、Miyamoto Yoichi、Takayama Kazuo、Okamoto Toru、Moriishi Kohji	4. 巻 199
2. 論文標題 Establishment of a stable SARS-CoV-2 replicon system for application in high-throughput screening	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 105268 ~ 105268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.antiviral.2022.105268	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 Nagatake Takahiro、Kishino Shigenobu、Urano Emiko、Murakami Haruka、Kitamura Nahoko、Konishi Kana、Ohno Harumi、Tiwari Prabha、Morimoto Sakiko、Node Eri、Adachi Jun、Abe Yuichi、Isoyama Junko、Sawane Kento、Honda Tetsuya、Inoue Asuka、Uwamizu Akiharu、Matsuzaka Takashi、Miyamoto Yoichi、Hirata So-ichiro、他15名	4. 巻 15
2. 論文標題 Intestinal microbe-dependent 3 lipid metabolite KetoA prevents inflammatory diseases in mice and cynomolgus macaques	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mucosal Immunology	6. 最初と最後の頁 289 ~ 300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41385-021-00477-5	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 Sakurai Koki、Itou Taichi、Morita Makiko、Kasahara Emiko、Moriyama Tetsuji、Macpherson Tom、Ozawa Takaaki、Miyamoto Yoichi、Yoneda Yoshihiro、Sekiyama Atsuo、Oka Masahiro、Hikida Takatoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Effects of Importin 1/KPNA1 deletion and adolescent social isolation stress on psychiatric disorder-associated behaviors in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0258364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0258364	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 Miyamoto Yoichi, Sasaki Mitsuho, Miyata Haruhiko, Monobe Yoko, Nagai Masahiro, Otani Mayumi, Whiley Penny A. F., Morohoshi Akane, Oki Shinya, Matsuda Junichiro, Akagi Ken ichi, Adachi Jun, Okabe Masaru, Ikawa Masahito, Yoneda Yoshihiro, Loveland Kate L., Oka Masahiro	4. 巻 34
2. 論文標題 Genetic loss of importin 4 causes abnormal sperm morphology and impacts on male fertility in mouse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 16224 ~ 16242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.20200768RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsuoka Junpei, Inuki Shinsuke, Matsuda Yuka, Miyamoto Yoichi, Otani Mayumi, Oka Masahiro, Oishi Shinya, Ohno Hiroaki	4. 巻 26
2. 論文標題 Total Synthesis of Dictyodendrins A - F by the Gold Catalyzed Cascade Cyclization of Conjugated Diyne with Pyrrole	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 11150 ~ 11157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202001950	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮本洋一、斉藤寿仁、岡正啓
2. 発表標題 核輸送分子の微小核局在に関する研究
3. 学会等名 2022年度生物機能研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木佐真玲央、宮本洋一、岡正啓、斉藤寿仁
2. 発表標題 Importin の微小核への分子濃縮
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮本洋一、伊東祐美、鈴木達也、田中智久、坂井祐介、小井士大、波田千彰、王彩霞、大谷真弓、森石恆司、立花太郎、鎌谷洋一郎、米田悦啓、岡本徹、岡正啓
2. 発表標題 SARS-CoV-2構成因子ORF6による核輸送制御機構
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮本洋一、徳永詢、鈴木達也、大谷真弓、井貫晋輔、江崎剛史、長尾 知生子、水口賢司、大野浩章、米田悦啓、岡本徹、松浦善治、岡正啓
2. 発表標題 核小体形成を標的とした抗フラビウイルス薬の同定
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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			
オーストラリア	Hudson Institute of Medical Research			
中国	復旦大学			