

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06476

研究課題名（和文）亜鉛シグナルによる精子受精能制御機構の解明

研究課題名（英文）Exploring the regulation of sperm fertilization capacity through zinc signaling

研究代表者

徳弘 圭造 (Tokuhira, Keizo)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20423105

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は哺乳類の受精現象における亜鉛を介した制御機構を分子レベルで明らかにすることにより、不妊症の原因解明・治療や避妊薬の開発につなげることである。精巣で発現する亜鉛トランスポーターを消失させることによって亜鉛シグナルの生殖機能における機能解析を進めた。亜鉛イオンを細胞外へ排出する細胞膜上のZnT1，線虫において精子の細胞内オルガネラ膜上に局在する亜鉛トランスポーターZip7を精巣内生殖細胞でのみ遺伝子欠損を誘導すると、いずれの遺伝子も雄性不妊を示し、雄の生殖機能において必須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

これまでの研究で、亜鉛は精子形成過程や射出後の精子が受精可能な精子へと変化する受精能獲得という現象に重要な制御因子として機能していることが報告されている。しかしながら、これらの亜鉛を介した現象の分子メカニズムは明らかとなっていない。本研究結果により、精巣における亜鉛トランスポーターの機能不全が雄性不妊を引き起こすことが明らかになり、今後さらに詳細な病態解析が行われることによって、不妊症の原因解明・治療や避妊薬の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the zinc-mediated regulatory mechanism of mammalian fertilization at the molecular level, aiming to understand the causes of infertility, develop treatments, and create contraceptive drugs. To achieve this, we analyzed the function of zinc signaling in reproductive processes by eliminating the zinc transporters expressed in testis. We generated conditional gene-deficient mice of ZnT1, which excretes zinc ions out of cells, and Zip7, a zinc transporter localized on the intracellular organelle membrane of sperm in *C. elegans*. The deletion of both genes resulted in male sterility, demonstrating their essential role in male reproductive function.

研究分野：生殖生物学

キーワード：亜鉛 受精能獲得 精子形成 雄性不妊

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、亜鉛は単に亜鉛恒常性を制御する栄養素ではなく、細胞機能を時空間的に制御するシグナル分子として機能していることが明らかとなってきた。現在までに細胞機能と病態形成における亜鉛イオンの多様な関与が示されている。申請者が専門としている生殖分野においても配偶子形成から受精現象まで様々な過程で亜鉛イオンの関与は報告されているが、その多くの分子メカニズムは未解明のままである。例えば、ヒトの精漿中には高濃度の亜鉛が存在することや、亜鉛が欠乏することによりヒトの精子の濃度低下や奇形率が上昇するという報告もあることから、雄性生殖系の機能にとって亜鉛は重要な機能を果たしていると考えられるが、その分子メカニズムは明らかとなっていない(*J Dairy Sci.* 67:1147-1156 1984)。また、人工授精の際に使用する精子は副精巣から採取され、卵子との共培養前に前培養が行われる。副精巣から採取された直後の精子は直進性の運動を示すが、この状態の精子は卵子の透明帯を通過することができない。培地中で1~2時間培養することにより capacitation(受精能獲得)が起こり、これにより円を描くような軌道の運動を示すようになり、精子は透明帯を通過できるようになる。この前培養の際に培地中に高濃度の亜鉛イオンが入っていると受精能獲得が起こらないことがわかっている。副精巣や雌の子宮内で受精能獲得が起こらないようにする decapacitation factor の存在は報告されているが、その分子メカニズムは明らかになっていない(*Fertil Steril.* 24:948-955 1973)。本研究では精子側の受精現象における亜鉛イオンによる正常な受精を誘導する制御機構に絞って、その分子メカニズムの解明を目指す。

2. 研究の目的

本研究では受精前後における精子の受精能に関与する亜鉛を介した分子メカニズムの解明を目的とし、様々な条件下の精子において亜鉛イオンの動態を詳細に解析するとともに、精子に発現している亜鉛チャンネルの分子機能を明らかにする。申請者はこれまで受精の研究を行い、その中で受精直後に卵子から大量の亜鉛イオンが放出される zinc sparks という現象に着目した。zinc sparks により放出された高濃度の亜鉛イオンが精子の運動性に影響を与えることにより卵子の外側に存在する透明帯を通過できなくなり、多精子受精阻害機構として機能していることを明らかにした(*Dev Cell.* 46:627-640 2018)。しかしながら、精子の運動性に影響を与える際に、亜鉛イオンを介した分子メカニズムに関する知見は得られていない。これ以外にも亜鉛を介した受精現象の報告はあるが、その分子メカニズムまで明らかとはならず、制御している分子を同定することができればヒトの妊孕性低下に対する治療法の開発や、依然として市販薬が開発されていない男性の経口避妊薬の開発が可能となり、生殖医療にとって大きなインパクトを与えるものである。また、細胞における亜鉛シグナルの異常は脳神経系、内分泌代謝系、癌、そして免疫系など多岐にわたっており、この分子機構が明らかになれば広範囲の分野における病気の予防や治療へと繋ぐ基盤的知見が得られる。

3. 研究の方法

1. 受精能獲得前後におけるマウス精子内の亜鉛動態解析

- ・受精能獲得が起こる培養条件

精子培養液である Human Tubal Fluid (HTF) 培地中で2時間培養後の精子

- ・受精能獲得が起こらない条件

受精能獲得に必須であるカルシウムを含まない HTF 培地中で培養後の精子

- ・強制的に受精能獲得を誘導する培養条件

受精能獲得に付随して起こる先体反応を Ca^{2+} ionophore で誘導したのちに精子内の過剰な Ca^{2+} ionophore を除いて運動性を回復させた精子 (*Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:18543-18548 2013)

これらの条件下での亜鉛の局在変化を観察することにより、受精能獲得における亜鉛局在変化及び亜鉛シグナルの重要性を明らかにする。

2. 遺伝子改変マウスを用いた亜鉛シグナルを介した受精制御機構の解析

精子形成過程後期に発現する2つの遺伝子 (*BMB Rep.* 44:347-351 2011) に注目して、生体内での亜鉛シグナルの受精現象における機能を解析する。

- ・ZnT1 conditional KO を用いた亜鉛シグナルの機能解析

亜鉛イオンを細胞外へ排出する細胞膜上のチャンネルとして ZnT1 が同定されている。欠損マウスの表現型は胎性致死であるため、妊孕性に関する解析は行われていない(*Genesis.* 40:74-81 2004)。そこで ZnT1 を精巣特異的 Cre 発現マウス (*Genesis.* 46:738-742 2008) を用いて生殖細胞特異的に欠損させることによって、精子内で起こる亜鉛イオンの動態に異常を誘導して、精子の運動性や妊孕性に影響が出るのか解析を進める。

- ・Zip7 conditional KO を用いた哺乳類精子での受精能獲得における亜鉛シグナルの機能解析

線虫では、精子の細胞内オルガネラ膜上に局在する zinc transporter である zip7.1 が最終的な精子の受精能獲得に必須である (*PLoS Biol.* 16:e2005069 2018)。マウスでは、Zip7 がホモ

ログであり、小腸の微絨毛特異的 conditional KO マウスを用いた解析が行われているが、妊孕性に関する解析は行われていない(*PLoS Genet.* 12:e1006349 2016)。生殖細胞特異的な conditional KO マウスを作製し、マウス精子の受精能獲得における Zip7 の役割を解析する。

上記 2 種類の遺伝子改変マウスの妊孕性に異常が見られた場合には、形態解析や精子運動性測定装置により不妊要因を同定する。

4. 研究成果

・受精能獲得前後における亜鉛イオンの局在解析

精子内での亜鉛イオンの局在変化を観察するために、各条件 (TYH 培地, Ca^{2+} free TYH 培地, Ca^{2+} ionophore 処理) で 2 時間培養後に FluoZin-3 を使用して高濃度の亜鉛イオンの局在を観察した。通常の TYH 培地で培養後の精子は 60% (頭部の先体)、3% (鞭毛) に亜鉛の局在が観察され、32% の精子では亜鉛のシグナルは観察されなかった。また、先体反応及び受精能獲得が起こらない Ca^{2+} free TYH 培地では、すべての精子で先体のみ亜鉛シグナルが観察された。一方で、カルシウムイオノフォアにより先体反応を強制的に誘導すると 60% の精子で尾部での亜鉛の局在が観察されるようになった。このことから、先体反応後にほとんどの精子では亜鉛が細胞外に放出されるが、一部の精子では尾部への亜鉛イオンの移行あるいは細胞外からの取り込みが確認された。ブタの精子での亜鉛の局在に関しては、培養直後は頭部と鞭毛の両方が染色される割合が多く、先体反応などに伴って頭部の染色が消失した精子の割合が増加すると報告されている(*Nat Commun.* 9(1):2061 2018)。マウスにおいては、鞭毛部分の染色はほとんどの精子で観察されなかったが、 Ca^{2+} ionophore 処理後に鞭毛部分に局在する精子の割合が増加したことからブタの精子とは少し異なる亜鉛シグナルが機能しているのかもしれない。

・ZnT1 conditional KO (cKO) マウスを用いた生殖における機能解析

ZnT1 の精巣特異的な欠損を誘導するために、ZnT1 flox マウスを CRISPR/Cas9 system を利用して樹立した。理研より Stra8-Cre TG マウスを購入して、ZnT1 flox マウスと交配させて ZnT1^{flox/Δ}, Stra8-Cre TG マウスの雄で妊孕性を確認した。しかしながら、Cre 酵素による flox 領域の切断効率が悪いために精巣内において flox allele が完全に deletion されていないことが産仔の genotyping によって明らかとなった。そこで、新たな Cre 発現マウスの樹立を試みた。生殖細胞で高発現する Ddx4 の stop codon の直前に P2A-Cre を挿入した Knock in マウスを樹立して、ZnT1 flox マウスと交配させた。しかし、ZnT1^{flox/Δ}, Ddx4-P2A-Cre^{+/KI} マウスは樹立することができなかった。2019 年に Ddx4 が胎児の腎臓、心臓、肝臓、脳で低レベルで発現していることが報告されており(*Nature.* 571(7766):505-509 2019)、これらの組織において ZnT1 欠損の状態になり胎生致死を引き起こすものと考えられる。

そこで、理研より Ddx4-CreERT2 (*Genesis.* 58(7):e23367 2020) を購入して、ZnT1 flox マウスと交配させることによりタモキシフェン誘導型の cKO マウスを樹立した。タモキシフェンをインジェクション後に ZnT1 cKO マウスの妊孕性を確認したところ、雄性不妊を示すことがわかった。そこで、受精可能な精子が貯蔵されている副精巣内の切片を観察すると、正常な精子はほとんど観察されず、精巣内の生殖細胞が剥がれ落ちていることが明らかとなった(図 1)。このことから、ZnT1 は精巣内の精子形成過程において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

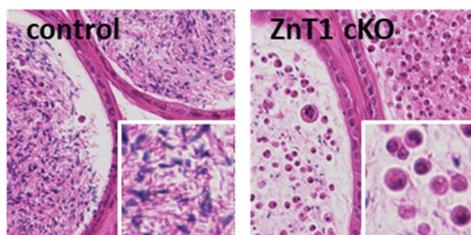


図 1 副精巣尾部を観察すると、コントロールでは多くの精子頭部が観察される。一方で、精巣特異的に ZnT1 を欠損させると、精子頭部はほとんど観察されず、精巣から剥がれ落ちたと思われる生殖細胞が見られた。

・Zip7 conditional KO (cKO) マウスを用いた生殖における機能解析

Zip7 flox マウスは徳島文理大学の深田 俊幸教授より分与していただき、ZnT1 マウスと同様にタモキシフェン誘導型の cKO マウスを樹立して、表現型解析を行った。タモキシフェン誘導後に野生型の雌マウスと交配させると、Zip7 cKO マウスも雄性不妊を示すことが明らかとなった。副精巣内の精子を観察すると、精子は観察されたものの鞭毛や頭部の形態に異常が観察された(図 2)。今後は、Zip7 欠損精子の受精能をさらに解析することにより、精子の受精能における亜鉛の機能を明らかにしていきたい。

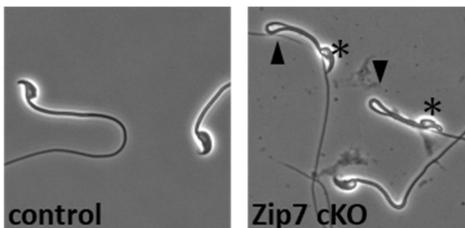


図 2 Zip7 欠損精子では鞭毛 (arrowhead) および頭部 (*) の形態に異常が起こることにより、雄性不妊を引き起こす。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Morohoshi Akane, Miyata Haruhiko, Tokuhiko Keizo, Iida-Norita Rie, Noda Taichi, Fujihara Yoshitaka, Ikawa Masahito	4. 巻 9
2. 論文標題 Testis-enriched ferlin, FER1L5, is required for Ca ²⁺ -activated acrosome reaction and male fertility	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eade7607
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.ade7607	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 Oyama Yuki, Miyata Haruhiko, Shimada Keisuke, Fujihara Yoshitaka, Tokuhiko Keizo, Garcia ThomasX, Matzuk MartinM, Ikawa Masahito	4. 巻 0
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated genome editing reveals 12 testis-enriched genes dispensable for male fertility in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Asian Journal of Andrology	6. 最初と最後の頁 0~0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4103/aja.aja_63_21	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大山 裕貴、宮田 治彦、嶋田 圭祐、藤原 祥高、徳弘 圭造、Garcia Thomas、Matzuk Martin、伊川 正人
2. 発表標題 精巣で発現する12遺伝子はマウス雄性生殖能力に必須ではない
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会 第40回学術大会および第31回精子形成・精巣毒性研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮田 治彦、諸星 茜、徳弘 圭造、飯田 理恵、野田 大地、藤原 祥高、伊川 正人
2. 発表標題 マウスFER1L5は先体反応と雄の妊孕性に重要である
3. 学会等名 第70回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2023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
---------	---------