

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09633

研究課題名(和文) Rimklbの精子形成における役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of Rimklb in spermatogenesis.

研究代表者

鷹野 正興 (Masaoki, Takano)

神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号：30258107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Rimklbは、リボソームタンパク質S6へのグルタミン酸の付加を触媒する大腸菌酵素RimKの哺乳類ホモログである。本研究では、3塩基の欠失によりAla 29が欠失し、Leu 30がValに置換されたRimklb変異マウスを作製した。RimklbA29del, L30V変異マウスは精巣のサイズと重量の減少を示し、体外受精では完全な雄性不妊を示した。さらに、哺乳類ラパマイシン標的/リボソームタンパク質S6転写経路の重要な因子が、変異体精巣の精細管でリン酸化亢進していることも見いだした。我々は、Rimklbが精細管における精子形成を含む重要な役割を担っていると結論付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳動物における生理的役割が分かっていなかったRimklb変異マウスを作製することに成功し、Rimklb変異が精子形成不全、雄性不妊を引き起こすことを明らかにした。学術的にはRimklbが精子形成において重要な役割を果たしていることを初めて示したものである。また、本研究はヒトにおいてもRimklbが精子形成において重要な役割を果たす可能性を示したものであり、男性不妊の原因の一つであるかもしれない。Rimklbの不全をレスキューする方法を見いだすことで、治療法へと繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Rimklb is a mammalian homologue of the E. coli enzyme RimK, which catalyzes addition of glutamic acid to the ribosomal protein S6. We generated a Rimklb mutant mouse in which a three-base deletion results in deletion of Ala 29 and substitution of Leu 30 with Val, which we named the RimklbA29del, L30V mutant mouse. RimklbA29del, L30V mutant mice show a decrease in testicular size and weight, and in vitro fertilization demonstrates complete male infertility. Furthermore, we found that a key factor in the mammalian target of the rapamycin/ribosomal protein S6 transcriptional pathway is hyperphosphorylated in the seminiferous tubules of the mutant testis. We conclude that Rimklb has important roles that include spermatogenesis in seminiferous tubules.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：雄性不妊 Rimklb 精子形成

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

-CG (beta-Citryl-L-glutamate) はクエン酸とグルタミン酸がアミド結合した、4つのカルボキシル基を持つ強酸性のユニークな構造を持つ生体内物質であるが、約40年前に神戸学院大学三宅正治教授によって発見された。-CGは幼若ラット脳に高濃度存在し、成熟後は精巣において高濃度存在するが、その他の臓器には、ほとんど存在しない。長い間、その役割については明らかにされず、生合成経路についても分からないままであった。生体内で -CG を合成する酵素について、長い間その実体は明らかにされていなかったが、そして -CG の発見から30年近くたった2011年に -CG 合成酵素である Rimklb がクローニングされた。Rimklb は大腸菌で見いだされた RimK (Ribosomal protein S6 modification protein) の哺乳類におけるホモログである。しかしながら、哺乳類における Rimklb、-CG の役割は全く分かっていなかった。



2. 研究の目的

哺乳類における Rimklb、-CG の役割を解明するために CRISPR/CAS9 によって、Rimklb ノックアウトマウスを作製し、その解析を行う。なお、本研究開始時点で、私達の研究グループは、-CG 合成酵素である Rimklb の1アミノ酸欠損、1アミノ酸変異である RimklbA29del, L30V mutant (Rimklb Mut) マウスを得ることに成功し、そのマウスが、強い雄性不妊の表現型を示すことを見だしていた。しかし、Rimklb がどのようなメカニズムで精子形成に関わるかは全く分かっていない。そこでなぜ Rimklb 変異がなぜ雄性不妊を引き起こすかに焦点を絞り、Rimklb の精子形成における役割を解明することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

免疫組織化学: 組織を灌流し、さらに Bouin 固定を用いて48時間固定した。パラフィン包埋組織を用い、組織抗原シグナルは VECTASTAIN Elite ABC Kit を用いて検出した。切片 (Phospho-S6 Ribosomal Protein) は Mayer's hematoxylin solution (富士フイルム和光純薬、大阪、日本) でカウンター染色した。p-S6 陽性細管または空胞を有する p-S6 陽性細管の測定を行った。

Rimklb 変異マウスの作製: Rimklb 変異マウスは、CRISPR/Cas9 システムとマウス胚の細胞質マイクロインジェクションを用いて作製した。ガイド gRNA (gRNA) は Rimklb 遺伝子のエクソン2を欠失させるように設計され、T7 プロモーターを含む130bpの化学合成二本鎖 DNA (gBlocks Gene Fragments, Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) から合成された。MEGAscript T7 Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて、gRNA 標的配列 (AGAGATCTTACGAGCGTTGA) と gRNA-スキャフォールド配列を鋳型とし、MEGAclear kit (Life Technologies) を用いて RNA を精製した。

胚の操作とマイクロインジェクション: M 卵細胞は過排卵した C57BL/6J の雌 (8~12週齢) から採取し、体外で受精させ、使用するまで KSOM 培地で培養した。受精した1細胞胚は、組換え Cas9 タンパク質 (50 ng/μl) と2つの gRNA (25 ng/μl) の混合物で細胞質マイクロインジェクションを行った。マイクロインジェクション後、胚は KSOM 培地で2細胞期まで培養し、膣栓当日 (Day 0.5) に仮妊娠 ICR 雌 (の卵管に移植した。子孫 (F0 ファウンダー) のゲノム DNA を野生型 C57BL/6J マウスと交配し、F1 世代の変異を Guide-it Mutation Detection Kit (タカラバイオ、滋賀県) を用いて解析した。変異 F2 雌を野生 BL/6 雄マウスと交配し、変異 F3 マウス同士を交配した後、TA クローニングを用いて塩基配列決定のためのリッター DNA を得た。3塩基欠失マウス1系統を選び、本研究に用いた。

ジェノタイピング: Proteinase KRimk1bCheckF: 5'-CCTCATCCTCCTGCCTAA-3' および Rimk1bCheckR: 5'-GCACTCAGCTCCAGCTCTCT'-3' を用いて、Ex Taq ポリメラーゼ (タカラバイオ) を用いて Rimklb 変異マウスの遺伝子型解析を行った。

ウェスタンブロッティング: タンパク質サンプルを10-20%ゲルで分離し、その後 Turbo Transfer System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて PVDF メンブレンに7分間のプロトコールで転写した。メンブレンをブロッキングワシ (ナカライテスク) で30分間、または3%BSA (Rockland Immunochemicals, Inc, Pottstown, PA, USA) の T-BST で1時間室温でブロッキングし、Blocking One で1:1000に希釈した以下の一次抗体とともに4で一晩インキュベートした: 抗ホスホ-S6 リボソームタンパク質 (#4858, Cell Signaling Technology) 抗 S6 リボソームタンパク質 (#2317, Cell Signaling Technology) 抗ホスホ-mTOR (#5536, Cell Signaling Technology) 抗ホスホ-ACT (#4060, Cell Signaling Technology) 抗ホスホ-p70S6K (#9234 Cell Signaling Technology) 抗ホスホ-4E-BP1 (#2855, Cell Signaling Technology) 西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗アクチン (A00730, GenScript, Piscataway, NJ, USA) 抗 Miwi (#2079, Cell Signaling Technology)

抗 GAPDH-S (13937-1-AP, Proteintech, Rosemont, IL, USA), 抗マウス Vasa Homologue (MVH/Vasa, ab13840, Abcam), 抗 IZUM01 抗体は、岡部勝博士 (大阪大学) のご好意によりご提供いただいた。各メンブレンを、Blocking One で 1:10,000 に希釈した抗マウスまたはウサギ IgG HRP 結合抗体 (Cell Signaling Technology) と室温で 1 時間インキュベートし、Lightning Ultra (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて化学発光反応を行った。シグナルは、BioChemii カメラ (UVP, Upland, CA, USA) を備えた ChemiDoc-It イメージングシステム (Bio-Rad) を用いて検出した。

組織学的染色: 精巣切片は脱脂後、ヘマトキシリン・エオジンで染色した。スライドをマウントし、顕微鏡で観察した (モデル IX71, オリンパス株式会社, 東京, 日本)。最大径が 30 μm を超え、精細管基底膜上またはその近傍に存在する空胞の測定には、少なくとも 50 個の効果的な円形精細管を用いた。空胞の値はすべて、計数した全管あたりの影響を受けた全管の割合で表した。

精子数と形態: 精子数は 12-13 週齢の Rimklb^{A29del, L30V} および WT マウスの尾側精巣上体を PBS 中で採取し、37 °C で 15 分間インキュベートした後、精子を PBS で 1:4 に希釈し、血球計数器を用いて複製サンプルの精子数を測定した。同様に精子を採取し、顕微鏡で観察した。各実験条件について、少なくとも 250 個の精子を観察した。頭部が丸い、薄い、または曲がっている精子は異常と判定した。

受精可能性試験および体外受精: C57BL/6J の雌マウス 2 匹と雄マウス 1 匹を、妊娠が成立するまで 2 ヶ月間同じケージで飼育した。交尾は毎朝膣栓の有無を調べることで確認した。体外受精は以下のように行った。C57BL/6J 雌マウスに妊娠雌馬血清ゴナアトロピン (PMSG) (7.5 ユニット、あすか製薬、東京、日本) を腹腔内注射し、48 時間後にヒト絨毛性ゴナアトロピン (hCG) (7.5 ユニット、あすか製薬) を注射した。過排卵雌マウスの各卵管膨大部から、hCG 注射 15 時間後に MII-卵母細胞を採取した。3 ヶ月齢の雄マウスの尾側精巣上体から精子を採取し、TYH 培地で 2 時間培養した。容量精子を MII-卵母細胞と一緒に 2×10^5 精子/mL の最終濃度で滴下培養した。24 時間培養後、2 細胞胚を顕微鏡でカウントした。Rimklb^{A29del, L30V} 雄マウスを 2 ヶ月間 (8 週齢から 16 週齢まで) 野生 C57BL/6 雌マウスと交配させ、その生殖能力を試験した。

精巣の組織学的解析を HE 染色によって行い、精細管組織の形態を解析した。

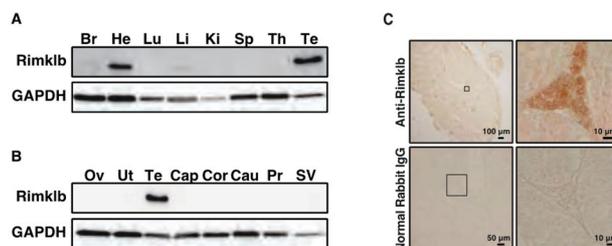
4. 研究成果

臓器および組織における Rimklb の発現: 成体マウスの様々な臓器における Rimklb の発現をウェスタンブロッティングで解析した。図 1A に示すように、Rimklb は心臓と精巣で強固に発現しており、脳と肝臓ではわずかに発現していた。これは、精巣から Rimklb を抽出した以前の研究と一致している⁵。さらに、さまざまな生殖器官における Rimklb の発現パターンを解析したところ、Rimklb は精巣にのみ発現しており、卵巣、子宮、精巣上体 (被殻、烏口体)、前立腺、精囊などの器官では発現していなかった (図 1B)。さらに、免疫組織化学的解析から、Rimklb は主に精巣のライディッヒ細胞に発現していることが明らかになった (図 1C)。

Rimklb 変異マウスの作製: 生体内での Rimklb の生理的役割を調べるため、CRISPR/Cas9 を介したゲノム編集法を用いて Rimklb 変異マウスを作製した。このアプローチにより、2 匹の雄マウスと 1 匹の雌マウスを含む 3 系統のホモ接合変異マウスを得た。変異マウスから得られた DNA 配列を、3 塩基欠失変異を示す電気泳動像として示す (図 1A)。

3 塩基の欠失により、Ala 29 が欠失し、Leu 30 が Val 30 に置換している (図 2B)。これらを Rimklb^{A29del, L30V} 変異マウスと呼ぶ。Off-spotter (<https://cm.jefferson.edu>) と CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no>) を用いて、潜在的なオフターゲット部位を同定した。Rimklb 標的部位と 1~2 カ所異なるゲノム DNA 配列はなかった。類似性の高い 3 カ所を選択し、塩基配列を直接シーケンシングで解析した。これらの部位には欠失や挿入はなかった。

図 1

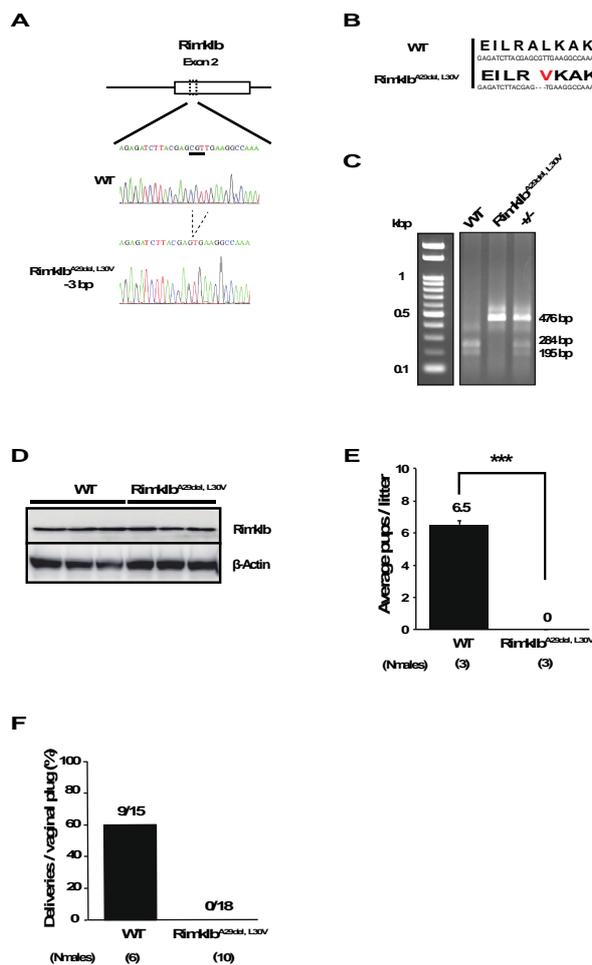


ジェノタイピングは、制限酵素 Mwo I を用いた PCR で行った (図 2C): 野生マウスの PCR 産物は Mwo I で切断されたが、変異マウスのアンプリコンは消化されなかった (図 2C)。変異型マウスと野生型マウスの精巣でシグナルに差がなかった Rimklb タンパク質の発現を解析したところ (図 2D、補足図 S2A)、変異型 Rimklb タンパク質は、Ala 29 の 1 アミノ酸欠失と Leu 30 の Val 30 への置換により、野生型タンパク質と同じサイズであると考えられた。

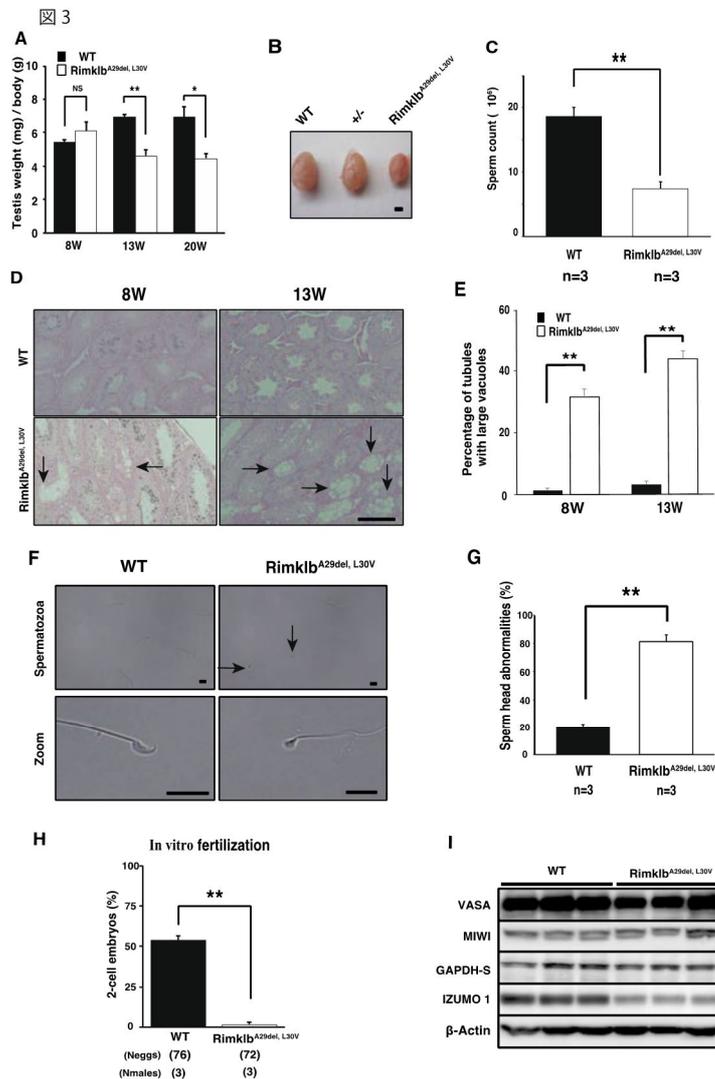
Rimklb^{A29del, L30V} 変異はマウスの雄性不妊を引き起こす。我々は、Rimklb^{A29del, L30V} 雄マウスを 2 ヶ月間 (8 週齢から 16 週齢まで) 野生 C57BL/6 雌マウスと交配させることにより、雄マウスの生殖能力を試験した。図 2E、F に示すように、雌マウスは Rimklb^{A29del, L30V} 雄マウスとの交配後に胎仔を示したが、野生 C57BL/6 雄マウスとの交配後の胎仔率 60%/胎仔に比べ、妊娠せず、胎仔を産まなかった。これらの結果は、Rimklb^{A29del, L30V} 雄マウスは交尾できるが、完全に不妊であることを示している。さらに、Rimklb^{A29del, L30V} 雄マウスの精巣重量は、13 週齢あるいは 20 週齢の野生 C57BL/6 マウスと比較して有意に減少していた (図 3A、B)。精子数は明らかに減少し (図 3C)、Rimklb^{A29del, L30V} 雄マウスでは精子運動性の減衰が観察された (補足動画 1)。テストステロン値には、野生型 (WT) と Rimklb^{A29del, L30V} 雄マウスの間で有意な変化は見られなかった。

組織学的解析の結果、8 週齢の Rimklb^{A29del, L30V} マウスの精巣では精細管に大きな空胞が認められ、それは 13 週齢で顕著になった (図 3D)。また、8 週齢および 13 週齢の Rimklb^{A29del, L30V} 雄マウスの精細管では、大きな空胞を有する精細管の発生率が顕著に増加した (図 3E)。これらの結果は、Rimklb^{A29del, L30V} 雄マウスの精巣では不完全な精子形成が起きていることを示唆している。Rimklb^{A29del, L30V} の精子の形態学的評価では、野生型と比較して、精子の頭部が異常であり、その割合が顕著に増加した (図 3F、G)。精子の受精性を評価するために、3 ヶ月齢の雄マウスの精子を用いて体外受精 (IVF) を行い、さらに解析したところ、Rimklb^{A29del, L30V} 精子は無傷の卵子では受精性を示さなかった; 53.8 ± 2.6% の受精卵が観察されたのに対し、Rimklb^{A29del, L30V} 精子で処理した場合は 1.7 ± 1.7% の受精卵が観察された (図 3H)。また、Rimklb^{A29del, L30V} 精子が透明帯 (ZP) に結合する様子を観察することができ、授精から 6 時間後に 2 つの前核を示した卵もあった。これらの結果から、卵子の受精率の低下は、運動性の低下や精巣の形態異常など、複数の要因によって引き起こされている可能性が示唆された。逆に、精子および精母細胞に特異的なタンパク質である VASA12、MIWI13

図 2



および GAPDH-S14 は、変異マウスと野生マウスの精巣で有意な変化は見られなかった (図 3)。Rimklb は精細管における精子形成過程に重要な役割を担っている。Rimklb^{A29del, L30V} の変異は不完全精子をもたらし、これは完全に不妊であることが示されている。まとめ: Rimklb は精子形成に必須であり、Rimklb は精子形成、精母細胞から精子への分化、増殖、精子受精のすべての過程に関与していると考えられる。しかし、その詳細なメカニズムは解明されておらず、さらなる研究が必要である。Rimklb の微細なメカニズムの解明は、男性不妊の未知のメカニズムの解明につながるかもしれない。



論文: Maekura K, Tsukamoto S, Hamada-Kanazawa M, Takano M. Rimklb mutation causes male infertility in mice. Sci Rep. 2021 Feb 25;11(1):4604. doi:10.1038/s41598-021-84105-z. PMID: 33633267; PMCID: PMC7907349.

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Maekura Koji, Yamano Ryo, Matsuura Kenji, Kadoyama Keiichi, Matsuyama Shogo, Hamada Michiko, Takano Masaoki	4. 巻 69
2. 論文標題 Proteomic analysis of the heart in normal aging mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 217 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.69.217	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 Maekura Koji, Tsukamoto Satoshi, Hamada-Kanazawa Michiko, Takano Masaoki	4. 巻 11
2. 論文標題 Rimk1b mutation causes male infertility in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84105-z	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鷹野 正興、前倉 孝治、塚本 智史、濱田 美知子、土井 賢太郎
2. 発表標題 Rimk1b遺伝子の変異はマウスにおいて雄性不妊を引き起こす
3. 学会等名 日本薬学会第142回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鷹野 正興、前倉 孝治、塚本 智史、濱田美知子、土井賢太郎
2. 発表標題 Rimk1b mutation causes male infertility in mice.
3. 学会等名 日本分子生物学会第44回年会(横浜)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鷹野 正興、前倉 孝治、塚本 智史、濱田美知子、土井賢太郎
2. 発表標題 Rink1b遺伝子の変異はマウスにおいて雄性不妊を引き起こす
3. 学会等名 日本薬学会第142年会(名古屋)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鷹野正興
2. 発表標題 雄性不妊に関わる新規因子の発見
3. 学会等名 BIOJAPAN 2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 不妊モデル動物	発明者 鷹野正興	権利者 神戸学院大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-072388	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------