

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16107

研究課題名（和文）K0マウスを用いたミトコンドリア鞘形成メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of mitochondrial sheath formation mechanism using K0 mice

研究代表者

嶋田 圭祐（Shimada, Keisuke）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：60779601

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：欠損させると精子のミトコンドリア鞘形態に異常が生じる，Tsk5およびSmdr5 K0マウスを用いて研究をおこなった。TSKSはミトコンドリアとは独立したnuageに局在し，このnuageがTSKS欠損により消滅すると，spermiationの段階で精子から細胞質が除去できなくなることが明らかになった。つまりTSKSは精巣特異的に生じるnuageに局在し，精子が精巣から放出されるspermiationの際に細胞質を除去する働きをしていることが明らかになった。またSmdr5欠損マウスでは精子ミトコンドリアの内膜構造に異常が生じることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトでは精子に過剰な細胞質が付着したまま放出されるExcess residual cytoplasmと呼ばれる疾患が存在し，そのため不妊症となる患者が存在する。本研究ではTSKSの機能を明らかにし，TSKSおよびTSKSによって誘導されるTSKS由来nuageが精子から細胞質を除去する上で必須であり，これらのおかげで精子がスリムな流線型を示し，適切な運動性を得られることを明らかにした。本研究を足がかりに不妊症に関する新たな知見が蓄積し，ひいては不妊症治療や男性避妊薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Our study used Tsk5 and Smdr5 K0 mice, with a mitochondrial sheath defect. TSKS is localized in the nuage independent of mitochondria. When this nuage disappears due to TSKS deficiency, cytoplasm cannot be removed from spermatozoa at the spermiation step. In other words, TSKS localizes to the testis-specific nuage and functions to remove cytoplasm from sperm during spermiation, when spermatozoa are released from the testis. In addition, we found that Smdr5-deficient mice have an abnormality in sperm mitochondria inner membrane structure.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精子形成 精子ミトコンドリア nuage

1. 研究開始当初の背景

日本を含む先進諸国では6組に1組の夫婦が不妊に悩んでいるとされ、少子高齢化の進行も伴い不妊症は重大な社会問題となっている。不妊症の約半数は男性に起因するが、その原因の約20%は精子無力症(精子運動能の低下)であると言われている(Curi et al, Arch Androl, 2003)。精子運動性の低下には様々な原因が考えられるが、精子中片部に局在するミトコンドリアによって形成される「ミトコンドリア鞘」と呼ばれる特徴的な構造に異常が生じると、精子運動性は低下し、不妊となることが知られている。

2. 研究の目的

本研究の目的は精子ミトコンドリア鞘に異常を有する *Tsks* (図1) 及び *Smdr5* KO マウスの表現型解析とこれら遺伝子の機能解析に加え、ミトコンドリア鞘形成に関連する分子メカニズムを解明することにある。

3. 研究の方法

既に作出済の *Tsks* および *Smdr5* KO マウスを用いて TSKS および SMDR5 の機能を *in vivo* で解析した。精子運動性の解析や妊孕性などを調べ、雄の KO マウスが不妊となる原因を明らかにした。また新たに作製した抗体を用いて、タンパク質の局在を明らかにしたり、精子形成過程の精子細胞を電子顕微鏡により観察したりすることで、より詳細な解析をおこなった。

さらに培養細胞を用いた *in vitro* 解析により、タンパク質の機能を明らかにした。

4. 研究成果

Tsks 欠損マウスは図1の通り、精子中片部に異常が生じ、精子運動性が低下し、体外受精をおこなってもほぼ受精しなかった。顕微授精をおこなったところ、*Tsks* 欠損精子から次世代のマウスを得ることができた。

ミトコンドリア鞘に特徴的な異常が生じているため、TSKS はミトコンドリア関連タンパク質であると考えて研究をおこなっていたが、新たに作製した抗 TSKS 抗体を用いて、TSKS の局在を調べると、ミトコンドリアとは全く異なる細胞質内に局在していることが分かった(図2)。この細胞内小器官を明らかにするため、免疫電子顕微鏡法を用いて観察したところ、TSKS は Reticulated body (RB) および Chromatoid body remnant (CR) と呼ばれる2つの異なる nuage に局在していることが明らかになった(図3)。Nuage とは生殖細胞内に存在する不定形の細胞内小器官で、電子顕微鏡で観察すると電子密度が高いことが分かる。雄性生殖細胞内には10を超える種類の nuage が存在しており、RB および CR についても古くから存在は知られていたものの、その機能などは全く分かっていなかった。

今回の研究により、TSKS が欠損すると雄性生殖細胞内に RB および CR が存在できないことが明らかになった。RB および CR の機能を明らかにするために、精子形成過程を電子顕微鏡で詳細に観察すると、*Tsks* 欠損マウスでは精子が完成して放出されるステップである spermiation に異常があることが明らかになった。通常

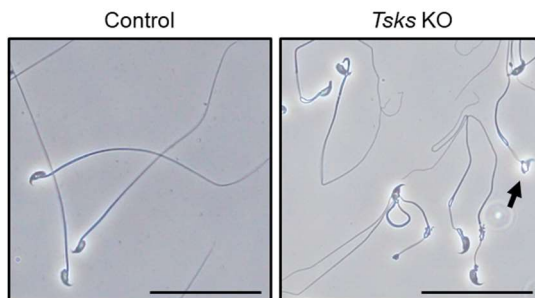


図1: *Tsks* KO マウス精子. ミトコンドリアが中片部に局在せず、精子中片部が細くなっている。頭部形態に異常がある精子も存在する(矢印)。スケールバー: 50 μm

Hoechst/TSKS/acetylated tubulin

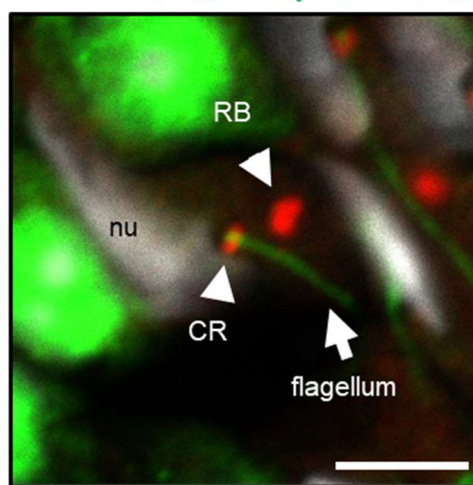


図2: TSKS は細胞質内に局在する。TSKS はミトコンドリアとは独立した場所に局在する。RB, Reticulated body; CR, Chromatoid body remnant, スケールバー: 5 μm

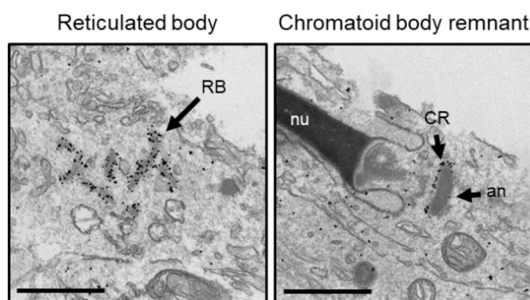


図3: 精子形成過程における TSKS の局在. TSKS は nuage である Reticulated body (RB) および Chromatoid body remnant (CR) に局在する。TSKS は金コロイドで標識してある。nu, nuclei; an, annulus, スケールバー: 1 μm

spermiation の段階では、精子から細胞質が除去されるが、TSKS 精子では spermiation がうまくできず、過剰な細胞質を有する精子が完成していた (図 4)。これらの精子は精巣上位尾部内でアポトーシス反応を起こし、電子顕微鏡観察すると、精子細胞膜がぼろぼろに崩れているのが観察された。これにより KO 精子ではミトコンドリア鞘に異常が生じたのだと考えられる (図 1)。

他にも TSKS はそのリン酸化酵素である TSSK1/TSSK2 および脱リン酸化酵素である PPP1CC2 と相互作用することを明らかにし、TSSK1/TSSK2 は TSKS と同様に RB および CR に局在することを示した。In vitro 解析により、TSKS は脱リン酸化状態で培養細胞内にも nuage を形成することを示し、逆に脱リン酸化されると、nuage 形成ができなくなることも明らかにした。以上のことから TSKS 由来 nuage は spermiation の際に精子細胞から細胞質を除去することで、精子をスリムな流線型にするために働いていることを明らかにした (Shimada et al., PNAS, 2023)。

SMDR5 については現在解析中であるが、KO マウスを用いた解析により、精子ミトコンドリア内膜の形態変化に必須のタンパク質であることを電子顕微鏡法を用いて明らかにしている。

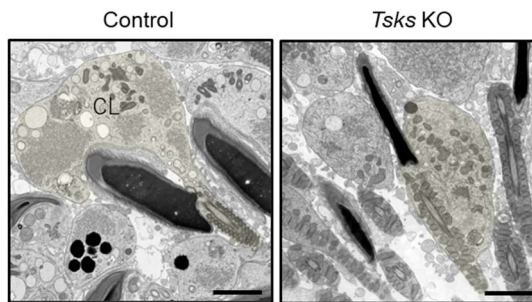
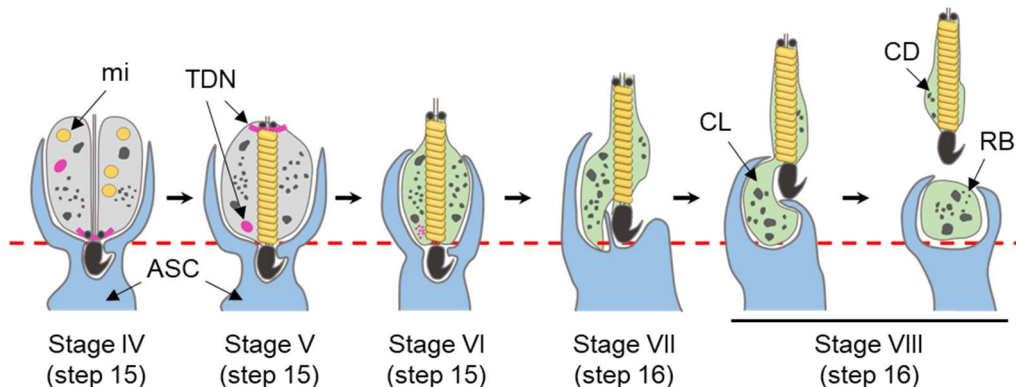


図 4: TSKS 欠損は spermiation に異常が生じる。

正常な精子形成では細胞質が Cytoplasmic lobe (CL) に集まる。この CL が spermiation の段階で除去されるため、細胞質の少ないスリムな精子が形成される。TSKS を欠損するとこの細胞質の除去がうまくできず、過剰な細胞質を有する精子ができてしまう。スケールバー: 1 μm

A



B

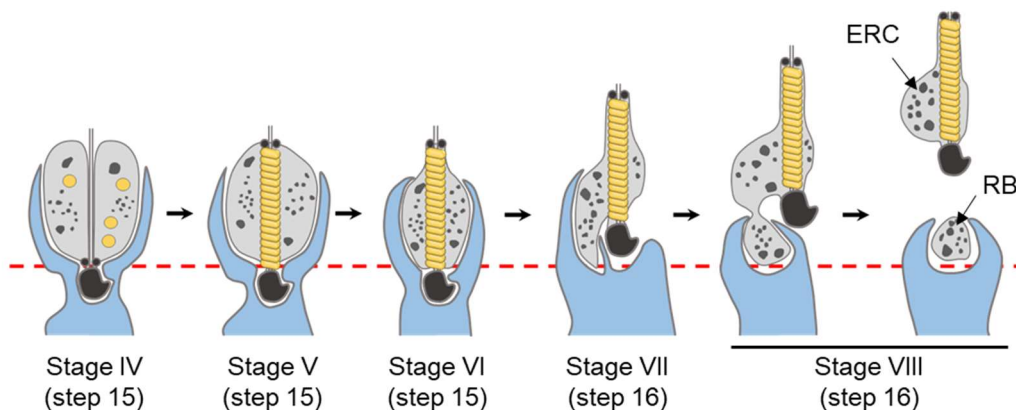


図 5: Spermiation における TSKS の機能。(A) 野生型マウスでは、精子細胞が有する細胞質はセルトリ細胞によって除去される。TSKS および TSKS 由来 nuage (TDN) は Step 15 精子細胞の途中まで存在するが (Stage V), その後消失し (Stage VI), 共局在していた TSSK1 および TSSK2 が細胞質内全体に局在することとなる (薄緑色)。野生型精子では Cytoplasmic lobe (CL) に精子細胞内の細胞質が集まり、これをセルトリ細胞に残す形で完成した精子が放出される。(B) *Tsk* KO 精子細胞には TSKS 及び TDN が存在しない。その結果、CL に細胞質が集まらず、精子に大量の細胞質を含む状態で精子が放出される。Mi, mitochondria; TDN, TSKS-derived nuage; ASC, apical Sertoli cell; CL, cytoplasmic lobe; CD, cytoplasmic droplet; RB, residual body; ERC, excess residual cytoplasm

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件／うち国際共著 11件／うちオープンアクセス 17件）

1. 著者名 Kaneda Yuki, Miyata Haruhiko, Shimada Keisuke, Oyama Yuki, Iida-Norita Rie, Ikawa Masahito	4. 巻 488
2. 論文標題 IRGC1, a testis-enriched immunity related GTPase, is important for fibrous sheath integrity and sperm motility in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 104-113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2022.05.011	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, Larasati Tamara, Fujihara Yoshitaka, Ikawa Masahito	4. 巻 21
2. 論文標題 TULP2 deletion mice exhibit abnormal outer dense fiber structure and male infertility	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12467	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 Kaneda Yuki, Miyata Haruhiko, Shimada Keisuke, Oura Seiya, Ikawa Masahito	4. 巻 -
2. 論文標題 Testis specific proteins, TSNAXIP1 and 1700010114RIK, are important for sperm motility and male fertility in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.13378	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 Kuribayashi Sohei, Fukuhara Shinichiro, Tsujimura Go, Imanaka Takahiro, Okada Koichi, Ueda Norichika, Takezawa Kentaro, Kiuchi Hiroshi, Saito Shigeyoshi, Takahashi Yusuke, Kioka Hidetaka, Oura Seiya, Shimada Keisuke, Ikawa Masahito, Nonomura Norio	4. 巻 22
2. 論文標題 Evaluation of the efficacy of creatine chemical exchange saturation transfer imaging in assessing testicular maturity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12507	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 Shimada Keisuke, Park Soojin, Oura Seiya, Noda Taichi, Morohoshi Akane, Matzuk Martin M., Ikawa Masahito	4. 巻 120
2. 論文標題 TSKS localizes to nuage in spermatids and regulates cytoplasmic elimination during spermiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2221762120	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 Castaneda Julio M., Shimada Keisuke, Satouh Yuhkoh, Yu Zhifeng, Devlin Darius J., Ikawa Masahito, Matzuk Martin M.	4. 巻 134
2. 論文標題 FAM209 associates with DPY19L2, and is required for sperm acrosome biogenesis and fertility in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.259206	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 Miyata Haruhiko, Oura Seiya, Morohoshi Akane, Shimada Keisuke, Mashiko Daisuke, Oyama Yuki, Kaneda Yuki, Matsumura Takafumi, Abbasi Ferheen, Ikawa Masahito	4. 巻 118
2. 論文標題 SPATA33 localizes calcineurin to the mitochondria and regulates sperm motility in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2106673118	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 Monsivais Diana, Nagashima Takashi, Prunskaitė-Hyyryläinen Renata, Nozawa Kaori, Shimada Keisuke, Tang Suni, Hamor Clark, Agno Julio E., Chen Fengju, Masand Ramya P., Young Steven L., Creighton Chad J., DeMayo Francesco J., Ikawa Masahito, Lee Se-Jin, Matzuk Martin M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Endometrial receptivity and implantation require uterine BMP signaling through an ACVR2A-SMAD1/SMAD5 axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23571-5	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 該当する

1. 著者名 Oyama Yuki, Miyata Haruhiko, Shimada Keisuke, Fujihara Yoshitaka, Tokuhiro 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 1-7
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

1. 著者名 Zhang Xin, Sun Jiang, Lu Yonggang, Zhang Jintao, Shimada Keisuke, Noda Taichi, Zhao Shuqin, Koyano Takayuki, Matsuyama Makoto, Zhou Shushu, Wu Jiayan, Ikawa Masahito, Liu Mingxi	4. 巻 134
2. 論文標題 LRRC23 is a conserved component of the radial spoke that is necessary for sperm motility and male fertility in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.259381	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 Mise Shintaro, Matsumoto Akinobu, Shimada Keisuke, Hosaka Toshiaki, Takahashi Masatomo, Ichihara Kazuya, Shimizu Hideyuki, Shiraishi Chisa, Saito Daisuke, Suyama Mikita, Yasuda Tomoharu, Ide Toru, Izumi Yoshihiro, Bamba Takeshi, Kimura-Someya Tomomi, Shirouzu Mikako, Miyata Haruhiko, Ikawa Masahito, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 13
2. 論文標題 Kastor and Polluks polypeptides encoded by a single gene locus cooperatively regulate VDAC and spermatogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-28677-y	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 Shimada Keisuke, Park Soojin, Miyata Haruhiko, Yu Zhifeng, Morohoshi Akane, Oura Seiya, Matzuk Martin M., Ikawa Masahito	4. 巻 118
2. 論文標題 ARMC12 regulates spatiotemporal mitochondrial dynamics during spermiogenesis and is required for male fertility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2018355118	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 Turner Patricia V., Hickman Debra L., van Luijk Judith, Ritskes-Hoitinga Merel, Sargeant Jan M., Kurosawa T. Miki, Agui Takashi, Baumans Vera, Choi Woo Sung, Choi Yang-Kyu, Flecknell Paul A., Lee Byeong H., Otaegui Pedro J., Pritchett-Corning Kathleen R., Shimada Keisuke	4. 巻 7
2. 論文標題 Welfare Impact of Carbon Dioxide Euthanasia on Laboratory Mice and Rats: A Systematic Review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 1~18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fvets.2020.00411	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 Park Soojin, Shimada Keisuke, Fujihara Yoshitaka, Xu Zoulan, Shimada Kentaro, Larasati Tamara, Pratiwi Putri, Matzuk Ryan M, Devlin Darius J, Yu Zhifeng, Garcia Thomas X, Matzuk Martin M, Ikawa Masahito	4. 巻 103
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated genome-edited mice reveal 10 testis-enriched genes are dispensable for male fecundity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 195~204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioaa084	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 Liu Chunyu, Miyata Haruhiko, Gao Yang, Sha Yanwei, Tang Shuyan, Xu Zoulan, Wu Huan, Dulioust Emmanuel, Tian Shixiong, Shimada Keisuke, Cong Jiangshan, Aminata, Zhang Feng, Ikawa Masahito	4. 巻 107
2. 論文標題 Bi-allelic DNAH8 Variants Lead to Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella and Primary Male Infertility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 330~341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2020.06.004	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 Larasati Tamara, Noda Taichi, Fujihara Yoshitaka, Shimada Keisuke, Tobita Tomohiro, Yu Zhifeng, Matzuk Martin M, Ikawa Masahito	4. 巻 103
2. 論文標題 Tmprss12 is required for sperm motility and uterotubal junction migration in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 254~263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioaa060	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 Kim Chang Rok, Noda Taichi, Kim Hyunkyung, Kim Gibeom, Park Seongwan, Na Yongwoo, Oura Seiya, Shimada Keisuke, Bang Injin, Ahn Jun-Yeong, Kim Yong Ryoul, Oh Se Kyu, Choi Hee-Jung, Kim Jong-Seo, Jung Inkyung, Lee Ho, Okada Yuki, Ikawa Masahito, Baek Sung Hee	4. 巻 32
2. 論文標題 PHF7 Modulates BRDT Stability and Histone-to-Protamine Exchange during Spermiogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107950 ~ 107950
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107950	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 嶋田 圭祐, Park Soojin, 宮田 治彦, Zhifeng Yu, 諸星 茜, 大浦 聖矢, Martin M. Matzuk, 伊川 正人
2. 発表標題 ARMC12はTBC1D21と協働してミトコンドリア鞘形成を可能にする
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 嶋田圭祐, Soojin Park, 宮田治彦, Zhifeng Yu, 諸星茜, 大浦聖矢, Martin M. Matzuk, 伊川正人
2. 発表標題 ARMC12は精子形成期においてミトコンドリア外膜上で接着因子として働くことでミトコンドリア鞘形成を可能にする
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第40回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 嶋田圭祐, Soojin Park, 宮田治彦, Zhifeng Yu, 諸星茜, 大浦聖矢, Martin M. Matzuk, 伊川正人
2. 発表標題 ARMC12は精子形成期におけるミトコンドリア鞘形成に必須である
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
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
---------	---------