

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15691

研究課題名（和文）新規GPIアンカー型タンパク質が解き明かす雄性妊娠制御

研究課題名（英文）Male regulation of pregnancy revealed by a novel GPI-anchored protein

研究代表者

渡邊 仁美（Watanabe, Hitomi）

京都大学・医生物学研究所・助教

研究者番号：80624056

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）：本研究では、新規GPIアンカー型タンパク質MuGPI-APについて以下の知見を得た。
1）MuGPI-APの精巣内での発現細胞を調べたところ、パキテン期精母細胞および円形精子細胞で発現開始することがわかった；2）MuGPI-APは精子活性化直後で精子表面での発現が最大となりその後速やかに消失した；3）MuGPI-APKO精子は、野生型精子と比較して体外受精率においては有意な差はなかった；4）MuGPI-APKO精子と野生型精子を等量混合して体外受精を行ったところ、受精卵のほぼ全てがKO精子由来であり、KO精子は、野生型精子に比べて受精しやすいことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不妊症の約30%は原因不明の男性不妊によるものと考えられている。本研究から哺乳動物精子には受精を負に制御する分子が存在することが示唆され、新たな受精メカニズム解明の扉がひらかれた。これにより、将来的に新たな不妊症診断や治療法開発につながる可能性考えられ、社会的意義も大きいものと思われる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we obtained the following findings about a novel GPI-anchored protein, MuGPI-AP. 1) MuGPI-AP was found to be expressed in pachytene spermatocytes and round spermatids; 2) MuGPI-AP was expressed on the sperm surface immediately after sperm activation and rapidly disappeared; 3) MuGPI-AP KO sperm had no significant difference in in vitro fertilization rate compared to wild-type sperm; 4) When equal amounts of MuGPI-APKO and wild-type sperm were mixed and performed in vitro fertilization, almost all fertilized eggs were derived from KO sperm, indicating that KO sperm have higher fertilizing ability than wild-type sperm.

研究分野：生殖工学

キーワード：受精 精子 精子表面タンパク質 体外受精 マウス GPIアンカー型タンパク質

様式 C-19, F-19-1, Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、グリコシルフォスファチジルイノシトールアンカー型タンパク質(GPI-AP)の受精における役割に焦点をあてて研究を進めてきた。GPI-APはさまざまな機能をもつタンパク質が糖脂質アンカー(GPI)を介して細胞膜表面に局在する膜結合型タンパク質の一種である。GPI-APはまた、酵母や原虫などの単細胞生物からヒトにわたるすべての真核生物に保存されており、単細胞生物では遺伝学的な研究の結果、GPI-APが欠損すると致死となることが知られている。一方、哺乳動物では、150種類をこえるGPI-APが知られており、加水分解酵素、接着因子、リガンド、レセプターなどタンパク質部分の機能は様々である。ところが、マウスES細胞でGPI-APを欠損させても致死的不是である。また、様々な組織でGPI-APをコンディショナルに欠損させると、恒常性維持や高次機能の発揮が損なわれることが知られており、高等生物でも重要な役割を担っている。そこで我々は、マウスの各組織において発現量が最大級に多いGPI-APは、それぞれの組織の恒常性維持や高次機能に重要であると想定して、骨格筋からこのようなGPI-AP(MuGPI-AP)を同定した。この分子のmRNA発現を全身の臓器で調べたところ、骨格筋や心臓での発現とともに精巣で特異的に強い発現を示した。次にこのGPI-APの機能を個体レベルで解析するために、CRISPR-Cas9ゲノム編集法を用いてノックアウトマウス(KOマウス)を作製し、表現型を観察した。その結果、骨格筋や心臓に異常は認めず、外見上正常であったが、雄KOマウスと野生型雌マウスの交配で、1出産あたりの産仔数が有意に増加するという想定外の結果を得た。また、なかには1出産で20匹以上のマウスが誕生するケースも複数存在した。さらにヘテロマウスでも、統計学的有意差はないもののKOマウスと野生型マウスの中間的な産仔数を示し、この表現型がdose-dependentである可能性を示唆した。

これらの結果は、妊娠の調節、すなわち過剰な妊娠を防ぐための雄由来のあらたな妊娠制御機構が存在するのではないという問いを導き出した。

2. 研究の目的

各組織の恒常性維持や高次機能の発露に中核的な役割を担うGPI-APの同定と機能解析を目的とした研究の一環として、骨格筋で高発現しているGPI-APとしてMuGPI-APを同定し、KOマウスを作製して、個体レベルでの機能解析を行った結果、予想に反して雄KOマウスの交配産仔数が有意に増加していることを見出した。

本研究は、この表現型の裏にひそむ分子機構を分子生物学的手法、遺伝学的手法や生殖・発生工学的手法を用いて集約的に解析することで、雄性因子による新たな妊娠制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MuGPI-AP発現細胞の同定

精巣生殖細胞を核相毎に分画し、MuGPI-APがどの分化段階の生殖細胞で発現しているかを調べる。また状況に応じて胎生期始原生殖細胞での発現を調べる。

(2) MuGPI-AP KOマウス精子のin vitro機能解析

まず K0 マウス精子の運動能を、受精能と直結する直進運動性や頭部振幅度等のパラメータを中心に解析する。さらに先体反応を含む精子膜反応の進行状況や体外受精能を調べる。

(3) MuGPI-AP K0 マウス精子の人工授精による in vivo 機能解析

K0 マウス精子を排卵誘発した雌マウスの膈内に注入して人工授精を行い、子宮卵管通過能を調べる。

(4) MuGPI-AP K0 マウス精子での受精誘導・促進分子の発現

ACE, ADAM3, Tex101, Pgap1, Ly6k, Lypd4 等の K0 マウスの表現型は、共通して精子の子宮卵管通過が障害されて、雄の妊娠異常が認められている。また Izumo1 K0 マウスでは、精子-卵融合不全により雄性不妊となる。そこで、MuGPI-AP K0 マウス精子でのこれらの受精誘導・促進分子の発現状況を調べる。

(5) 受精誘導・促進分子 K0 マウスでの MuGPI-AP の発現

また、逆に、上記分子の K0 マウス精子での MuGPI-AP の発現状況をしらべ、妊娠制御への関与を両方向から調べる。

4 . 研究成果

我々は、骨格筋から同定した新規 GPI アンカー型タンパク質 MuGPI-AP について、その機能を生体レベルで解析するために、ノックアウトマウス (K0 マウス) を作製し表現型を観察したところ、雄 K0 マウスと野生型雌マウスの交配で、1 出産あたりの産仔数が有意に増加することを見出した。本研究では、この現象の分子機構を解析することで、雄性因子による新たな妊娠制御メカニズムの解明を目標とした。以下は 3 カ年の研究で得られた主要な結果である。

(1) MuGPI-AP K0 精子 について in vitro での性状解析を行い、この精子は直線運動性が野生型に比べて向上していることを認めたが、野生型精子と比較して体外受精率においては有意な差が認められなかった。

(2) MuGPI-AP の精子受精能獲得プロセスでの分子動態について野生型精子を用いて調べたところ、受精能獲得培養液 (HTF) で処理後 30 分で精子表面での発現が最大になり、120 分後ではほぼ消失した。このことから MuGPI-AP は精子の受精能獲得プロセスにおいて一過性に精子表面に露出し、その後消失すると考えられた。

(3) MuGPI-AP の精巣内での発現細胞をデータベース検索により調べたところ、パキテン期精母細胞および円形精子細胞で発現し始めることがわかった。

(4) MuGPI-AP K0 精子と野生型精子を 1:1 で混合して、体外受精を行い、得られた受精卵を仮親に移植して、誕生した産仔の遺伝子型を調べたところ、ほぼ全ての個体が K0 遺伝子を有していた。このことから、K0 精子は、野生型精子に比べて受精しやすいことがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------