

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11217

研究課題名(和文)酸化ストレスに起因した男性不妊に対する新たな治療戦略の検討

研究課題名(英文)The novel strategy to treat male infertility by oxidative stress

研究代表者

佐藤 伴 (SATO, Ban)

筑波大学・生命環境系・特任助教

研究者番号：90443126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：男性不妊患者の精子では、酸化ストレスによる傷害が増大することが妊娠率低下の原因となっている。本申請では、精子における酸化ストレス応答異常の解明のために以下の研究に着目した。(1)プロテアソームの機能低下は精子の運動性低下を引き起こす。(2)酸化ストレスの増大は精子の機能低下を引き起こす。以上の研究を基盤とし融合することで、酸化ストレス応答が破綻し、結果プロテアソームの機能が低下することが男性不妊を引き起こしているという仮説を提唱し、検証する。その結果、酸化ストレスで発現が上昇するタンパク質Lipin1が欠損マウスにおいて上昇し、精子のミトコンドリア鞘形成を制御している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精子形態異常を伴う男性不妊の酸化ストレスの関与、及びプロテアソームの機能低下はそれぞれ症例から明らかになったものであり、その後実験によって確認されていない。プロテアソームの異常によって酸化ストレスが増大することは実験的に証明されている。男性不妊患者の異常形態精子では、双頭、尾部が二股、中片の短縮など様々な形態をとるが、その原因はほとんどわかっていない。二重欠損マウス精子は、ヒト患者精子と同様の形態を呈していた。今後、更なる検証を行うことで、男性不妊の原因の一端がプロテアソームの活性低下にあることが証明できれば、治療戦略に新たな視点を提供できる。

研究成果の概要(英文)：Although oxidative stress related to abnormal spermatogenesis in patients of male infertile, the underlying mechanisms of occurrence of male infertile is poorly understood. To investigate the mechanism of spermatogenesis involved with oxidative stress, we focused on three independent research topics. (1) Decreased activity of protein degradation by proteasome induce poor sperm motility. (2) Increment of oxidative stress observed in the patients of male infertility. We hypothesized that male infertility caused by the breakdown of oxidative stress response with hypoactivity of proteasome. In this study, we revealed that Lipin1 is a candidate for regulation of spermatogenesis with mitochondrial sheath formation.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精子形成 プロテアソーム活性化因子 ミトコンドリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

男性不妊の原因の多くは、酸化ストレスが関連していることが報告されている (Robert J.A. et al., *Hum. Mol.*, 2008)。最近、所属研究室において、プロテアソームの欠損によって酸化ストレス応答が亢進することで精子の成熟過程に異常を呈することが明らかとなっている。酸化ストレス増大は、タンパク質や脂質の酸化を引き起こし、精子の運動性や精子を形成する生殖細胞の DNA に傷害を与えることで、男性不妊を引き起こすことが明らかとなっている。酸化ストレス増大の原因は、生活習慣、環境ホルモンや紫外線など様々な要因が考えられているが、不明な点が多く、また回避策も確立されていない。そのため、精子における酸化ストレス応答を解明することは、不妊患者の軽減に貢献し、妊娠出産率の向上につながると考えられる。本申請では、精子の ATP 非依存性プロテアソームによる酸化タンパク質の分解機構解明のために、以下二つの事象に着目した。

1) タンパク質分解を担うプロテアソームには、活性化因子存在によって極めて多岐にわたる構成が存在することが明らかとなっている (図1)。申請者の所属する研究室ではプロテアソーム活性を制御する因子の遺伝子欠損マウス (PA28ab<sup>-/-</sup>, PA28g<sup>-/-</sup>, PA200<sup>-/-</sup>) をそれぞれ作製しているが、いずれのマウスも単一の遺伝子欠損では、顕著な表現型を示さなかった。(タンパク質分解は、生命を継続する上で基盤となる役割を担うことから、単一遺伝子の欠損に対しては、代償的な作用が強いためと考えられた。) そのため、プロテアソームの複数の経路を遮断することを

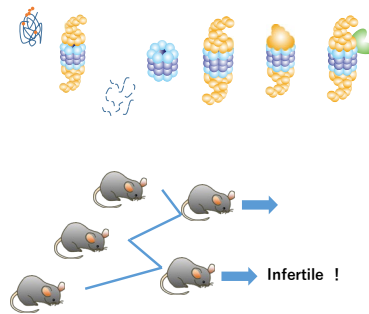


図1 プロテアソーム活性化因子

目的として、二重欠損マウス (PA28g<sup>-/-</sup>/PA200<sup>-/-</sup>) を作製したところ、精子の運動性の著しい低下のために雄性不妊になることが明らかとなっている (Huang et al., *Sci. rep.* 2016)。さらに、別の二重欠損マウス (PA200<sup>-/-</sup>/Ecm29<sup>-/-</sup>) においても、精巣上体の頭部以外に精子が存在しないために雄性不妊となることを予備実験から明らかにしている。以上のようにプロテアソームの機能低下は、雄性不妊を引き起こす事が明らかとなっている。

2) さらに、大規模解析からも明らかになっているように酸化ストレスの増大によって精子の運動性低下や生殖細胞の DNA 傷害が起きることが明らかとなっている (Kelton Tremellen, *Hum. Rep.*, 2008)。酸化ストレスの亢進によって、酸化ストレスタンパク質の積極的な分解が精子においても活性化されると考えられるが、これまでに、酸化ストレスタンパク質の蓄積や分解に焦点を絞った研究は行われてこなかった。興味深いことにマウスやラットでは、加齢が精巣上体でのプロテアソーム発現量低下を引き起こすことも明らかとなっている。以上のことから酸化タンパク質の蓄積は男性不妊の原因の一端を担っているが想定される。

以上のことから、加齢に伴い低下したプロテアソームの機能低下が雄性不妊の原因となっている事が推察され、プロテアソーム活性化因子の欠損マウス (PA200<sup>-/-</sup>/Ecm29<sup>-/-</sup>) は雄性不妊の酸化ストレスによる不妊の再現モデルになると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、雄性不妊の酸化ストレスによる不妊の再現モデルとしてプロテアソーム活性化因子の欠損マウス (PA200<sup>-/-</sup>/Ecm29<sup>-/-</sup>) を用い、プロテアソーム活性化因子の欠損が酸化ストレスを介することでどのように雄性不妊を引き起こすかについて解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、酸化ストレスによる雄性不妊発症の原因を解明するために以下の実験を行った。

### (1) 雄性不妊モデルの解析

雄性不妊を確認するために、欠損オスマウス (PA200<sup>-/-</sup>/Ecm29<sup>-/-</sup>) と野生型メスマウスとの交配によって得られる産仔数の定量を行い野生型との比較を行った。また、精子の形態を観察することを目的として、免疫蛍光染色による光学的観察及び定量を行った。さらに、より精緻な形態観察を行うことを目的とし電子顕微鏡による観察についても行った。

### (2) 欠損マウス精巣上体精子の機能異常を規定している分子の探索

プロテアソーム活性化因子 PA200 及びアクセサリタンパク質 Ecm29 の欠損によって残存するプロテアソーム活性は PA28 によるハイブリットプロテアソームによるものしかなくなる (図1)。プロテアソーム活性の低下は、単一のタンパク質でなく複数のタンパク質の集積を引き起こすことが推察される。そこで、本申請では、集積するタンパク質すなわち基質タンパク質を一網打尽で同定することを目的として、野生型、PA200 欠損マウス、Ecm29 欠損マウス、及び二重欠損マウスから精巣上体を摘出し、タンパク質を抽出した。抽出したタンパク質を用い定量プロテオミクスを行

った。

### (3) 精原幹細胞を用いた解析

精子の機能異常を解析することを目的として、機能異常が細胞自律的なのか非自律的なのかを明らかにするために、精原幹細胞の樹立を試みた。野生型及び欠損マウス精巣を摘出後、コラゲナーゼ処理によって細胞を分散し、精原幹細胞用の培地で培養を行った。得られた精原幹細胞から RNA を抽出し定量的 RT-PCR を行い、未分化マーカーの mRNA 発現量を比較した。

## 4. 研究成果

### (1) 雄性不妊モデルの解析

欠損マウスとの交配試験の結果、産仔数の解析から欠損マウスが完全に雄性不妊であることが明らかになった(図1)。また、精巣上部より採取した精子は、中片部の屈曲や短縮が観察された。さらに、一部の精子では複数の頭部を有することも明らかにした。また、電子顕微鏡を用いることで、中片及び尾部の詳細な観察を行ったところ、欠損マウスでは中片から尾部の構造が倍数化している事が明らかとなった(図2)。以上のことから、欠損マウスの精子は精子形成後の細胞体同士の不分離が原因となって形態的な異常を呈していると考えられた。通常、精子形成は精巣内において完了し、異常な形態を有する精子は精巣及び精巣上部において除去されると考えられている。欠損マウスにおいては、異常な形態を有する精子が8割以上存在していた。このことから、精子の形態制御とプロテアソームによるタンパク質分解が関与していると推察された。

さらに、精巣についても電子顕微鏡による観察を行った。形態において顕著な差は認められなかったものの、二次精細胞においてミトコンドリアの数に有意な差が認められた(図3)。欠損マウスではミトコンドリアの恒常性に異常を呈している可能性が示唆された。

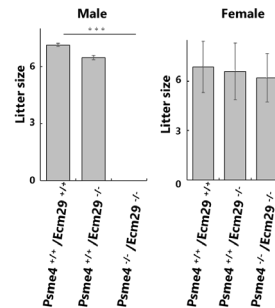


図1、二重欠損マウスは雄性不妊を示した

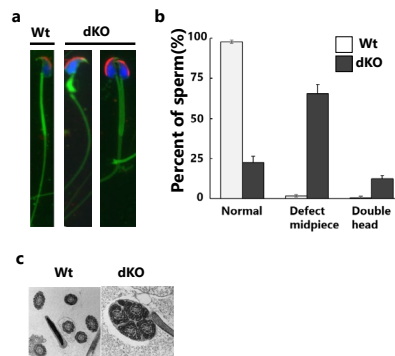


図2、二重欠損マウスで観察された精子形成異常 a)代表的な蛍光画像(緑:ミトコンドリア,赤:アクロソーム),b)精子の形態の定量解析,c)代表的な電子顕微鏡画像

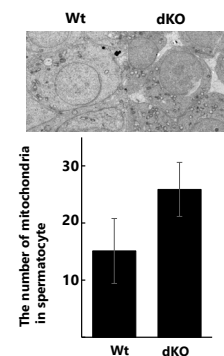


図3、二重欠損マウス精巣における精細胞のミトコンドリア数の変化

### (2) 欠損マウス精巣上部精子の機能異常を規定している分子の探索

精子及び精巣上部における精子形成の異常の原因を明らかにするために、二重欠損マウスでのみタンパク質の発現量が上昇している分子を複数候補として同定することが出来た。候補となった遺伝子について発現解析および二重欠損細胞でのタンパク質の蓄積について検討を行った。複数の候補の中でも、酸化ストレスによっても発現上昇するタンパク質として Lipin1 を同定した (Kyuwha S. et al., Toxic. Res., 2017)。一方で、Lipin1 はホスファチジン酸の代謝を制御することで、ミトコンドリアの分裂・融合に関与すると考えられている。精子の中片では、ミトコンドリアが融合を繰り返し管状に軸糸に巻き付いたミトコンドリア鞘が形成される。電子顕微鏡及び光学顕微鏡での解析から、二重欠損マウスの精子では中片の短縮が観察されていることから、Lipin1 がミトコンドリア形成という点と一致する。以上のことから、プロテアソーム関連タンパク質の二重欠損によって酸化ストレスが亢進し、Lipin1 発現量が上昇することで精子形成に異常を呈する可能性が示唆された。

### (3) 精原幹細胞を用いた解析

野生型及び二重欠損マウス精巣より精原幹細胞を単離し樹立した。得られた細胞から RNA を抽出し定量的 RT-PCR 解析を行ったところ、未分化マーカーに有意な差は認められなかった。また、増殖性についても検討を行ったが有意な差は認められなかった。当初、二重欠損マウスから得られた精原幹細胞を野生型マウスへ移植することを計画していたが、樹立に時間を要したため、計画を実行することが出来なかった。今後、移植実験を行い細胞自律的な作用化について検討しようと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kim J, Tsuruta F, Okajima T, Yano S, Sato B, Chiba T.	4. 巻 494
2. 論文標題 KLHL7 promotes TUT1 ubiquitination associated with nucleolar integrity: Implications for retinitis pigmentosa.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 220-226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.10.049.	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Sato Ban, Chiba Tomoki
2. 発表標題 Analysis of male infertility in proteasome-associated protein PA200/Ecm29 double knockout mouse.
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（神戸）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kim Jiwoo, Sato, Ban, Tsuruta Fuminori, Chiba Tomoki
2. 発表標題 PSME4-/-/ECM29-/-ノックアウトマウス精巣におけるミトコンドリア恒常性の破綻
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（福岡）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉研究室ホームページ  
<http://tchibalab.org/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----