

令和 2 年 4 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17852

研究課題名(和文)精子中片部におけるミトコンドリア局在メカニズムの解明

研究課題名(英文)Revealing the mechanism of mitochondrial localization in the sperm midpiece

研究代表者

嶋田 圭祐(Keisuke, Shimada)

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はSMDR1の欠損が精子ミトコンドリア鞘形成に異常を引き起こし、精子運動性の低下及び雄性不妊を引き起こすことを明らかにした。生殖細胞ではSMDR1はミトコンドリア外膜上に存在し、さらに既知のミトコンドリア外膜タンパク質であるVDAC2及びVDAC3と相互作用していることを明らかにした。これらのことはSMDR1が精子ミトコンドリア鞘形成に必須の存在であり、SMDR1がミトコンドリア同士を繋げてミトコンドリアダイナミクスを制御することでミトコンドリア鞘形成を可能にしていることを示すものであり、世界で初めてミトコンドリア鞘形成の分子メカニズムを明らかにすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精子の中片部にはミトコンドリア鞘と呼ばれる特徴的な構造を有しており、ミトコンドリア鞘の形成不全は精子の運動性低下を引き起こし、雄性不妊の原因となる。現在までにこのミトコンドリア鞘形成に関わる分子メカニズムについては全く明らかになっておらず、これを解明することは将来的に雄性不妊の治療法や男性避妊薬の開発に繋がる可能性がある。さらにこのミトコンドリア鞘はミトコンドリアの様々な形態の変化が複合的に生じた結果形成されるものであり、このメカニズム解析は一般的なミトコンドリアダイナミクス研究へ応用される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We discovered that absence of Sperm mitochondria related gene 1(SMDR1) disrupts mitochondrial sheath formation, resulting in reduced sperm motility and male sterility. In vitro analysis demonstrates that SMDR1 induces mitochondrial clustering, revealing that SMDR1 functions as an adherence factor between mitochondria. In mouse testicular germ cells, SMDR1 localizes to the mitochondrial surface and directly interacts with mitochondrial outer membrane proteins VDAC2 and VDAC3 as well as SMDR2. These findings suggest that SMDR1 binds to VDAC proteins to tether adjacent mitochondria, and this tethering allows mitochondria to properly elongate and coil around the sperm flagellum. Thus, our studies demonstrate for the first time that SMDR1 regulates sperm mitochondrial dynamics, an essential function for mitochondrial sheath formation and male fertility.

研究分野：実験動物学

キーワード：ミトコンドリア鞘形成 精子形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本における不妊のカップルは7組に1組と言われているが、近年の晩婚化に伴いこの割合は増加している。不妊の原因は多岐に渡るが、その一つに精子の運動能力の異常が挙げられる。この精子の運動能力には精子中片部に存在するミトコンドリアが関与していると考えられ、その構造が正しく形成され、正しく機能することが妊孕性に必須であると考えられる。申請者が所属する研究室では生殖に関連する遺伝子を欠損させたノックアウト (KO) マウスを数多く作製し、受精に関わる生理機能を明らかにしてきた。

申請者が精巣特異的に発現する遺伝子 KO マウスを複数作出したところ、そのうち *Smdr1* KO マウスは精子が奇形となり (図1) 雄性不妊を呈した。KO マウスの精子を染色するとミトコンドリアは中片部ではなく精子形成期にセルトリ細胞に貪食されるはずの細胞質中に局在し、ミトコンドリア鞘形成に異常が生じていることが明らかになった。そのため、SMDR1 が精子ミトコンドリア鞘形成に必須の因子であることが示唆された。従ってこの KO マウスの解析により、SMDR1 の機能を明らかにすることができれば精子中片部におけるミトコンドリアの局在メカニズムが明らかにできるのではないかと考えた。

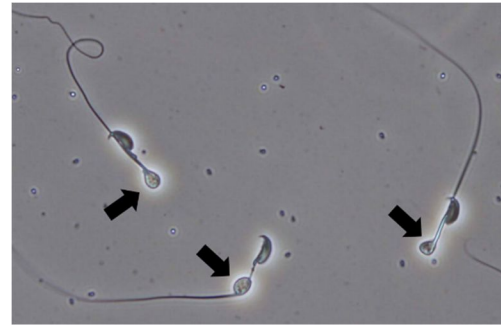


図1: *Smdr1* KO マウスの精子. ミトコンドリアが中片部に局在せず, excess residual cytoplasm 内に認められており (矢印), 精子中片部が細くなっているのが分かる。

2. 研究の目的

本研究では精子の形態形成期における SMDR1 の動態を調べるとともに、この局在に影響を与える他の因子も明らかにすることで、精子ミトコンドリアの中片部局在メカニズムを解明することを第一の目標としている

3. 研究の方法

作出された *Smdr1* KO マウスを用いて SMDR1 の機能を *in vivo* で解析した。精子運動性の解析などの定性的な解析に加えて精子の形態観察をおこない、さらに走査型電子顕微鏡を用いてミトコンドリア鞘形成期におけるミトコンドリアの挙動を詳細に解析した。さらに FLAG タグを付加した *Smdr1* 遺伝子の C 末端に付加したノックイン (KI) マウスを作製して SMDR1 の発現場所の解析及び相互作用するタンパク質の解析をおこなった。これらの実験と並行して培養細胞を用いた *in vitro* 解析をおこない、SMDR1 の細胞内の発現場所の解析や相互作用タンパク質の解明をおこなった。

4. 研究成果

まず *Smdr1* KO マウスの表現型解析をおこない、精子の形態異常 (図1) や精子運動性の低下を明らかにした。KO 雄マウスを雌と交配させると子宮への精子の射出は認められるが、KO 精子は子宮と卵管の境界に当たる子宮卵管接合部 (UTJ) を通過できないことが分かり、これが KO 雄マウスの雄性不妊の原因であることが分かった。精子形成期における精子ミトコンドリアの挙動について電子顕微鏡で観察すると、KO 精子では精子ミトコンドリアが正常に

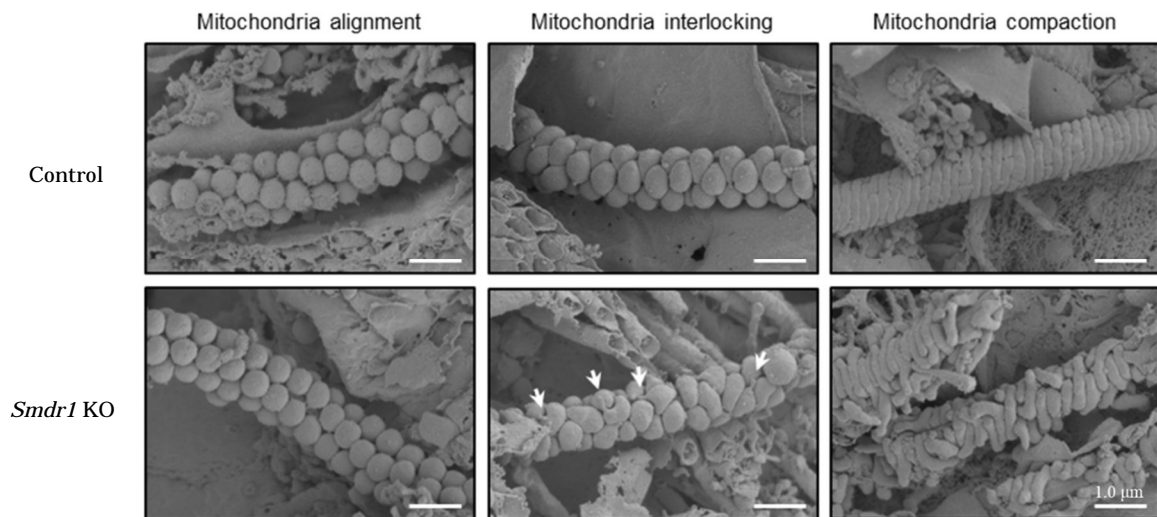


図2: *Smdr1* KO 精子におけるミトコンドリア鞘形成. KO 精子では interlocking 構造が正しく形成できず (矢印), その後はミトコンドリアが鞭毛周辺にタイトに巻き付くことができない。

interlocking 構造を形成できないことが分かり (図 2 下段中央), そのため続くミトコンドリアが伸長して鞭毛周辺に巻き付く段階に至っても, ミトコンドリアの伸張は認められるものの鞭毛周辺に巻き付くことができないことが明らかになった。これらの観察から SMDR1 はミトコンドリア鞘を形成する際にミトコンドリアが鞭毛周辺で正常に巻き付くことに必要なタンパク質であることが明らかになった。

SMDR1 の細胞局在や相互作用タンパク質を明らかにする目的で FLAG タグを C 末端に付与した KI マウスを作出した。この KI マウス及び抗 FLAG 抗体を用いることで SMDR1 が精子形成期のミトコンドリア外膜上に存在することが明らかになった (図 3)。

さらに生殖細胞を抗 FLAG 抗体で免疫沈降し, 得られたタンパク質を用いて MS 解析をおこなった。得られたタンパク質をヒントに共免疫沈降法とその後のウエスタンブロット解析をおこなうことで相互作用するタンパク質を探索した。その結果, SMDR1 は精巣特異的なタンパク質の SMDR2 と相互作用していることが明らかになった。この *Smdr2* については KO マウスを既に作製しており, *Smdr1* KO マウスと同様にミトコンドリア鞘形成に異常が生じ, 雄性不妊となることが分かっている。またミトコンドリア外膜上に存在することが知られている VDAC2 及び VDAC3 タンパク質が SMDR1 と相互作用することも明らかになった。

また培養細胞を用いた実験から SMDR1 がミトコンドリアを凝集させる機能を有することが明らかになり (図 4), ドメイン情報はまだ知られていない SMDR1 の N 末端がこの凝集に必須であることを示した。

これらの結果を総合すると, SMDR1 はミトコンドリア上に存在する VDAC タンパク質を足場にしてミトコンドリア同士を繋げる役割を持っており, この働きによってミトコンドリア鞘形成時におけるミトコンドリアダイナミクスに関わっていることが考えられた (図 5)。

以上の結果はまとめて論文を投稿したところで現在査読を受けている。さらに本研究では複数の精巣特異的な KO マウスを作製しており, この報告書では説明していないが複数の論文として発表されている。

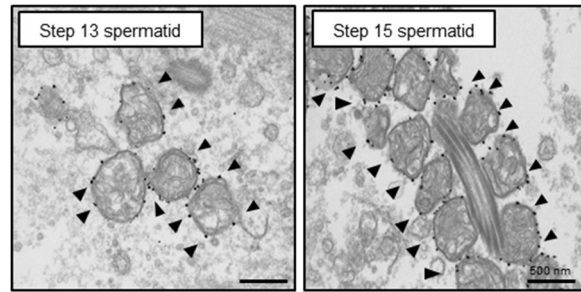


図 3: SMDR1 を免疫ラベルして観察したミトコンドリア鞘形成期の精子細胞の電子顕微鏡像。ミトコンドリア外膜上に SMDR1 が局在しているのが分かる (矢頭)。

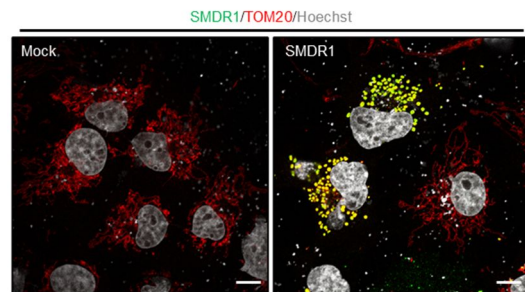


図 4: 培養細胞に SMDR1 を過剰発現させた免疫染色像。SMDR1 がミトコンドリアと共局在し, ミトコンドリアの凝集が生じていることが分かる。

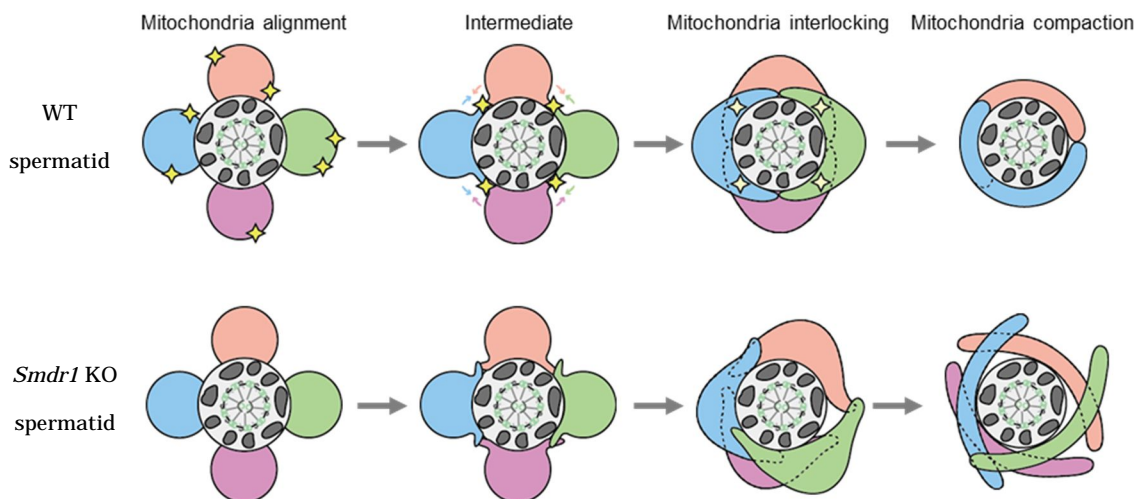


図 5: ミトコンドリア鞘形成における SMDR1 の役割。WT 精子では SMDR1 (星型で示す) がガイドとして働き, 隣接するミトコンドリアの間でミトコンドリアの伸張をサポートするが, KO 精子では SMDR1 がいないためミトコンドリアの伸張が正しく起きずに自由に伸長してしまうため, タイプなミトコンドリア鞘を形成することができない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 SHIMADA Keisuke, KATO Hirotaka, MIYATA Haruhiko, IKAWA Masahito | 4. 巻 65 |
| 2. 論文標題 Glycerol kinase 2 is essential for proper arrangement of crescent-like mitochondria to form the mitochondrial sheath during mouse spermatogenesis | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development | 6. 最初と最後の頁 155 ~ 162 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2018-136 | 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 Abbasi Ferheen, Miyata Haruhiko, Shimada Keisuke, Morohoshi Akane, Nozawa Kaori, Matsumura Takafumi, Xu Zoulan, Pratiwi Putri, Ikawa Masahito | 4. 巻 131 |
| 2. 論文標題 RSPH6A is required for sperm flagellum formation and male fertility in mice | 5. 発行年 2018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.221648 | 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 Oura Seiya, Miyata Haruhiko, Noda Taichi, Shimada Keisuke, Matsumura Takafumi, Morohoshi Akane, Isotani Ayako, Ikawa Masahito | 4. 巻 68 |
| 2. 論文標題 Chimeric analysis with newly established EGFP/DsRed2-tagged ES cells identify HYDIN as essential for spermiogenesis in mice | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Experimental Animals | 6. 最初と最後の頁 25 ~ 34 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.18-0071 | 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 Lu Yonggang, Oura Seiya, Matsumura Takafumi, Oji Asami, Sakurai Nobuyuki, Fujihara Yoshitaka, Shimada Keisuke, Miyata Haruhiko, Tobita Tomohiro, Noda Taichi, Castaneda Julio M, Kiyozumi Daiji, Zhang Qian, Larasati Tamara, Young Samantha A M, Kodani Mayo, et al. | 4. 巻 101 |
| 2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated genome editing reveals 30 testis-enriched genes dispensable for male fertility in mice† | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biology of Reproduction | 6. 最初と最後の頁 501 ~ 511 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iox103 | 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, Shimada Keisuke, Morohoshi Akane, Oura Seiya, Matsumura Takafumi, Xu Zoulan, Oyama Yuki, Ikawa Masahito | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 Testis enriched kinesin KIF9 is important for progressive motility in mouse spermatozoa | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 The FASEB Journal | 6. 最初と最後の頁 5389-5400 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201902755R | 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 Morohoshi Akane, Miyata Haruhiko, Shimada Keisuke, Nozawa Kaori, Matsumura Takafumi, Yanase Ryuji, Shiba Kogiku, Inaba Kazuo, Ikawa Masahito | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 Nexin-Dynein regulatory complex component DRC7 but not FBXL13 is required for sperm flagellum formation and male fertility in mice | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 PLOS Genetics | 6. 最初と最後の頁 1008585 ~ 1008585 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1008585 | 査読の有無 無 |
| 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6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 3件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 嶋田圭祐 |
| 2. 発表標題 SMDR1は精子ミトコンドリアの鞭毛への巻き付きに必須である |
| 3. 学会等名 第33回日本生殖免疫学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 嶋田圭祐 |
| 2. 発表標題 SMDR1は精子形成期における精子ミトコンドリアの鞭毛への巻き付きに関わることでミトコンドリア鞘の形成に必須となるタンパク質である |
| 3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 嶋田圭祐 |
| 2. 発表標題 Smdr1 is required for sperm mitochondrial alignment during spermatogenesis |
| 3. 学会等名 The 1st International Mitochondria Meeting for Young Scientists (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Keisuke Shimada |
| 2. 発表標題 Molecular mechanism of mitochondrial sheath formation revealed through gene-edited mice |
| 3. 学会等名 第14回研究所ネットワーク国際シンポジウム(招待講演)(国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 嶋田圭祐 |
| 2. 発表標題 SMDR1は精子形成期においてミトコンドリア間を繋ぎ止めて精子中片部にミトコンドリア鞘を形成するのに必須のタンパク質である |
| 3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Keisuke Shimada |
| 2. 発表標題 Glycerol kinase 2 is important for proper arrangement of crescent-like mitochondria to form the mitochondrial sheath |
| 3. 学会等名 SSR 52nd Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2019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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|