

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05547

研究課題名(和文) 超解像イメージングによる精子多形化のメカニズム解明

研究課題名(英文) Mechanism of sperm polymorphism by super-resolution imaging

研究代表者

兼森 芳紀 (Kanemori, Yoshinori)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：40529088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物では、遺伝子変異や環境ストレスなどにより頭部が複数のタイプに変形した精子(多形化精子)が産生されることがある。我々は最近、精子多形化に関わる遺伝子ACRBPを偶然見出した。本研究課題では、ACRBPに着目し精子多形化のメカニズムを明らかにすることを目的とした。超解像イメージング解析により、精子多形化には先体顆粒内におけるリング状構造が寄与することが判明した。ゲノム編集技術により、ACRBP内における多形化配列の同定を試みた。予想した特徴のあるグルタミン酸(E)とグルタミン(Q)の繰り返しドメインは、多形化に関与しないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常精子と形態が異なる多形化精子は、卵子との受精率が著しく低いため、不妊治療の現場で大きな障害となっている。したがって、精子多形化の原因究明 関連遺伝子の同定やそのタンパク質の生理機能の解明 は、単に基礎的な学術知見の集積だけでなく、不妊精子の選別など畜産や医療分野への応用研究につながると考えられている。

研究成果の概要(英文)：In mammals, polymorphized sperm whose head is deformed into multiple types due to genetic mutation or environmental stress may be produced. Recently, the acrosomal protein ACRBP has been proposed to be involved in sperm polymorphization. In this research project, we focused on ACRBP and aimed to clarify the mechanism of sperm polymorphization. Super-resolution imaging analysis revealed that a ring-shaped structure in the acrosomal granules contributes to sperm polymorphization. We attempted to identify polymorphic sequences within ACRBP using genome editing technology. It was suggested that the repetitive domains of glutamic acid (E) and glutamine (Q) with the characteristics are not involved in polymorphization.

研究分野：生殖科学

キーワード：精子 先体 受精 ゲノム編集 超解像イメージング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一般的に精子頭部には、核のほかに先体(アクロソーム)とよばれるゴルジ体由来の袋状の細胞小器官が存在する。先体の中にはさまざまな加水分解酵素が含まれており、受精での精子の卵子卵丘細胞層や卵子透明帯の通過を補助している。精子形成過程において、先体の生合成は減数分裂後の球状精細胞から開始される。この時、複数の小胞がゴルジ体から核膜表面に輸送され、各々が融合することで大きな先体胞となる。伸長精細胞になると、先体胞が伸長し、核前方部分を覆うように広がり先体が完成する。この間の先体の劇的な形態変化には、核周辺のアクチン細胞骨格因子を主成分とする構造物が重要な役割を担っている。

代表的な先体タンパク質の1つにACRBPが知られている。ACRBPは約30年前にブタ精子から単離・同定されて以降、申請者が中心となり主にマウスの系で以下のような発現様式や生理機能が明らかにされてきた(Baba et al, JBC, 1994; Ono et al, PNAS, 2001; Kanemori et al, Biol Reprod, 2013; Kanemori et al, PNAS, 2016)。

ACRBPにはmRNAの選択的スプライシングにより生じる2つのバリエーションが存在する。

ACRBPは精子プロテアーゼAcrosinと結合しており、その前駆体の活性化に関与する。

ACRBPは球状精細胞で先体形成初期の先体胞の維持に必要である。

ACRBPは精子形態において頭部の多形化を抑制する。

この中で特に、ACRBP遺伝子の欠損マウスの解析で、ACRBPと精子多形化とのつながりを初めて示唆したものである。ACRBPが欠損した精子は、核と先体の形態に応じて4つのタイプに分類され、形態不良が重度化するにつれ運動能と受精能が著しく低下していた。しかし、その一方、この精子多形化に対するいくつかの疑問が未だに残されている。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果のもと、本研究課題ではACRBPに着目した精子多形化のメカニズムを解明することを目的とした。目的を達成するために、3年間で2項目の研究を遂行した。ACRBP欠損マウスの多形化精子の超解像イメージング、ACRBPにおける多形化に関する配列決定である。

3. 研究の方法

ACRBP欠損マウスの多形化精子の超解像イメージング

先体顆粒は謎の構造物である。その機能や含有タンパク質の詳細は分かっていない。知られている先体顆粒局在タンパク質にACRBPがあり、その精子形成過程においてACRBPの機能は、先体顆粒の形成と維持である。ACRBP欠損により、先体が異常形成する。同時に、ACRBPの欠損により他の先体タンパク質の局在も変化する。このことは、ACRBPが他の先体顆粒の局在タンパク質のパッケージングおよびアンカーリングに関わることを示唆している。マウス精細胞での先体顆粒タンパク質の詳細な局在はほとんど知られていない。われわれは、超解像顕微鏡PALMを用いて、ACRBP-W、ACRBP-V5、ACR、およびZBP2の局在を調べる。さらに、精細胞、精巣切片、または生体外精巣培養系で得られたイメージ画像を解析ソフト(ImarisやImageJ)で3次元構築や数値化させ、立体シミュレーションすることで、多形化精子の詳細を明らかにする。

ACRBPにおける多形化に関する配列決定

ACRBPにはグルタミン(E)とグルタミン酸(Q)に富んだ領域(EQ-richドメイン)が存在するが、精子多形化との関わりについては不明である。Crispr/Cas9システムを利用してEQ-richドメインの欠損マウスの作製を試みる。EQ-richドメインの27アミノ酸を効果的かつ正確に除去するため、ssODN(一本鎖オリゴヌクレオチド)を設計し、ドナーDNAとしてCrispr/Cas9とともに受精卵へ導入する。導入した受精卵のゲノムをシーケンシング解析する。この手法により、Crispr/Cas9システムによって特定のアミノ酸部位を除去する。作製したマウスとACRBP欠損マウスとの表現型比較などによって、精子多形化の分子メカニズムの一端を明らかにする。

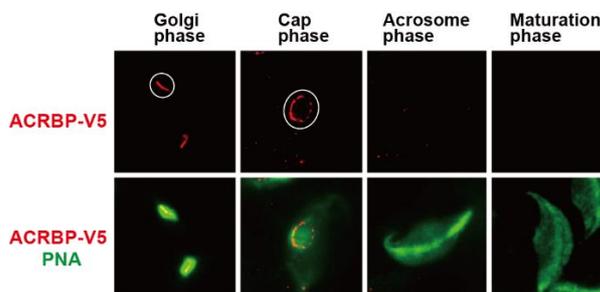
4. 研究成果

ACRBP欠損マウスの多形化精子の超解像イメージング

ACRBP-WとACRBP-V5は、先体顆粒内でリング状に観察される

精子先体顆粒でのACRBP-WとACRBP-V5の詳細な局在を超解像顕微鏡PALMにて観察した。減数分裂が終了した球状精細胞から伸長精細胞での先体形成は、PNAレクチンによる染色により判断し、各フェーズ(ゴルジフェーズ、キャップフェーズ、アクロソームフェーズ、成熟フェーズ)を分別した。それぞれの精細胞に対し、抗ACRBP-W抗体および抗ACRBP-V5抗体を用いて免疫染色した。超解像顕微鏡解析の結果、ゴルジフェーズでのACRBP-WとACRBP-V5のシグナルは、PNAレクチンのシグナルより内側に複数のドット状に存在していた。先体顆粒の肥大化に伴い、ゴルジフェーズではACRBP-WとACRBP-V5のドット状は増加していた(下図)。興味深いことに、増加したドット状シグナルは、リングのような構造となっていた。このリング構造は、先体顆粒のよ

り外側でみられた。アクロソームフェーズと成熟フェーズにおいては、先体胞と先体顆粒の伸長化により、ACRBP-W のリング状構造を維持したまま広がっていた。これら時期の ACRBP-V5 のシグナルは消失していた。この ACRBP-V5 の消失は、以前に報告したわれわれの結果と一致する。ACRBP-W と ACRBP-V5 の超解像シグナルは、ACRBP 欠損マウスでは検出できない。以上の結果から、ACRBP-W と ACRBP-V5 は先体顆粒内でドットとして存在し、結果的にリング状の構造になることが判明した。



ACRBP の欠損により ACR のリング構造は崩壊する

他の先体タンパク質である ACR の先体顆粒での局在も調べた。抗 ACR 抗体を用いて超解像観察すると、ゴルジフェーズで ACR は先体顆粒の内部にドット状に存在していた。キャップフェーズでは ACR はリング状で存在していた。アクロソームフェーズと成熟フェーズでは、先体顆粒と共に ACR のリング構造も伸長していた。次いで、ACRBP 欠損マウスの精細胞で ACR の局在を調べた。ゴルジフェーズで見えていたドット状の ACR のシグナルは、キャップフェーズで先体顆粒内に点在していた。アクロソームフェーズと成熟フェーズでは、シグナルがほとんど検出されなかった。この時期は ACRBP 欠損の影響で、先体顆粒の拡散が確認される。これらの結果から、ACR も ACRBP-W や ACRBP-V5 と同様に先体顆粒内でドットが連なった円状に存在することが判明した。加えて、ACRBP の欠損により ACR のリング状構造も崩壊することも示唆された。

ZBP2 は先体顆粒内で点在している

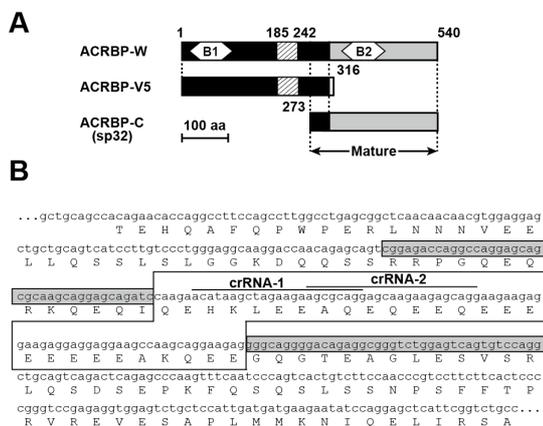
次いで、ZBP2 の局在を調べた。超解像観察をするとゴルジフェーズでみえたドット状でみえたシグナルは、キャップフェーズで球状精細胞の先体顆粒内でシグナルが点在していた。この点在シグナルはアクロソームフェーズになると先体外膜に近い領域に列に配置していた。ACRBP 欠損の精細胞では、初期の球状精細胞で見られた ZBP2 のシグナルは先体顆粒構造の崩壊とともに拡散していた。伸長精細胞でも列に並ぶことなく、先体全体にシグナルが観察された。これらの結果から、ZBP2 は ACRBP や ACR と異なる局在をすることが明らかになった。

先体顆粒内で ACRBP、ACR、ZBP2 は区画化されている

ACRBP-W と ACRBP-V5、ACR、ZBP2 の空間的な局在の違いを明らかにするため、ステップ 9 の精細胞でのそれぞれの局在を比較した。超解像顕微鏡により先体顆粒内での先体タンパク質は異なる区画で存在することを示唆した。その差異を確認するため、ステップ 7-9 の先体顆粒でのそれぞれのタンパク質の局在を座標化してみた。ACRBP-V5 はドットが連なった円状構造であったが、シグナルを数値化しプロットすると直径約 1.8 μm の円になっていた。立体的にみるとさまざまな高さのドットがあることも確認された。ACR は ACRBP-V5 と異なりドット状の円と円の内部にシグナルがあった。ヒストグラムでも外輪と内部にシグナルの高いピークがあった。円の直径は約 1.36 μm であり ACRBP-V5 の円よりやや小さいことが分かった。ZBP2 のシグナルは先体顆粒の内部で点在しており 1 つ 1 つのドットは独立しているように見えた。シグナル上端と下端を結ぶ線の長さは、1.30 μm であり ACR よりさらに内部に存在することが示唆された。すなわち、これらの結果から ACRBP、ACR、ZBP2 は先体顆粒内で区画化されており、それぞれが相互作用をしないことが示唆された。興味深いことに、ACR 欠損マウス、ZBP2 欠損マウスは先体顆粒の崩壊はみられない。特に ZBP2 欠損マウスは先体の位置は隆線に従って移動しているが、先体顆粒としての構造は維持している。すなわち、ACR と ZBP2 の欠損は先体顆粒の維持には関係しないことが示唆された。

ACRBP における多形化に関する配列決定 EQ ドメイン欠損のための戦略

げっ歯類において、先体タンパク質 ACRBP はスプライシング変異により 2 種類産出される(右図 A)。全長 ACRBP-W と第 5 イントロンが一部残存した ACRBP-V5 変異体の N 末領域は共通のミノ酸から構成される。その N 末領域には種間でも良く保存された、特徴のあるグルタミン酸 (E) とグルタミン (Q) の繰り返しドメインが存在する。ACRBP の機能に関して、EQ ドメインの役割はこれまで不明であった。CRISPR/Cas9 テクノロジーを用いて、EQ ドメインを特異的に欠いたマウスの作製が必要とされた。ACRBP 遺伝子座におい



て EQ ドメインは第 5 エキソンに存在し、アミノ酸レベルでは 185 番目のグルタミンから 242 番目のグルタミンまでの範囲となる。IDT のアルゴリズム検索により EQ ドメイン内で 2 つの gRNA (crRNA-1 と crRNA-2) を設計した (上図 B)。インフレームで EQ ドメインを確実に除くため、EQ ドメインの上流 50 塩基と下流 50 塩基を連結させた 100 塩基の ssODN を用意した。この ssODN は、2 本鎖切断後の修復の際のドナー DNA として機能することを期待した。

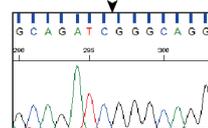
A

	No. of egg electroporated with Cas9/gRNA	No. of blastocyst survived after electroporation	No. of blastocyst subjected to PCR	No. of blastocyst that genome was edited
crRNA-1	80	52 (65.0%) ^a	30	24 (80.0%) ^b
crRNA-2	102	73 (72.6%)	40	2 (5.0%)

B

	No. of blastocyst subjected to PCR	No. of blastocyst that genome was edited	No. of blastocyst that genome was correctly deleted EQ domain
crRNA-1 ssODN	32	26 (81.2%) ^b	4 (6.25%) ^c

C



D

WT
 ctgcagtcactccttctccctgggagcgaaggaaccaagagcagtcggagaccagggccaggagcagcgcgaagcaggagcagatcgaagaacataagctagaag
 aagcgcaggagcgaagaagcagcgaagaagaggaagaggaagcgaagcgaagcgaagagggcaggggacagagcgggtctggagtcagtgccaggct
 gcagtcagactcagagcccaagtccaatccagtcactgtctccaacccgtcctcttcaactcccgggtccagaggtggagctgtgctccattgatgatg

EQ mut
 ctgcagtcactccttctccctgggagcgaaggaaccaagagcagtcggagaccagggccaggagcagcgcgaagcaggagcagatc-----
 (81 nt del) -----gggcaggggacagagcgggtctggagtcagtgccaggct
 gcagtcagactcagagcccaagtccaatccagtcactgtctccaacccgtcctcttcaactcccgggtccagaggtggagctgtgctccattgatgatg

E

	No. of egg electroporated with Cas9/gRNA	No. of egg transferred	No. of offspring	No. of offspring that genome was edited	No. of offspring that genome was correctly deleted EQ domain
crRNA-1 ssODN	173	140	27	19 (70.3%) ^b	2 (7.4%) ^c

EQ ドメイン欠損マウスの産出

選定した 2 つの gRNA の変異導入効果を確認するため、受精卵を利用したエレクトロポレーションを行った。過排卵処理した雌と雄を交配させ、卵管膨大部から受精卵を採取した。前核期卵を選別し、シャーレ上で gRNA-Cas9 タンパク質複合体と混合し、エレクトロポレーションを施した。エレクトロポレーション後は、受精卵は 37.5% 二酸化酸素下で培養した。4 日後に胞胚期の胚を採取し、ダイレクト PCR により ACRBP の遺伝子型を検証した。野生型マウスゲノムと crRNA-1 を導入胚から得られた増幅 DNA のサイズを比較すると 30 個体中 24 個体でバンドサイズのばらつきが確認された (上図 A)。このことは、crRNA-1 を含む Cas9 複合体の働きによりゲノム編集が起こったことを意味している。一方で、crRNA-2 を導入胚から増幅したバンドは、野生型のものと同様のサイズを示した。これらの結果から、crRNA-1 が EQ ドメインの欠損に効果が高いことが示唆された。次いで、用意した 100 塩基の ssODN により、適切に EQ ドメインが除去可能か確かめた。受精卵に gRNA-Cas9 タンパク質複合体と ssODN を混合し、エレクトロポレーションを施した。胞胚期ゲノムを用いた PCR 解析の結果、32 個中 4 個で EQ ドメインの正しい欠損が確認された (上図 B)。すなわち、高い頻度ではないが ssODN によりゲノムの修復が起こったことが明らかになった。ACRBP の EQ ドメイン欠損マウスを作製するため、crRNA-1 と ssODN の導入胚を偽妊娠マウスに移植した。移植総計は 140 個で生まれた産仔が 27 個体であった (上図 E)。ゲノム DNA を採取し、PCR を行うと 2 個体で 81 塩基、すなわち 27 アミノ酸の欠損マウスが確立された (上図 C および D)。その他生まれた 17 個体のマウスの遺伝子型を調べた結果、型にはまらない欠損、17 欠損、73 欠損が居ることも判明した。得られたファウンダーマウスを野生型と交配し、ヘテロ型マウスを得た。ヘテロ型マウスは、兄弟交配により EQ ドメイン変異マウスを産出させた。

EQ ドメインが欠損した ACRBP の存在

EQ ドメインが欠損した ACRBP が発現するか確認するため、精巣と精巣上体精子の抽出液を用いてウエスタンブロット解析を行った。抗 ACRBP-W 抗体でブロットすると、野生型では 60 kDa と 55 kDa のダブルットと 30 kDa にバンドが検出された。30 kDa のタンパク質は精子形成過程で成熟された ACRBP-C である。EQ ドメイン変異マウスからのタンパク質抽出液からは、56 kDa と 48 kDa のダブルットと 30 kDa が確認された。56 kDa と 48 kDa のダブルットは、EQ ドメインが欠損したアミノ酸分子量と一致する。加えて、30 kDa のバンドの大きさも野生型と差が無いことから、N 末に存在する EQ ドメインのみが欠損したタンパク質が産出されていることを示唆している。ACRBP-V5 抗体で検出した場合、野生型 48 kDa に対し、変異型は 43 kDa のバンドのみが検出された。欠損マウスからの抽出液を用いた場合では、ACRBP のいずれのバンドは見られなかった。ACRBP 欠損でみられた SPACA 1 にバンドのシフトは、EQ 欠損では、変化がなかった。精巣上体精子抽出液を用いたウエスタンブロット解析から、EQ 欠損で 30 kDa のバンドには変化がなかった。

ACRBP の EQ ドメインの精子形成における役割

EQ ドメインが欠損したことによる、精子形成に与える影響を調べるため、精子の形態を免疫染色法により調べた。ACRBP 欠損精子では、既報通り 4 種類の先体をもつ精子が観察されたのに対し、EQ 変異体では野生型に近い形態を示した。すなわち、先体は鎌状で頭部核も断片化が無く中編部もミトコンドリアの整列が見られた。精巣から精子形成過程中的のさまざまな精細胞を分別し、先体形成をモニターした。ACRBP 欠損の精細胞ではステップ 5 あたりから、先体顆粒の分散が確認された。一方で EQ 変異体では顆粒の集積ならびに、その後の先体の伸長化がおき、頭部核を覆うように広がっていた。これらの結果から、EQ ドメインの 27 アミノ酸は精子先体形成には関与しないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 田中豪人、柏原真一、兼森芳紀、馬場忠
2. 発表標題 マウス精子形成過程におけるY-box RNA結合タンパク質YBX2の機能解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 須郷卓也、相田千尋、兼森芳紀、柏原真一、馬場忠
2. 発表標題 Acrbp pre-mRNAの選択的スプライシング機構の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018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
連携研究者	竹下 典男 (Takeshita Norio) (20745038)	筑波大学・生命環境系・准教授 (12102)	

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