

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06448

研究課題名(和文) 線虫を用いたJNK型MAPキナーゼによる精子形成・活性化機構の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of JNK-type MAPKs on *C. elegans* spermiogenesis

研究代表者

西村 仁 (Nishimura, Hitoshi)

摂南大学・理工学部・教授

研究者番号：80241347

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)：本研究では、線虫が持つ4種類のJNK型MAPKの中のどれが精子形成・活性化に関与しているのか、で同定されたJNKの基質は何か、について調べた。線虫の精子形成・活性化には、少なくとも3種類の経路(SPE-8クラス依存経路、SPE-8クラス非依存経路、DDI-4経路)の関与が知られている。まず、*kgb-1*と*kgb-2*遺伝子について、これらの遺伝子が協調してDDI-4経路で機能していることが示された。また、*C49C3.10*遺伝子について、SPE-8クラス依存経路への関与が示唆された。現在、*KGB-1*・*KGB-2*や*C49C3.10*の基質タンパク質を調べている段階である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来より、JNK型MAPKがストレス応答やアポトーシスに関与していることは知られているが、本研究では、線虫における精子形成・活性化にもJNK型MAPKが関与していることを初めて示唆した。さらに、線虫精子と哺乳類精子の活性化が互いに類似したプロセスを経ることから、哺乳類精子の活性化にもJNK型MAPKが寄与していることが予想される。現在、JNK型MAPKを活性化する化合物が知られているが、そのような活性を持つ化合物を創製することにより、男性不妊に対する新規治療薬・検査薬のシード(種)化合物となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：JNK-type MAPKs are well known to act in stress response and apoptosis. However, it is unclear whether JNKs are involved in reproduction. The *C. elegans* genome encodes four JNK-type MAPKs (*JNK-1*, *KGB-1*, *KGB-2*, *C49C3.10*). This study was carried out to identify JNKs that act during *C. elegans* spermiogenesis and their substrates. It has been so far suggested that *C. elegans* spermiogenesis is induced via either of the SPE-8 class dependent, the SPE-8 class independent or the DDI-4-triggered pathways. When *kgb-1* and *kgb-2* genes were examined using mutant worms in which either or both of these two genes are disrupted, I found that these two genes are presumably involved in the DDI-4 pathway. On the other hand, it was suggested that *C49C3.10* gene participate in the SPE-8 class-dependent pathway. Currently I am trying to identify substrate proteins for *KGB-1*/*KGB-2* and *C49C3.10*.

研究分野：生殖生物学

キーワード：JNK型MAPK 線虫 精子形成 精子活性化 spermiogenesis 化合物

1. 研究開始当初の背景

分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (mitogen-activated protein kinase, MAPK) は真核生物で幅広く保存されており、多様な生命現象を制御しているセリン/トレオニンキナーゼである。MAPK ファミリーとして、extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) および p38 の少なくとも 3 種類があり、これらの MAPK の主な役割として、ERK は細胞増殖や分化、JNK や p38 はストレス応答への関与が知られている。

最近、申請者らによる先行研究により、JNK 型 MAPK が線虫の精子形成・活性化に関与していることが示唆された。線虫では、減数分裂後の精細胞から偽足が伸長する精子の形成反応と授精能の獲得反応 (精子の活性化反応) がほぼ同時に起こり、これらの過程は spermiogenesis と呼ばれている。線虫を使う一番の利点は、化合物のみからなるシンプルな培地中で精細胞に精細胞活性化因子 (SAF) を加えることで、spermiogenesis を容易に再現できることである。

線虫の *in vitro* spermiogenesis における SAF として、微生物が産生するプロテアーゼの混合物であるプロナーゼ (Pron) や微生物のセリンプロテアーゼであるプロテイナーゼ K (ProK)、化合物である DDI-4 が挙げられる。当研究室は、(1) ProK や DDI-4 が SAF として使用できること、(2) Pron, ProK および DDI-4 がそれぞれ SPE-8 クラス依存的経路、SPE-8 クラス非依存的経路、DDI-4 経路という異なる経路を活性化することを見出したが、Pron および ProK で spermiogenesis を活性化する系に各 MAPK 阻害剤を添加した所、Pron による活性化が JNK 阻害剤で約 99% 阻害されることがわかった。これらの結果は、線虫の spermiogenesis に JNK 型 MAPK が関与していることを示唆している。

2. 研究の目的

「1. 研究開始当初の背景」で述べたように、申請者らは、JNK 型 MAPK が線虫の精子形成・活性化 (spermiogenesis) に関与している可能性を示唆しているデータを既に得ている。本研究の目的は、線虫の精子形成・活性化における JNK 型 MAPK の機能を明らかにすることである。生殖における JNK 型 MAPK の機能について、マウス等を使ったこれまでの研究では、未熟な生殖細胞や精子のアポトーシスに関与していることが報告されているのみである。したがって、「1. 研究開始当初の背景」で述べた申請者らによる先行研究の結果は、生殖における JNK 型 MAPK の新規機能を示唆している。また、JNK 型 MAPK の基質タンパク質の多くは転写因子や核タンパク質、アポトーシス関連のものが多いが、精細胞は減数分裂後の半数体の細胞であるため、基本的に遺伝子発現は起こらない。また、精子の形成・活性化はアポトーシス経路とは独立している可能性が高く、精細胞内に存在する JNK の基質タンパク質は、これまでに知られているものとは異なることが考えられる。さらに、線虫と哺乳類を含む他の生物種との比較において、特に精子の活性化反応のプロセスや意義に類似点が多く、本研究で得られた知見は、哺乳類を含めた他の生物種における精子形成・活性化のメカニズムについても重要な示唆を与えることが予想される。

3. 研究の方法

線虫ゲノムには、4 個の JNK 型 MAPK (JNK-1, KGB-1, KGB-2 および C49C3.10) がコードされている。本研究では、(1) どの JNK が精子形成・活性化に関与しているのか、(2) その JNK の基質タンパク質は何か、に焦点を絞って研究計画を実行する。

精子形成・活性化で機能する JNK 型 MAPK の同定

線虫がもつ 4 個の JNK 型 MAPK 遺伝子のうち、C49C3.10 遺伝子には既存の変異体が存在しないため、CRISPR/Cas9 法で変異体を作製する。jnk-1, kgb-1 および kgb-2 遺伝子には既存の変異体があり、kgb-1 変異体は雌雄同体およびオスがいずれも不妊であることが報告されているが、精細胞の活性化に関する詳細は全く不明である。そこで、それぞれの変異型オスが産生する精細胞を Pron, ProK および DDI-4 で刺激して、spermiogenesis が惹起されるかどうかを調べる。

精子形成・活性化で機能する JNK 型 MAPK の基質タンパク質の同定

野生型および 3- 項で同定された変異体のオスから精細胞を調製し、Pron, ProK および DDI-4 で刺激する。緩衝液で洗浄して SAF を除いた後、非イオン性界面活性剤を含む緩衝液で細胞を可溶化する。可溶化されたタンパク質をトリプシンで消化し、リン酸化ペプチドをガリウム固定化カラムで回収する。回収したペプチドは、一旦、脱リン酸化処理してから質量分析法で同定し、野生型と変異型精細胞間で異なるリン酸化ペプチドを調べる。一方、別の方法でも基質タンパク質の同定を行う。4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF) は、JNK と p38 を活性化することが知られている。実際、精細胞を AEBSF で刺激すると、精子形成・活性化が惹起されるが、JNK 阻害剤存在下ではブロックされることを申請者らは確認済みである。そこで、ショウジョウバエの S2 細胞等の培養細胞内で線虫の各種 JNK 型 MAPK の組換えタンパク質を産生させた後、AEBSF 処理して活性化する。野生型のオスから精細胞を調製して界面活性剤で可溶化し、AEBSF 処理前と処理後の組換え JNK とインキュベートして精細胞内の基質タンパク質をリン酸化する。その後、トリプシン消化を行い、リン酸化ペプチドを上述のように同定した

後, AEBSF 処理した JNK で特異的にリン酸化されたと思われるペプチドを調べる. このようにして同定された基質タンパク質について, 既存の変異体がない場合は CRISPR/Cas9 法で作製し, 変異体のオスが産生する精細胞が Pron, ProK および DDI-4 で活性化するか否かを調べる.

4. 研究成果

精子形成・活性化で機能する JNK 型 MAPK の同定

まず, 既存の変異体が存在しない C49C3.10 遺伝子について, CRISPR/Cas9 法で変異体を作製した. jnk-1, kgb-1 および kgb-2 遺伝子には既存の変異体があるため, それらを実験に使用した. 野生型および各変異型線虫の精細胞を Pron, ProK および DDI-4 で活性化した所, 表 1 で示す結果になった. 野生型精細胞の活性化率を 100%とした場合, Pron および DDI-4 による C49C3.10 変異型精細胞の活性化率は, それぞれ約 86%および 70%であり部分的に低下したが, ProK では正常に活性化した. 次に, jnk-1, kgb-1 および kgb-2 遺伝子について調べた所, jnk-1 変異型精細胞は, いずれの SAF (Pron, ProK, DDI-4) でも正常に活性化された. kgb-1 変異型精細胞の場合, Pron や ProK では正常に活性化されたが, DDI-4 による活性化率は約 55%であった. kgb-2 変異型精細胞はいずれの SAF でも正常に活性化されたが, 興味深いことに, kgb-1 kgb-2 二重変異体では, DDI-4 による活性化率が 33%であり, kgb-1 単独変異型精細胞における活性化率を優位に下回った.

表 1. 各 JNK 型 MAPK 遺伝子の変異型精細胞における spermiogenesis の活性化率*

SAF	精細胞ゲノムで変異している遺伝子				
	C49C3.10	jnk-1	kgb-1	kgb-2	kgb-1 kgb-2
Pron	86%	100%	100%	100%	100%
ProK	100%	100%	100%	100%	100%
DDI-4	70%	100%	55%	100%	33%

*野生型精細胞における活性化率を 100%としている.

これらの結果より, 次のことが考えられた. まず, C49C3.10 遺伝子が Pron による活性化経路 (SPE-8 クラス依存的経路) に部分的に関与している可能性である. 申請者らによる先行研究では, JNK 阻害剤存在下で精細胞を Pron で活性化すると, ほぼ完全に活性化が阻害されたので, 本研究の結果は, C49C3.10 遺伝子が Pron により活性化される経路に関与している唯一の JNK 型 MAPK 遺伝子ではないことを示唆している. 実際, DDI-4 経路では, 複数の JNK 型 MAPK 遺伝子が関与している (後述). 次に, DDI-4 経路において, 少なくとも kgb-1 と kgb-2 が協調して機能することが示唆された. この結果は, 他の経路においても, 複数の JNK 型 MAPK 遺伝子が寄与していることを示唆しているのかもしれない. また, 当研究室によるデータより, DDI-4 経路はマウスにも保存されている可能性が考えられているため, 精子形成・活性化における JNK 型 MAPK の関与は普遍的であることが示唆される.

精子形成・活性化で機能する JNK 型 MAPK の基質タンパク質の同定

現在, 野生型および kgb-1 kgb-2 二重変異型または C49C3.10 変異型精細胞を DDI-4 で活性化させた後, リン酸化された精子タンパク質を同定している段階である.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白木梨央奈, 島田幸広, 山中美貴子, 金子眞弓, 大倉光平, 橋場優喜, 橋本正陽, 軽尾友紀子, 表雅章, 西村仁
2. 発表標題 DDI-4は線虫精子とマウス精子を活性化する化合物である
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
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
研究協力者	表 雅章 (Omote Masaaki) (90299032)	摂南大学・薬学部・教授 (34428)	
研究協力者	軽尾 友紀子 (Karuu Yukiko) (30826235)	摂南大学・薬学部・助教 (34428)	

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