

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14303
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2022
課題番号：19K06780
研究課題名(和文) ショウジョウバエを用いた、オミクス解析でみつかるとヒト男性不妊候補遺伝子の検証

研究課題名(英文) Experimental verification of human male infertility genes by the use of Drosophila models

研究代表者
高野 敏行 (Takano, Toshiyuki)
京都工芸繊維大学・応用生物学系・教授

研究者番号：90202150
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエのオス不妊遺伝子の同定とヒト-ショウジョウバエ間での精子形成の比較を目的に、生殖への機能が未だ実証されていないヒト男性不妊候補遺伝子のオーソログを含む103のショウジョウバエ遺伝子を調査し、新たに63のオス不妊遺伝子を同定した。妊性が低下した個体の表現型は細胞増殖や減数分裂異常など多岐にわたるが、一見、正常に見える精子にもかかわらず不妊となるものも多数観察された。精子とメスのコミュニケーションに障害があるものも含まれると推察される。実際、そのうちの一つNep4遺伝子の機能を破壊すると、精子はメス体内で貯精されず、また受精も完了できない。

研究成果の学術的意義や社会的意義
今、不妊は世界共通の大きな公衆衛生課題となっている。そのうち半数は男性側の障害によるが、原因不明なケースが3割を超える。一方で、データベースには多数の遺伝子が男性の不妊候補遺伝子として登録されている。しかし、これらはオミクス解析によって関連が示唆された過ぎず、モデル生物での実験検証が待たれている。今回、ショウジョウバエをモデルに検証を進め、オス不妊遺伝子リストを充実させることができ、ヒト男性の不妊の理解を深めることにも繋がった。殊に、一見、正常に見える精子でも貯精、受精障害等の異常をもつことも稀ではないことは今後の研究、診断にも役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：To advance our understanding of sexual reproduction, we screened 103 *Drosophila melanogaster* genes for their association with male sterility by tissue-specific RNAi knockdown and CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis, resulting in the discovery of 63 new genes associated with male fertility in *Drosophila*. The phenotypes varied considerably; Interestingly, the second largest class among the distinct sterility phenotypes caused sterility despite apparently normal testis and sperm morphology. We focused on two such genes, Rack1 and Nep4, and found that both plays an important role in sperm function following sperm transfer to females. Many genes are yet to be identified and their role in male reproduction, especially after ejaculation, remains to be elucidated.

研究分野：集団遺伝学、ゲノム科学、量的遺伝学、進化学

キーワード：男性不妊 オス不妊 精子形成 精子成熟 ショウジョウバエ 生物種間横断研究 精子 メスの相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

今でも不妊は世界共通の大きな公衆衛生課題となっている。そのうち半数は男性側の障害によるが、原因不明なケースが3割を超える。一方で、データベースには865の遺伝子が男性の不妊候補遺伝子として登録されている。しかし、これらは男性不妊との関連が予想されるということに過ぎず、モデル生物をつかった実験検証が待たれている。実際、候補遺伝子のうちマウス、ショウジョウバエのいずれでもオス不妊遺伝子として同定されていない遺伝子は600を超える。これらの候補遺伝子が実際にオス(男性)の妊性へ関与するのか、モデル生物による検証が待たれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、オミクス解析でみつかったヒト男性不妊候補遺伝子のうちマウス、ショウジョウバエいずれのモデル生物でもオス不妊遺伝子として同定されていない遺伝子が実際にオスの妊性に関わるか否かを、ショウジョウバエを用いて検証することにある。殊に、このうちから受精と受精後の発生に関わる父性効果遺伝子に注目し、その同定を目指す。

3. 研究の方法

(1) 組織特異的 RNAi クリーニング: ヒト疾患データベースでヒト男性不妊との関連が示唆されているものを含め、合計103のショウジョウバエ遺伝子を GAL4/UAS システムを用いた RNAi スクリーニングによってオスの妊性への関与を調査した。調査には、生殖細胞系列に特異的な GAL4 ドライバー2種 (*nos-GAL4*, *bam-GAL4*)、精巣体細胞系列に特異的な GAL4 ドライバー2種 (*ptc-GAL4*, *upd-GAL4*) の合わせて4種のドライバーシステムを用いた。繁殖力(子孫数)に低下が認められた場合、精巣、精子観察をおこない、ステージ毎の表現型を確認した。すべてのステージに異常がみられなかったものについては受精率、孵化率を調査した。ここまでで、不妊遺伝子リストを作成した。

(2) 組織特異的遺伝子ノックアウトによる検証: mRNA の破壊の効果は即効性があるが定量的である。一方、CRISPR/Cas9による突然変異の誘発実験は効果に遅延があるかもしれないがノックアウトが可能である。この利点を生かし、RNAi 実験結果の検証のため組織特異的な遺伝子ノックアウトをおこなった。また、必須でない遺伝子については完全ノックアウトシステム、アイソフォーム特異的なノックアウトシステムを作出した。

(3) *Nep4* 遺伝子の発現時期、タンパク質の局在部位の同定: アイソフォーム特異的な転写量をリアルタイム PCR によって測定した。また、父性効果の認められた *Nep4* 遺伝子のタンパク質の局在部位を特定するためゲノム編集によって内在遺伝子に AID-FLAG タグ付けを行った。

(4) ヒト遺伝子による代替性の検証: ヒト遺伝子との機能比較を目的に、ヒト遺伝子による代替性テストをおこなった。組織特異的なノックダウンあるいはノックアウトとともに、同じ組織でショウジョウバエ遺伝子あるいはヒトオースログ遺伝子を発現させることで表現型の救済を試みた。

4. 研究成果

(1) RNAi スクリーニングによるオス不妊遺伝子の同定

ヒトでは男性不妊関連遺伝子とデータベースに登録されているがショウジョウバエではオス不妊と認められていない53遺伝子を含む103遺伝子を GAL4/UAS システムを用いた RNAi スクリーニングによって調査した。その結果、63の新規オス不妊遺伝子を含む75遺伝子が RNAi ノックダウンによってオス不妊あるいは妊性の低下を引き起こした。これには生殖細胞でのノックダウンだけでなく、体細胞でのノックダウン (*ptc-GAL4*, *upd-GAL4*) によって妊性の低下が認められたものも含む。ノックダウンオスの精巣の観察から、1) 生殖細胞の増殖あるいは成長障害、2) 減数分裂への移行障害、分裂異常、3) 静止の伸長、コイリングあるいは精子分裂 (individualization) の異常、4) 精子細胞 (spermatid) の精嚢腺 (seminal vesicle) への移行不全、5) 正常な精子形成に見えるにも関わらず精嚢腺での成熟精子が全く見られないか極めて少ない、6) 一見、正常な精子形成に関わらず不妊という6つのクラスに障害を大別した。このうち最大クラスは1)の細胞増殖・成長障害だが、形態的に正常に見える精子にも関わらず不妊となるクラス6の遺伝子もほぼ同数、見つかった。一般に、精子形成といえば、生殖幹細胞の維持や分化、減数分裂過程を対象とした研究が多く、成熟過程以降の理解はそれほど進んでいない。私たちが今回、見出した新規オス不妊遺伝子のなかには、精子とメスの細胞・器官とのコミュニケーションに障害があるものも含まれると推察される。

(2) 初期生殖細胞系列と精子成熟過程の2つのステップで働く *Rack1* 遺伝子

複数のシグナル分子と相互作用する多機能なリボソーム足場タンパクと考えられる *Rack1* を精原細胞で特異的にノックダウンすると、孵化率や子孫の数が有意に減少する。このノックダウンオスが不妊となる原因は精子が正常にメスの貯精器官に進入できないためだ。一見、正常に見える精子は射精されメスに送り込まれるが、子宮内に散在したまま、正常な精子に見られるような前部への移動が観察されない。*RACK1* は運動機能あるいは走性に関わる認識機構に重要な役割を果たしていると考えられる。一方、ノックダウンではなく、CRISPR/Cas9による突然変異の誘発を生殖幹細胞でおこなうと、ほとんど生殖細胞が見られない著しく萎縮した精巣が観察された。初期生殖細胞系列においては生殖細胞の維持あるいは分化に必須の働きをしていると考えられる。また、精原細胞でのノックダウンの表現型はショウジョウバエ *Rack1* 遺伝子あるいはヒトオースログ *RACK1* 遺伝子の強制発現によって救済することができる。機能の代替性からも、ヒトにおいても *RACK1* 遺伝子が同様の機能を果たしていると考えられる。

(3) メスの受精嚢に移行後に必須の働きをする *Nep4* 遺伝子

RNAi スクリーニングによりオス完全不妊を示した *Nep4* 遺伝子のヌル変異体を作成した。そのホモ接合体は生存可能で、メスの妊性に異常はないが、オスは完全不妊となる。この変異体オスも、ほぼ正常に見える精子を作ることができ、精子は正常にメスの貯精器官(管状受精嚢)に進入する。ところが、それから間もなく管状受精嚢から精子が捨てられはじめ、24時間後には5%以下にまでその数が減少する。残った精子も卵への進入率は低く、また進入できても核が脱凝縮せず、受精が完了しない。この *Nep4* には、このエンドペプチダーゼが属する M13 metalloproteinases に典型的な膜貫通型とシグナルペプチド配列をもち、膜貫通ドメインを欠いた非膜貫通型の2つのアイソフォームが存在する。精巣の RNA 発現解析から精巣では主に後者が発現していること、またアイソフォーム特異的な変異体を作成することで、この非膜貫通型を欠くとオス不妊となることを明らかにした。さらにゲノム編集によって遺伝子のC末端にEGFPタグを導入することで遺伝子産物の発現時期と局在を明らかにした。精巣内の Onion stage cells から強く発現を始めた NEP4 タンパク質は精子の先体に局在していた。先体に局在する NEP4 タンパクは、メスの受精嚢に進入した精子においても残ったままである。最近、NEP4 タンパクが筋組織のカルシウムイオン(Ca^{2+})ストアへのイオンの取り込みに関与することが示唆されている。 Ca^{2+} の取り込みと放出は精子成熟においても重要であり、 Ca^{2+} イオンの制御不全が *Nep4* 変異体精子の核の脱凝集や放出が起きない原因であるという新たな仮説を提唱する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ibaraki Kimihide, Nakatsuka Mihoko, Ohsako Takashi, Watanabe Masahide, Miyazaki Yu, Shirakami Machi, Karr Timothy L, Sanuki Rikako, Tomaru Masatoshi, Takano-Shimizu-Kouno Toshiyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 A cross-species approach for the identification of Drosophila male sterility genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 G3 Genes Genomes Genetics	6. 最初と最後の頁 jkab183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/g3journal/jkab183	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 Ohsako Takashi, Shirakami Machi, Oiwa Kazuharu, Ibaraki Kimihide, Karr Timothy L., Tomaru Masatoshi, Sanuki Rikako, Takano-Shimizu-Kouno Toshiyuki	4. 巻 96
2. 論文標題 Drosophila Neprilysin 4 gene is essential for sperm function following sperm transfer to females.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes and Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 177 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1266/ggs.21-00024	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 Asaoka Miho, Sakamaki Yurina, Fukumoto Tatsuya, Nishimura Kaori, Tomaru Masatoshi, Takano-Shimizu Toshiyuki, Tanaka Daisuke, Kobayashi Satoru	4. 巻 4
2. 論文標題 Offspring production from cryopreserved primordial germ cells in Drosophila	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02692-z	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 Tomaru, M., Hattori, E., Yamada, H. & Oguma, Y.	4. 巻 39
2. 論文標題 Sexual isolation between Drosophila simulans and D. mauritiana: D. simulans females do not discriminate against intact-wing D. mauritiana males.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Ethology	6. 最初と最後の頁 73-87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10164-020-00675-x	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 -

1. 著者名 Shimada, S., Muraoka, Y., Ibaraki, K., Takano-Shimizu-Kouno, T., Yoshida, H., and Yamaguchi, M.	4. 巻 386
2. 論文標題 Identification of CR43467 encoding a long non-coding RNA as a novel genetic interactant with dFIG4, a CMT-causing gene.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 111711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2019.111711	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 -

1. 著者名 Nakano, R., Iwamura, M., Obikawa, A., Togane, Y., Hara, Y., Fukuhara, T., Tomaru, M., Takano, T., and Tsujimura H.	4. 巻 453
2. 論文標題 Cortex glia clear dead young neurons via Drpr/dCed-6/Shark and Crk/Mbc/dCed-12 signaling pathways in the developing Drosophila optic lobe.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 68-85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2019.05.003	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 -

1. 著者名 Sanuki, R., Tanaka, T., Suzuki, F., Ibaraki, K., and Takano T.	4. 巻 80
2. 論文標題 Normal aging hyperactivates innate immunity and reduces the medical efficacy of minocycline in brain injury.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain, Behavior, and Immunity	6. 最初と最後の頁 427-438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbi.2019.04.023	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 -

1. 著者名 Tomaru, M, Takano-Shimizu-Kouno, T, and Wakada, H	4. 巻 -
2. 論文標題 No Wolbachia infection was detected in Drosophila elegans collected from the wild in the Ryukyu Islands, Japan.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 microPublication Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17912/micropub.biology.000644	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大岩航陽、大迫隆史、白神真知、茨木公英、Timothy L. Karr、都丸雅敏、佐貫理佳子、高野敏行
2. 発表標題 ショウジョウバエNep4遺伝子は射精後の精子の機能に必要である
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野敏行
2. 発表標題 ゲノムを一括で復元できるショウジョウバエ始原生殖細胞の凍結保存技術
3. 学会等名 NBRP オンラインワークショップ バイオリソースの先端技術のまるわかり
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takano-Shimizu, T. , K. Nishimura, S. Yamamoto, M. Tomaru, R. Sanuki, M. Asaoka, S. Kobayashi, & D. Tanaka
2. 発表標題 Progress and future perspectives of fly-stock cryopreservation in the National BioResource Project (NBRP)
3. 学会等名 14th Japan Drosophila Research Conference
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 TAKANO-SHIMIZU, T., SATO, K., MATSUBARA, K., SANUKI, R., YAMAGUCHI, M., KOWADA, R., YOSHIDA, H., KOSAKI, K. , UEHARA, T., and TALENOUCHI, T.
2. 発表標題 in vivo study of human disease candidate mutations with gain-of-function and loss-of-function effects under the IRUD Beyond.
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野敏行
2. 発表標題 SNAREシャペロン遺伝子の機能獲得型変異
3. 学会等名 「未診断疾患イニシアチブ (Initiative on Rare and Undiagnosed Diseases (IRUD)) : 希少未診断疾患に対する診断プログラムの開発に関する研究」 令和元年度 ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野敏行、佐貫理佳子、松原光平、茨木公英、佐藤克則、大岩航陽
2. 発表標題 ゲノムだけでは解決しないバリエーションに対する機能解析のアプローチ “ IRUD Beyond ” について
3. 学会等名 第61回日本小児神経学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohsaki, T., Inai, K., and Takano-Shimizu, T.
2. 発表標題 Analysis of expression patterns of 96 GAL4 drivers in female sperm storage organs in <i>Drosophila melanogaster</i> .
3. 学会等名 第15回日本ショウジョウバエ研究集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲井 琴梨, 大迫 隆史, 都丸 雅敏, 高野 敏行
2. 発表標題 ショウジョウバエメスの精子保存器官で発現するGAL 4 ドライバー
3. 学会等名 日本遺伝学会第94回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yano, H., Nishimura, K., Yamamoto, S. Takano-Shimizu, T., Saito, K.
2. 発表標題 Attempts and current status of cryopreservation method for Drosophila melanogaster embryos.
3. 学会等名 第15回日本ショウジョウバエ研究集会
4. 発表年 2022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 分担者	都丸 雅敏 (Tomaru Masatoshi) (70324720)	京都工芸繊維大学・応用生物学系・助教 (14303)	

	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	大迫 隆史 (Ohsako Takashi)	京都工芸繊維大学 (14303)	
研究 協力者	カー ティモシー (Karr Timothy)		

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