

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：34438

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09723

研究課題名（和文）精子の加齢を制御する精巣特異的Kansl1-Lのisoform同定と機能解析

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of Kansl1-L gene isoform in testis that controls sperm aging

研究代表者

畑村 育次（Hatamura, Ikuji）

関西医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：80336883

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Kansl1-L KOマウスの精巣においては、後期パキテン期で精子形成の分化が停止していた。DNAマイクロ解析にて、老化関連遺伝子（Sirt1, Klotho等）に変化を認めた。これらの発現様式の検索結果精子形成のFirst wave時期に作用し、後期パキテン期にSirt1遺伝子の発現が低下、ヒストン3, 4のアセチル化の抑制が惹起され、Ccna1の発現が抑えられことで細胞分化が止まり、アポトーシスが誘導され精子形成が停止したと考えられた。またKlotho遺伝子の発現の低下も認め、精子細胞の老化が促進していた。これらからKansl1-L遺伝子は精子形成の初期の分化を制御する重要な分子と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の日本では不妊治療の件数が増加してきており、とくに男性不妊が以前と比べ急激に増加傾向である。その原因の一つに精子の産生能の低下や、晩婚による精子の加齢が挙げられている。本研究において精子形成の初期にKansl1-L遺伝子が重要な役割を担っており、この遺伝子が欠損することにより、精子の細胞分化が停止し、さらには加齢遺伝子に影響を及ぼし、精子形成の初期の分化を制御していると考えられた。男性不妊の一端である精子低形成に及ぼす可能性があり、この遺伝子を活性化することにより、男性不妊の改善に寄与できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Kansl1-L KO mice were generated, and the testis of the KO mice was significantly smaller and had no spermatozoa compared to that of wild mice. The testis of the KO mice had no spermatogenesis compared to that of the wild mice. To analyze the mechanism of spermatogenesis, we performed DNA microanalysis of testis from KO and wild mice and found significant differences in aging-related gene groups. We have also analyzed the Kansl1-L gene and aging-related genes (Sirt1, Klotho, etc.) in spermatocytes and found that these genes act during the first wave of spermatogenesis. This suppression of Ccna1 expression may result in cell division retardation, induction of apoptosis, and cell differentiation arrest of spermatogenesis. It is also thought that reduced Klotho gene expression in testis failed to suppress sperm cell senescence and promoted spermatocyte apoptosis. The Kansl1-L gene is thought to be an important regulator of the early differentiation of spermatogenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：精子形成 Kansl1-L遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Kans11-L (KAT8 Regulatory NSL Complex Subunit 1) KO (Knock out) マウスを作製し、その KO マウス精巣組織においては、wild マウス組織と比較すると著明に小さく、無精子であった。この組織を観察する B 型精粗細胞以降分化していく過程で見られる精子細胞や小さくどがった分化成熟した精子までの細胞を一つも認めずパキテン期後期で精子形成の分化が停止していた。この精子形成におけるメカニズムの解析を行うために、KO マウスと Wild マウスの精巣組織より DNA マイクロ解析を行なったところ、老化関連遺伝子群に有意な差を認め、KO マウスでは、Pgc1 (peroxisome proliferator-activated receptor- coactivator 1) 遺伝子の低下を認めていた。また我々は精巣組織に特異的に発現する Kans11-L 遺伝子の isoform を認めており、精巣特異的 Kans11-L 遺伝子と精母細胞の老化関連遺伝子特に Sirt1 と Pgc1 1 とのクロストークの検索を行った。

2. 研究の目的

不妊症は、多くの先進国で大きな社会問題となっている。男性不妊の大部分は、精子数の低下、精子機能の異常や形成異常等に由来すると考えられている。とくに精子形成異常は不妊症の重要な原因である。しかし、精子形成は哺乳類の体内における複雑なプロセスの一つであり、その詳細は未だ不明である。本研究において Kans11-L (KAT8 Regulatory NSL Complex Subunit 1) KO (Knock out) マウスの無精子の精巣組織を用いて、精子形成に関与する分子とくに、老化に関連する klotho 遺伝子、sirt1 遺伝子および Pgc1 (peroxisome proliferator-activated receptor- coactivator 1) 遺伝子等を中心にこれらのクロストークを検索し、精子形成と老化の関連性を明らかにし、人の不妊症の解明や治療、産業家畜の安定供給や有害野生動物の繁殖抑制にも繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

1) Kans11-L 遺伝子欠損ホモ接合体 (KO) マウス及び野生型 (Wild) マウスの精巣組織を用いて、経時的に組織化学的に精子形成の検討をおこなった。

2) KO 及び Wild マウス精巣組織における精子形成における時期特異的に発現する遺伝子発現様式 (特に組織学的の後期パキテンキに発現する Ccna1 (cyclin-A1) を中心に) を RT-PCR 法で検討した。

3) KO マウスと Wild マウスの精巣組織 (4 週齢) より DNA マイクロ解析を行ない、変化する遺伝子群 (特に加齢に関する遺伝子群を中心に) の解析を行った。

4) Kans11-L 遺伝子は KAT8 Regulatory NSL Complex Subunit 1-Like なのでヒストンの修飾に関与しエピジェネティックな制御をしている可能性があるのでアセチル化についても検討を行った

5) KO マウスと Wild マウスの精巣組織において、Tunnel 染色や DNA ラダー法を用いてアポトーシスの検討を行った。

6) KO マウスおよび Wild マウスの精巣組織における Klotho 遺伝子の発現様式の検討を RT-PCR 法を用いて検討した

7) 精子形成における First wave とくに 16 日 (後期パキテンキ) における Sirt1 遺伝子の発現様式を検討した。

4. 研究成果

1) KO マウスと Wild マウスの精巣の組織(H・E 染色) 2, 4 週齢の Kana1-LKO マウス及 Wild マウスの精巣組織において、組織化学的に精子形成の検討をおこなった結果の右図 1 に示すように 4 週齢の KO マウスの精巣組織に於いて明らかに wild マウスの組織と異なり、野生型では見られる減数分裂によってつくられた精子細胞 (spermatid) やその後精子形成をへて成熟した小さくとがった精子は全く認められず、A 型精母細胞、それから有糸分裂をおこない精子を産生するように運命づけられた B 型精粗細胞を認めることはできたが、それ以降の精子細胞の分化の過程を示す細胞は全く認めず、こういった精母細胞の一部の核に断片化を認めた。組織からはパキテン期で精子形成の分化が停止していると考えられた。

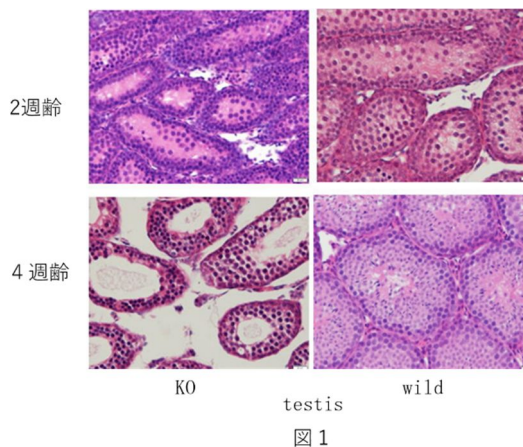
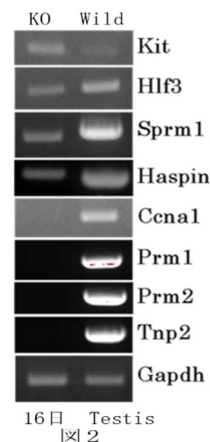


図 1

2) 正常精巣に於いて出生後 14 日: 初期パキテン期、16 日: 後期パキテン期、18 日: ディプロテン期、ディアキネシス期、20 日: 精子細胞に分化し、後期パキテン期、ディプロテン期に Ccna1 分子が強く発現する遺伝子発現様式を検討した(右図 2)。その結果組織から考えられたとおり遺伝子レベルでの精子形成の分化が後期パキテン期で停止していると考えられる。Prm1、Prm2、Tnp 2 遺伝子は精子細胞で発現する遺伝子群であり、このことから精子形成は 16 日(後期パキテン期)で停止している。



16日 Testis 図 2

3) KO マウスと Wild マウスの精巣組織(4 週齢)より DNA マイクロ解析を行ない、変化する遺伝子群(特に加齢に関する遺伝子群を中心に)の解析を行った結果、加齢に関する Sirt1 遺伝子、Klotho 遺伝子、Pgc1 遺伝子などが変化していた。

4) Kans11-L 遺伝子は KAT8 Regulatory NSL Complex Subunit 1-Like なのでヒストンの修飾に関与しエピジェネティックな制御をしている可能性があるのでアセチル化についても検討を行ったところ、Histon 3, 4 のアセチル化は精子形成の first wave の時期において wild と比較して著しく低下していた。

5) KO マウスの精巣組織において、精母細胞に核の断片化を認めたので、KO マウスと Wild マウスの精巣組織において、Tunnel 染色や DNA ラダー法を用いてアポトーシスの検討を行ったところ、KO マウスの精巣組織に於いて精母細胞の tunnel 陽性細胞が野生型と比し明らかに多いことを認めた。また KO マウス精巣組織に於いて DNA ラダーを認めた。(図 3)

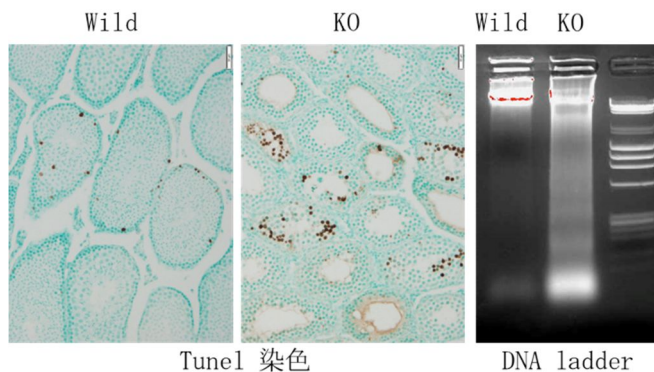


図 3 4 週齢 精巣組織

6) KO マウスおよび Wild マウスの精巣組織 (4 週齢) における Klotho 遺伝子の発現様式の検討を RT-PCR 法を用いて検討した (図 4)。KO マウス精巣組織において Klotho 遺伝子の発現を認めなかった。今回図には示さなかったですが、腎組織においての Klotho 遺伝子の発現には影響はなく、Kans11-L 遺伝子は精巣特異的に Klotho 遺伝子を制御していると考えられた。

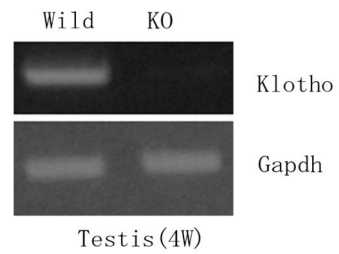


図 4

7) 精子形成における First wave とくに 16 日 (後期パキテンキ) における Sirt1 遺伝子の発現様式を検討するために KO および Wild マウス両精巣組織 (16 日) を用いて、Realtime-PCR を施行したところ、KO マウスの精巣における Sirt1 遺伝子の発現は Wild マウスのそれと比較すると低下していた。一方 Pgca-1 遺伝子の発現は亢進していた。これについては精子形成が停止することで、代償的に発現が増加した可能性がある。

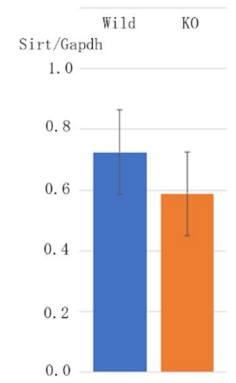


図 5

以上のことから Kans11-L 遺伝子は精子形成の First wave 時期において作用して、この遺伝子の欠失で、とくに後期パキテン期に Sirt1 遺伝子の発現が低下し、ヒストン 3, 4 のアセチル化の抑制が惹起され、Ccna1 の発現が抑えられることで細胞の分裂が滞り、アポトーシスの誘導が起こり、精子形成が停止すると考えられる。また精巣組織における Klotho 遺伝子の発現の低下が精子細胞の老化を抑制できず、精母細胞のアポトーシスを促進していると考えられる。このように Kans11-L 遺伝子は精子形成の初期の分化を制御する重要な分子と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鍵弥朋子、伊藤俊治、畑村育次
2. 発表標題 新規雄性不妊遺伝子Kans11Lは線毛関連遺伝子発現を調節する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会、幕張
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鍵弥朋子、伊藤俊治、畑村育次
2. 発表標題 精子形成関連遺伝子Kans11-Lと精巢の一次線毛の関連
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会、横浜
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鍵弥朋子、伊藤俊治、畑村育次
2. 発表標題 新規嚢胞腎遺伝子Kans111は線毛を介して嚢胞を形成する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会、オンライン開催
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
研究分担者	伊藤 俊治 (Itoh Shunji) (50275351)	関西医療大学・保健医療学部・教授 (34438)	

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