

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06442

研究課題名（和文）精子ダイニン軽鎖による生殖能力維持の新たな仕組み

研究課題名（英文）New Mechanism of Fertility Maintenance by sperm dynein light chain related gene

研究代表者

平舘 裕希（Hiradate, Yuki）

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教（常勤）

研究者番号：20649157

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）：精巣には発現は認められるものの、機能が不明のままである遺伝子が数多く残されている。ノックアウトマウスの作製と交配試験によるスクリーニングにより、新規の雄性妊孕性に不可欠な遺伝子としてAxnd1を同定し、更なる表現型解析を行った。欠損マウスではアポトーシスに伴う精巣組織の縮小と著しい精子形成不全が組織学的観察により判明した。さらに円形精子細胞から精子形態の完成に至る過程において、一過的に形成されるマンシェット構造に異常が認められた。以上からAxnd1は精子の形態形成において必須の遺伝子であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規の雄性妊孕性に不可欠な遺伝子としてAxnd1を特定し、その原因が精子形態形成不全に伴うことであることを明らかにした。知見は男性不妊症の発生メカニズムの解明に外挿することが可能で、新たな治療法開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：There remain a number of genes in the testis that are expressed but whose function remains unknown. Through the generation of knockout mice and screening by mating tests, Axnd1 was identified as a novel gene essential for male fertility and further phenotypic analysis was performed. Histological observation revealed shrinkage of testicular tissue associated with apoptosis and marked spermatogenesis defects in the deficient mice. In addition, the transiently formed manchette structure was abnormally formed during the process from round spermatid to complete sperm morphogenesis. These results indicate that Axnd1 is an essential gene for sperm morphogenesis.

研究分野：生殖生物学、発生工学

キーワード：CRISPR/Cas9 ノックアウトマウス マンシェット構造 非閉塞性無精子症 精子完成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精巣には特異的あるいは他の組織と比較して著しく高い発現を示す遺伝子が数多く知られている。雄性生殖能力に重要な機能を持つものも含まれることが予測されるが、転写レベルでの発現が認められるものの、タンパクとしての機能は不明のままのものも多く含まれている。これらの機能をあきらかにすることでこれまで知られていない、新たな男性不妊症の発症メカニズムの解明と治療法開発へ向けた知見が得られる可能性がある。生体における個々の遺伝子機能を解明するためにはノックアウトマウスの作製とそれが示す表現型の解析が有効であり、そこでCRISPR/Cas9を利用して、候補として選抜した遺伝子を順次ノックアウト、系統化し、交配試験により雄性妊孕性への影響を検討したところ、本研究の課題となった雄性不妊を示す新規の原因遺伝子、*Axdnd1*を見出した。

2. 研究の目的

交配試験スクリーニングにより見出した *Axdnd1* ノックアウトマウスの表現型解析を行うことで、表現型が不妊を示した原因を解析し、*Axdnd1* の雄性妊孕性における役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

不妊を示す *Axdnd1* ノックアウトマウスの精巣をブアン固定後、薄切し、He-PAS 染色により標本作製、顕微鏡下で観察を行った。また *Axdnd1* の部分配列を大腸菌で発現させ、抗原としてウサギに免疫しポリクローナル抗体を作製した。さらにラットにも免疫し、モノクローナル抗体を作製した。得られた抗体を用いて免疫染色および免疫沈降を行い、局在解析と相互作用因子の特定を試みた。

4. 研究成果

(1) 組織学的観察による雄性不妊要因の特定

ノックアウト精巣を野生型と比較したところ、組織の縮小が認められ、重量も有意に低下していた。さらに精巣上体尾部を切開し採取した完成精子は頭部尾部ともに形態不全を示した。この結果から精子形成過程に異常が生じた可能性が示唆されたことから、精巣薄切標本のPAS染色による精子形成サイクルの観察を行い、円形精子細胞からの伸長過程において頭部形成の異常が認められることを見出した。また組織切片に対してアポトーシスを検出するTUNELアッセイを行ったところ、精細管あたりの平均陽性細胞の数は野生型と比較して有意に高かった。また精巣から生殖細胞を単離、塗抹標本を調整して観察を行ったところ、16段階に分類される円形精子細胞から精子への分化過程のうち、顕著な形態変化が生じる後半で野生型と比較して異常伸長したマンシェット構造、頭部奇形が認められた。以上の結果より *Axdnd1* ノックアウトマウスが示す雄性不妊は主に円形精子細胞から精子への分化不全に因るものであることが示唆された。

(2) 免疫染色による *Axdnd1* 局在パターンの特定

一方で作製した抗体を用いた組織免疫染色では、*Axdnd1* の局在はパキテン期精母細胞より認められた。またその局在は円形精子細胞の伸長が起こる直前のstep8まで細胞質内に局在することが認められたものの、先述の構造的異常が生じるstep9以降の段階では、少なくとも我々の抗体を用いた免疫染色では局在は検出されず、*Axdnd1* の欠損の影響は円形精子細胞の段階で発生し、精子形態形成の異常として顕在化することが推測された。

(3) 生化学的アプローチによる相互作用因子の探索

抗体を作製すべく全長クローニングを行い、大腸菌に発現させ1,111アミノ酸からなる全長をリコンビナントタンパクを獲得しようと試みたが、部分的に毒性を持つ配列を持つためか全長は獲得できず、C端側の部分発現によって得られたタンパクを抗原として免疫しウサギポリクローナルおよびラットモノクローナル抗体を作製した。何れの抗体もウエスタンブロットと免疫染色に使用できたが、共免疫沈降では質量分析による有意な相互作用タンパクの特定はできなかった。

本研究によって *Axdnd1* ノックアウトマウスの解析により、円形精子細胞からの精子完成過程において精子頭部、鞭毛形態形成に異常が生じることが不妊の要因となることが明らかとなった。この成果は査読を経て論文発表することができた。また研究期間中に他グループにより発表された報告に依れば、ヒト非閉塞性無精子症の患者 DNA から *AXDND1* の変異が見いだされ、ノックアウトマウスが示す表現型も類似のものであった (Ma et al., *Cell Death Discov*, 2021)。今後さらに詳細な *Axdnd1* の精子完成における役割が明らかになることで、無精子症疾患の理解、およびその治療法の開発につながることを期待される。

< 引用文献 >

Ma, Q., Cao, C., Zhuang, C. *et al.* AXDND1, a novel testis-enriched gene, is required for spermiogenesis and male fertility. *Cell Death Discov.* **7**, 348 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuki Hiradate, Ryua Harima, Rin Yanai, Kenshiro Hara, Kazue Nagasawa, Makoto Osada, Tomoe Kobayashi, Makoto Matsuyama, Shin-ichiro Kanno, Akira Yasui, Kentaro Tanemura	4. 巻 21
2. 論文標題 Loss of Axdnd1 causes sterility due to impaired spermatid differentiation in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 e12452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12452	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 張磨琉亜, 平舘裕希, 原健士朗, 種村健太郎
2. 発表標題 精子完成におけるダイニン関連因子（Axdnd1）の機能解明
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 張磨 琉亜, 平舘 裕希, 松山 誠, 藤井 渉, 原 健士朗, 種村 健太郎
2. 発表標題 Axdnd1遺伝子欠損マウスに生じる精子形成不全
3. 学会等名 第113回日本繁殖生物学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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