様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　 ５ 月 ３０ 日現在

機関番号：１４４０１
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2021
課題番号：２０Ｋ１５８０４

研究課題名（和文）Understanding the role of TCP11 and TCP11L3 in hyperactivation

研究課題名（英文）Understanding the role of TCP11 and TCP11L3 in hyperactivation

研究代表者
ＣＡＳＴＡＮＥＤＡ　ＪＵＬＩＯ（Castaneda, Julio）

大阪大学・微生物病研究所・特任助教（常勤）

研究者番号：００７９１６５９

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）：この研究では、精子の運動性に重要な1つの遺伝子（Tcp11）と、精子の動きに必要のない関連遺伝子（Tcp11 Like 3）を特定しました。 マウスのTcp11遺伝子を取り除くと、精子の動きが減少し、オスのマウスは不妊になります。 人間にもTcp11遺伝子があり、この研究は、Tcp11が男性の精子の運動性にも重要である可能性があることを示唆しています。

研究成果の学術的意義や社会的意義
This research identified Tcp11 as important for sperm motility. The research suggests that Tcp11 is functioning through the cAMP signaling pathway. The societal benefits is in human reproduction. In infertile men whose sperm are immotile, we think Tcp11 might be the cause of this defect.

研究成果の概要（英文）：This research identified one gene (Tcp11) that is important for sperm motility, and a related gene (Tcp11 Like 3) that is not necessary for sperm movement. When we remove the Tcp11 gene in mice, sperm have decreased movement and the male mice are infertile. Humans also have the Tcp11 gene, and this research suggests that Tcp11 may also be important for sperm motility in men.

研究分野：reproduction

キーワード：sperm　sperm motility　infertility　Tcp11　cAMP signaling

※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。

１．研究開始当初の背景

Gamete production is essential for sexual reproduction. Mammalian males produce sperm in the testis through a process called spermatogenesis. Testicular sperm of mammals is incapable of fertilizing oocytes naturally. Their sperm must transit through the epididymis for maturation. When sperm are ejaculated into the female reproductive tract, the environment of the female reproductive tract causes pH changes in sperm, leading to an influx of calcium ions and activation of the cAMP pathway. The cAMP pathway is essential for sperm to be hyperactivated, which is characterized by an increase in motility and a straightening of sperm swimming. Failure of sperm to hyperactivate leads to decreased fertilization success and may cause infertility in males. Mouse TCP11 has been implicated in the cAMP pathway in sperm. TCP11 is a testis specific protein with unknown function. A recent study showed that TCP11 forms a complex with Protein Kinase A (PKA), which is a downstream effector of the cAMP signaling pathway. Interestingly, there is a paralog of *Tcp11* that is also expressed in the testis (*Tcp11l3*). I examined the role *Tcp11* and *Tcp11l3* in mouse spermatogenesis.

２．研究の目的

The purpose of this research is to understand the mechanism of mammalian sperm hyperactivation that is required for sperm to successfully fertilize oocytes. Hyperactivation is characterized by increased sperm motility that is caused by calcium influx and the cAMP pathway. TCP11 is a testis specific protein that has been implicated in the cAMP pathway in previous work. TCP11L3 is a paralog of TCP11 that is also only expressed in the testis. The purpose of this research is to determine the role of both these proteins in spermatogenesis.

３．研究の方法

TCP11 is a testis specific protein has been implicated in the cAMP singling pathway. TCP11 has been shown to form a complex with the main effector of the cAMP pathway in sperm, Protein Kinase A. I have obtained a KO of *Tcp11* from the Knockout Mouse Project (KOMP) and have begun to characterize this mutant.

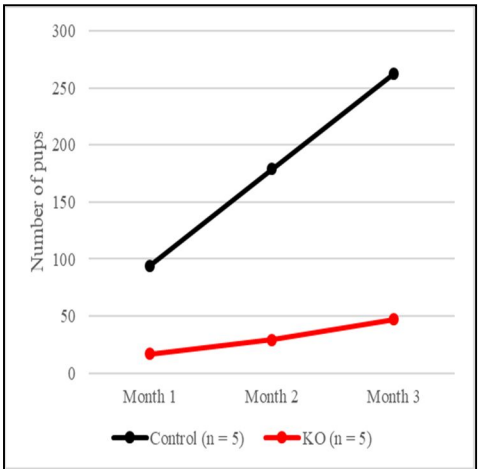

Figure 2. Breeding results of Tcp11 KO males compared with wild-type males. The number of pups were recorded.

Knockout *Tcp11* males show decreased sperm motility, consistent with a role in hyperactivation, but are subfertile when paired with wild-type females (Figure 2). Interestingly, there is an additional *Tcp11* paralog expressed in testis, *Tcp11l3*. With the help of Dr. Masahito Ikawa, I have successfully knocked out *Tcp11l3* using CRISPR/Cas9. With these two KOs, I will perform the following experiments:

1A) Finish characterizing *Tcp11* KO males. Breeding results show that Tcp11 KO males are subfertile. I will examine spermatogenesis in these mice to determine the cause of the subfertility. Testis histology and

immunofluorescence will help identify if there is a problem in spermatogenesis. Computer assisted sperm analysis (CASA) and *in vitro* fertilization (IVF) will help determine if the sperm are defective and incapable of fertilizing eggs.

1B) Characterize *Tcp11l3* KO males. Using CRISPR/Cas9, I have successfully knocked out the entire coding region of *Tcp11l3*, the *Tcp11* paralog also expressed in testis. Like *Tcp11* KO mice, I will perform breeding studies to test whether *Tcp11l3* is required for male fertility. Examining spermatogenesis with testis histology and immunofluorescence will help determine if there are any defects in spermatogenesis. CASA and IVF will determine whether sperm from these KO males can fertilize eggs.

4．研究成果

Characterization of Tcp11 KO males lead to a publication in Biology of Reproduction (DOI: 10.1093/biolre/ioz226). In the publication, I showed that *Tcp11* is required for sperm motility and deletion of *Tcp11* leads to subfertility in male mice. Interestingly, I also showed that TCP11 protein is restricted to the testis and is not present in spermatozoa from the cauda epididymis. This contradicts the previous reports of TCP11 in mouse; however, I showed that Protein Kinase A signaling (a downstream target of cAMP) is reduced in the absence of TCP11, which is consistent with previous reports. Analysis of *Tcp11l3* is still ongoing; however, Tcp11l3 is not required for male fertility.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計6件（うち査読付論文　6件／うち国際共著　5件／うちオープンアクセス　6件）

１．著者名 Castaneda Julio M、Miyata Haruhiko、Archambeault Denise R、Satouh Yuhkoh、Yu Zhifeng、Ikawa Masahito、Matzuk Martin M	４．巻 102
２．論文標題 Mouse t-complex protein 11 is important for progressive motility in sperm	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Biology of Reproduction	６．最初と最後の頁 852～862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioz226	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 Oji Asami、Isotani Ayako、Fujihara Yoshitaka、Castaneda Julio M、Oura Seiya、Ikawa Masahito	４．巻 102
２．論文標題 Tesmin, Metallothionein-Like 5, is Required for Spermatogenesis in Mice	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Biology of Reproduction	６．最初と最後の頁 975～983
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioaa002	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 Sun Jiang、Lu Yonggang、Nozawa Kaori、Xu Zoulan、Morohoshi Akane、Castaneda Julio M、Noda Taichi、Miyata Haruhiko、Abbasi Ferheen、Shawki Hossam H、Takahashi Satoru、Devlin Darius J、Yu Zhifeng、Matzuk Ryan M、Garcia Thomas X、Matzuk Martin M、Ikawa Masahito	４．巻 103
２．論文標題 CRISPR/Cas9-based genome editing in mice uncovers 13 testis- or epididymis-enriched genes individually dispensable for male reproduction	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Biology of Reproduction	６．最初と最後の頁 183～194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioaa083	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 Xu Zoulan、Miyata Haruhiko、Kaneda Yuki、Castaneda Julio M、Lu Yonggang、Morohoshi Akane、Yu Zhifeng、Matzuk Martin M、Ikawa Masahito	４．巻 103
２．論文標題 CIB4 is essential for the haploid phase of spermatogenesis in mice	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Biology of Reproduction	６．最初と最後の頁 235～243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioaa059	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 Oura Seiya、Kazi Samina、Savolainen Audrey、Nozawa Kaori、Castaneda Julio、Yu Zhifeng、Miyata Haruhiko、Matzuk Ryan M.、Hansen Jan N.、Wachten Dagmar、Matzuk Martin M.、Prunskaite-Hyyrylainen Renata	4．巻 16
2．論文標題 Cfap97d1 is important for flagellar axoneme maintenance and male mouse fertility	5．発行年 2020年
3．雑誌名 PLOS Genetics	6．最初と最後の頁 1-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1008954	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 Castaneda Julio M.、Shimada Keisuke、Satouh Yuhkoh、Yu Zhifeng、Devlin Darius J.、Ikawa Masahito、Matzuk Martin M.	4．巻 134
2．論文標題 FAM209 associates with DPY19L2, and is required for sperm acrosome biogenesis and fertility in mice	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Journal of Cell Science	6．最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.259206	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

〔学会発表〕　計0件

〔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