

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月13日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22688022

研究課題名（和文）

精子形成に関わるオートファジー（自食作用）の新たな生理機能の解析

研究課題名（英文）

Functional analysis of autophagy during spermatogenesis in mice

研究代表者

塚本 智史 (TSUKAMOTO SATOSHI)

独立行政法人 放射線医学総合研究所・研究基盤センター・技術員

研究者番号：80510693

研究成果の概要（和文）：

オートファジーはリソソームを分解の場とする細胞質成分の大規模な分解系である。本研究ではオートファジーの精子形成過程における生理機能を明らかにするために、精子細胞特異的にオートファジーを欠損するノックアウトマウスを作出した。このマウスは週齢依存的に不妊になることが分かった。さらにこのノックアウトマウスの精細管にはタンパク質の凝集体を含む不要成分の蓄積が観察された。オートファジーは精子形成過程における精子細胞質のリモデリングに参与する可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：Autophagy is a bulk degradation system in which the cytoplasmic contents engulfed by autophagosomes are degraded in the lysosomes. Although autophagy is conserved among diverse species, the function of autophagy in male germ cells is poorly understood. In this study, we found that autophagy is highly induced during haploid male germ cell differentiation. To investigate whether autophagy functions during spermatogenesis, we generated male germ cell-specific autophagy knockout mice. These mice showed age-dependent infertility, reduced testis size, and low numbers of mature sperm with morphological abnormalities. Furthermore, we revealed that abnormal structures that contained residual sperm cytoplasm and protein aggregates accumulated in autophagy knockout testes. Our results indicate that autophagy could be essential for proper cytoplasmic remodeling during late step of spermatogenesis (spermiogenesis) in mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学 獣医学・応用動物科学

キーワード：オートファジー、精巣、精子形成

1. 研究開始当初の背景

細胞内で起こる分解はユビキチン・プロテアソームとオートファジーの経路に大きく分

類される。ユビキチン・プロテアソームは選択性が高い分解系であるのに対し、オートファジーはリソソームを介した細胞質成分の

大規模な分解系である。オートファジーは隔離膜と呼ばれる二重の膜で取り囲んだ細胞質成分をまとめて分解するため選択性はあまりない。近年の研究によって、オートファジーは栄養状態が悪化した際（飢餓時）などの栄養供給と恒常的な細胞内浄化（異常なタンパク質や老廃物の蓄積防止）に関与することが明らかになっている。一方で、ほ乳動物の発生・分化におけるオートファジーの役割についてはあまり知られていなかった。特に、精子形成過程におけるオートファジーの役割については全く分かっていなかった。精子は精巣内の精細管で生産されるが、その過程で細胞の形態は極めてダイナミックに変化する。特に精子形成の後期（精子完成・変態と呼ばれる）過程では、細胞様から精子様の形態へと急速に変化する。この過程では、後述するように様々な変化が生じるが、特に精子細胞からの余分な細胞質の除去にバルクな分解系が関与していると考えられた。またオートファジーによって精子形成に必要な栄養が供給され、精子細胞の品質維持にもオートファジーが関与している可能性も考えられたため、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

精子完成（変態）過程では、精子頭部への先体の形成、尾部へのミトコンドリアの再配置、べん毛の伸長そして余分な細胞質が除去され、精子は結果的に非常にユニークな構造となる。この一連のプロセスは急速に進行することから、細胞質成分の大規模な分解系であるオートファジーが関与している可能性が高いと考えられた。そこで本研究では、精子形成過程（特に精子完成過程）におけるオートファジーの生理学的役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) オートファジーの誘導状況の観察

精子形成のどの段階でオートファジーが起こるのかを検出するために全身のオートファゴソームが GFP（緑色蛍光タンパク質）で標識される GFP-LC3 マウスから週齢ごとに精巣を回収し切片を作製する。評価は蛍光顕微鏡を用いた GFP ドット（オートファゴソーム）の定量的解析とオートファゴソーム数に相関する膜結合型の LC3 タンパク質の量をウェスタンブロッティングによって解析することによる。また電子顕微鏡を用いた観察によってオートファゴソームなどオートファジーに関わる構造体の観察を行う。

(2) 精子細胞特異的オートファジー欠損マウスの作出と表現型解析

精子形成過程におけるオートファジーの生理機能を解析するために、精子細胞特異的に

オートファジーを欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作出する。このノックアウトマウスを使って週齢ごとに精巣と精巣上体の切片を作成し病理学的な解析を行う。成熟精子が回収できる場合には、精子濃度や運動性の評価、さらには自然交配や体外受精による受精能の評価を行う。また、加齢による影響も考慮するために長期的な交配実験も実施して産仔数のカウントを行う。

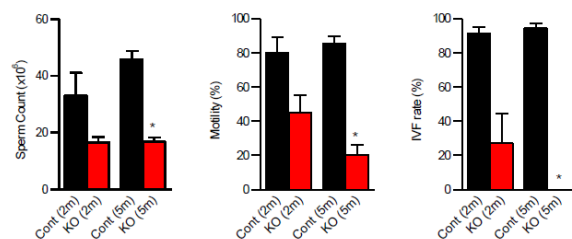
(3) オートファジー不全が精巣タンパク質の発現に及ぼす影響の解析

オートファジー不全が精子形成に与える影響をタンパク質レベルで網羅的に解析するために、(2) で作出したノックアウトマウスの精巣や精子から全タンパク質を抽出し二次元電気泳動によって発現に差のあるタンパク質を検出し同定する。また、精子形成過程の各時期の精細胞を分離して同様にタンパク質の発現比較を行う。

4. 研究成果

(1) GFP-LC3 マウスを使った解析から、当初の予想通り精子完成過程でオートファジーが誘導されることが明らかとなった。減数分裂期の精子細胞ではオートファジー誘導は観察されなかったことから、精子完成過程において特異的な機能を持つ可能性が示唆された。

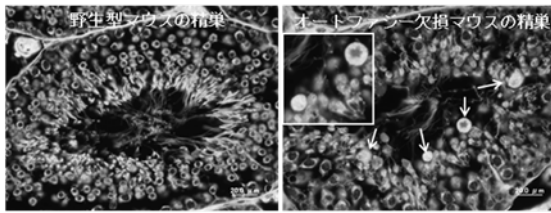
(2) 精子細胞特異的にオートファジーを欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作出した。このノックアウトマウスと野生型のメスマウスを同居させて繁殖性を検討したところ、15週齢頃から不妊傾向を示すことが明らかとなった。また、週齢依存的に精子数が減少し、精子運動性や受精能も低下することが明らかとなった（図1）。



(図1) 左から精子数、精子運動率、受精率の2ヶ月齢と5ヶ月齢の変化を示す。同じ週齢の正常マウス (Cont) と比較するとノックアウトマウス (KO) では2ヶ月齢で観察された差が5ヶ月齢ではより顕著になる。精子細胞特異的なオートファジーの欠損が週齢依存的に影響を与えることを示している。

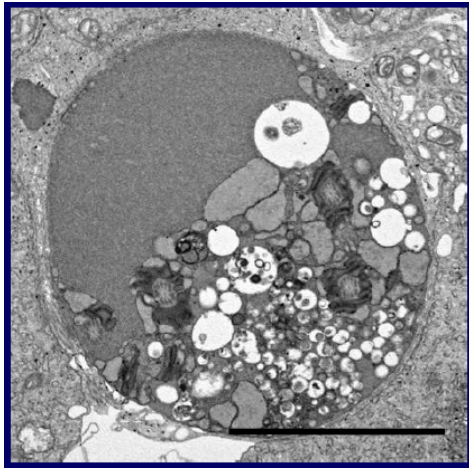
(3) 精巣切片を用いた病理学的な解析から、ノックアウトマウス由来の精細管には多数

の異常構造体の蓄積が観察された (図2)。



(図2) 野生型マウスの精細管 (左) と比較するとノックアウトマウスの精細管 (右) の内腔側には異常構造体が複数観察される。

(4) 電子顕微鏡を用いた解析によって異常構造体には複数の精子細胞中の構造体が観察された。さらには多量のRNAや脂質にも富むことが明らかとなった (図3)。



(図3) 精子細胞特異的にオートファジーを欠損したマウスの精細管に観察される異常構造体の電子顕微鏡像を示す。精子細胞中の構造体 (精子核やべん毛)、脂質やRNAに富む構造から構成される。スケールバーは5 μm。

(5) 精巣全タンパク質の二次元電気泳動解析を中心に、オートファジーの欠損が精巣機能に及ぼす影響について多面的に検討した。その結果、精原細胞や精子細胞までの増殖や分化過程に及ぼす影響は少ないことが分かった。オートファジーを欠損した精巣のサイズは同週齢のマウスの精巣よりも一回り以上小さいことを考えると予想外の結果であったが、アポトーシスによる細胞死も観察できなかったことから、オートファジーは精子形成の初期には影響せず、減数分裂完了以降の精子完成過程で起こる細胞質の分解や細胞質のリモデリングに関与している可能性が推察された。

(6) (5) の結果をさらに検討するために、酵素処理とBSA密度勾配法を組み合わせた方

法によって、精巣からそれぞれのステージの精細胞を分離して、分離した細胞ごとにオートファジー不全が及ぼす影響を調べた。その結果、(5) で得られた結果と関連して、精子幹細胞や精母細胞の機能は正常だが、精子細胞以降の分化過程においてオートファジー欠損の影響があらわれることが明らかとなった。次に精巣や精子タンパク質を使って二次元タンパク質発現解析を実施した。その結果、ミトコンドリア機能に関連するタンパク質がオートファジー欠損下で顕著に差が見られた。現時点ではこれらのタンパク質の発現異常と精子完成過程におけるオートファジーの生理機能の関連性は説明出来ないが、精子完成過程におけるミトコンドリアの品質管理にもオートファジーが関わっている可能性を示唆しているかもしれない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Tsukamoto S, Hara T, Yamamoto A, Ohta Y, Wada A, Ishida Y, Kito S, Nishikawa T, Minami N, Sato k, Kokubo T, Functional analysis of lysosomes during mouse preimplantation embryo development, J Reprod Dev, 2013, 59(1), 33-39, DOI: 10.1262/jrd.2012-096

② Ishida M, Okazaki E, Tsukamoto S, Kimura K, Aizawa A, Kito S, Imai H, Minami N, The promoter of the oocyte-specific gene, Oog1, functions in both male and female meiotic germ cells in transgenic mice, Plos One (in press), DOI: 10.1371/journal.pone.0068686

[学会発表] (計3件)

① 塚本 智史、マウス胚発生におけるオートファジー (自食作用) の役割、北陸実験動物研究会 (招待講演)、平成24年4月28日、金沢市

② 塚本 智史、精子完成過程におけるオートファジーの生理機能の解析、日本繁殖生物学会 (口答発表)、平成23年9月15-17日、盛岡市

③ Satoshi Tsukamoto, The Role of autophagy during embryogenesis and spermatogenesis in mice, 日本発生生物学会 (招待講演)、平成22年7月23日、京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 智史 (TSUKAMOTO SATOSHI)
独立行政法人放射線医学総合研究所・研究
基盤センター・技術員
研究者番号：80510693

(2) 連携研究者

南 直治郎 (MINAMI NAOJIRO)
京都大学 農学研究科・准教授
研究者番号：30212236