

総 説

ショウジョウバエの分子遺伝学を用いた精子形成の研究

野口立彦

防医大誌 (2023) 48 (1) : 1 - 9

要旨: ヒト男性不妊は世界的な増加傾向を示し、社会問題となっている。精子形成は始原生殖細胞分化から受精可能な精子の完成まで、長く複雑な過程を経る。それ故に、不妊の遺伝因子は多岐に渡り、全容解明には長い道のりが予想される。精子形成の共通性を見極めながら、ショウジョウバエの分子遺伝学を上手に活用することは、ヒト男性不妊の遺伝因子解明を加速させる一手段であると考えられる。

索引用語: キイロショウジョウバエ / 精子形成 / 男性不妊因子

緒 言

近年のWHOの調査は、世界で子供を授かろうとする男女カップルの約9%は何某かの不妊の問題を抱えており、その50%は男性側に原因があると報告している¹⁾。日本では晩婚化など社会変化に伴い、不妊に悩むカップルを支援するための生殖補助医療の体制は大きく発展し、IVF等の生殖補助医療の助けをかりて生まれる子供の割合は年々増加している。柳町博士のハムスターを用いたin vitroでの受精実験成功をきっかけに、エドワーズ博士らによる試験管ベビー誕生へとつながり、近年では自力では受精ができない精子でも、精子頭部を直接卵子に注射する顕微受精技術ICSIにより妊娠・出産を期待できるようになった。また、無精子症患者の精巣・精巣上体から手術によって精子を採取するTESEやMESAなどの方法が発達し、減数分裂をおえた円形精子などの未成熟精子を使用(ROSI)した治療が可能となっている²⁾。さらに近年ではES細胞やiPS細胞を利用して、in vitroで精子と卵子を作成がマウスなどのモデル動物では可能となりつつある^{3, 4)}。

生殖補助技術が発展する一方で、受精に使用する精子の質をどう担保するかが重要課題として残っている。未成熟の精子の中から健康な精子を選抜するため様々な新しい選抜方法が考案

されている⁵⁾。しかし、男性の遺伝子変異に起因する精子形成の不備が胚発生に影響し子に障害をもたらす可能性はゼロではないし⁶⁾、不妊の変異が次世代に伝わることも前提とすべきである。不妊の原因を特定し、診断することができなければ、このような問題は最終的には解決されないと考えられる。

現在でも男性不妊の30%は原因がわからない突発性の不妊症とされる¹⁾。精路非閉塞性の造精機能障害の遺伝因子が明らかになっているのは約20%に過ぎず、クラインフェルター症候群のような染色体異常と、Y染色体のAZF領域の小欠損などに限られている。

以上のような事情から、多様な不妊に関連する遺伝子とその機能や表現型に関するデータの蓄積は、今後も重要な研究テーマであり続けると考える。本稿では、ヒトの造精機能障害、精子の機能や精子形成の複雑なプロセス、そして、不妊関連遺伝子の機能解析におけるモデル生物(キイロショウジョウバエ)の果たすべき役割とその可能性について概説することとしたい。

1. 男性不妊について

男性不妊の要因は、生活環境の問題と遺伝的問題とに大別される。WHOは、男性不妊の世界的増加傾向と肥満の増加との関連の可能性を

報告している。また、ストレスや炎症などによる障害、ホルモン異常や精路閉塞症など、造精機能以外の原因も多い。これらに対し、精路非閉塞性の造精機能障害は以下に分類される。

乏精子症・無精子症：精路が非閉塞でも精液中の精子が極端に少ない、あるいは認められない場合。先天性造精機能障害には、精巣組織の観察で精細管内に完成した精子が見つけれないもの、生殖細胞を欠損するもの、精母細胞など特定の分化ステージの細胞のみが見られるものなど様々なケースがある。

奇形精子症：精子数は比較的多いが、精子形態異常と判断できる場合。頭部の形態に変形、核内空胞、鞭毛の異常な屈曲、精子の変形が起こらない円形精子などが知られている。精子核の染色体DNAの断片化の程度を精子の質の指標とする研究も進んでいる⁷⁾。

精子無力症：運動性を欠く、あるいは著しく低い運動活性を示すもの。原因としては、鞭毛のモータータンパク質や構造タンパク質の変異による鞭毛軸系の運動性の欠如、あるいは運動活性化調節不全の両方が考えられる。

受精能の欠如：一見形態や運動性は正常だが受精が起こらない場合。卵と接触しても受精反応が起こらない場合や、受精に伴う発生の機構の活性化が起こらないものなどが該当する。

胚発生に問題が起こるもの：減数分裂での染色体不分離が原因となる染色体異数性や、染色体異常は発生異常、及び流産の原因となる。また、生殖細胞分化過程でのエピジェネティックリプログラミングと、精子形成過程でのゲノムインプリンティングの不全は胚発生異常を引き起こす。その代表例として、Angelman症候群、Beckwith-Wiedemann症候群などが知られている。上記のTESEやROSNIなどの生殖補助技術によって得られた精子については、ゲノムインプリンティングの状態について受精率や発生率の低さから一部懸念が表明されている²⁾。

2. ヒト精子形成異常に関わる遺伝因子について

造精機能障害の無精子症の25%は、性染色体に異数性を示すクラインフェルター症候群などの染色体異常と、Y染色体上にあるAZF (azoospermia factor) 領域の小欠損が遺伝因子

であると報告されている¹⁾。クラインフェルター症候群の患者では、円形精子が精細管内に少数しか確認されないなど、一般に精子形成に問題を抱える。また、染色体異常は減数分裂での相同染色体の対合の障害となり、精子形成が完了しない。

乏精子症の5~10%、無精子症の10~15%の患者に見られるAZF領域の小欠損については、領域内の原因遺伝子の同定も進んでいる。(例えば生殖細胞の分化に関わるDBY遺伝子領域が欠損した場合、生殖細胞が欠如して精細管内はセルトリ細胞のみとなる。)

繊毛病は体内の様々な器官に存在する繊毛の形成と機能に異常が生じ、広範な体機能に障害が見られる遺伝病である。運動性繊毛の軸糸構造や運動を駆動する因子の変異により、気管繊毛などが運動性を失うほか、身体の左右性のランダム化など症状は多岐にわたる。そして鞭毛軸糸を共有する精子も運動性を示さない^{8, 9)}。繊毛症では既に185の遺伝子が原因遺伝子として確定しており、さらに241の候補遺伝子が存在している。これらには繊毛や鞭毛の運動構造である鞭毛軸糸の9+2構造を形成する因子、IFT (intra-flagellar transport) に関わる因子、多様なシグナル伝達に関わる因子が含まれる。

別の例として、大脳皮質の発生異常を示す滑脳症 (lissencephaly) でも精子形成に異常がみとめられることが報告された^{10, 11)}。滑脳症の原因遺伝子LISIは、中心体から伸びる微小管と、神経細胞核の核膜との結合を仲介する因子である。同様の核膜と微小管との結合を必要とする精子形成にも異常が見られる。

現状では、男性不妊の30%はまだ原因を説明できない突発性の不妊症と診断されるが、未解明の遺伝因子がかなりの部分を占めると予想される。近年この状況を打破する研究の流れとして、精巣、あるいは精子のオミックス解析が盛んに行われ、男性不妊の遺伝因子研究への活用が期待されている¹²⁾。精子形成に関連する遺伝子数は5000を超え、ヒトの全遺伝子の25%程度であるとの見積りもある。一方で、これらの候補因子と、その変異がもたらす障害を結びつけるため地道な研究は男性不妊の理解には欠かせない。

3. 精子形成過程

精子形成は、発生初期の生殖細胞の分化に始まり、精巣上で成熟精子の完成まで、長く複雑な過程である。重要なポイントを次に示す。
生殖細胞の分化：始原生殖細胞はできたばかりの未分化生殖腺へ移動し、支持細胞であるセルトリ細胞からの働きかけで精祖細胞へと分化する。精祖細胞は精細管の幹細胞ニッチ（哺乳類では精細管基底膜側）で生殖幹細胞として機能するようになる。

減数分裂：減数分裂は、2倍体細胞が持つ2組の相同染色体セットを分配して1セットに半減させる分裂である。相同染色体同士の対合や組換えなど体細胞分裂には見られない過程を含み緻密で長い時間がかかる。それ故に多くの特有の因子が働き、間違いも起こしやすい。不妊因子でも減数分裂の不全によるものの割合は大きいと考えられる。

精子変形：減数分裂後の円形精子細胞が細胞内構造の大幅な作り換えにより、精子特有の形態へと変形する。これには、先体胞の形成、核染色体の凝縮と核の形態形成、中心体のbasal bodyへの分化、鞭毛軸系伸長、ミトコンドリアの分化、細胞質除去、細胞膜リン脂質成分の入れ換えなどが含まれ、どれも精子特異的な過程である。精細管で作られた精子は、精巣上で送られ精巣上で成熟を起す。

4. 受精過程における精子の働き

精子という細胞の形態と機能：精子の細胞構造は合目的で無駄がない。精子の頭部から、先体（受精装置）、核（遺伝物質）、basal bodyから鞭毛軸系（モータースクリュー）が伸び、鞭毛の基部にはミトコンドリア（エネルギー供給装置）が位置している。鞭毛は卵から放出される刺激物質などに応答し、運動パターンを変化させる制御機構を備える。そして、不必要な細胞

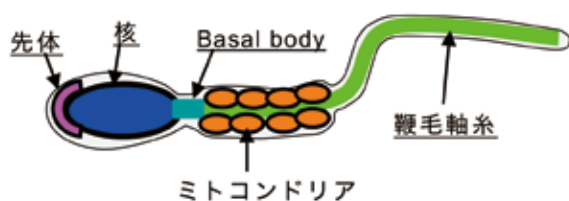


図1. 精子の基本形

質は殆ど排除され形態がスリム化されている。この形態は広く種を越えて保存され「精子の基本形」とよばれる（図1）。

受精における精子の変化と働き：雌性生殖路に放出された精子は、僅かな誘因物質を頼りに卵に向かって遊泳する。卵付近に到達すると先体反応を起こし、放出された酵素が卵周囲の構造を壊して、精子は卵表に到達する。卵表に接した時点で、同種か否か（生物種によっては自己か非自己か）を識別した上で卵と細胞融合する。精子の頭部は卵表層に飲み込まれ、遺伝物質と中心体が卵内に送り込まれる。また、精子の侵入をきっかけに卵内のカルシウムイオン濃度の上昇が起こり、多精拒否に加えて、細胞周期の再開などの発生現象のトリガーとしての役割を果たす。このように受精で発揮される精子の機能は多岐に渡り、精子の分化に関連する遺伝子数が非常に多いことをよく説明する。

精子変形は他の細胞種では見られない精子独特の過程が多く、研究が遅れている分野であるが、今後の研究の進展が望まれる。ここからは、精子頭部とミトコンドリアの分化に注目して、最近の研究の進展を解説する。生殖幹細胞の分化、減数分裂、鞭毛形成など、他にも大きな研究分野を形成しているトピックはあるものの、多くの総説等があるため、本稿では割愛する。

5. 精子頭部の分化と形態変化

では、精子変形における精子頭部の変化を、核を中心に見ていく。

精子変形で最初に起こるのは、受精に必要な各種分解酵素を内包する先体胞の形成である。先体胞はゴルジ装置とエンドソームに由来し、核膜の前方に広がって結合する¹³⁾。これらの小胞の核表面への集合には細胞骨格が必要である¹⁴⁾。興味深いことに、ゴルジ装置は通常核側がシス面、細胞膜側がトランス面とされるが、先体胞形成では微小管細胞骨格の働きでゴルジ装置の向きが反転することが知られている¹³⁾。先体胞と核膜の結合には、アクチン繊維と中間径フィラメントのlamin A/Cが関わっている^{15,16)}が、詳細なメカニズムは不明である。

さて、減数第一分裂の相同染色体対合に先立ち、染色体両端のテロメア領域が核膜にアン

カーされ、核膜の特定領域に集合する。このテロメアの集合には細胞質側の微小管と、核膜を裏打ちする中間径フィラメントのlaminC2が関わるが、核内と核外をつないでいるのはSUN1-KASH5で構成されるLINC複合体である¹⁷⁾。そして、細胞骨格とLINC複合体は、精子核の形態形成にも重要な役割を果たす。精子核前方には先体胞が形成され、後方には微小管が整列したmanchetteが形成される。そしてbasal bodyが核表面後方の極部分に結合する。この先体胞とmanchetteの核膜への結合維持にはLINC複合体が働いていると考えられている¹⁴⁾。

体細胞の組織では繊毛基部を形成するbasal bodyは細胞膜に結合し、細胞表面から繊毛構造が伸長する。これに対して、精子の場合は中心体由来のbasal bodyの前方は精子核と結合し、後方は細胞膜と結合し鞭毛伸長の鋳型となる。精子核表面とbasal bodyとの結合維持にも異なるLINC複合体が関わっていることが示唆されている¹⁸⁾。ただし、basal bodyと核膜の結合が形成される際、basal bodyと結合した細胞膜は細胞の内部に向けて深く湾曲して入り込むため、細胞骨格を利用した積極的な細胞膜の変化が示唆されるが、そのメカニズムは不明である。もう一つ大事な問題は、先体胞の反対側の核膜表面にbasal bodyの結合を局限する要因である。つまり、細胞膜側にある極性、あるいは核表面に形成される極性が、精子頭部の先端から、先体胞、精子核、鞭毛基部の順に細胞内構造の配列を決定し、精子の基本形を作る要因となる。

精子の核形態形成には細胞骨格が必須であることが示唆されている。これは哺乳類の場合は核周囲に形成されるmanchetteと呼ばれる微小管配向の形成を理由にしているが、manchetteの核の形態変化への力学的寄与は不明である。また、近接するセルトリ細胞も形状を規定する可能性があり、結論が定まっていない¹⁴⁾。

精子核の染色体は高度に凝集しパッキングされ、種特有の形状に加工される。この変化はDNAへのダメージを防ぎ、遊泳時の抵抗を減らし、鞭毛を含む精子全体の剛性をあげる。精巣では精巣特異的なヒストンタンパク質(H1T2、

TH2A, TH2B, H3T, H4)が染色体のクロマチン構造を形成しているが、精子核が凝集する段階では、まず塩基性の移行タンパク質(TNP1, TNP2)に交換される。TNP1とTNP2では役割が異なり、より緩やかにDNAに結合するTNP1はヒストンの排除に働き、より凝縮したDNAに親和性を示すTNP2はDNAを凝集させ、次のプロタミンへの交換を可能にしていると推測されている¹⁹⁾。そして塩基性のプロタミンへと更に交換され、染色体DNAのパッケージングが完成する。凝縮した染色体DNAは、ヒストンを作るクロマチン構造に比較して最大20倍の凝集率になると考えられている。

さて、核成分の生化学的解析とプロテオミクス解析より、精巣特異的なヒストンタンパク質群の多様な翻訳後修飾が明らかになっている。この化学修飾は、プロタミンへの交換促進、遺伝子の転写調節、エピジェネティックな修飾という3つの役割が想定され¹⁹⁾、①タンパク質交換を促進するリン酸化、②アセチル化、③ユビキチン化、④メチル化、⑤ポリADPリボシル化などの種類がある。④のH3のメチル化は、H4のアセチル化領域とオーバーラップし、プロタミンへの移行を促進すると同時に、ヘテロクロマチン形成とエピジェネティックな制御への関与が示唆されている。リン酸化、アセチル化、ユビキチン化の修飾に関与する精巣特異的酵素遺伝子の欠損マウスでは、核形態異常が認められる²⁰⁻²³⁾。また、アセチル化ヒストンに結合するBRDTの変異体マウスでも、精子核の異常形態が報告されている²⁴⁾。

この分野の発展はオミックス解析と変異体解析に頼る部分が多い。ヒストンからプロタミンまでに見られる多様な化学修飾とその組み合わせの意味、エピジェネティックな修飾と精子形成過程、あるいは胚発生での遺伝子発現制御との関係、ヒストン修飾からプロタミン修飾への情報の受け渡しの機構、また、ChIPアッセイを利用した標的遺伝子群の特定など⁶⁾、未解明な部分が多く残されている。更に、新規の化学修飾は複数存在すると考えられており、全容の解明には多くの進展が必要と考えられる。

6. 精子形成過程でのミトコンドリアの分化

ミトコンドリアの機能不全が男性不妊に関わることは1990年代より、様々な証拠が示されてきた²⁵⁾。電子顕微鏡観察により、精子形成過程においてミトコンドリアの形態が目まぐるしく変化することも報告されている²⁶⁾。また、ミトコンドリア関連遺伝子を欠損したマウスの表現型解析により、その役割は予想を超えて多岐にわたることが示された^{25, 27)}。更に、必要とされるATPが細胞質で起こる解糖系から供給されるのか、ミトコンドリアによる酸化的リン酸化により供給されるのかについても、精子形成過程の段階により異なるため、詳細な研究が進んでいる。

胚性幹細胞の段階から起こるエピジェネティックなDNAの化学修飾に必要な補酵素は、ミトコンドリアのクエン酸回路の代謝産物から供給されることが報告されている。アセチルCoAはヒストンアセチル化のためのアセチル基を供給し、 α -ケトグルタル酸はヒストン脱メチル化酵素の補酵素として供給される²⁸⁾。よって、この時期に生殖幹細胞でミトコンドリアの活性は高く維持されていると考えられている。

雄性の生殖細胞内には、電子密度の高く境界のはっきりしないgerm line granuleがミトコンドリアに近接して存在し、ミトコンドリアセメント（あるいはpi-body）と呼ばれる。ミトコンドリアセメントではsmall ncRNAの一種であるpiRNAの合成が行われている。減数分裂パキテン期以前のpiRNAは核内でのトランスポゾンの発現を抑え、生殖細胞のゲノムDNAの安定性に関わる。一方、パキテン期以降から円形精子の時期に発現するpiRNAは分子種が実に多様であり、各piRNA分子の働きについての解析が現在進行中である。

哺乳類の精祖細胞では解糖系が主なATP供給の役割を果たす。この時期の炭素源は精細管周囲の毛細血管から供給されるグルコースであり、細胞内では解糖系に関わる酵素が高発現している。これに対し、精巢の精細管の血液精巢関門より内腔側に位置する精母細胞内では、ミトコンドリアが発達し内部のクリステが伸展して酸化的リン酸化の活性が上昇する。精母細胞では、DNA複製、相同染色体の対合、組み換

えとDNA修復など、ATPを大量に消費する機構が次々と稼働するためであると考えられている。興味深いことに、この時の炭素源はグルコースではなく精細管基底側の解糖系から供給されるピルビン酸が変化した酪酸であり、これが再びピルビン酸に変換されてクエン酸回路を動かし酸化的リン酸化に利用される。続く1倍体円形精子細胞ではミトコンドリアの形態は小型化して再び解糖系依存的になる。精子変形の過程において、ミトコンドリアは劇的な変化を示す。通常みられる分裂・融合サイクルは停止し、伸長して中片部で鞭毛軸系を取り囲むように螺旋を巻きバックされる。精子が運動性を獲得してから受精に至るまでのATP供給を解糖系が行うのか、酸化的リン酸化が行うのかは長く議論が定まらなかった。近年では解糖系のみでも精子は生存できるが、運動活性の主なATP供給源は中片部のミトコンドリアが行う酸化的リン酸化であり、部分的には鞭毛尾部の解糖系が担っているという解釈に落ち着きつつある²⁹⁾。また、中片部にミトコンドリアが集合し螺旋形にバックされる機構は、その周囲を螺旋形のアクチン繊維束が取り囲むこと以外は不明である。不思議なことに精子中片部に含まれるミトコンドリアの個数は哺乳類の種間で異なり、それぞれ正確に決まっているが、その制御メカニズムは不明である。

精子形成過程でのミトコンドリアの分化と形態形成、piRNA合成での働き、解糖系と酸化的リン酸化の切り替え制御、精子の運動のためのシグナル伝達経路と酸化的リン酸化の活性調節の繋がりなど、今後のさらなる進展が望まれる興味深い研究トピックスが満載である。

7. キイロショウジョウバエの精子形成

精細管を持つ哺乳類とは精巢の形態は大きく異なるが、ショウジョウバエの精子形成の基本的プロセスは哺乳類と共通している。精巢は細長く、生殖幹細胞は遠位先端の幹細胞ニッチに位置する。精巢内には生殖系列の細胞と、哺乳類のセルトリ細胞に該当する体細胞系列のシスト細胞の2種類の細胞が存在する。生殖幹細胞より分裂して生じた精原細胞は直ちに2つのシスト細胞に取り囲まれてシストを形成する。以

降の分化過程はシスト単位で進行し、分化段階が進むにつれて精巣の基底側（出口付近）に移動する。さて、精原細胞は4回の分裂で16個の第一精母細胞となった後、減数分裂を経て64個の精細胞になる。減数分裂後の精細胞は変形を起こし、先体胞形成、精子核の変形と染色体の凝集、ミトコンドリアの分化、鞭毛形成、細胞質の排除など、哺乳類と基本的には同じ過程を経て精子が完成する。精子の形態形成が完了すると、64本の精子がシスト単位で精巣から排出されて雄の貯精囊に入る。

8. 精子研究ツールとしてのショウジョウバエ分子遺伝学

ショウジョウバエゲノムの約14000の遺伝子のうち、63%の遺伝子はヒトのオルソログ遺伝子であり、現在もヒトの疾患モデルとして関連遺伝子探索などに多用されている。ショウジョウバエの遺伝学を利用し、大規模な雄不妊変異体のスクリーニングが行われ、2000を超える雄不妊変異体が作成されてきた^{30,31)}。概算で精子形成の必須遺伝子数は必須遺伝子全体の20%を超えると推測されている。その後、RNAiを組織特異的に発現させるノックダウン実験が盛んになったことを受け、全遺伝子に対するRNAi発現システムの作成が進められ、効率の優劣はあるにせよ、全遺伝子に対するRNAiシステムが提供されるようになった。さらに、CRISPR/Cas9系を利用しノックアウトしたい遺伝子のガイドRNA発現システムの作成と供与のサービスが提供されている³²⁾。

このような分子遺伝学ツールに加えて、精巣と精子プロテオーム解析の報告が続き^{33,34)}、6000を超えるタンパク質の発現が報告されている。また、組織ごと、あるいは発生段階ごとのオミックス解析データベースも公開されている^{35,36)}。更に近年ショウジョウバエの258種類の細胞についてのシングルセルRNA-seqの解析の情報が公開された³⁷⁾。

ショウジョウバエをヒトの男性不妊の理解に利用する利点は明確である。精子形成で発現する遺伝子群・タンパク質群の詳細な検討が進み、ノックアウト系統、ノックダウン系統はリソースからの供給があることは上述の通りである。これらを活用しオミックスデータと遺伝子機

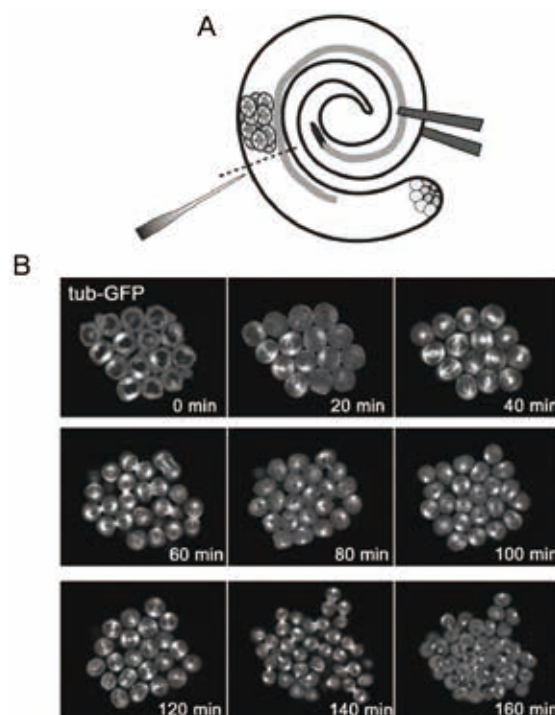


図2.

A. 細長い精巣の中央部を切り減数分裂中のシストを摘出する。

B. GFP-tubulin を発現した精母細胞の減数分裂の様子

能・表現型を紐づけていくことが最大の貢献であると考えられる。その上で、工夫する点が2つあると考える。1点目は変異系統の表現型の解析手法の充実である。解析方法としては、蛍光免疫染色や電子顕微鏡のような基本的な手法に組み合わせて、精子形成の分化段階に応じたシストの初代培養による、詳細な細胞生物学的解析技術の開発と改善がある。ショウジョウバエの精巣は細長く、顕微鏡下で分化段階の異なるシストを取り出しライブ観察することが可能である（図2）。今後さらに改良を重ねることを検討している。2点目は、哺乳類とショウジョウバエの精子形成過程の共通性を見極めであると考える。精子の構造と形成過程は基本的には共通する部分が多いが、異なる部分もある。例えば、ヒストンからプロタミンへの置き換えや、piRNAトランスポゾン抑制機構は動物種間で良く保存されている。一方、鞭毛軸糸形成は、ショウジョウバエでは哺乳類と異なり、IFTを必要としない。

ではここから、筆者の精子形成研究の取り組みを以下に簡単に紹介したい。

• 精子核周辺に形成される微小管細胞骨格の働き

精子頭部では、basal bodyから伸びる微小管がLis1 / ダイニンを介して核膜と結合し核の局在が維持される (図3)。しかし、この前段階にbasal bodyが核後部極に移動し局在するメカニズムは不明である。Basal bodyから伸びる微小管とは独立に精子核膜表面に出現する微小管束によって精子核は細長く変形するが、その重合・形成のメカニズムは不明である。更に、核変形微小管束が消失しかけると、染色体凝集の起点になる予想されている別の一層の微小管配向が核周囲を覆うようになる。微小管重合因子、basal bodyを欠損する中心体関連因子、核膜と微小管を連結するLINC複合体などの変異体の表現型解析を通して精子頭部の細胞内構造の形成と微小管細胞骨格の役割を明らかにする。

• 精子基本形を生み出す精子頭部内の細胞内構造の配列

精子頭部内の細胞小器官の配列は、核を挟んで先体胞とbasal bodyが両極に位置することで成立する。ショウジョウバエの場合も哺乳類同様、先体胞とLINC複合体の局在は相互排除の関係になっている。これは中心体を欠損する変異体でも変化しない。核膜上の因子の不均等な局在が細胞全体の極性と配置を決定することを示唆しており、細胞膜の極性因子の不均等配置

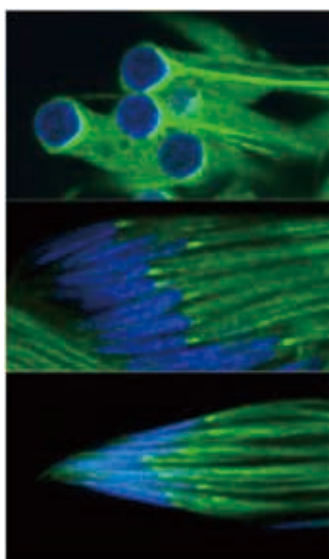


図3. ショウジョウバエ精子核の分化
球形の核が細長く伸長した後、染色体の凝集により細く変形する。

によって決定するこれまでの細胞極性とは異なる機構であることが予想される。

• 精子の運動性制御の分子メカニズム

水生動物精子の生化学と運動解析等の先行研究によりダイニンを介した大まかな運動制御機構が示され、上述の精子オミックス解析やヒト遺伝病の情報から研究は大きく広がりつつある。しかし、この分野でのショウジョウバエの貢献は非常に少ない。哺乳類などの体内受精を行う動物の雌性生殖路では、誘引物質への反応や卵周辺での超活性化など、雌側からの働きかけにより精子の運動活性は変化するが、そのシグナル伝達経路や鞭毛構造との関連は研究課題として残っている。多くの野生動物は交尾後に一度メスの貯精囊に精子を保管し、環境が整った時に精子を再活性化して受精を行う。これはショウジョウバエでも同様である。そこで筆者は以下のようなスクリーニングを行い、ショウジョウバエでもシグナル経路が明らかに2つあることを示唆する結果を得た。

GFP-tubulinを発現させた精子で、精子運動活性調節の候補遺伝子をRNAiによってノックダウンし、野生型雌と交尾させる。その後の雌性生殖路での精子の挙動を追跡した (図4)。

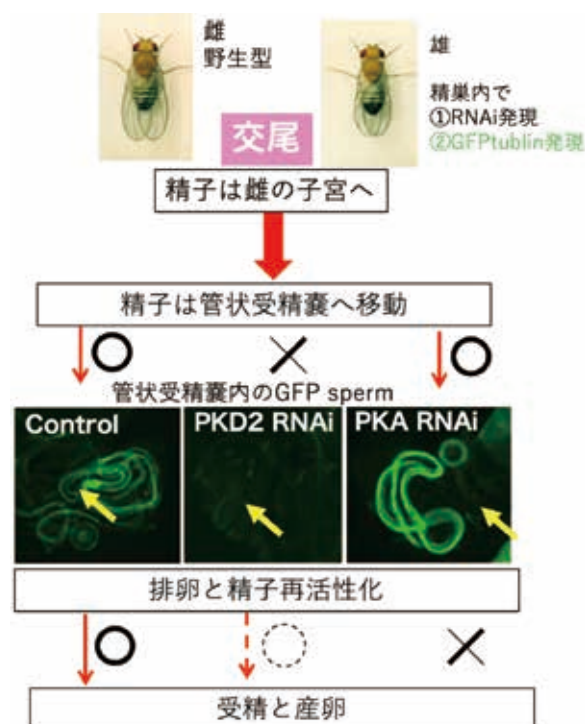


図4. RNAi発現による精子運動活性制御因子の探索

先行研究から交尾後のメス貯精嚢（管状受精嚢）への移動に必須であるとされるPKD2（polycystic kidney disease-2）をノックダウンした精子は貯精嚢に入ることはなかった。パイロット的なスクリーニングの結果、精巣特異的に発現するPKAサブタイプのRNAi系統の精子は管状受精嚢に入るが、管状受精嚢から出て卵を受精しないことが判明した。つまり、管状受精嚢に入る段階と出る段階で異なるシグナル伝達経路が働いている可能性を示唆している。今後は、ノックダウンする遺伝子の範囲を広げ、雌体内で精子運動制御に関わる因子を網羅的に解析することを予定している。

結 語

男性不妊は、世界的には数え切れないほどの人の人生に関わる問題である一方、非常に多数の未解明な遺伝因子が想定されている。ショウジョウバエの分子遺伝学の活用方法を工夫・発展させて、男性不妊遺伝因子の全容解明に微力ながら貢献できればと願っている。

利益相反

本研究に関する利益相反なし。

文 献

- 1) Fainberg J, Kashanian JA.: Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Research*. 8: 670, 2019.
- 2) The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and the Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology: Round spermatid nucleus injection (ROSNI). *Fertility and Sterility*. 90: S199, 2008.
- 3) Ishikura Y, Yabuta Y, Ohta H, et al.: In Vitro Derivation and Propagation of Spermatogonial Stem Cell Activity from Mouse Pluripotent Stem Cells. *Cell Reports*. 17: 2789-2804, 2016.
- 4) Saitou M, Hayashi K.: Mammalian in vitro gametogenesis. *Science*. 374: 47, 2021.
- 5) Baldini D, Ferri D, Baldini GM.: Sperm Selection for ICSI: Do We Have a Winner? *Cells*. 10: 3566, 2021.
- 6) Chen W, Peng Y, Ma X et al.: Integrated multi-omics reveal epigenomic disturbance of assisted reproductive technologies in human offspring. *EBioMedicine*. 61: 103076, 2020.
- 7) Agarwal A, Cho C-L, Majzoub A, et al.: The Society for Translational Medicine: clinical practice guidelines for sperm DNA fragmentation testing in male infertility. *Transl Androl Urol*. 6: S720-S733, 2017.
- 8) Hildebrandt F, Benzing T, Katsanis N.: Ciliopathies. *N Engl J Med*. 364: 1533-1543, 2011.
- 9) Reiter JF, Leroux MR.: Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat REV MOL CELL BIOL*. 18: 535-547, 2017.
- 10) Kerjan G, Gleeson JG.: Genetic mechanisms underlying abnormal neuronal migration in classical lissencephaly. *Trends Genet*. 23: 623-630, 2007.
- 11) Nayernia K, Vauti F, Meinhardt A, et al.: Inactivation of a Testis-specific Lis1 Transcript in Mice Prevents Spermatid Differentiation and Causes Male Infertility. *J. BIO. CHEM*. 278.: 48377-48385, 2003.
- 12) Omolaoye TS, Omolaoye VA, Kandasamy RK, et al.: Omics and Male Infertility: Highlighting the Application of Transcriptomic Data. *Life*. 12: 280, 2022.
- 13) Elkis Y, Bel S, Rahimi R, et al.: TMF/ARA160 governs the dynamic spatial orientation of the golgi apparatus during sperm development. *PLoS ONE*. 10: e0145277, 2015.
- 14) Dunleavy JEM, O'Bryan MK, Stanton PG, et al.: The cytoskeleton in spermatogenesis. *Reproduction*. 157: R53-R72, 2019.
- 15) Vogl AW.: Distribution and function of organized concentrations of actin filaments in mammalian spermatogenic cells and Sertoli cells. *Int Rev Cytol*. 119: 1-56. 1990.
- 16) Shen J, Chen W, Shao B, et al.: Lamin A/C proteins in the spermatid acroplaxome are essential in mouse spermiogenesis. *Reproduction*. 148: 479-487, 2014.
- 17) Morimoto A, Shibuya H, Zhu X, et al.: A conserved KASH domain protein associates with telomeres, SUN1, and dynactin during mammalian meiosis. *J. Cell Biol*. 198: 165-172, 2012.
- 18) Yeh C-H, Kuo P-L, Wang Y-Y, et al.: SEPT12/SPAG4/LAMINB1 complexes are required for maintaining the integrity of the nuclear envelope in postmeiotic male germ cells. *PLoS ONE*. 10: e0120722, 2015.
- 19) Bao J, Bedford MT.: Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. *Reproduction*. 151: R55-R70, 2016.
- 20) Wu JY, Ribar TJ, Cummings DE, et al.: Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nat. Genet*. 25: 448-452, 2000.
- 21) Bell EL, Nagamori I, Williams EO, et al.: SirT 1 is required in the male germ cell for differentiation and fecundity in mice. *Development*. 141: 3495-3504, 2014.
- 22) Lu LY, Wu J, Ye L, et al.: RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Dev Cell*. 18: 371-384, 2010.
- 23) Meyer-Ficca ML, Lonchar J, Credidio C, et al.: Disruption of poly(ADP-ribose) homeostasis affects spermiogenesis and sperm chromatin integrity in mice. *Biol Reprod*. 81: 46-55, 2009.
- 24) Shang E, Nickerson HD, Wen D, et al.: The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development*. 134: 3507-3515, 2007.
- 25) Zhang Z, Miao J, Wang Y.: Mitochondrial regulation

- in spermatogenesis. *Reproduction*. 163: R55-R69, 2022.
- 26) Folgero T, Bertheussen K, Lindal S, et al.: Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Hum Reprod*. 8: 1863-1868, 1993.
- 27) Varuzhanyan G, Chan DC: Mitochondrial dynamics during spermatogenesis. *J. Cell Sci*. 133: jcs235937, 2020.
- 28) Moussaieff A, Rouleau M, Kitsberg D, et al.: Glycolysis-Mediated Changes in Acetyl-CoA and Histone Acetylation Control the Early Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Cell Metab*. 21: 392-402, 2015.
- 29) Tourmente M, Villar-Moya P, Rial E, et al.: Differences in ATP Generation Via Glycolysis and Oxidative Phosphorylation and Relationships with Sperm Motility in Mouse Species. *J. BIOL CHEM*. 290: 20613-20626, 2015.
- 30) Wakimoto BT, Lindsley DL, Herrera C.: Toward a Comprehensive Genetic Analysis of Male Fertility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 167: 207-216, 2004.
- 31) Castrillon DH, Gonczy P, Alexander S.: Toward a Molecular Genetic Analysis of Spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. Characterization of Male-sterile Mutants Generated by Single P Element Mutagenesis. *Genetics*. 135: 489-505, 1993.
- 32) DRSC/TRiP Functional Genomics Resources & DRSC-BTRR, Harvard medical school : <https://fgr.hms.harvard.edu/crispr-fly-stocks-and-vectors>, (accessed 2023-02-10)
- 33) Wasbrough ER, Dorus S, Hester S. et al.: The *Drosophila melanogaster* sperm proteome-II (DmSP-II). *J Proteomics*. 73: 2171-2185, 2010.
- 34) Stage-specific testes proteomics of *Drosophila melanogaster* identifies essential proteins for male fertility. Gärtner SMK, Hundertmark T, Nolte H, et al.: *E J Cell Biol*. 98: 103-115, 2019.
- 35) Chintapalli VR, Wang J, Dow JAT.: Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nat Genet*. 39: 715-720, 2007.
- 36) Casas-Vila N, Bluhm A, Sayols S, et al.: The developmental proteome of *Drosophila melanogaster*. *Genome Res*. 27: 1273-1285, 2017.
- 37) Hongjie Li, Jasper J, Maxime DW et al., Fly Cell Atlas: A single-nucleus transcriptomic atlas of the adult fruit fly *Science*. 375: eabk2432, 2022.

Study of spermatogenesis using *Drosophila* molecular genetics

Tatsuhiko NOGUCHI

J. Natl. Def. Med. Coll. (2023) 48 (1) : 1 – 9

Abstract: Human male infertility shows a tendency to increase worldwide and has become a social problem in some countries. Spermatogenesis is a long and complex process from primordial germ cell differentiation to completion of fertilizable spermatozoa. Therefore, the hereditary factors of infertility are diverse, and it is expected that a long research process will be required to fully elucidate them. Utilizing *Drosophila* molecular genetics, while identifying the commonality of spermatogenesis with mammals, is considered to be a means to accelerate the elucidation of the genetic factors of human male infertility.

Key words: *Drosophila melanogaster* / spermatogenesis / factor of male infertility