PRESS RELEASE（2022/03/01）

2 種類の小さなタンパク質が精子ミトコンドリアの形態を制御する

ー　男性不妊のメカニズムの一端を解明　ー

ポイント

① 近年、長鎖ノンコーディング RNA からタンパク質が産生されることが明らかとなっており、そのようなタンパク質のさらなる探索が必要とされていた

② 本研究で、長鎖ノンコーディング RNA から産生される、精子の機能に必須な 2 つの小さなタンパク質を世界で初めて発見

③ 今後、精巣の他の隠れたたんぱく質を同定・解析することで、不妊症の原因解明や治療につながると期待される

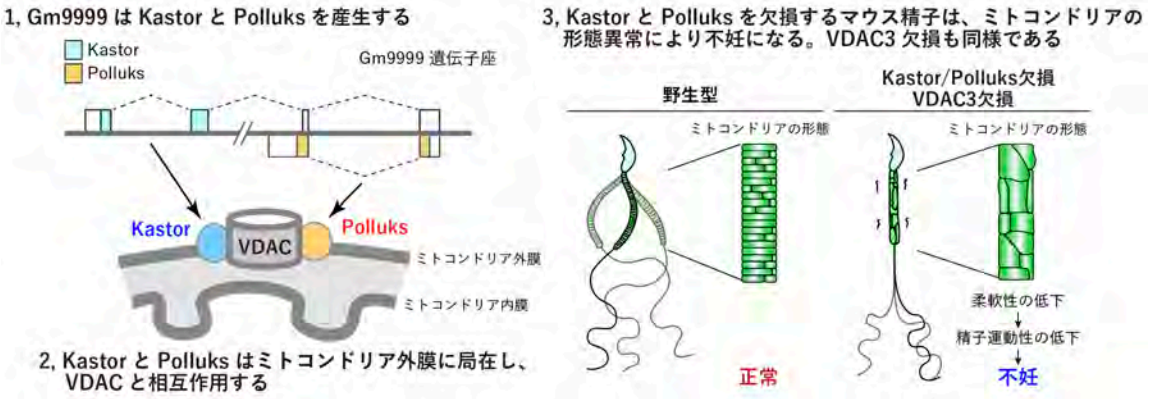
概要

近年、タンパク質を産生しないと考えられていた長鎖ノンコーディング RNA のいくつかが、100 アミノ酸以下の小さなタンパク質を産生することが明らかになってきており、このような小さなタンパク質のさらなる探索が必要とされていました。本研究では、これまで長鎖ノンコーディング RNA とされていたマウス遺伝子座（Gm9999）から産生される 2 種類の精子特異的タンパク質（双子座の星から名前をとって、それぞれカストル Kastor、ポルックス Polluks と名付けました)を発見し、これらが精子の機能に重要であることを明らかにしました。

九州大学生体防御医学研究所の中山 敬一 主幹教授、松本 有樹修 准教授らの研究グループは、精巣特異的に発現する長鎖ノンコーディング RNA からタンパク質が産生される可能性を網羅的に探索し、Gm9999 遺伝子座から二つの小タンパク質である Kastor と Polluks が産生されることを突き止めました。Kastor と Polluks はアミノ酸配列が完全に異なりますが、どちらもミトコンドリア外膜に局在し、電位依存性アニオンチャンネル（VDAC ※1）と直接結合しています。Kastor と Polluks の両方を欠損する雄マウスでは精子のミトコンドリア鞘（※2)の形が異常になり不妊になりますが、これは以前に知られていた VDAC3 欠損マウスと類似した異常であることから、Kastor と Polluks は協調的に VDAC3 を制御して、精子におけるミトコンドリア鞘の形成と雄の生殖能力の獲得に必須であることがわかりました。

今回新たに Kastor と Polluks を同定しましたが、精巣には他にも多くの隠れたタンパク質が存在する可能性があります。隠れた小さなタンパク質をさらに同定して解析していくことによって、精子形成の理解がより深まり、不妊症の原因解明や治療につながることが期待されます。

本研究成果は英国の雑誌「Nature Communications」に 2022 年 2 月 28 日（月）(日本時間)に掲載されました。



（参考図）研究成果の概要

Gm9999 遺伝子座から産生される Kastor と Polluks は精子ミトコンドリアの形態制御に必須である。

【研究の背景と経緯】

長鎖ノンコーディング RNA はタンパク質を産生しないと定義されています。長鎖ノンコーディング RNA の多くは、組織特異的な発現パターンを示し、特に精巣では多くの種類の長鎖ノンコーディング RNA が発現することが知られています。精巣特異的に発現する長鎖ノンコーディング RNA は精子形成の間に様々な発現パターンを示すことから、精子形成に重要な役割を担っていると考えられていました。しかし、精巣における長鎖ノンコーディング RNA の機能は、一部を除いてほとんど分かっていませんでした。近年、私たちのグループを含めて複数のグループから、一部の長鎖ノンコーディング RNA は実際に機能的な小さなタンパク質を産生していることが報告されていました。多くの長鎖ノンコーディング RNA が精巣特異的に発現することから、精巣には隠れたタンパク質が存在する可能性が高く、その探索を通して、精子形成の分子機構を解明することを目指しました。

【研究の内容と成果】

精巣特異的に発現することが知られている長鎖ノンコーディング RNA について、タンパク質が産生される可能性を探索した結果、Gm9999 遺伝子を候補の遺伝子として見出しました（図 1)。非常に興味深いことに、Gm9999 は 1 つの遺伝子座から 2 種類の小さなタンパク質を産生する可能性が示唆され、これらのタンパク質を Kastor と Polluks と名付けました（図 1)。

Kastor タンパク質と Polluks タンパク質が産生されるのかを確かめるために、Kastor と Polluks タンパク質の末端にタグ配列（※3)をもつノックインマウス（※4)を作製し、発現解析からその存在を明らかにしました（図 2)。さらに、Kastor と Polluks の機能を推定するために、ノックインマウスを用いて Kastor と Polluks の結合タンパク質を探索しました。免疫沈降（※5)とプロテオミクス解析(※6)から、Kastor と Polluks は共に電位依存性アニオンチャネル（VDAC)と結合していることがわかりました。

VDAC3 欠損マウスは、精子ミトコンドリア鞘の形態異常により、精子の運動性が低下し、雄性不妊になることが知られていました。そこで、Kastor と Polluks の両方を欠損するマウスを作製したところ、VDAC3 欠損マウスと同様に、雄性不妊を示しました（図 3)。さらに、電子顕微鏡を用いてこれらの精子ミトコンドリア鞘を観察したところ、Kastor と Polluks の両方を欠損する精子ミトコンドリアは、明らかな形態異常を示していました。この形態異常は VDAC3 を欠損した精子ミトコンドリアと非常に類似しており、この形態異常により、精子の運動性が低下することで、不妊につながることがわかりました。

以上の結果から、Kastor と Polluks が VDAC3 依存性のミトコンドリア鞘形成に必須な役割を果たし、それが雄の生殖機能に必要であることが示唆されました。

【今後の展開】

本研究では、これまで長鎖ノンコーディング RNA と思われていた Gm9999 から、実は Kastor と Polluks という 2 種類の小さなタンパク質が産生され、それらが精子ミトコンドリアの形態制御を担っていることを明らかにしました。Kastor と Polluks は共にヒトを含む哺乳類に広く保存されており、これらの生物では、共通した機能を持つと考えられます。精巣特異的な遺伝子の機能解析は、男性不妊の原因解明だけでなく、これらを標的とした避妊薬の開発への展開が期待されます。

【参考図】

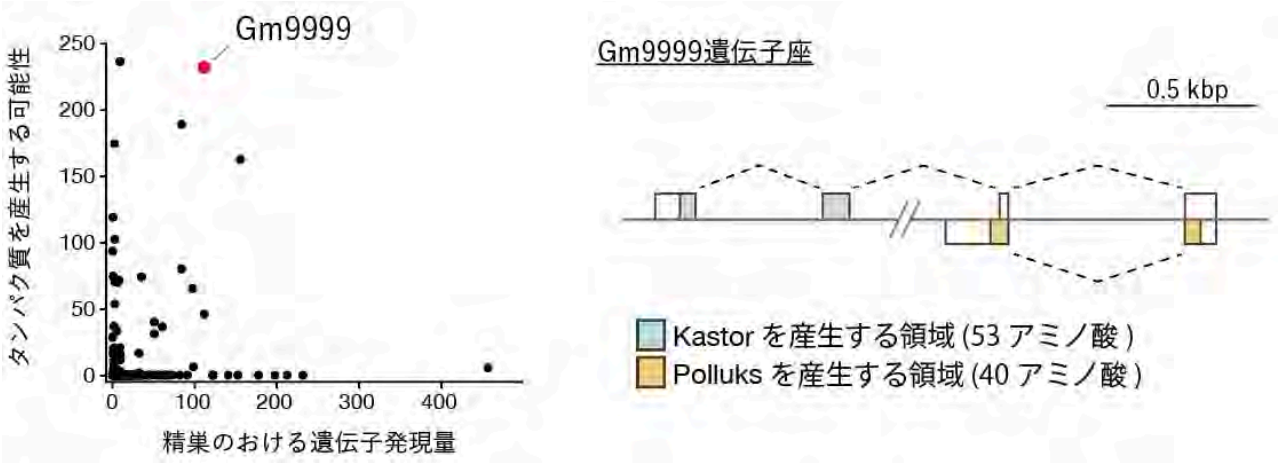


図 1. タンパク質を産生する長鎖ノンコーディング RNA の探索

精巣に発現する長鎖ノンコーディング RNA からタンパク質が産生される可能性を網羅的にスクリーニングし、Gm9999 遺伝子を見出した(左図)。

Gm9999 遺伝子には、2 種類のタンパク質を産生する領域が存在することが分かった（右図)。

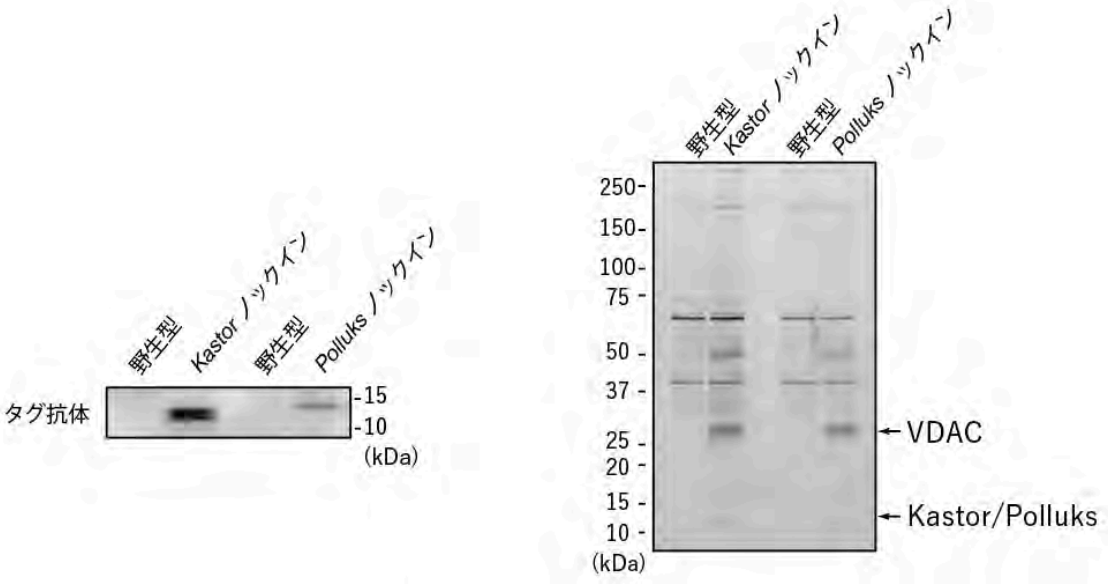


図 2. 産生された Kastor と Polluks は VDAC に結合する

ノックインマウスの精巣を用いて、Kastor タンパク質と Polluks タンパク質がそれぞれ産生されていることを明らかにした（左図)。

タグ配列を用いた免疫沈降とプロテオミクス解析から、Kastor と Polluks はどちらも VDAC と強く結合していることが分かった（右図)。

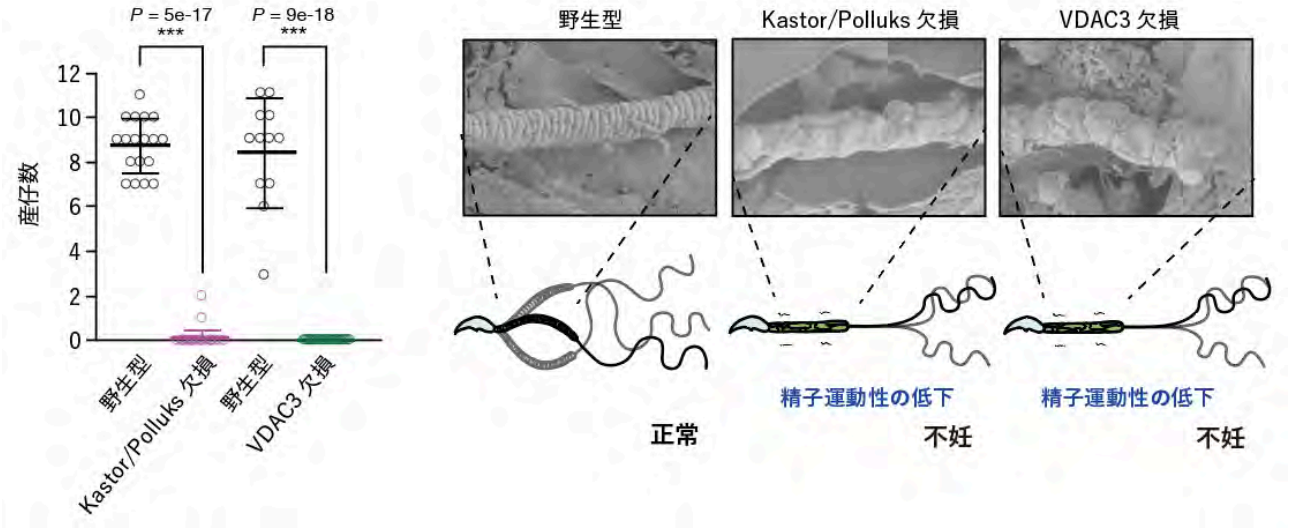


図 3. Kastor/Polluks 欠損マウスは、VDAC3 欠損マウスと同様に雄性不妊を示す

Kastor と Polluks の両方を欠損するマウスを作製し、野生型のメスと交配したところ、仔マウスがほとんど生まれなかった（左図)。この結果は VDAC3 欠損マウスも同様であった。
電子顕微鏡を用いて、精子ミトコンドリア鞘の形態を観察した（右図)。野生型の精子ミトコンドリア鞘は紐状のミトコンドリアが螺旋状に巻きついた構造をとるが、Kastor/Polluks 欠損や VDAC3 欠損では、瓦状になったミトコンドリアが重なりながら巻きついている。

【用語解説】

(※1）電位依存性アニオンチャネル（VDAC)
ミトコンドリア外膜に豊富に存在するタンパク質で、哺乳類には VDAC1~VDAC3 の 3 種類が存在します。VDAC は Voltage-dependent anion channel の略称です。

(※2）ミトコンドリア鞘
完成した精子の持つミトコンドリアは、紐状のミトコンドリアが螺旋状に整列した（図 3 に見られるような)非常に特徴的な構造体になります。この構造から、ミトコンドリア鞘と呼ばれています。

(※3）タグ配列
人工的なタンパク質配列で、その配列を認識する抗体により、目的のタンパク質を検出するための目印となります。

(※4）ノックインマウス
外来の遺伝子配列を人工的に挿入した遺伝子改変マウスのことです。

(※5）免疫沈降
抗原（本研究ではタグ配列)とそれを認識する抗体を利用して、混合液から抗原タンパク質を分離する方法です。この時、抗原タンパク質(本研究では Kastor と Polluks)に結合しているタンパク質も一緒に回収することができます。

(※6）プロテオミクス解析
タンパク質を断片化し、その質量を測定することで、タンパク質の種類と量を推定する手法です。

【謝辞】
本研究は、JSPS 科研費（JP18H05215, JP20H05928, JP20K21397, JP20K16107)、AMED BINDS (JP21am0101082)の助成を受けたものです。

【論文情報】
掲載誌：Nature Communications
タイトル：Kastor and Polluks polypeptides encoded by a single gene locus cooperatively regulate VDAC and spermatogenesis
著者名：Shintaro Mise, Akinobu Matsumoto, Keisuke Shimada, Toshiaki Hosaka, Masatomo Takahashi, Kazuya Ichihara, Hideyuki Shimizu, Chisa Shiraishi, Daisuke Saito, Mikita Suyama, Tomoharu Yasuda, Toru Ide, Yoshihiro Izumi, Takeshi Bamba, Tomomi Kimura-Someya, Mikako Shirouzu, Haruhiko Miyata, Masahito Ikawa & Keiichi I. Nakayama
D O I ：10.1038/s41467-022-28677-y

【お問合せ先】
＜研究に関すること＞
九州大学 生体防御医学研究所　主幹教授
中山 敬一（なかやま けいいち）
TEL：092-642-6815　FAX：092-642-6819
Mail：nakayak1@bioreg.kyushu-u.ac.jp

＜報道に関すること＞
九州大学　広報室
TEL：092-802-2130　FAX：092-802-2139
Mail：koho@jimu.kyushu-u.ac.jp