

微小管の翻訳後修飾と加齢による生殖機能低下との関連解明

〔1〕組織

代表者：小林 美穂

(東京科学大学大学院医学総合研究科)

対応者：林 陽平

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

大我 政敏 (麻布大学獣医学部)

研究費：物件費 12 万 2 千円，旅費 7 万 8 千円

〔2〕研究経過

日本が近い将来に迎える超高齢化社会に対応する戦略の一つとして、健康寿命の延伸に向けた研究が盛んに進められている。また、超高齢化社会に陥る要因の一つである少子化は、近年のワーク・ライフバランスの低下や女性の社会進出による妊娠・出産の高齢化がもたらす妊娠・出産率の低下に関連している。しかし、高齢期での妊娠・出産を直接可能とする対策の実装までには至っていない。

全身に分布する血管は生体の恒常性を維持する役割を持ち、個体の老化と密接に関連している。これまでに、加齢に伴い組織の微小血管密度が低下し、それが個体の老化促進の要因となり得ることが報告されている (Science. 2021;373(6554):eabc8479)。一方、微小管を構成する α -チューブリンの翻訳後修飾である脱チロシン化を誘導する酵素「*vasohibin-1* (VASH1)」は内皮細胞に高発現しており、*Vash1* をノックアウト (KO) した *Vash1* KO マウスでは老化表現型の出現が抑制されて健康寿命が延伸するが (J Aging Res. 2017;2017:9851380) (申請者による解析結果：老齢での運動機能および認知機能の維持)、健康寿命が延伸するための分子機構は不明である。申請者はこれまでに、VASH1 が脱チロシン化型 α -チューブリン (ΔY 型チューブリン) の増加を介して血管新生抑制効果をもたらすことや、VASH1 により微小管の ΔY 型レベルが高くなると細胞内輸送が影響を受けることを明らかにしており (Angiogenesis. 2021;24(1):159-176)、VASH1 の生理的作用の根源が ΔY 型チューブリンの増加にあることを示してきた。さらに近年、*Vash1* KO マウスでは加齢に伴う組織の微小血管密度の低下

が抑制されていることを明らかにしている (論文投稿準備中)。加えて、*Vash1* KO マウスでは比較的高齢でも交配が可能である傾向にあることを確認している。授精には微小管を重要とする精子の数や運動性が関与し、妊娠が成立するための着床現象には細胞内輸送が関与することも併せて、*Vash1* KO マウスでは加齢による生殖能力の低下が抑制されているのではないかと仮説を立てるに至った (図1)。

そこで本共同研究では、まず野生型マウスを用いて微小管の翻訳後修飾である脱チロシン化と加齢による生殖能力低下との関連について明らかにすることを目的として研究を行なった。

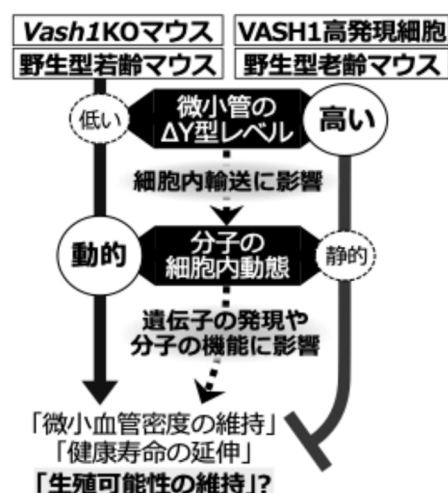


図1. 研究代表者によるこれまでの知見と本共同研究課題における生殖能力維持の仮説モデル

以下、研究活動状況の概要を記す。本共同研究では加齢研から供給される老年を含む各ライフステージのマウスが雄のみであったことから、4月に共同研究打ち合わせを実施し (Web ミーティング)、精子・精巢を中心に解析することとした。また実験内容として、研究代表者は精巢における ΔY 型チューブリン量 (脱チロシン化レベル) やその分布を検討し、共同研究者は精子の機能解析や受精率解析を実施することとした。その後、各解析の条件検討を経て、老年マウスを用いて具体的にどのような実験・解析を行うのが最適かについて10月初旬に共同研究打ち合わせを実施した (Web ミーティング)。その打ち合わせをもとに、各ライフステージ (Young/Adult/Middle/Old) のマウスから各組織と精子を加齢研にて摘出して解析に使用し

た。精巣は研究代表者が持ち帰って凍結包埋し、精子は加齢研にて共同研究者（林）がその場で解析した。さらに加齢研にて摘出した精巣上体尾部は、研究代表者が東京まで適切な温度で運搬して共同研究者（大我）に手渡し、精子の機能解析や体外受精による受精率解析に使用した。これら1連の解析は、10月・11月・12月に分けて実施した。それぞれの解析についてのフィードバックとして、研究代表者の小林と共同研究者の林や大我は定期的にWebミーティングを行い、研究進捗状況の確認、得られたデータのディスカッションを行った。

〔3〕成果

（3－1）研究成果

共同研究者（林・大我）による精子数と運動性の解析により、加齢とともに精子数と運動性の両方が低下することが分かり、特に老年（Old）で大きく低下することが明らかとなった。また、精子運動性の詳細解析から、壮年・老年マウス（Middle、Old）由来の精子では頭部振幅数が大きくなり、それに伴って直進性も低下することが分かった。しかし、受精率解析ではMiddle由来精子でも胚発生がみられ、精子数の方と相關する結果となったことから、体外受精における着床前胚発生には運動性は大きく影響しないのではないかと考えられた。

研究代表者による精巣組織の免疫染色から、若年（Young）や成年（Adult）では精細管の中心に向かって「精原細胞や精母細胞とセルトリ細胞→精子細胞→精子」という階層がクリアに観察できたが、MiddleやOldでは精原細胞や精母細胞とセルトリ細胞が少なくなると共に階層性が曖昧になっていた。特にOldでは精細管内の精子以外の細胞の大きさが同一になって階層性がなくなり、精子とその他の細胞が混ざった配置をしていた。一方、微小管が強く染色される精子はどのライフステージでも精細管の中心に局在していた。共同研究者による精子解析結果と同様に、精子を示す微小管染色は加齢とともに少なくなり、Oldでは大きく減少していた。また、精細管を囲む平滑筋細胞における微小管染色がMiddle以降に強くなっていた。ΔY型チューブリンについては、どのライフステージでも精子尾部での染色が強かったことから、精子の運動性にΔY型チューブリンが大きく影響すると考えられた。ライフステージごとの比較では、YoungからMiddleにかけては加齢に伴い鞭毛と考えられる部分で脱チロシン化レベルの上昇がみられ、それ以外の細胞での染色はほとんど観察されなかった。特筆すべきこととして、Oldでは精子と想定される精細管中心部でのΔY型チューブリンの局所的染色性が弱くなる一方で精細管内の全ての細胞でΔY型チューブリンの染

色が見られたことから、精細管内で脱チロシン化レベルに差がなくなる傾向にあった。これは、局所的に脱チロシン化されることが無くなったことを示している。したがって、精子への分化段階が進むほど脱チロシン化レベルが高くなることが重要ではないかと考えられた。また予想外に、精細管外に存在する血管ではΔY型チューブリンの染色がほとんどみられなかった。

以上の結果から、精子の数や機能とΔY型チューブリンとが関連しており、精子の分化段階に応じた脱チロシン化レベルの局所的な増加が何らかの役割を果たしている可能性が考えられた。さらに、加齢に伴い精細管全体としての脱チロシン化レベルが高くなっていたことから、ΔY型チューブリンが精巣での加齢マーカーとなる可能性が示唆された。

（3－2）波及効果と発展性など

本共同研究により、代表者の研究領域外の学外研究者との交流が飛躍的に活性化すると共に、全身の各組織において脱チロシン化型チューブリンの機能や役割を解析するプロジェクトの発足に発展した。また、本共同研究で明らかになった精巣における脱チロシン化レベルと加齢との関係の成果は、生殖機能における脱チロシン化の役割という新しい研究領域の開拓（萌芽的研究の発見）に結びつき、今後の発展が期待される。また、脱チロシン化を誘導する酵素はVASH1以外にも存在するため、今後はVASH1のみならず他の脱チロシン化酵素に関しても加齢との関係性を調べることで、脱チロシン化を軸とした大型プロジェクトへの発展が期待される。

〔4〕成果資料

該当なし