



Title	遺伝子改変マウスを用いた精子完成期に重要な遺伝子の機能解析
Author(s)	金田, 侑樹
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105588
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

2025 年度（令和 7 年度） 博士論文

遺伝子改変マウスを用いた 精子完成期に重要な遺伝子の機能解析

大阪大学大学院 薬学研究科 創成薬学専攻

遺伝子機能解析学分野

金田侑樹

目次

略語一覧

第一節 緒論

第二節 本論

第一章 精子形成における TEX38 の機能解析

序論

実験方法

結果

第一節 TEX38 はマウスの精子頭部の形成と雄性妊孕性に必須である。

第二節 *Tex38* の欠損は子宮卵管接合部（UTJ）における精子の通過異常を引き起こす。

第三節 TEX38 は ZDHHC19 と相互作用し、*Zdhhc19* KO マウスは *Tex38* KO マウスと類似した表現型を示す。

第四節 ZDHHC19 は精子細胞の細胞膜で TEX38 と共局在し、互いを安定化させる。

第五節 ZDHHC19 の S-アシルトランスフェラーゼ活性は精子形成に必須である。

小括・考察

第二章 精巣に高発現する F-box タンパク質ファミリーの機能解析

序論

実験方法

結果

第一節 *Fbxo36* および *Fbxo39* はマウス精巣で高発現しており、ヒトにおいても高い保存性を示す。

第二節 *Fbxo36* 欠損は雄マウスの生殖能力に影響を与えなかった。

第三節 *Fbxo39* 欠損は雄マウスの生殖能力低下と精子形成異常を引き起こす。

第四節 *Fbxo39* KO 精子は形態異常及び運動性の低下を呈した。

第五節 *Fbxo39* KO マウスは精子完成期の頭部形成異常を示す。

小括・考察

第三編 総括

第四編 謝辞

第五編 主論文・参考論文リスト

第六編 参考文献

略語一覧 (A to Z)

B6D2F1/Slc	: (C57BL/6NCrSlc ♀×DBA/2CrSlc ♂) F1
CASA	: Computer-assisted sperm analysis
Cas9	: CRISPR-Associated Proteins 9
CRISPR	: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
ES	: Embryonic stem
gRNA	: guide RNA
hCG	: human chorionic gonadotropin
IB	: heterozygous
IB	: immunoblotting
IF	: immunofluorescence
IP	: immunoprecipitation
IVF	: in vitro fertilization
KI	: knock-in
KO	: knock-out
ORF	: open reading frame
PAM	: protospacer adjacent motif
PMSG	: pregnant mare serum gonadotropin
scRNA-seq	: single cell RNA sequence
SEM	: scanning electron microscopy
TEM	: transmission electron microscopy
VAP	: average path velocity
VSL	: straight-line velocity
VCL	: curvilinear velocity
WT	: wild type

第一編 緒論

我々ヒトを含む生物の一生（一世代）は大事であるが、新たな世代の個体を作り出すこと、すなわち世代が連続して続くということは生物と無生物を分ける決定的な差である。このことから、生殖は生物の基本的でかつ重要な活動であると言える。一部を除き、基本的に生物は有性生殖によって種を保存しており、生殖を理解することは生物学的観点から重要である。

現在、日本を含めた先進国では、不妊症が大きな社会問題となっている。国立社会保障・人口問題研究所の統計調査（2021年度）によると日本では4.4組に1組のカップルが不妊の検査または治療を経験しており、この割合は前回（2015年度）の調査の5.5組に1組と比べて増加している。世界的にはこのような不妊問題に加え、少子高齢化問題や人口増加などの種々の人口問題が顕在化していることから、生殖現象の理解は生物学的観点のみならず社会的観点からも非常に重要である。

WHOの報告によると、先進国では不妊のおよそ半数は男性側に起因するとされており¹、男性の生殖（雄性生殖）の機構を明らかにすることは重要である。雄性生殖細胞である精子が形成される精巣は、タンパク質をコードする遺伝子の発現が最も多い臓器として知られている²が、その多くの遺伝子の機能が未だに不明である。哺乳類の精子は、高度に特殊化した細胞であり、父性遺伝情報が高密度に凝縮された頭部と、運動性を制御する鞭毛から構成される。精子は精原細胞の増殖に始まり、精母細胞の減数分裂を経て、円形精子細胞から伸長精子細胞への大きな形態変化を伴って形成される。この形態変化は精子完成期（spermiogenesis）と呼ばれ、先体の形成、鞭毛の伸長、核の凝縮、ミトコンドリアの再配置などが起こる（図1）³。完全に分化した精子細胞は最終的に精巣精細管上皮から管腔内へと放出される（この過程は精子放出〈spermiation〉と呼ばれる）。精子放出は、精子頭部および細胞質のリモデリング、接着構造の除去、そしてセルトリ細胞からの最終的な離脱といった複数の段階から構成される。この過程で精子細胞の細胞質は残余体（residual body）として分離され、セルトリ細胞によって貪食される⁴。その後、精子は精巣上体へ輸送され、成熟を続けて運動性と受精能力を獲得する^{5,6}。マウスでは、精原細胞から精子に分化するまでにおよそ1ヶ月という長い期間を要する。

現在のところ、*in vitro* で幹細胞から完全な哺乳類精子を作製した報告はない。近年、マウス ES 細胞から伸長精子細胞を作製し、顕微受精により次世代を得た報告がなされたものの⁷、減数分裂以降は精巣組織片に細胞を移植しており（*ex vivo* 系）、作業が複雑であるうえ効率が低い。さらに、精巣上体を経ていないため、得られた精子は運動能力および受精能力を欠いている。このように、運動性と受精能力を有する完全な精子を試験管内で作製することはいまだ実現しておらず、したがって精子形成や受精の分子機構を理解するに

は、個体レベルの研究が不可欠である。これまでの数十年間にわたりマウスのノックアウト (KO) 研究により、精子形成に必須な多くの遺伝子が同定されてきたものの^{3,8}、この複雑な過程を支える分子機構は未だ十分に解明されていない。

筆者は、精巣特異的に発現し、減数分裂以降の精子形成過程で高く発現する遺伝子である *Tex38* 及び *Zdhhc19* (第一章)、*Fbxo36* 及び *Fbxo39* (第二章) について発生工学的手法を用いてそれら遺伝子の機能を個体レベルで解析した。

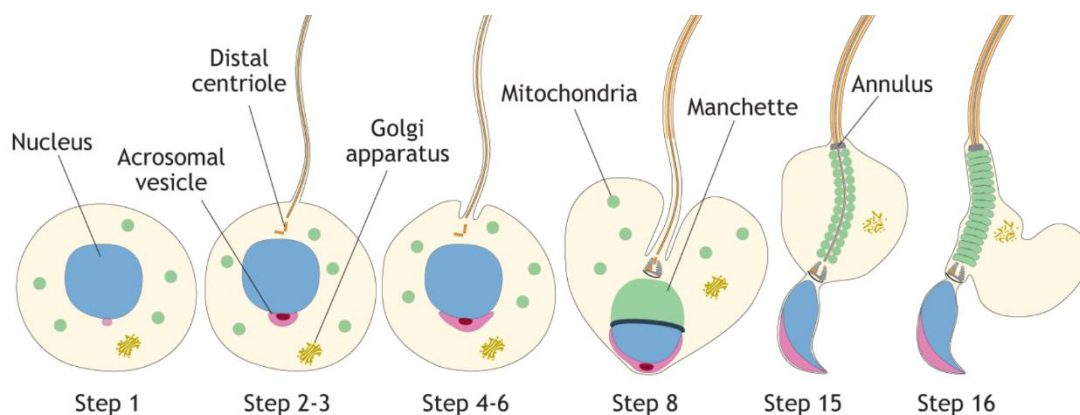


図 1. 精子完成期 (spermiogenesis) の概略図 (マウス)

精子形成 (spermiogenesis) では、円形精子細胞が成熟精子へと分化する過程で、著しい形態変化が段階的に進行する。マウスではこの過程が 16 段階に分類され、step 2-3 では遠位中心体 (Distal centriole) から軸系が伸長する。軸系の伸長に伴い中心体は核膜近傍へ移動して核と細胞膜をつなぎ、その後中心体と核が反対側へ移動することで細胞膜が内側に折れ込む陥入が生じ、鞭毛領域の区画化が行われる。陥入は Annulus の移動とともに消失し、ミトコンドリアが再配置され中片部に巻き付くことで最終的にミトコンドリア鞘が形成される。この過程で、核前方の先体 (Acrosome) が伸展して成熟し、さらに Manchette によって核が変形されることで、成熟精子特有の三日月状の核が形成される。(参考論文 4 より引用)

第二編 本論

第一章 精子形成における TEX38 の機能解析

要旨

精子の形態形成は、細胞構造の大規模な再編を伴う精密に制御された分化過程であり、その異常は精子機能障害や雄性不妊の主要な原因となる。本研究では、この過程の分子機構を解明することを目的として、精巣特異的に発現する遺伝子 *Tex38* に着目し、その機能解析を行った。

Tex38 KO マウスでは、頭部屈曲や細胞質残存を特徴とする精子形態異常が観察され、雄性不妊を呈した。さらに解析を進めた結果、TEX38 は精巣特異的アシルトランスフェラーゼ ZDHHC19 と相互作用し、円形精子細胞の細胞膜上で共局在することが明らかとなった。TEX38 または ZDHHC19 のいずれかを欠損させると、相手タンパク質の発現量が著しく低下することから、両者が互いの安定性を維持していることが示唆された。培養細胞を用いた検討でも、TEX38 が ZDHHC19 の膜局在を促進し、逆に ZDHHC19 も TEX38 の局在を支持することが確認され、両者の相互依存的な機能関係が裏付けられた。

さらに、ZDHHC19 の酵素活性を失活させる C142S 変異を導入したマウスや *Zdhhc19* KO マウスでも、*Tex38* KO マウスと同様の精子形態異常が認められた。加えて、ZDHHC19 が精子分化に関与する arrestin ファミリータンパク質 ARRDC5 を S-パルミトイル化することを明らかにした。

これらの結果から、TEX38 と ZDHHC19 は精子細胞の細胞膜上で安定な複合体を形成し、下流タンパク質の S-パルミトイル化を介して精子頭部の形態形成を制御していることが示された。本研究は、S-パルミトイル化が雄性生殖過程において果たす新たな役割を示すとともに、特発性男性不妊の病態理解や非ホルモン性避妊法の開発に向けた新たな手がかりを提供するものである。

序論

S-アシル化（または S-パルミトイル化）は、タンパク質の翻訳後修飾の一種であり、長鎖脂肪酸がシステイン残基に可逆的に共有結合する反応である。S-パルミトイル化は、タンパク質の疎水性を高めることで局在や機能を調節することが知られている^{9,10}。この修飾は、Asp-His-His-Cys (DHHC) モチーフを有する ZDHHC ファミリーのアシルトランスフェラーゼ (protein acyltransferase, PAT) によって媒介され、多くの ZDHHC タンパク質は小胞体およびゴルジ体に局在している¹¹。これまでに同定されている 23 種類の ZDHHC のうち、*Zdhhc11* および *Zdhhc19* は主にマウス精巣で発現している。*Zdhhc11* 欠損雄マウスは正常な生殖能力を示すのに対し、*Zdhhc19* 欠損は精子頭部の異常な折り畳みを伴う雄性不妊を引き起こすことが報告されている¹²。興味深いことに、他の ZDHHC タンパク質とは異なり、ZDHHC19 は精子細胞の細胞膜に局在するが、その局在制御機構や PAT 活性と表現型との関連については未解明である。

本研究では、主に精巣で発現する膜貫通型タンパク質 TEX38 に着目し、CRISPR/Cas9 システムを用いてマウスにおける遺伝子欠損を行った。その結果、*Tex38* KO 雄マウスは精子頭部の異常な屈曲を示し、*Zdhhc19* KO マウスと類似した不妊表現型を呈することが明らかとなった。さらに、TEX38 と ZDHHC19 が相互作用することを見出し、この相互作用が両タンパク質の安定性および細胞膜局在に必須であることを示した。加えて、アシルビオチン交換法 (acyl-biotin exchange) とプロテオミクス解析を組み合わせることで、ZDHHC19 が ARRDC5 の S-パルミトイル化を触媒することを明らかにした。興味深いことに、*Arrdc5* 欠損マウスも精子形態異常を示すことが報告されており^{13,14}、ZDHHC19-TEX38-ARRDC5 経路が精子形成における新たな膜制御機構を担う可能性が示唆された。

実験方法

動物

野生型マウスは日本 SLC 株式会社より購入し、実験に供した。動物実験は大阪大学微生物病研究所・動物実験委員会の承認を得て行った（承認番号: 動微 H30-01、動微 R03-01）。

CRISPR/Cas9 を使用した *Tex38* KO、*Zdhhc19* KO、KI 及び Tg マウスの作製

表に示す 2 種類の gRNA と tracrRNA (Merck) を Cas9 タンパク質 (Thermo Fisher Scientific) および Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) と混合し、gRNA/Cas9 リボヌクレオタンパク質複合体を作製した (Cas9 : 93 ng/μl、gRNA : 37.2 ng/μl)。gRNA の設計は CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>) を用いて行った。得られた複合体は NEPA21 Super Electroporator (Nepagene) を用いたエレクトロポレーションにより受精卵 (B6D2F1xB6D2F1) に導入した (poring pulse, voltage: 225 V, pulse width: 2 ms, pulse interval: 50 ms, number of pulses: +4; transfer pulse, voltage: 20 V, pulse width: 50 ms, pulse interval: 50 ms, and number of pulses: ±5)。2 細胞期に達した胚を、精管切除した雄との交配後 0.5 日目の ICR 偽妊娠マウスの卵管に麻醉下で移植し、自然分娩または帝王切開で仔マウスを得た。PCR により欠損を確認した F0 変異マウスを B6D2F1 WT マウスと交配し、その後兄妹交配を行うことによりホモ KO マウスを得た。ジェノタイピングに用いたプライマーを下記表に示す。

Zdhhc19 (C142S) KI マウスは、CRISPR/Cas9 システムを用いて同様の方法で作製した。*Zdhhc19* の DHHC ドメインを標的とする gRNA と、DHHC ドメイン中のシステイン残基をセリンに置換するとともに、ノックイン部位の再編集を防ぐために追加の同義変異を導入した 128 塩基対の一本鎖オリゴヌクレオチド (ssODN) を設計した。ssODN および CRISPR/Cas9 複合体を受精卵 (B6D2F1xB6D2F1) にエレクトロポレーションした後、胚を一晩培養し、疑妊娠マウスに移植した。得られた F0 マウスは、ノックイン領域を増幅した PCR 産物のシーケンスにより遺伝子型を確認した。

HA-*Zdhhc19* トランスジェニック (Tg) マウスは、ヒトインフルエンザヘマグルチニン (HA) を N 末端に付加した *Zdhhc19* を、Cln プロモーターおよびウサギ β グロビンのポリアデニル化 (polyA) シグナルを含むプラスミド (Addgene, Plasmid #173686) に挿入して作製した。線状化したプラスミドを、体外受精 (IVF) によって得た *Zdhhc19* ヘテロ接合またはホモ接合ノックアウトマウス胚の前核にマイクロインジェクションした。注入胚は一晩培養した後、疑妊娠マウスに移植した。トランスジェーンの導入は、N 末端オープンリーディングフレーム (ORF) および polyA シグナルを標的とするプライマーを用いた PCR により確認した。プライマー、gRNA、および ssODN の配列は下記表に示す。

RT-PCR

10~12 週齢の野生型 C57BL/6J マウス（日本 SLC）から脳、胸腺、肝臓、心臓、肺、脾臓、腎臓、精巣、卵巣、子宮を採取した。採材後すぐに TRIzol（Invitrogen）を用いて RNA を抽出した。RNA 精製後、SuperScript III 逆転写酵素（Invitrogen）とオリゴ dT プライマーを用いて cDNA を合成した。その後、KOD-Fx Neo (TOYOBO) を用い、cDNA を鋳型として PCR を行った。用いたプライマーを下記に示す。

Method	Symbol	Sequence (5'→3')
Cloning	<i>Zdhhc19</i> cloning Fw	ATGAATTCCCTTTCTTAAAGGATGC
	<i>Zdhhc19</i> cloning Rv	GCGTCGACTCAGGACAGGACAAGCAGC
	<i>Tex38</i> cloning Fw	ATTCTAGAGCCGCCATGTGGATCTCCTT GTGCAT
	<i>Tex38</i> cloning Rv	GCGATATCCAGCTCTAAAGCAAAAGGC TTGG
	<i>Zdhhc19</i> iPCR #1	AGTAAGTGGGTCAATAACTGCATCG
	<i>Zdhhc19</i> iPCR #2	ATGGTGGTTCGAAGTCCTCCACGC
	<i>Arrdc5</i> cloning Fw	ATGGATCCTCTGTGGTGAAGTCCATCGA
	<i>Arrdc5</i> cloning Rv	GCGAATTCTCAAACCATATGGTCCTCAT
RT-PCR	<i>Tex38</i> Fw	AGCAGTGGGTGGAAGTGATG
	<i>Tex38</i> Rv	AACATTCTTTTCAGGGCGGT
	<i>Actb</i> Fw	CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC
	<i>Actb</i> Rv	ATGGAGCCACCGATCCACA
Genotyping	<i>Tex38</i> KO Fw	AATGCTCTGTGTGCTCTCCC
	<i>Tex38</i> KO Rv	GCTGTGGAACCAACCAAGGTA
	<i>Tex38</i> WT Fw	GTTGTGTACTAGAGGTTACTGGATG
	<i>Tex38</i> WT Rv	GCCTTCTGGGAGTACTTAGTTTCTA
	<i>Zdhhc19</i> KO Fw	GAGCTTGCCCATTTGGCTGG
	<i>Zdhhc19</i> KO Rv	GCGTCTTGACGTTCCCCGG
	<i>Zdhhc19</i> WT Fw	CCAAAGGGCTTTCCGCCTGG
	<i>Zdhhc19</i> WT Rv	AGTCCTGTTACAGGGTGAGG
	<i>Zdhhc19</i> (C142S) KI Fw	CTCGCTCACTGCCTGTCTCC
	<i>Zdhhc19</i> (C142S) KI Rv	GATGCCTTGTGCGAAATAGG
	<i>Zdhhc19</i> Tg Fw	ATGAATTCCCTTTCTTAAAGGATGC
	<i>Zdhhc19</i> Tg Rv	GCCACACCAGCCACCACCTTCTG
gRNA	<i>Tex38</i> gRNA #1	GACCTTTACGGATTCCCAAA
	<i>Tex38</i> gRNA #2	AGAGCTATGGTGGCCTACAT

	<i>Zdhhc19</i> gRNA #1	TCGAGCGTGTTTGCTGCCTT
	<i>Zdhhc19</i> gRNA #2	GTTGAAGGGTCGTGAAGACA
	<i>Zdhhc19</i> gRNA #3	GTGGTCGAAGTCCTGTTACA
ssODN	<i>Zdhhc19</i> C142S	AGCTAATGGAAGCTGGGAGGAAGGACG GATCCCGGAGGCCTTTCCCTCACTCTGTA ACAGGATTTTGATCACCATAGCAAGTGGG TCAATAACTGCATCGGTCACCGCAACTTC CGCCTCTTCATGCT

in silico 発現解析

ヒト及びマウス精巢のシングルセル遺伝子発現データを参考にした¹⁵。*Tex38* 及び *Zdhhc19* の精巢内での発現は Loupe Cell Browser 3.3.1 (10X Genomics)を用いて解析した。

プラスミド

Tex38、*Zdhhc19*、および *Arrdc5* の ORF をマウス精巢 cDNA から増幅し、種々のエピトープタグを有する pCAG1.1 ベクター (Addgene, Plasmid #173685) のマルチクローニングサイトに挿入した。*Zdhhc19* (C142S) 発現ベクターは、KOD -Plus- Mutagenesis Kit (東洋紡) を用いてインバース PCR 法により作製した。クローニングおよびインバース PCR に用いたプライマー配列を上記表に示す。

HEK293T 細胞および COS-7 細胞へのトランスフェクション

HEK293T 細胞¹⁶ および COS-7 細胞 (#RCB0539、理研バイオリソースセンター) は、10%ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich) および 1%ペニシリン-ストレプトマイシン (ThermoFisher Scientific) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 中で、37°C・5% CO₂条件下で維持培養し、3~4 日ごとに継代した。HEK293T 細胞にはリン酸カルシウム法¹⁶を、COS-7 細胞には Polyethylenimine Max (Polysciences, Inc.) を用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクション後 24 時間培養し、タンパク質抽出または免疫染色に供した。

抗体作製

マウス ZDHHC19 のアミノ酸残基 332-347 (PGGPRQPTAEPAAAGDP) およびマウス BASIGIN のアミノ酸残基 94-112 (VGRSEINVEGPPIKVGKK) に対応する合成ペプチド (Sigma-Aldrich) をウサギに免疫してポリクローナル抗体を作製した。得られた抗血清から、合成ペプチドを結合させた SulfoLink Coupling Resin (Thermo Fisher Scientific) を用いて抗体を精製した。TEX38 に対するモノクローナル抗体は、マウス TEX38 (NP_083472.1) のアミノ酸残基 61-115 をコードする pGEX6p-1 ベクター (GE Healthcare) を BL21 (DE3) pLysS 大腸菌株 (Thermo Fisher Scientific) に導入し、N 末端 GST 融合 TEX38 タンパク質として発現させた。精製は Glutathione Sepharose 4B (GE

Healthcare) を用いて行い、PreScission Protease (Cytiva) で GST タグを除去した。得られたリコンビナントタンパク質を用いてラットを免疫し、ハイブリドーマを既報¹⁷の方法により樹立した。

交配試験

WT、*Tex38* KO あるいは *Zdhhc19* KO 雄マウス(8 週齢以上) と B6D2F1 の WT 雌マウス(8 週) を 3 ヶ月以上同居させ、妊孕性を評価した。試験期間中は毎朝プラグの有無を確認し、出産当日に産仔数をカウントした。

精巣の形態観察及び重量測定

雄マウスから精巣を採材し、実体顕微鏡 (Olympus、SZX7) により観察した。精巣重量は電子天秤 (エー・アンド・デイ、BM252) を用いて測定した。

精巣と精巣上体の PAS/ヘマトキシリン染色による組織学的解析

マウスから精巣と精巣上体を採材し、ブアン固定液 (PolyScience) に 2 時間以上浸漬させて固定した。エタノールで段階的に脱水し (70%、80%、90%、100%、100%)、キシレンに置換後、サンプルをパラフィン包埋した。包埋したサンプルはミクロトーム (MICROMHM325、Thermo Fisher Scientific) を用いて 10 μ m に薄切して MAS コートスライドガラス (松浪硝子工業株式会社) に張り付けた。その後キシレンによりパラフィンを除き、段階的に希釈したエタノールにつけた後、水で洗浄した。1%過ヨウ素酸ナトリウム (ナカライ) で 10 分処理し、シッフ試薬 (FUJIFILM Wako) で 20 分処理した。流水で洗浄後、Mayer's Hematoxylin 溶液 (FUJIFILM Wako) で 3 分間処理し、再び流水で洗浄後、エタノールで段階的に脱水し、キシレンに置換後、サンプルを封入した。染色像は光学顕微鏡 (Olympus、BX53) で観察した。

精子の形態観察

精巣上体尾部に切れ込みを入れてピンセットにより精子を採取し、TYH 培地¹⁸ のドロップに懸濁し、37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ の条件下で培養した。5 分後に MAS コートスライドガラス (松浪硝子工業株式会社) に精子を載せ、光学顕微鏡 (Olympus、BX53) で観察した。

精子運動性の測定

精子はそのままでは受精能を持たず、受精能の獲得には TYH 培地での培養が必要である。そこで精子の受精能獲得前後の運動能力を比較するため、培養して 10 分後と 2 時間後に、TYH 培地ドロップの上層から精子を採取した。チャンバー (Leja®, Standard Count 2 Chamber Slide 100 micron) に精子懸濁液を入れ、精子運動解析装置 (Hamilton Thorne, CEROSII) を用いて各種運動性パラメーター [平均速度: Average Path Velocity (VAP) μ m / 秒、直線速度: Straight-line Velocity (VSL) μ m / 秒、曲線速度: Curvilinear Velocity (VCL) μ m / 秒、前進運動率: $VSL/VAP \geq 0.8$ かつ $VAP \geq 50 \mu\text{m/sec}$] を解析した。

体外受精 (IVF)

B6D2F1 雌マウスに妊馬血清ゴナドトロピン (PMSG) (5 U、あすか製薬) を、さらに 48 時間後にヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) (5 U、あすか製薬) を腹腔内投与して、過排卵を誘起した。hCG を投与して 14 時間後に、B6D2F1 雌マウスから卵管を摘出し、卵管膨大部より卵子卵丘細胞複合体を採取して TYH 培地ドロップに入れた。卵丘細胞の除去のため、ヒアルロニダーゼ溶液 (Sigma-Aldrich、H4272-30MG、最終濃度 300 μ g/ml) で卵子卵丘細胞複合体を 5 分間処理した。また、透明帯の除去のためには、コラゲナーゼ (Merck、C1639-50MG、最終濃度 1 mg/ml) で 5 分間処理した。精子は受精能を獲得させるために TYH 培地で 2 時間の前培養を行い、卵子を含む TYH ドロップに媒精した(最終濃度: 2×10^5 精子/ml、透明帯を除去した場合のみ 2×10^4 精子/ml)。媒精の約 8 時間後、雌雄前核の有無を顕微鏡下で観察し、受精率を算出した。

雌性生殖管内における精子の観察

Tex38 KO あるいは *Zdhc19* KO マウスを、CAG/Su9-DsRed2 および Acr3-EGFP (RBGS) を発現するトランスジェニック (Tg) マウス¹⁹ と交配した。性成熟した B6D2F1 雌マウスに過排卵処置を行い、雄マウスと交配させた。プラグの形成を確認してから 4 時間後に、子宮から卵管までの生殖管を採取した。採取した生殖管をスライドガラスに載せ、BZ-X710 顕微鏡 (Keyence) を用いて観察した。

ウエスタンブロッティング

精巣、精巣上体尾部精子、および培養細胞は、1% Triton X-100 溶解バッファー [1% Triton X-100、50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1% (v/v) ホスファターゼ阻害剤カクテル (ナカライテスク)] 中で、4°C にてエンドオーバーエンド回転しながら 1 時間または一晩溶解した。その後、4°C で $15,300 \times g$ 、15 分間遠心し、得られた上清をタンパク質溶解液として回収した。タンパク質濃度は Bradford 法により測定した。

Minute plasma membrane protein isolation kit (Invent Biotechnologies 社、米国ミネソタ州 Plymouth) を用いて、精巣の膜タンパク質に富む画分を分離した。得られた細胞膜画分は、1% Triton X-100 溶解バッファー中で 4°C にてエンドオーバーエンド回転しながら 1 時間溶解した。その後、サンプルバッファー (終濃度; 63 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2 % SDS 溶液、10 % グリセロール、0.003% ブロモフェノールブルー) を加え、18G のシリンジを用いてホモジナイズした後に 95°C で 5 分間加熱してタンパク質を抽出した。

得られたタンパク質溶液は、最終濃度 5 % になるように 2-メルカプトエタノールを加えて 95°C で 5 分間加熱し、アクリルアミドゲル (アトー) を用いて SDS-PAGE を行った。泳動後のゲルはブロッティング装置 (Bio-Rad) を用いて PVDF 膜 (Merck Millipore) に転写した。転写後の膜を 10% スキムミルク (Becton Dickinson) で 30 分間ブロッキングし、一次抗体と 4°C で一晩反応させた。TBST [50mM Tris-HCL バッファー (pH6.8)、138mM NaCl、2.7mM KCl、0.1% Tween 20] で 5 分間 $\times$ 3 回洗浄後、HRP 標識二次抗体と 1 時間反応させた。TBST で 5 分間 $\times$ 3 回洗浄後、Chemi-Lumi one super (ナカライ) もしくは Chemi-Lumi one ultra (ナ

カライ) を用いて HRP 活性を検出した。使用した抗体は下記に示す。

Antibodies	Host	Source	Identifier	Method
anti-ZDHHC19 polyclonal	Rabbit	SIGMA custom	This study	IB/IF/IP
anti-TEX38 monoclonal	Rat	Shigei Medical Research Institute	This study	IB/IF/IP
anti-SYPL1 polyclonal	Rabbit	SIGMA custom	This study	IF
anti- β -actin	Mouse	abcam	ab6276	IB
anti- β -actin	Rabbit	MBL	PM053	IB
anti-IZUMO1	Rat	²⁰		IB/IF
anti-GM130 Clone 35	Mouse	BD Transduction Laboratories	#610822	IF
anti-CANX	Rabbit	²¹		IB
anti-tACE (ACE 1D5)	Mouse	²²		IB
anti-ADAM1B	Rat	²³		IB
anti-PRSS37	Rabbit	SIGMA	HPA020541	IB
anti-Basigin	Rabbit	SIGMA custom	This study	IB/IF
anti-Na ⁺ /K ⁺ -ATPase α 1	Rabbit	Invitrogen	MA5-32184	IB
anti-GAPDH (14C10)	Rabbit	Cell Signaling Technologies	#2118	IB
anti-MARK1	Rabbit	Proteintech	21552-1-AP	IB
anti-MARK2	Rabbit	Proteintech	15492-1-AP	IB
anti-MARK3	Rabbit	abcam	ab52626	IB
anti-MARK4	Rabbit	Proteintech	20174-1-AP	IB
anti-FLAG M2	Mouse	SIGMA	F1804	IB
anti-HA tag	Rabbit	MBL	#561	IB/IF
anti-ID4 tag	Mouse	A kind gift from Dr. Martin M. Matzuk		IB/IF
anti-ADAM3 (F-4)	Mouse	SantaCruz	sc-365288	IB
anti-rabbit IgG-HRP	Goat	Jackson ImmunoResearch	#111-036-045	IB
anti-rat IgG-HRP	Goat	Jackson ImmunoResearch	#112-035-167	IB
anti-mouse IgG-HRP	Goat	Jackson ImmunoResearch	#115-036-062	IB

anti-rabbit IgG-Alexa Fluor 488	Goat	Thermo Fisher Scientific	A-11070	IF
anti-rabbit IgG-Alexa Fluor 546	Goat	Thermo Fisher Scientific	A-11071	IF
anti-rat IgG-Alexa Fluor 488	Goat	Thermo Fisher Scientific	A-11006	IF
anti-rat IgG-Alexa Fluor 546	Goat	Thermo Fisher Scientific	A-11081	IF
anti-rat IgG-Alexa Fluor 647	Goat	Thermo Fisher Scientific	A-21247	IF
anti-mouse IgG-Alexa Fluor 546	Goat	Thermo Fisher Scientific	A-11003	IF
anti-mouse IgG-Alexa Fluor 488 Highly Cross-Adsorbed	Goat	Thermo Fisher Scientific	A-11029	IF

精子の免疫蛍光染色

精巣上体から採取した精子を PBS で希釈し、スライドガラス上で風乾した。乾燥後、4%PFA で室温 10 分間固定し、PBS で 3 回洗浄した。次に、3%ウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich) および 10%ヤギ血清を含む PBS で室温 1 時間ブロッキングした後、一次抗体と 4°Cで一晩反応させた。PBS で 3 回洗浄後、蛍光標識二次抗体 (1:1000) を室温で 2 時間反応させた。PBS で洗浄後、Hoechst 33342 (1:5000, ThermoFisher) で室温 5 分間染色し、PBS で洗浄した。Shandon Immu-Mount (Thermo Scientific) で封入し、光学顕微鏡 (Olympus BX53) で観察した。

精巣切片の免疫蛍光染色

精巣を 4%PFA で 4°C、3 時間固定した後、15%および 30%スクロースを含む PBS で置換した。OCT コンパウンド (サクラファインテックジャパン) 中に包埋後、液体窒素中で凍結し、クリオスタットで 10 μ m 厚の切片を作製した。切片を 42°Cで乾燥させた後、0.1% Triton X-100 で 15 分間透過処理した。次に、3%ウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich)、10%ヤギ血清、0.1% Triton X-100 を含む PBS で室温 1 時間ブロッキングし、一次抗体と 4°Cで一晩反応させた。PBS で洗浄後、蛍光標識二次抗体 (1:2000) および Alexa Fluor 568 標識 PNA Lectin (1:2000) を室温で 2 時間反応させた。PBS で洗浄後、Hoechst 33342 (1:5000, ThermoFisher) で 5 分間染色し、Shandon Immu-Mount (Thermo Scientific) で封入して観察した。

COS-7 細胞の免疫蛍光染色

トランスフェクション 18 時間後に細胞をカバーガラス上に再播種した。固定の 20 時間前に 0.1%ウシ胎児血清を含む DMEM (Sigma-Aldrich) で培養し、細胞周期を同調させた。4%PFA で室温 10 分間固定した後、PBS で 3 回洗浄し、0.1% Triton X-100 で 15 分間透過処理した。PBS で洗浄後、3%ウシ血清アルブミンおよび 10%ヤギ血清を含む PBS で室温 1 時間ブロッキングし、一次抗体と 4°Cで一晩反応させた。PBS で 3 回洗浄後、蛍光標識二次抗体 (1:1000) を室温で 2 時間反応させ、Hoechst 33342 (1:5000, ThermoFisher) で 5 分間染色した。PBS で洗浄後、Shandon Immu-Mount (Thermo Scientific) で封入し、光学顕微鏡 (Olympus BX53) で観察した。

共免疫沈降(co-IP)法

精巣もしくは培養細胞から溶解バッファー [1 % Triton X-100 (ナカライ)、1 % Protease inhibitor (ナカライ)、50 mM NaCl、20 mM Tris-HCl pH 7.4] を用いてタンパク質を抽出した。抽出液は 15,300 g で 5 分間遠心し、上清を得た。上清を、一次抗体をあらかじめコンジュゲートした Dynabeads (#10009D, Thermo Fisher Scientific) と 4°Cで 60 分間反応させた。洗浄液 (0.1 % Triton X-100、10 % グリセロール、150 mM NaCl、40 mM Tris-HCl pH 7.4) を用いて Dynabeads を 3 回洗浄した後、溶出バッファー (132 mM Tris HCl pH 7.4、4% SDS、20% glycerol、0.01% Bromophenol Blue) で処理した。溶出後のサンプルはウエスタンブロッティングあるいは大阪大学微生物病研究所質量分析コアにて LC-MS/MS 解析に供した。

透過型電子顕微鏡 (Transmission electron microscopy; TEM) を用いた精子尾部の微細構造観察

先行研究に従って実施した²⁴。具体的には、深麻酔下[1.3 mL/kg ドミトール (日本全薬工業)、5.3 mL/kg ドルミカム (丸石製薬)、3.3 mL/kg ベトルファール (明治アニマルヘルス株式会社)]で、4%PFA を用いて灌流固定後、精巣と精巣上体を採材し、4%PFA 中に 4°Cで 6 時間浸漬した。組織は安全カミソリで 2 mm×2 mm×2 mm にスライスし、1%グルタルアルデヒド溶液 (30 mM HEPES pH 7.8) に 4°Cで一晩浸漬し、30 mM HEPES で 3 回 (各 5 分間) 洗浄した。その後、組織片を、1% OsO₄ および 0.5%フェロシアン化カリウムを含む溶液 (30 mM HEPES) で室温 1 時間固定した。蒸留水で洗浄した後、試料を氷上で 50、70、90% エタノール溶液を用いて段階的に脱水し、さらに室温で 10 分間、100%エタノールを用いて脱水させた。脱水したサンプルを 100%プロピレンオキシド (PO) 中で 5 分間処理した後、PO とエポキシ樹脂の混合液に置換し、室温で 1 時間培養した。その後、組織はエポキシ樹脂混合物中に 2 回、室温で 1 時間ずつ浸漬し、60°Cで 2 日間包埋した。80 nm の超薄切片を作製し、2%酢酸ウラニル溶液で 30 分間染色した後、蒸留水で 3 回洗浄し、さらに鉛染色液で 2 分間染色した。蒸留水で 3 回洗浄した後、CCD Veleta 2K×2K カメラ (オリンパス) を備えた JEM-1400 plus 電子顕微鏡 (JEOL) を用いて、80kV で観察した。

AlphaFold 3 を用いた構造予測

TEX38-ZDHHC19 ヘテロ二量体および ZDHHC19 の自己アシル化中間体と複合体を形成

した TEX38 の三次元構造は、AlphaFold 3²⁵ を用いて予測した。得られた構造は UCSF ChimeraX²⁶ を用いて可視化した。

Acyl-MfTag-exchange (AME) アッセイ

タンパク質のパルミトイル化は、Protein S-Palmitoylation Detection Kit (RapidsPALM、BioDynamics Laboratory Inc.、日本) を用いて検出した。培養細胞を用いた解析では、発現ベクター導入 24 時間後に細胞を回収した。得られたタンパク質試料を、ヒドロキシルアミンを添加しない「非切断群 (ネガティブコントロール)」と、ヒドロキシルアミンを添加して MfTag 標識を行う「切断群」に分けて反応させた。

Acyl-Biotin-exchange (ABE) アッセイ

ABE アッセイは既報²⁷に従って実施した。マウス精巣からタンパク質を、4% SDS 緩衝液 [4% (w/v) SDS、50 mM Tris、5 mM EDTA (pH 7.4)、および 1% (v/v) プロテアーゼ阻害剤カクテル (ナカライテスク)] を用いて抽出した。200 μ g の精巣タンパク質を ABE アッセイに供し、得られたサンプルを大阪大学微生物病研究所質量分析コアにて LC-MS/MS 解析に供した。パルミトイル化スコアは、ヒドロキシルアミン (+) 条件と (-) 条件の比として算出した。フォールド変化を求める際には、ゼロ除算を避けるために各スペクトルカウント値に 0.1 を加えた。

統計解析

平均値は少なくとも 3 回以上の独立した実験結果から計算した。統計解析は Welch's t-test を用いて行い、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ のときに有意差があるとみなした。エラーバーは標準誤差を示す。

結果

第一節 TEX38 はマウスの精子頭部の形成と雄性妊孕性に必須である。

TEX38 は、アミノ酸残基 4–26 に疎水性領域を有し、この領域は SMART 解析により膜貫通ドメインとして予測された (図 1-1A)。マウス各組織由来 cDNA を用いた RT-PCR 解析の結果、*Tex38* の発現が精巣で認められた (図 1-1B)。さらに、*Tex38* の発現は生後 18–21 日のマウス精巣 cDNA から検出され、この時期はマウス精子形成における減数分裂後期に相当する (図 1-1C)。

Tex38 の生理的機能を *in vivo* で検証するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて *Tex38* 遺伝子のコード領域を挟む 2 本の gRNA を設計し、1,458 bp の欠失を有する *Tex38* KO マウスを作製した (図 1-1D)。ゲノム PCR およびサンガーシーケンスにより欠失領域を確認した (図 1-1D 及び E)。*Tex38* KO マウスは成長や外観、行動に明らかな異常を示さなかったが、野生型雌との交配実験において交尾は正常に行われたものの、2 か月間の交配期間中に産仔を得ることができなかった (図 1-1F)。これらの結果から、*Tex38* は雄性生殖能に必須であることが示された。

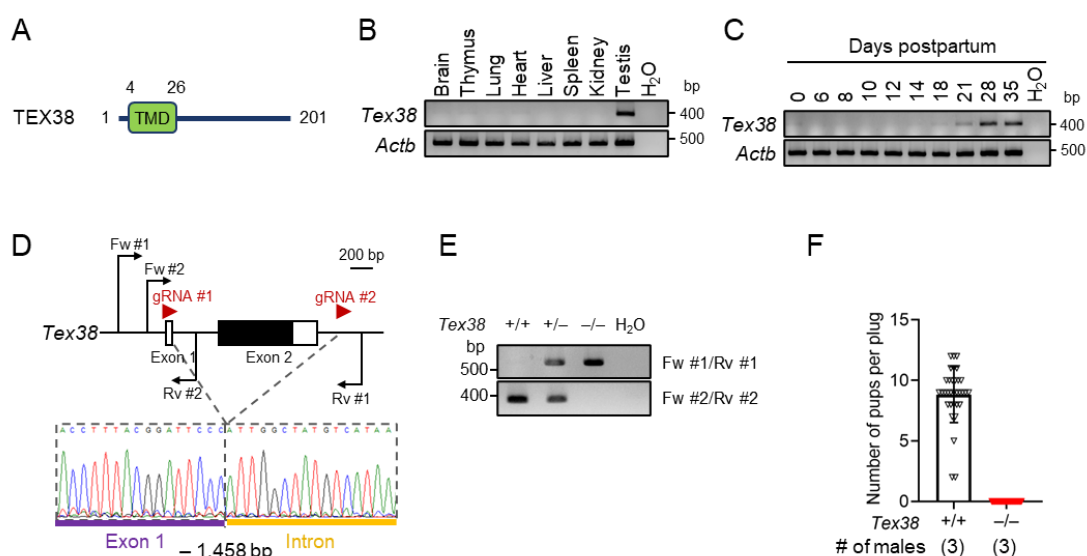


図 1-1. *Tex38* KO マウスの作製および表現型解析 (A) TEX38 の膜貫通ドメイン (TMD) を SMART (https://smart.embl.de/smart/change_mode.cgi) を用いて予測した。(B) 成熟マウスの各種組織から抽出した RNA を用いた *Tex38* の RT-PCR 解析。*Tex38* は主に精巣で強く発現していた。*Actb* をローディングコントロールとして用いた。(C) 生後 0 日から 35 日までのマウス精巣 RNA を用いた *Tex38* の RT-PCR 解析。(D) CRISPR/Cas9 システムを用いた *Tex38* KO マウス作製の概略図。白塗り領域および黒塗り領域はそれぞれ非翻訳領域およびタンパク質コード領域を示す。赤で示した領域は設計した gRNA 配列を示す。Fw および Rv は遺伝子型判定に用いたフォワードおよびリバースプライマーを示す。サンガーシーケンス解析により、欠損アレルにおいて 1,458 bp の欠失が確認された。(E) *Tex38* KO マウスの遺伝子型判定。図 1-1 (D) に示すように、KO アレルの検出には Fw #1 および Rv #1 プライマーを、WT アレルの検出には Fw #2 および Rv #2 プライマーを使用した。(F) 一交尾あたりの産仔数。雄マウスと 3 匹の WT 雌マウスを 3 ヶ月間同一ケージで飼育した。

雄性不妊の原因を明らかにするため、*Tex38* KO マウスの精巣、精巣上体および精子の形態学的解析を行った。精巣重量に有意な差は認められなかった (図 1-2A)。精子形成を詳細に評価するため、PAS (Periodic Acid-Schiff) /ヘマトキシリン染色により精巣切片を観察した。コントロールでは精細管ステージ VIII~IX で伸長精子細胞が管腔内に放出されていたのに対し、*Tex38* KO マウスでは円形精子細胞が精細管内に残存していた (図 1-2B)。また、*Tex38* KO マウスの精巣上体尾部では、変性した精子細胞と考えられる円形細胞が観察された (図 1-2C)。精子の鞭毛構造に顕著な異常は見られなかったが、精子頭部が後方へ折れ曲がる異常が認められた (図 1-2D)。

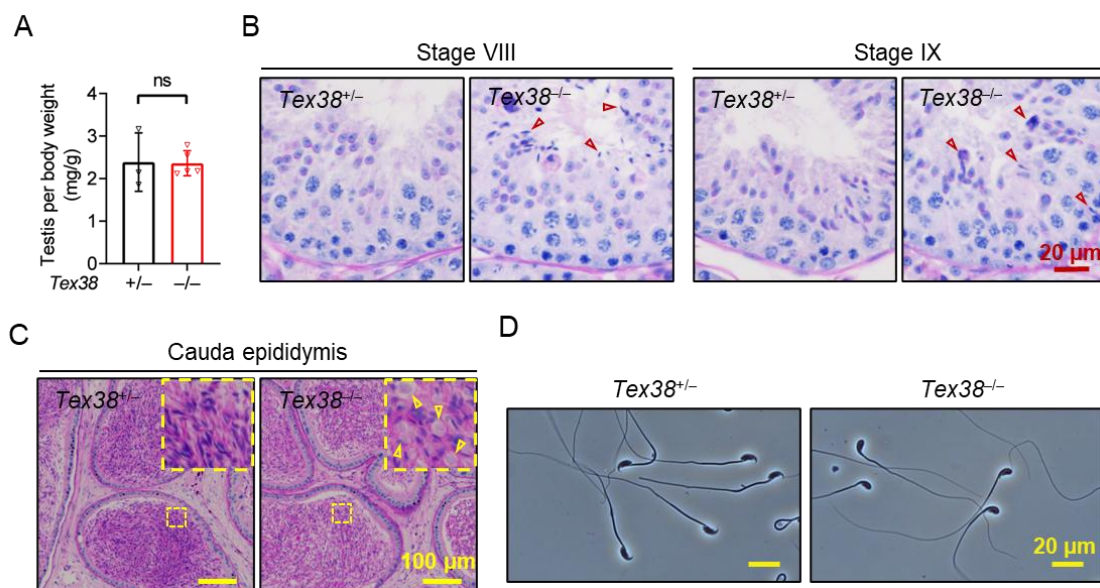


図 1-2. *Tex38* KO マウスの組織学的解析 (A) 体重に対する精巣重量比。(B) 精巣切片の PAS/ヘマトキシリン染色像。赤矢頭は残存した精子を示す。(C) *Tex38*^{+/+}および *Tex38* KO マウスの精巣上体尾部の PAS/ヘマトキシリン染色像。(D) *Tex38*^{+/+}および *Tex38* KO マウスの精巣上体尾部精子の形態観察。

複数の先行研究により、精子頭部における「細胞質滴 (cytoplasmic droplet; CD)」の異常形成と、頭部の屈曲異常との間に因果関係があることが報告されている (11–15)。CD は、小胞体やゴルジ体に由来する小胞状膜構造からなる残余細胞質の一部であり、脊椎動物の精子に広く保存されている^{28–30}。精子が精細管腔内に放出された後、CD は精子頭部から鞭毛方向へと移動することが知られている³¹。免疫蛍光解析の結果、CD マーカーである SYPL1³²の強いシグナルが *Tex38* KO マウスの屈曲した精子頭部に検出されたのに対し、対照群では SYPL1 が中片部と主片部の接合部に局在していた (図 1-3A)。このことから、*Tex38* KO 精子では CD の形成異常に加え、頭部の残存細胞質が異常に保持されていること示唆された。

さらに、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて精子の微細構造を観察したところ、*Tex38* KO 精子の頭部に異常に保持された細胞質が確認された (図 1-3B)。また、細胞膜が屈曲頭部から尾部中片部へ繋がっている像が観察された (赤矢頭, 図 1-3B)。この所見は、異常な残存細胞質が頭部構造の安定性を損なっている可能性を示唆している。興味深いことに、屈曲した精子は *Tex38* KO マウスの精巣内ではほとんど観察されなかった。しかし、精子が精巣上体の頭部から体部、尾部へ移行する過程で、精子頭部屈曲を呈する割合が段階的に増加した (図 1-3C 及び D)。これは、CD が精子頭部から鞭毛へと移動する時期と一致している。以上の結果から、*Tex38* KO マウスでは細胞質除去機構の破綻が生じており、これが精子頭部屈曲の主因となっている可能性が示唆された。

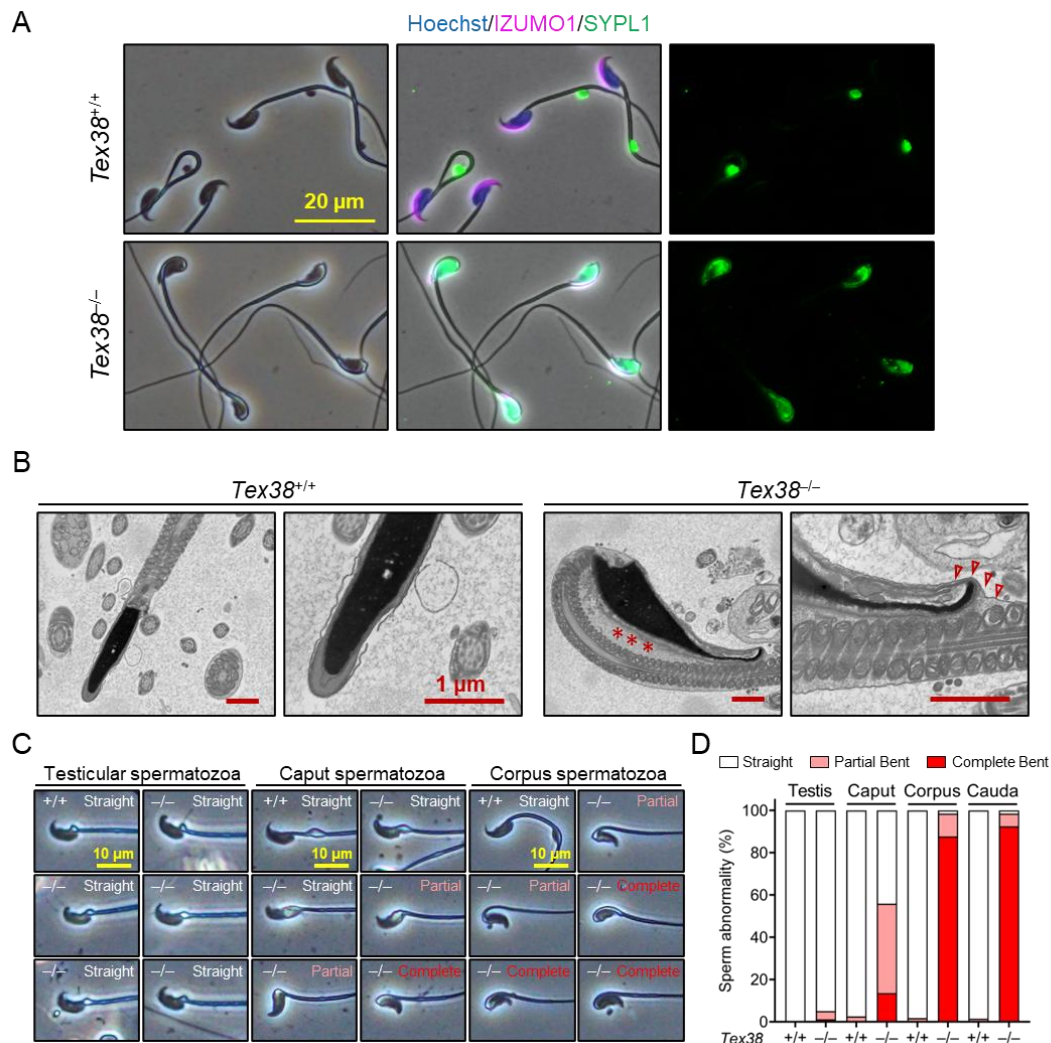


図 1-3. *Tex38* KO 精子の解析 (A) WT および *Tex38* KO 精子における IZUMO1 (マゼンタ) および SYPL1 (緑) の免疫染色。IZUMO1 および SYPL1 はそれぞれ先体および細胞質滴 (CD) のマーカーとして用いた。核は Hoechst 33342 (青) で染色した。

(B) 透過型電子顕微鏡 (TEM) による *Tex38* KO マウスの精巣上部尾部精子の観察。精子頭部には細胞質の残存が観察され (赤アスタリスク)、細胞膜が屈曲頭部から尾部中片部へ繋がっている様子が認められた (赤矢頭)。

(C) 精巣および精巣上部頭部、体部、尾部由来の精子を、形態に基づいて「直線 (Straight)」 「部分的な屈曲 (Partial)」 「完全な屈曲 (Complete)」 の 3 群に分類した。

(D) WT および *Tex38* KO 雄マウス (n=3) における頭部異常精子の割合。頭部屈曲は精巣内精子ではほとんど観察されなかったが、精巣上部体部および尾部では多数の屈曲精子を認めた。

第二節 *Tex38* の欠損は子宮卵管接合部 (UTJ) における精子の通過異常を引き起こす。

Tex38 KO 精子の表現型をさらに評価するために、精子運動解析システム (CASA) を用いて精子運動性を調べた。受精能獲得を誘導する TYH 培地で 10 分 (受精能獲得前) および 120 分間 (受精能獲得後) 培養したところ、運動精子率および先進運動率は、10 分および 120 分間培養のいずれも *Tex38*^{+/+} 対照群と比較して有意に低下していた (図 1-4A 及び B)。さらに、平均速度 (VAP) および直線速度 (VSL) などの運動パラメータも *Tex38* KO 精子で低下していた (図 1-4C)。

次に、*Tex38* KO 精子の受精能を評価するために、卵丘細胞を保持した卵子 (卵丘付き卵子)、ヒアルロニダーゼ処理により卵丘細胞を除去した卵子 (卵丘除去卵子)、およびコラゲナーゼ処理により卵丘細胞と透明帯のいずれも除去した卵子 (透明帯除去卵子) を用いて体外受精 (IVF) を行った。その結果、野生型精子はすべての条件で一定の受精率を示したのに対し、*Tex38* KO 精子はすべての条件下で受精しなかった (図 1-4D、E 及び F)。*Tex38* KO 精子が呈した精子頭部形態および運動能力の異常が、体外における受精不全の原因であると考えられる。

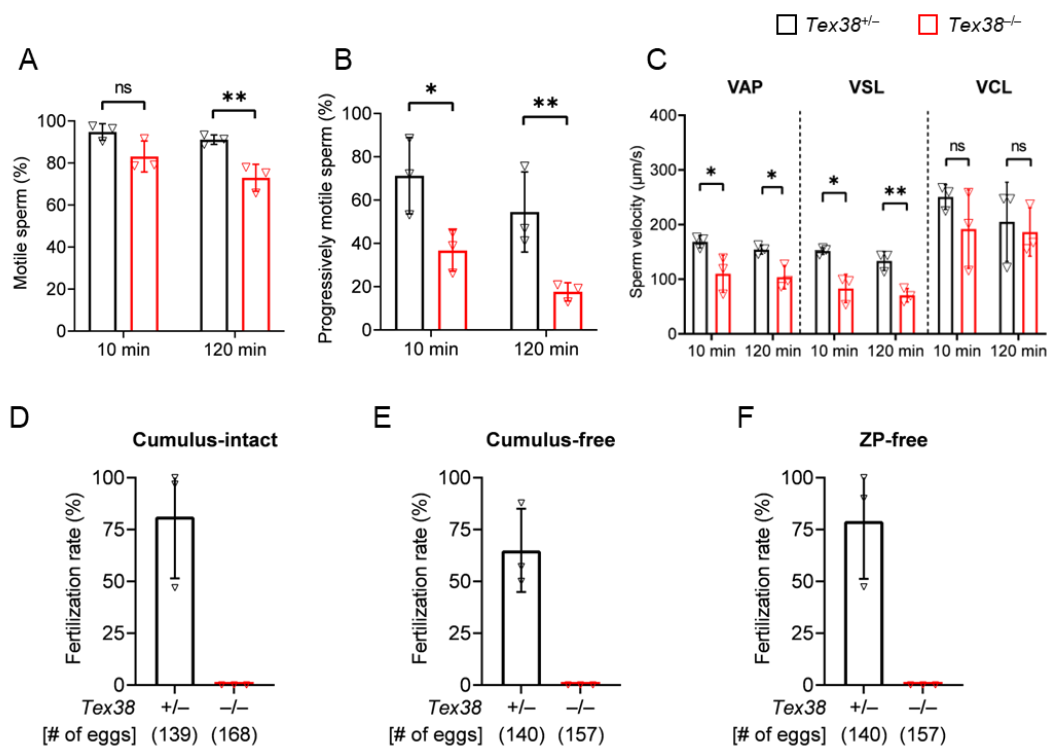


図 1-4. *Tex38* KO 精子の運動性及び受精能の評価。(A) TYH 培地中で培養後 10 分および 120 分における運動精子の割合。(B) 培養 10 分および 120 分における前進運動精子の割合。(C) 平均速度 (VAP)、直線速度 (VSL)、および曲線速度 (VCL) を評価した。(D) 卵丘細胞を保持した卵子を用いた体外受精の受精率。(E) 卵丘細胞を除去した卵子を用いた体外受精の受精率。(F) 透明帯を除去した卵子を用いた体外受精の受精率。

子宮卵管接合部 (UTJ; Uterotubal junction) は精子が卵管内を移行して受精するために通過しなければならない障壁として存在する。そこで、*Tex38* KO 精子が UTJ を通過できるかどうかを検討するため、ミトコンドリアに赤色蛍光タンパク質である DsRed2 を発現する Red Body Green Sperm (RBGS) トランスジェニック (Tg) マウスと掛け合わせた *Tex38* KO RBGS マウスを用いて解析を行った¹⁹。その結果、対照群の精子は UTJ を通過したのに対し、*Tex38* KO 精子は卵管内でほとんど検出されなかった (図 1-5A)。

次に、UTJ 通過に重要な精子頭部タンパク質 ADAM3 関連分子の発現をウェスタンブロッティングにより評価した^{22,33}。その結果、*Tex38* KO 精子では ADAM3 および tACE (testis angiotensin-converting enzyme) の発現が低下し、PRSS37 が異常に残存していた (図 1-5B 及び C)。tACE は精巣特異的に発現する ACE のアイソフォームで、ADAM3 の精子頭部表面への適切な局在に関与することが知られている³⁴。また、PRSS37 は精巣上体における ADAM3 のプロセッシングに関与することが知られている^{35,36}。これらの異常なタンパク質発現は、細胞質除去や頭部形成の異常に由来する精子プロテオームの変化を反映している

可能性があると考えられる。以上の結果から、in vivo での *Tex38* KO マウスの雄性不妊は、UTJ 通過不全によるものと考えられる。

さらに、*Tex38* KO 雄の不妊が顕微授精 (ICSI) により回復可能かを検討した。*Tex38* KO 精子頭部を 71 個の卵子に注入したところ、31 個の 2 細胞期胚が得られた。これらの胚を偽妊娠雌の卵管に移植した結果、KO アレルを有する健康な仔マウスが 2 匹得られた (図 1-5D、E 及び F)。これらの結果から、*Tex38* KO 雄の不妊は ICSI により回復可能であることが示された。

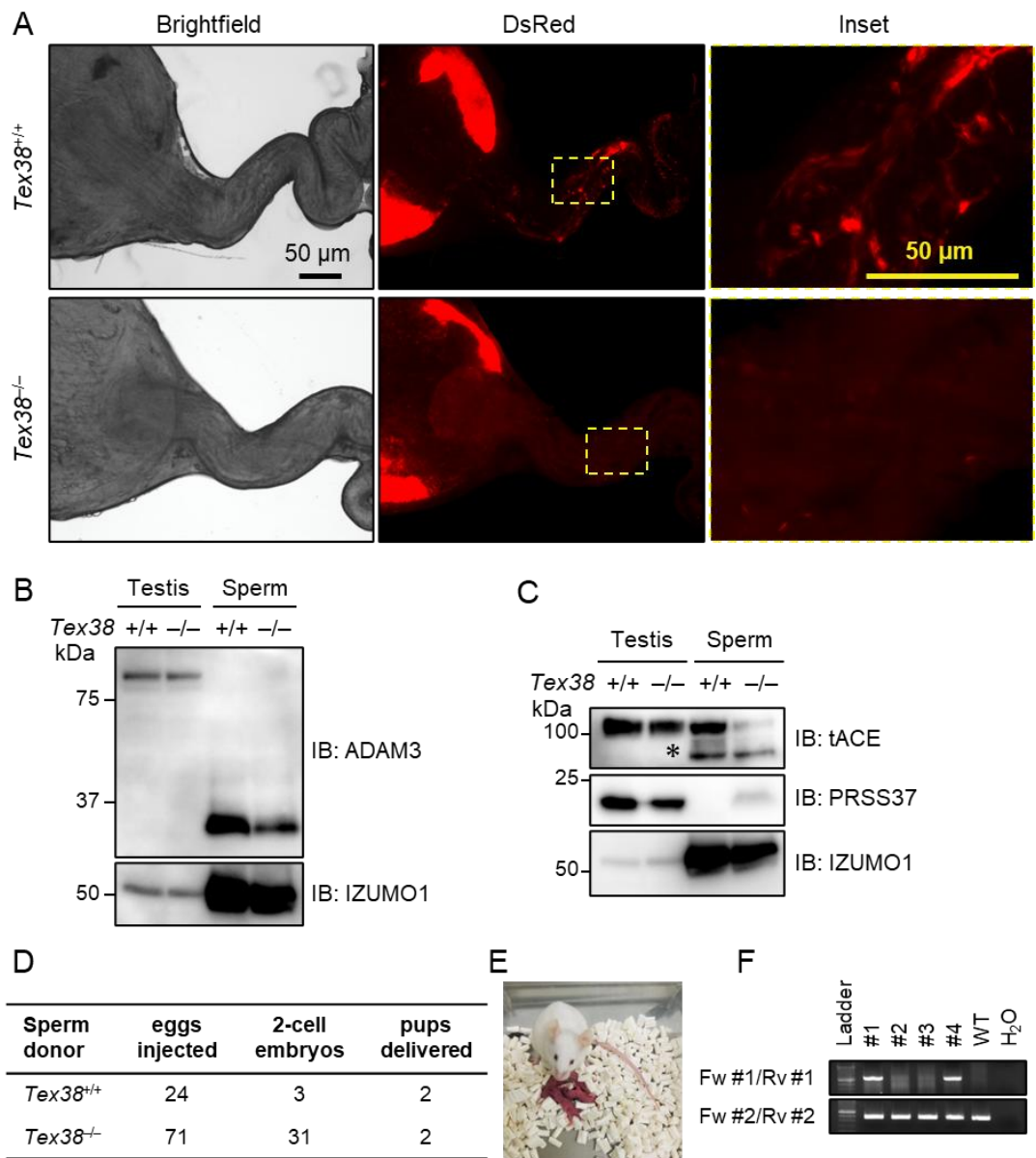


図 1-5. *Tex38* KO 精子の UTJ 通過能の評価。 (A) 雌生殖路における RBGS トランスジェンを発現する WT および *Tex38* KO 精子の観察。右のパネルは中央パネルの黄色点線枠部分の拡大像。(B) 精巣および精巣上体尾部精子における ADAM3 のウェスタンブロッティング解析。IZUMO1 をローディングコントロールとして用いた。(C) WT および *Tex38* KO マウスの精巣および精巣上体尾部精子における各種タンパク質のウェスタンブロッティング解析。黒いアスタリスクは非特異的バンドを示す。(D) *Tex38* KO 精子を用いた顕微授精 (ICSI)。用いた卵子数、2 細胞期胚数、得られた仔マウス数を示す。(E) ICSI により得られた仔マウス。(F) ICSI で得られた仔マウスの遺伝子型判定結果。*Tex38* KO マウス由来の KO アレル (Fw #1/Rv #1) を有するマウスが 2 匹得られた。

第三節 TEX38 は ZDHHC19 と相互作用し、*Zdhhc19* KO マウスは *Tex38* KO マウスと類似した表現型を示す。

TEX38 の相互作用タンパク質（インタラクトーム）を同定するため、抗 TEX38 抗体を用いた免疫沈降（co-immunoprecipitation, co-IP）を行い、得られたタンパク質複合体を質量分析（MS）によって解析した。その結果、*Tex38* KO 精巣と比較して WT 精巣で 5 倍以上のペプチドが検出されたタンパク質が 10 種類同定された（図 1-6A）。その中には微小管結合調節キナーゼ（MARK; Microtubule Affinity-Regulating Kinase）ファミリー（MARK1-4）および翻訳後修飾の一種である S-パルミトイル化を触媒するアシルトランスフェラーゼ ZDHHC19 が含まれていた¹¹。精巣タンパク質を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、MARK1-4 のタンパク質量は *Tex38* KO と WT でほぼ同等であったが、ZDHHC19 の量は *Tex38* KO 精巣で著しく減少していた（図 1-6B）。興味深いことに、*Zdhhc19* の欠損によって精子頭部の折れ曲がりが生じることが以前に報告されており¹²、*Tex38* KO マウスの表現型と類似している。

そこで、*Tex38* と *Zdhhc19* の関係を明らかにする目的でさらに解析を進めた。既報の scRNA-seq データ³⁷によると、*Tex38* と *Zdhhc19* はいずれも円形精子細胞で発現ピークを示すことが分かった（図 1-6C）。精巣タンパク質を用いた co-IP およびウエスタンブロッティングの結果、質量分析の結果と一貫して、TEX38 と ZDHHC19 の相互作用を確認することができた（図 1-6D）。

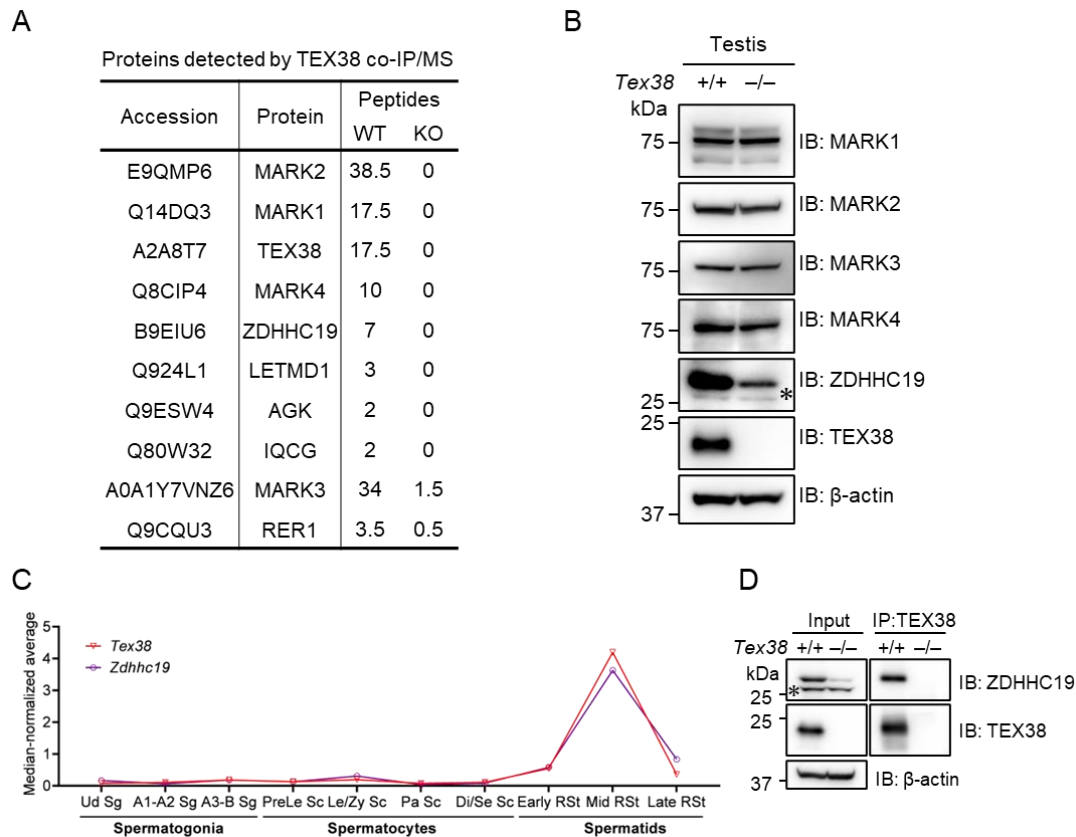


図 1-6. TEX38 の相互作用タンパク質の探索。(A) TEX38 抗体を用いた co-IP/MS 解析 (FC > 5)。抗体由来と考えられる IgG に相当するタンパク質はリストから除外した。(B) co-IP/MS により同定した、TEX38 相互作用タンパク質のウェスタンブロッティング。 β -actin をローディングコントロールとして用いた。黒いアスタリスクは非特異的シグナルを示す。(C) scRNA-seq データセット³⁷に基づく、マウス精子形成系列における *Tex38* および *Zdhhc19* の発現プロファイル。(D) 精巣組織における TEX38 と ZDHHC19 の相互作用の検証。TEX38 の免疫沈降物に ZDHHC19 が共沈した。 β -actin をローディングコントロールとして用いた。黒いアスタリスクは非特異的なバンドを示す。

TEX38 と ZDHHC19 の関係をさらに解析するため、*Zdhhc19* のコード領域を挟む 2 つの gRNA を用いて *Zdhhc19* KO マウスを作製した (図 1-7A)。ゲノム PCR およびサンガーシーケンスにより、10,075 塩基対の欠失が確認された (図 1-7A 及び B)。さらに、KO 精巣および精子における ZDHHC19 の欠失をウェスタンブロッティングで確認した (図 1-7C)。また、レスキュー実験を目的として、精巣特異的プロモーターである *Clgn* プロモーターの下流に N 末端 HA タグ付き ZDHHC19 を発現するトランスジェニックマウスを作製

した（図 1-7D 及び E）。交配試験を行ったところ、先行研究と同様に *Zdhhc19* KO 雄は不妊を呈した（図 1-7F）[10, 11]。 *Zdhhc19* KO;Tg では生殖能力が回復したことから（図 1-7F）、オフターゲット欠損の影響によるものではなく、 *Zdhhc19* が雄性妊孕性に必須であることが示された。

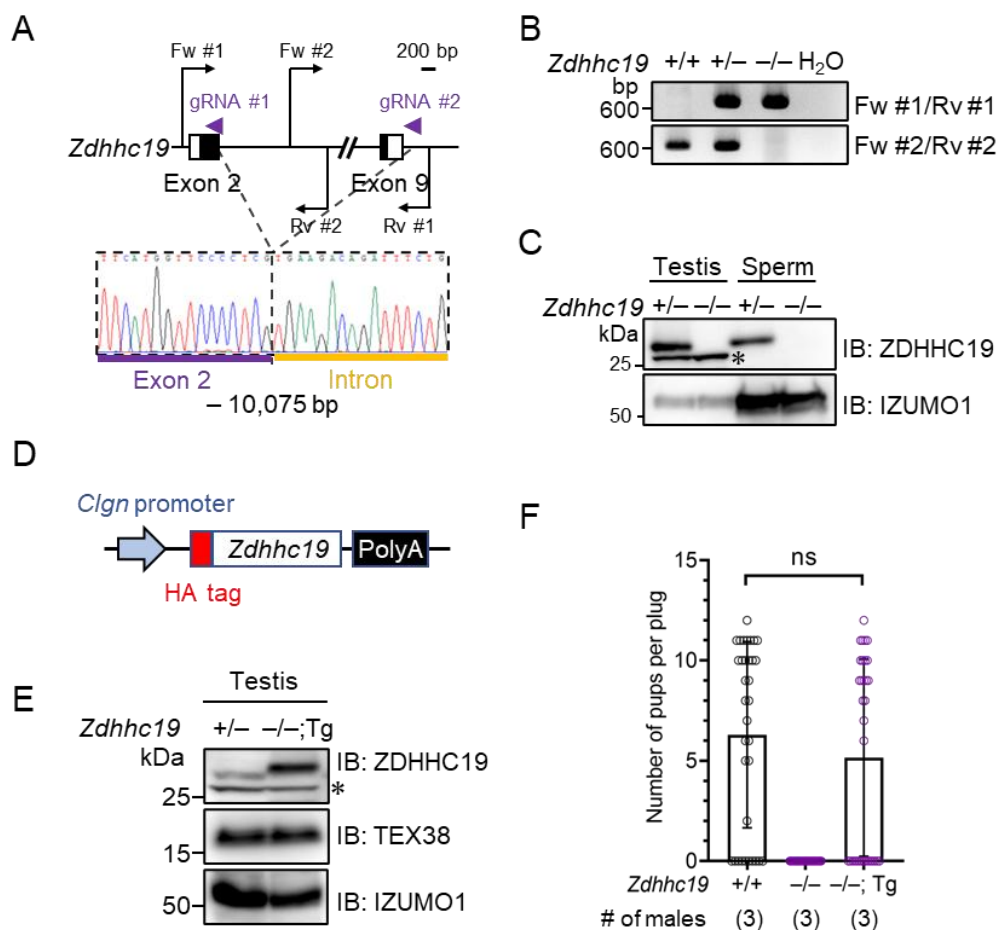


図 1-7. *Zdhhc19* KO マウスの作製。(A) CRISPR/Cas9 システムを用いた *Zdhhc19* KO マウス作製の概略図。白いボックスは非翻訳領域、黒いボックスはタンパク質コード領域を示す。紫色のバーは gRNA を示す。Fw および Rv は、それぞれジェノタイピングに用いたプライマーを示す。KO アレルでは 10,075 bp の欠失がサンガーシーケンスにより確認された。(B) *Zdhhc19* KO マウスの遺伝子型判定。図 1-7A に示すように、Fw #1 および Rv #1 プライマーで KO アレルを、Fw #2 および Rv #2 プライマーで WT アレルを検出した。(C) WT および *Zdhhc19* KO マウスの精巣および精巣上体尾部精子における ZDHHC19 のウエスタンブロッティング解析。IZUMO1 をローディングコントロールとして解析した。黒いアスタリスクは非特異的バンドを示す。(D) *Clgn* プロモーター下で N 末端に HA タグを付加した *Zdhhc19* を発現するトランスジーン構築。トランスジーンは前核注入法によりマウス受精卵に導入した。(E) 精巣における ZDHHC19 のウエスタンブロッティング解析。*Zdhhc19* KO;Tg 精巣では ZDHHC19 の発現量が回復した。黒いアスタリスクは非特異的バンドを示す。(F) 交配試験の結果。交尾あたりの産仔数を示している。

次に、*Zdhhc19* KO マウスの表現型について詳しく解析を行った。*Zdhhc19* KO マウスでは精巣の外観や重量に顕著な変化は認められなかった (図 1-8A 及び B)。また、*Tex38* KO マウスで観察された表現型と同様に、*Zdhhc19* KO マウスにおいても、精子頭部の屈曲と、頭部残余細胞質の不完全除去が観察された (図 1-8C)。PAS/ヘマトキシリン染色により精巣及び精巣上体切片の組織学的観察を行ったところ、ステージ VIII 精細管における精子の残留 (図 1-8C) が認められ、精巣上体尾部では異常な円形精子様細胞 (図 1-8C) が確認された。また、CASA を用いて精子運動能力を評価したところ、*Zdhhc19* KO マウスで有意に低下していた (図 1-8E-G)。

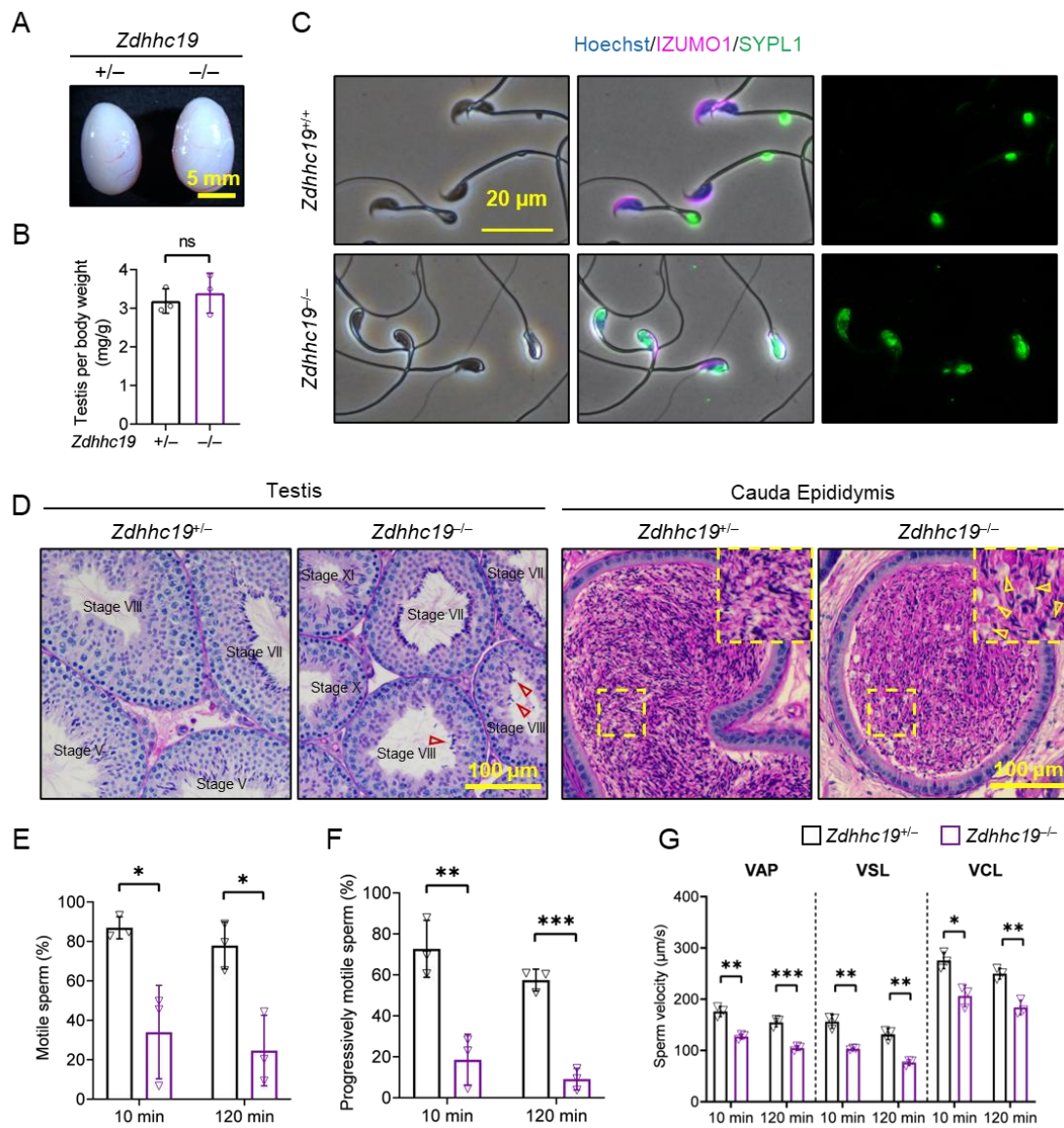


図 1-8. *Zdhhc19* KO マウスの表現型解析。 (A) *Zdhhc19* $+/-$ および *Zdhhc19* KO マウスの精巣外観。 (B) *Zdhhc19* $+/-$ および *Zdhhc19* KO マウスにおける体重あたりの精巣重量。 (C) WT および *Zdhhc19* KO 精子における IZUMO1 (マゼンタ) および SYPL1 (グリーン) の免疫染色。 IZUMO1 および SYPL1 はそれぞれ先体および CD のマーカーとして用いた。核は Hoechst 33342 (青) で可視化した。 (D) *Zdhhc19* HE および *Zdhhc19* KO マウスの精巣および精巣上体のパラフィン切片における PAS/ヘマトキシリン染色。赤い矢頭は精細管腔内に異常に残存した精子を示し、黄色の矢頭は変性した精子細胞と考えられる円形細胞を示す。 (E) TYH 培地に 10 分および 120 分間培養した後の運動精子の割合。 (F) 同条件での前進運動精子の割合。 (G) 同条件での精子の VAP、VSL、および VCL。

さらに、精子頭部の形態についてより詳細に観察を行った。精巣上体精子の TEM 解析により、*Zdhhc19* KO 精子頭部に細胞質が残存していることが確認された (図 1-9A)。また、精子が精巣で形成されたのちに精巣上体頭部から体部、尾部へ移行する過程で、頭部屈曲を呈する精子の割合が段階的に増加していた (図 1-9B 及び C)。これらの観察結果は *Tex38* KO 精子で観察された表現型と一致している (図 1-3B、C 及び D)。

さらに、精巣の超薄切片を用いた TEM 解析により、WT ではステップ 15-16 精子細胞の頭部尾部結合部 (頸部) に局在する細胞質が、*Zdhhc19* KO マウスでは頭部に異常に残存していることが確認された (図 1-9D 及び E)。これらの結果から、*Zdhhc19* KO においても精子完成期における細胞質除去異常が示唆された。

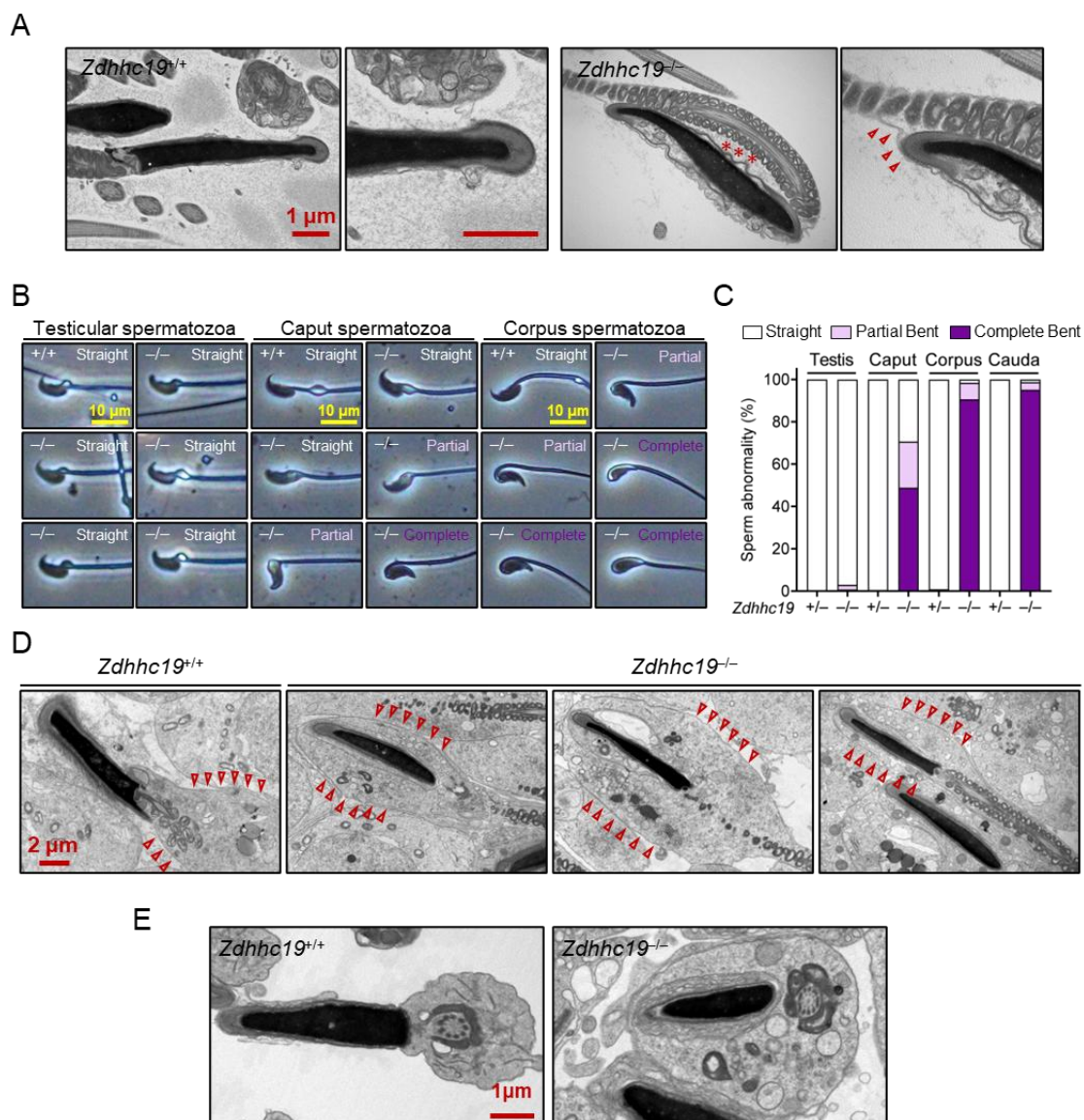


図 1-9. *Zdhhc19* KO 精子の形態観察。(A) 精巣上体尾部精子の TEM 像。精子頭部周囲に細胞質の残存が観察された（赤いアスタリスク）。また、細胞膜が屈曲頭部から尾部中片部へ繋がっている様子が認められた（赤い矢頭）。(B) 精巣および精巣上体頭部・体部・尾部の精子形態を、直線（Straight）、部分的な屈曲（Partial）、完全な屈曲（Complete）の 3 群に分類した。(C) 精巣および精巣上体（頭部・体部・尾部）における精子頭部異常の割合。(D) TEM による伸長精子細胞の観察。赤い矢頭は細胞質を示す。(E) 精巣内の精子細胞の TEM 観察。*Zdhhc19* KO 精子細胞では、残存細胞質が核周囲に異常に保持されていた。

Zdhhc19 KO マウスに Red Body Green Sperm (RBGS) トランスジーンを導入して解析したところ、KO 精子は子宮卵管接合部 (UTJ) をほとんど通過できなかった (図 1-10A)。また、UTJ 通過に関与する ADAM3 および関連タンパク質のプロセッシングや発現量にも異常が認められた (図 1-10B 及び C)。一方、ADAM3 経路とは無関係な精子頭部膜タンパク質 ADAM1B も未成熟型のまま部分的に残存していた (図 1-10C)。さらに、精子尾部膜タンパク質 BASIGIN が、*Zdhhc19* KO 精子では頭部に異常局在していた (図 1-10D)。これらの結果から、ADAM3 関連タンパク質の異常に限定されず、残余細胞質の保持や精子頭部形態の異常によって精子プロテオーム全体が変化し、精子機能が損なわれている可能性が示唆された。

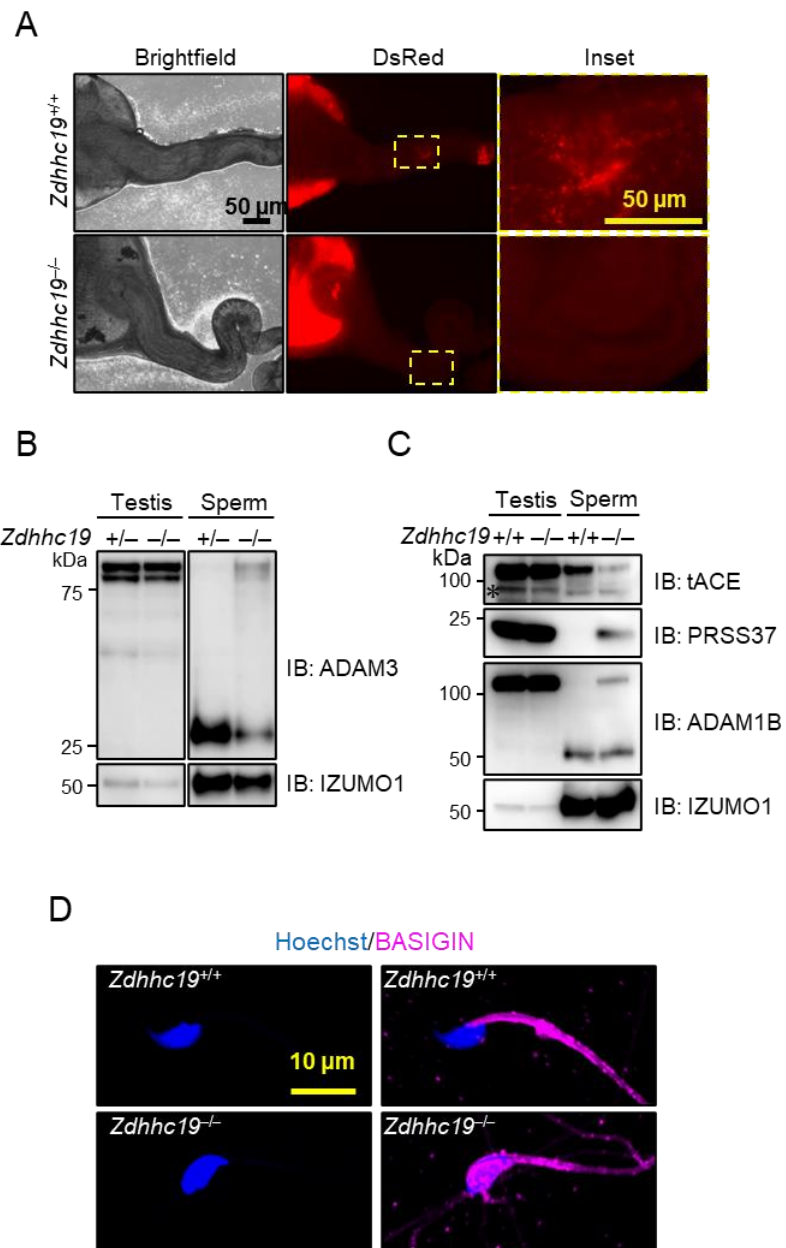


図 1-10. *Zdhhc19* KO 精子の UTJ 通過能の評価。 (A) 雌性生殖路における RBGS トランスジーンを発現する WT および *Zdhhc19* KO 精子の観察。右のパネルは、中央パネルの黄色の点線枠内を拡大した像。(B) *Zdhhc19*^{+/+} および *Zdhhc19* KO マウスの精巣および精巣上体尾部精子における ADAM3 のウエスタンブロッティング解析。IZUMO1 はローディングコントロールとして解析した。(C) WT および *Zdhhc19* KO マウスの精巣および精巣上体尾部精子における各種タンパク質のウエスタンブロッティング解析。黒いアスタリスクは非特異的バンドを示す。(D) WT および *Zdhhc19* KO マウスの精巣上体尾部精子における BASIGIN の免疫染色像。核は Hoechst 33342 (青) で染色した。

第四節 ZDHHC19 は精子細胞の細胞膜で TEX38 と共局在し、互いを安定化させる。

ZDHHC19 が TEX38 結合タンパク質であり、KO マウスが同様の表現型を示すことから、両者のタンパク質レベルにおける関係性に着目した。精巣ライセートを用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、*Zdhhc19* KO 精巣では TEX38 が著しく減少し、逆に *Tex38* KO 精巣では ZDHHC19 が有意に減少することが分かった (図 1-11A 及び B)。これらの結果は、両者が互いに依存する関係にあることを示唆している。さらに、HEK293T 細胞に ZDHHC19 および TEX38 をそれぞれ単独または同時に発現させたところ、両者を共発現した細胞で ZDHHC19 および TEX38 の量が上昇した (図 1-11C 及び D)。このことから、ZDHHC19 と TEX38 はヘテロ二量体を形成することで互いに安定化することが示された。

さらに、TEX38 が精巣内でパルミトイル化されているかを解析するため、acyl-MfTag exchange (AME) アッセイを行った。この手法では、パルミトイル基を多機能タグ (MfTag) に置換することで、パルミトイル化タンパク質にサイズ変化を生じさせ、ゲルシフトによってパルミトイル化の有無を判別できる。精巣タンパク質を用いて AME アッセイを行ったところ、パルミトイル化のポジティブコントロールである CANX (Calnexin) ではバンドシフトが認められたが³⁸、TEX38 ではバンドシフトは観察されなかった (図 1-11E)。したがって、TEX38 は ZDHHC19 によって S-パルミトイル化される基質ではないと考えられる。興味深いことに、ZDHHC19 自身において単一のバンドシフトが観察された (図 1-11E)。これは、ZDHHC19 が自身を自己アシル化 (autoacylation) し、そのパルミチン酸を基質へ転移させる過程を反映していると考えられる³⁹。

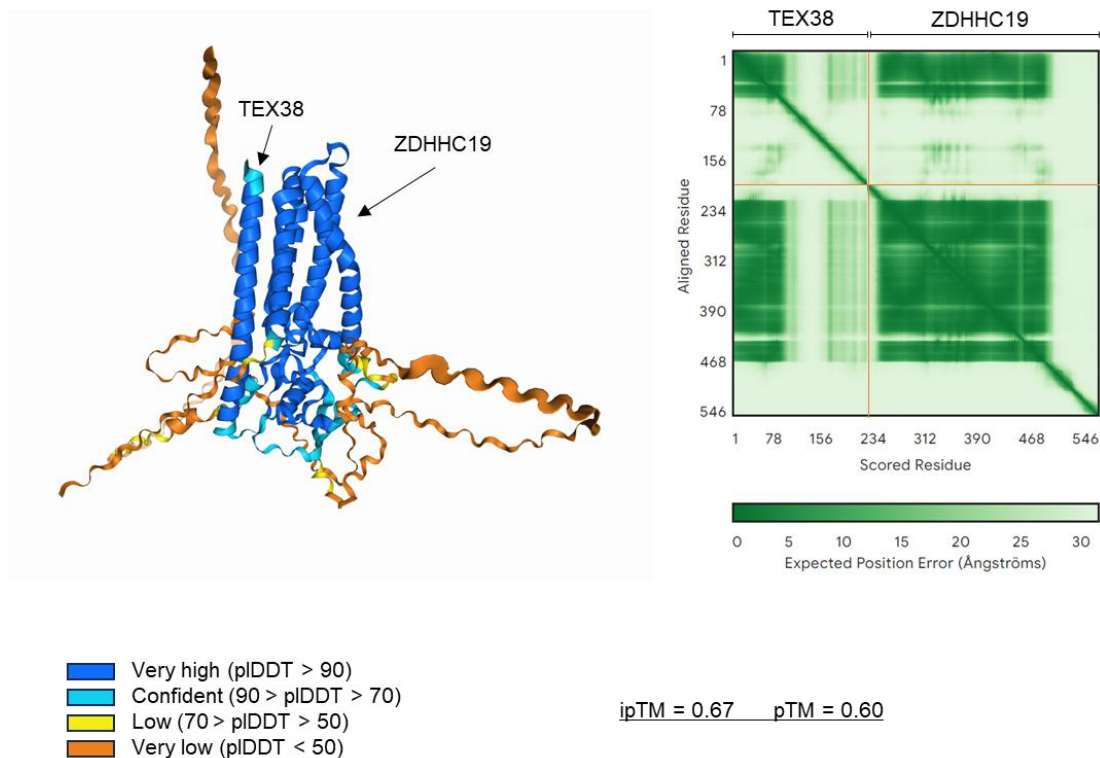


図 1-12. AlphaFold 3 によって予測されたマウス TEX38-ZDHHC19 ヘテロ二量体構造およびその信頼度評価。TEX38-ZDHHC19 構造は、予測された pLDDT スコアに基づいて着色している。右のパネルは、予測構造に対応するアライメント誤差プロットを示している。

次に免疫染色法により精巣内での細胞内局在を解析したところ、TEX38 と ZDHHC19 は、円形および伸長精子細胞の細胞膜に共局在していた（図 1-13B、1-14 及び 1-15）。さらに、タンパク質分画解析により、TEX38 が精巣の細胞膜分画に濃縮されていることが明らかになった（図 1-13C）。ウェスタンブロッティングの結果（図 1-13C）と一致して、*Tex38* KO および *Zdhhc19* KO 精子細胞の細胞膜では、ZDHHC19 および TEX38 はいずれも検出されなかった（図 1-13B 及び 1-15）。一方で興味深いことに、両タンパク質は KO 精子細胞のおそらくゴルジ体と考えられる先体近傍（おそらくゴルジ体）で弱く検出された（図 1-13B）。

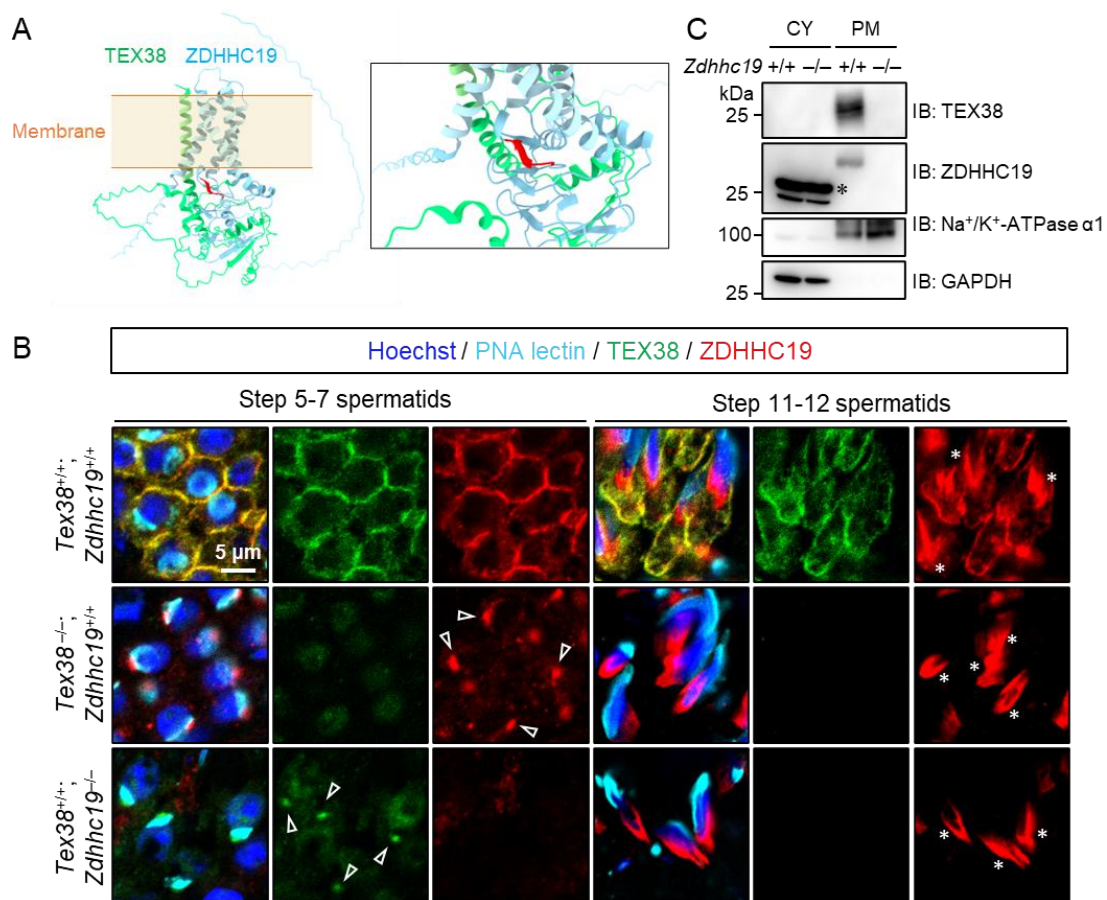


図 1-13. 精子細胞の細胞膜における TEX38 と ZDHHC19 の共局在。(A) AlphaFold3 により予測された TEX38-ZDHHC19 ヘテロ二量体の構造。ZDHHC19 の DHHC ドメインは赤で示した。(B) 精巣凍結切片における TEX38 および ZDHHC19 の免疫染色。TEX38 と ZDHHC19 は WT の精子細胞の細胞膜に局在し、一方のタンパク質を欠損した KO 精子細胞では、先体付近に位置するゴルジ体（白い矢頭）に局在していた。核および先体はそれぞれ Hoechst 33342（青）および lectin-PNA（シアン）で可視化した。白いアスタリスクはマンシェットと呼ばれる微小管構造に観察された非特異的シグナルを示す。(C) 精巣タンパク質の分画解析。CY および PM はそれぞれ細胞質画分および細胞膜画分を示す。Na⁺/K⁺-ATPase α 1 は細胞膜画分のポジティブコントロールとして、GAPDH は細胞質画分のポジティブコントロールとして用いた。黒いアスタリスクは非特異的バンドを示す。

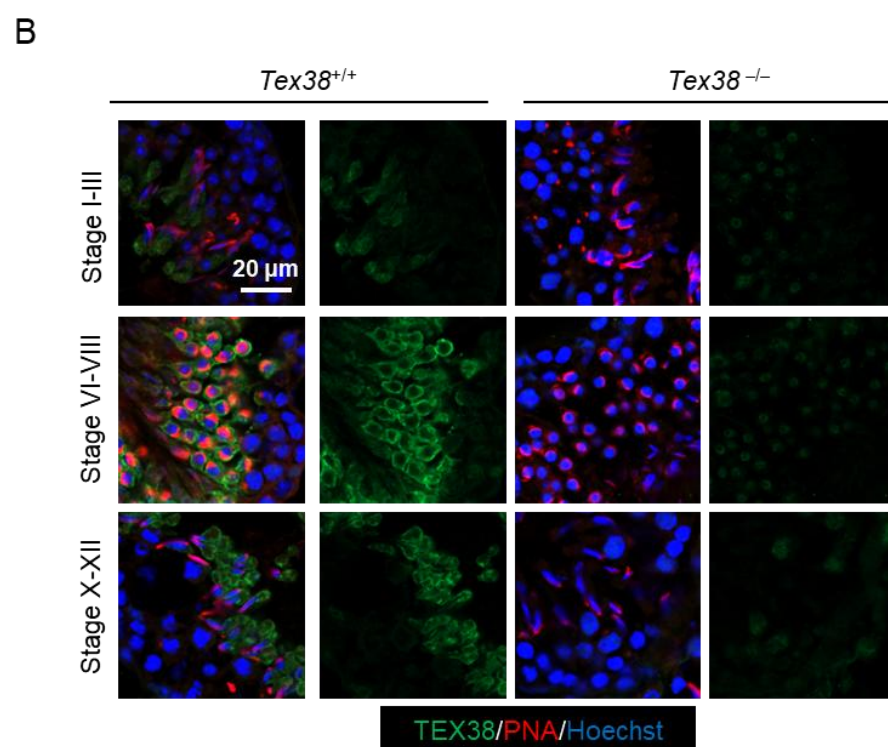
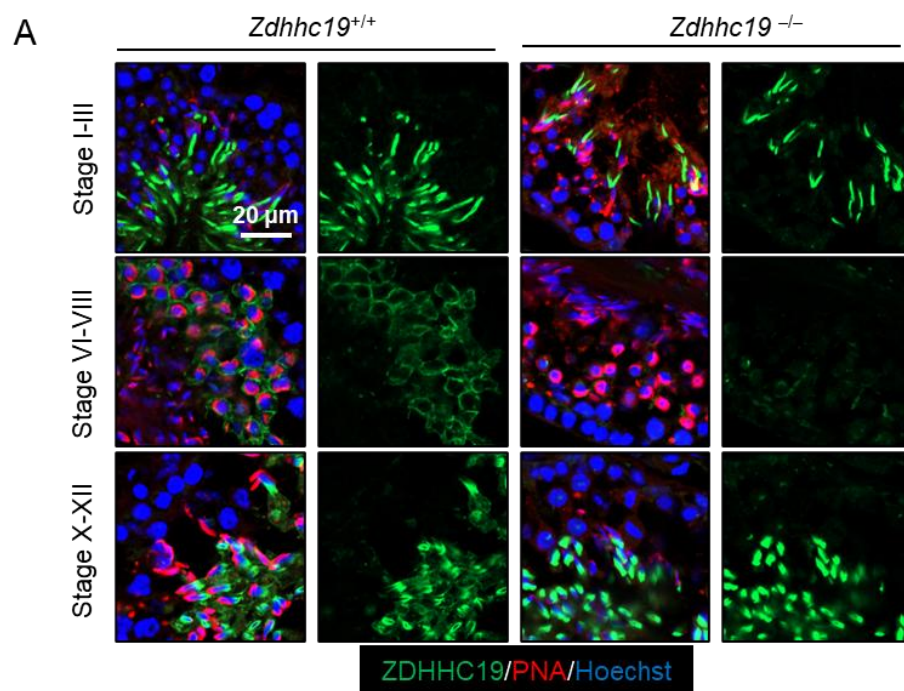


図 1-14. 精巣における TEX38 および ZDHHC19 の細胞内局在の検証。(A) 各精細管ステージにおける ZDHHC19 の免疫染色。ZDHHC19 (緑) は精子細胞の細胞膜に局在していた。核は Hoechst 33342 (青)、先体は lectin-PNA (赤) で染色した。WT 精子細胞のマンシェットに検出された緑色シグナルは、*Zdhhc19* KO 精巣でも同様に観察されたことから、非特異的である。(B) 各精細管ステージにおける TEX38 の免疫染色。TEX38 (緑) は精子細胞の細胞膜に局在していた。核は Hoechst 33342 (青)、先体は lectin-PNA (赤) で染色した。

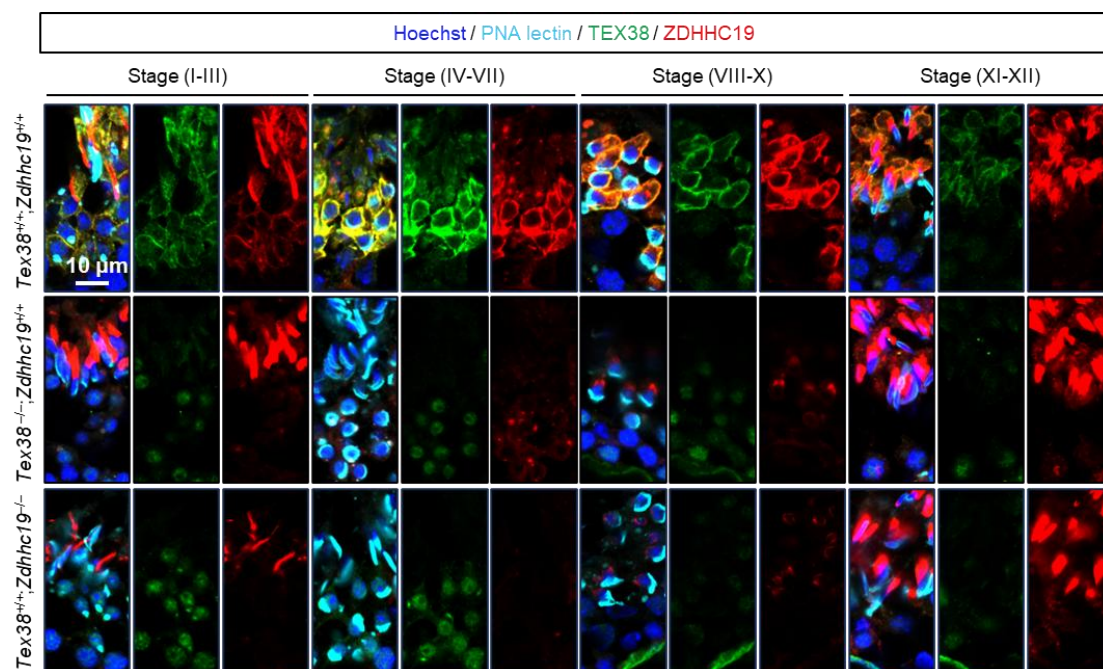


図 1-15. 精巣における TEX38 および ZDHHC19 の細胞内共局在。各精細管ステージにおける TEX38 および ZDHHC19 の免疫染色。TEX38 (緑) および ZDHHC19 (赤) は、精子細胞の細胞膜に共局在していた。核は青 (Hoechst 33342)、先体はシアン (lectin-PNA) で染色した。

興味深いことに、COS-7 細胞では、TEX38 または ZDHHC19 を単独で発現させた場合はゴルジ体に局在したが、両者を共発現させると、いずれも細胞膜に局在した (図 1-16、1-17A 及び B)。

以上の結果から、TEX38 は ZDHHC19 と複合体を形成することで細胞膜へ輸送されることが示唆された。

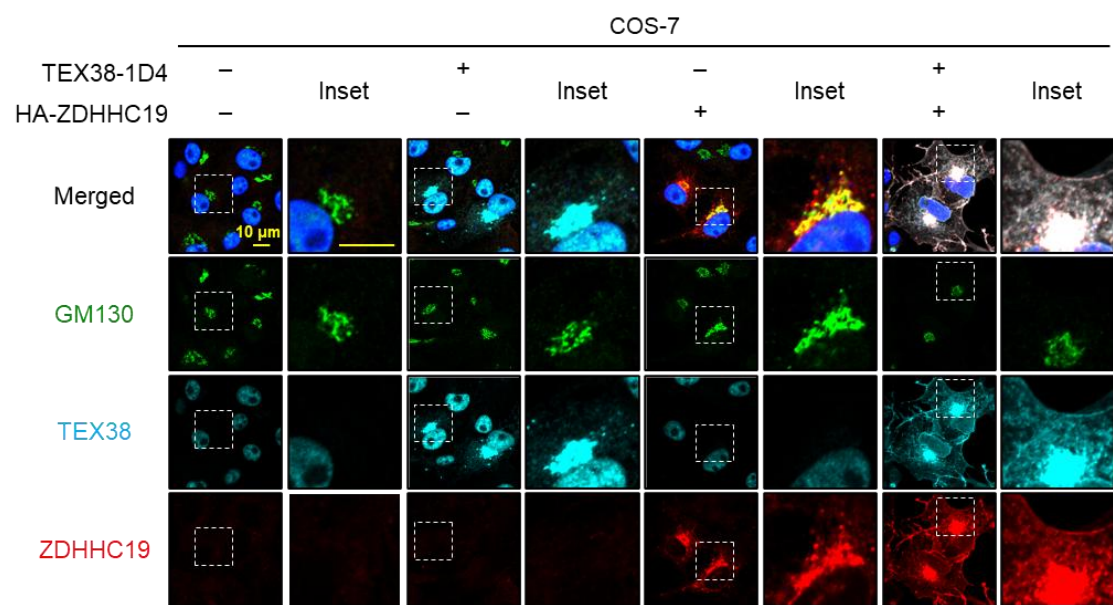


図 1-16. 培養細胞の細胞膜における TEX38 と ZDHHC19 の共局在。TEX38-1D4 および/または HA-ZDHHC19 を COS-7 細胞に発現させ、免疫染色を行った。COS-7 細胞の核およびゴルジ体は、それぞれ Hoechst 33342 (青) および抗 GM130 抗体 (緑) で染色した。

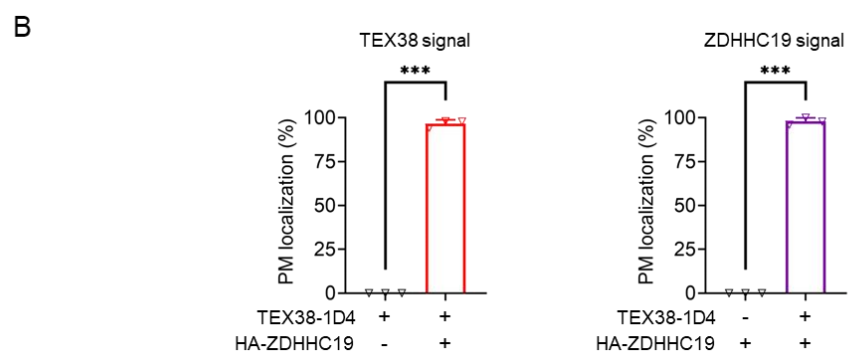
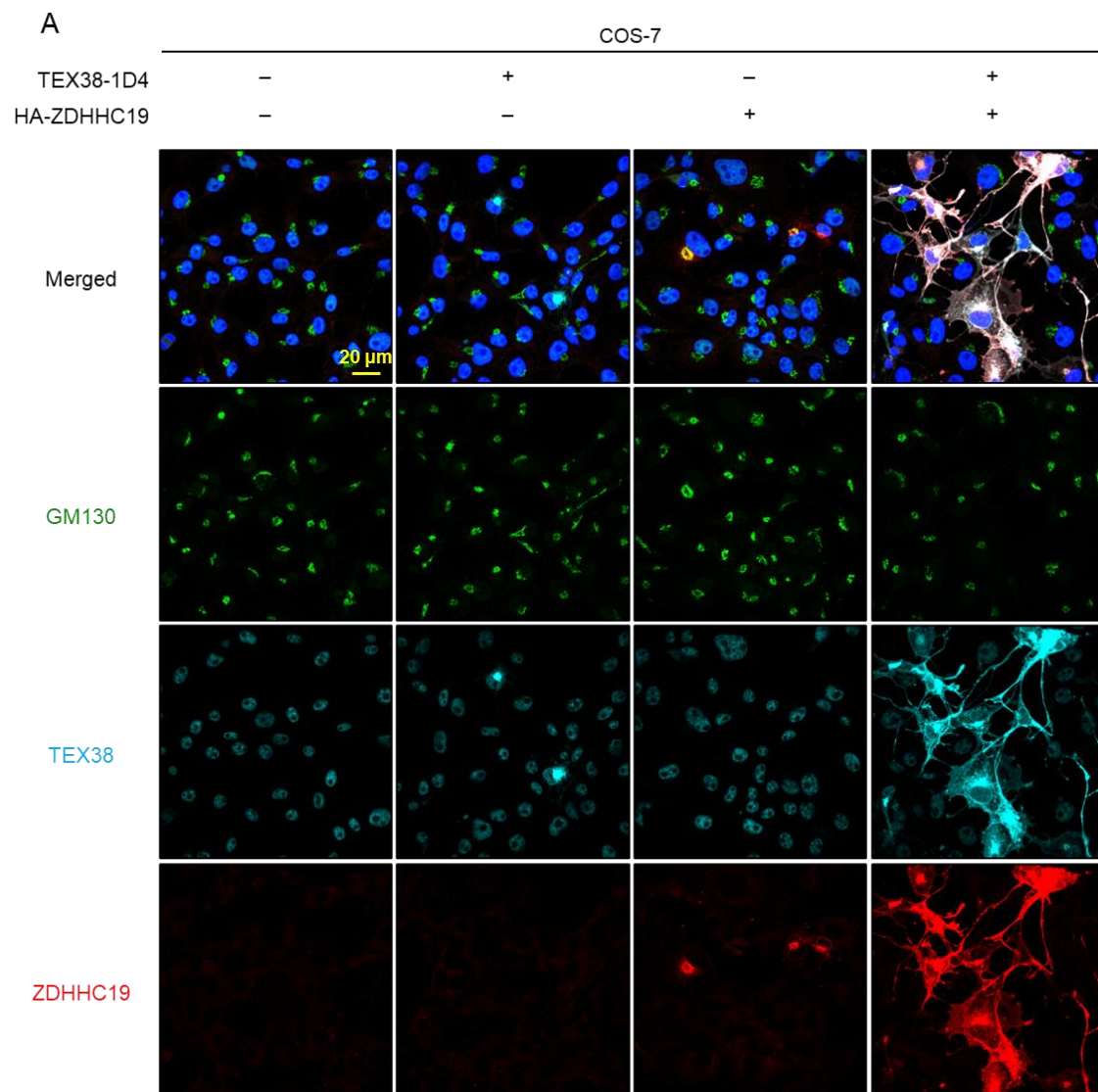


図 1-17. 培養細胞における TEX38 および ZDHHC19 の細胞内局在の検証。(A) TEX38-1D4 および/または HA-ZDHHC19 をコードするプラスミドを導入した COS-7 細胞における TEX38 および ZDHHC19 の免疫染色像。免疫染色の前に血清飢餓処理を行い、細胞周期を同期させた。TEX38 (シアン) および ZDHHC19 (赤) は共発現時に細胞膜上で共局在していた。核は Hoechst 33342 (青)、ゴルジ体は GM130 (緑) で染色した。(B) COS-7 細胞における TEX38 および ZDHHC19 の細胞膜 (PM) 局在頻度。TEX38 および ZDHHC19 の共発現により、細胞膜局在が有意に増加した。各実験で 10 細胞以上を解析した。

第五節 ZDHHC19 の S-アシルトランスフェラーゼ活性は精子形成に必須である。

ZDHHC 酵素は、基質へのパルミチン酸基の転移を触媒し、この反応には DHHC ドメイン内のシステイン残基の自己アシル化によるパルミトイル化中間体の形成が必要である³⁹。ZDHHC19 は、第 2 および第 3 膜貫通領域の間に DHHC ドメインを有している (図 1-18A)。ZDHHC19 の自己アシル化中間体と TEX38 の複合体構造を AlphaFold3 により予測し、その結合界面に立体的な干渉が存在しないことを確認した (図 1-18B 及び 1-19)。

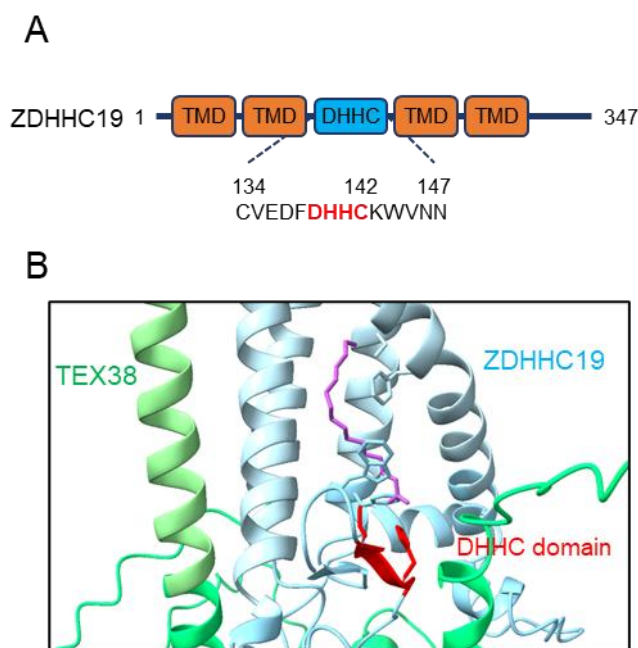


図 1-18. ZDHHC19 における S-アシルトランスフェラーゼ活性に関与するドメイン。
(A) ZDHHC19 のドメイン構成。DHHC ドメイン内のシステイン 142 が自己アシル化される。TMD は膜貫通ドメインを示す。(B) AlphaFold3 によって予測された、自己アシル化状態の ZDHHC19 と TEX38 の複合体構造。ZDHHC19 の DHHC ドメインは赤色で示し、パルミチン酸は紫色で示している。

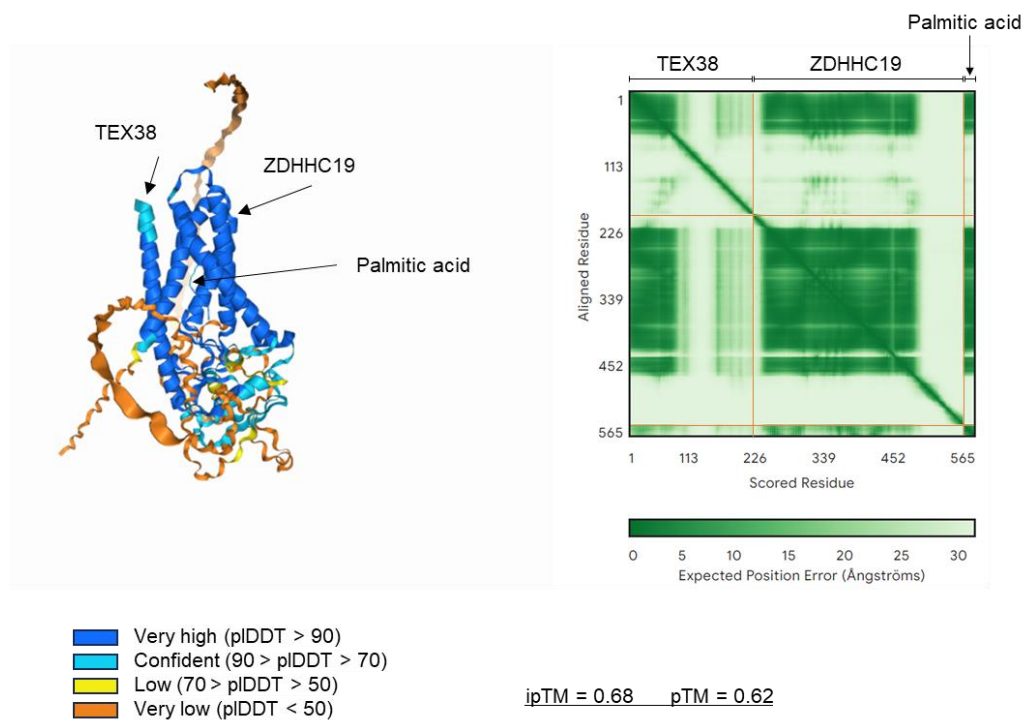


図 1-19. AlphaFold3 によって予測された自己アシル化状態の TEX38-ZDHHC19 複合体構造およびその信頼度評価。マウス TEX38-ZDHHC19 自己アシル化複合体構造は、予測された pLDDT スコアに基づいて着色している。右のパネルは、予測構造に対応するアライメント誤差プロットを示している。

ZDHHC19 のタンパク質アシルトランスフェラーゼ (PAT) 活性が雄の生殖能力に寄与するかを検証するため、DHHC ドメインの自己アシル化を阻害する C142S 変異を導入した変異マウス [*Zdhhc19* (C142S) KI マウス] を作製した (図 1-20A) ⁴⁰。この C142S 変異はサンガーシーケンスにより確認した (図 1-20B)。WT および *Zdhhc19* (C142S) KI マウスの精巣において、ZDHHC19 および ZDHHC19 C142S タンパク質の量は同程度であった (図 1-20C)。しかし、*Zdhhc19* (C142S) KI マウスの精巣上体尾部精子では、*Zdhhc19* KO マウスと同様に精子頭部の折れ曲がり異常が観察された (図 1-20D 及び E)。これらの結果は、ZDHHC19 の PAT 活性が精子頭部形態形成に重要であることを示している。

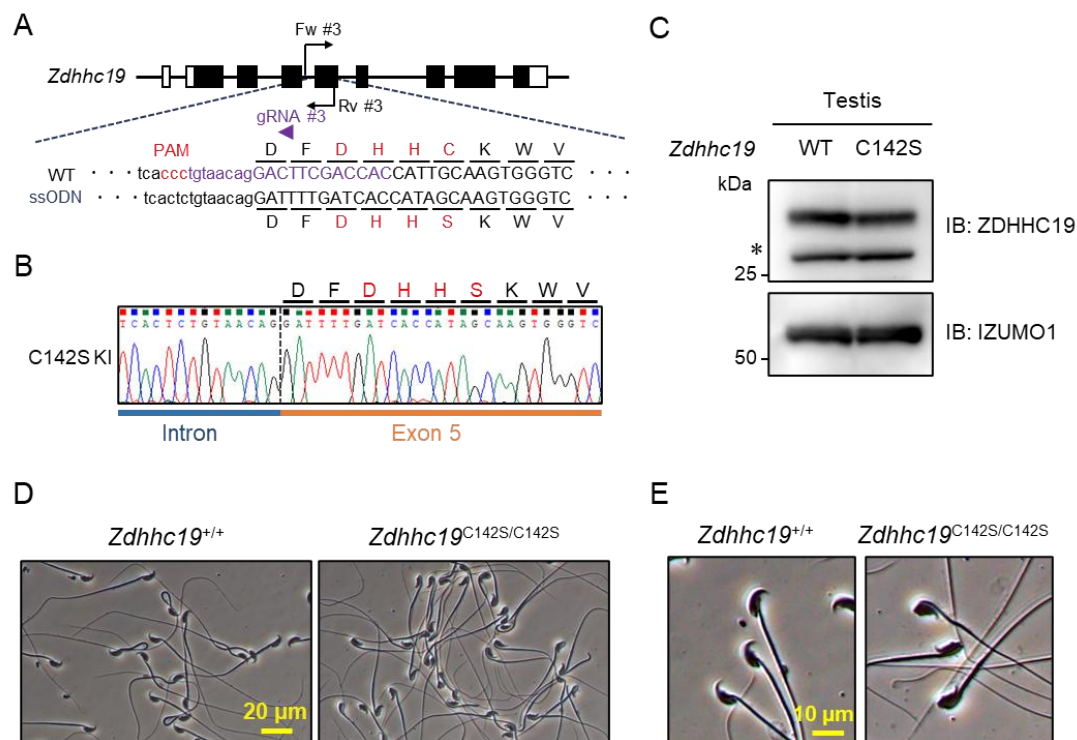


図 1-20. *Zdhhc19* (C142S/C142S) 変異マウスの作製及びその表現型解析。(A) CRISPR/Cas9 による *Zdhhc19* (C142S) 変異マウスの作製の概略図。白および黒のボックスはそれぞれ非翻訳領域およびタンパク質コード領域を示す。gRNA 配列は紫色で示した。(B) Fw #3 および Rv #3 プライマーで増幅した PCR 産物のサンガーシーケンスにより、C142S ノックイン変異を確認した。(C) WT および *Zdhhc19* (C142S) 変異マウスの精巣における ZDHHC19 のウエスタンブロッティング解析。ZDHHC19 タンパク質量に明らかな差は認められなかった。IZUMO1 をローディングコントロールとして用いた。アスタリスクは非特異的バンドを示す。(D) WT および *Zdhhc19* (C142S) マウスの精巣上体尾部から回収した精子の形態。(E) 図 1-20 (D) の精子形態写真の拡大図。

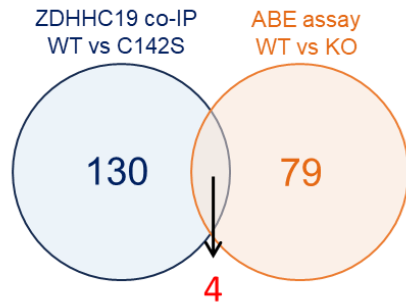
ZDHHC19 の精巣内における基質候補を同定するため、抗 ZDHHC19 抗体を用いて co-IP/MS を行った。その結果、ZDHHC19 (WT) および ZDHHC19 (C142S) に対する結合能が異なる 130 種のタンパク質を検出した [FC (WT/C142S) > 3 または FC (C142S/WT) > 3] (図 1-21A)。

さらに基質候補を絞り込むため、S-パルミトイル化システイン残基をビオチンプローブで標識して S-パルミトイル化タンパク質を精製する acyl-biotin exchange (ABE) アッセイを実施した²⁷。MS 解析 (Table S3) により、*Zdhhc19* KO 精巣に比べて WT 精巣で S-パル

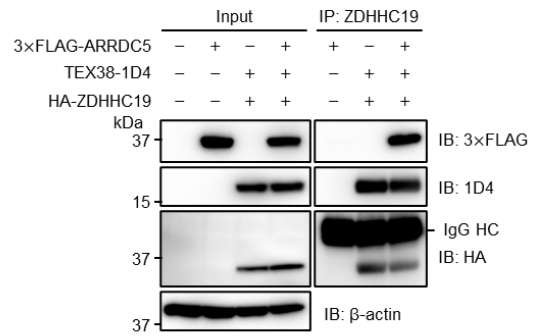
ミトイル化スコアが3倍以上高い79種のタンパク質を同定した [FC (WT/KO) > 3] (図 1-21A)。

特に、ARRDC5、PLA2G6、AP1M1、およびRAI14は、co-IP/MSとABE/MSの両方で検出された (図 1-21B)。これら4種のタンパク質のうち^{14,41-43}、*Arrdc5* KO マウスでは *Zdhhc19* および *Tex38* KO マウスと同様に、精子頭部の折れ曲がり異常が報告されている¹⁴。そこで HEK293T 細胞を用いた解析を行ったところ、ZDHHC19 が ARRDC5 と相互作用することが明らかになった (図 1-21C)。さらに、AME アッセイの結果、WT ZDHHC19 との共発現時には ARRDC5 がパルミトイル化される一方、C142S 変異体 ZDHHC19 との共発現時にはパルミトイル化が見られなかった (図 1-21D)。ARRDC5 は ZDHHC19 非共発現下でも弱いパルミトイル化が検出されたが、これは HEK293T 細胞内の内在性 ZDHHC によるものと考えられる。そこで COS-7 細胞を用いて同様の実験を行った結果、ARRDC5 は WT ZDHHC19 によってパルミトイル化され、C142S 変異体 ZDHHC19 ではパルミトイル化されなかった (図 1-21E)。また、ZDHHC19 の C142S 変異体自体はパルミトイル化されなかったことから、自己アシル化はシステイン 142 残基で起こることが示された。

A



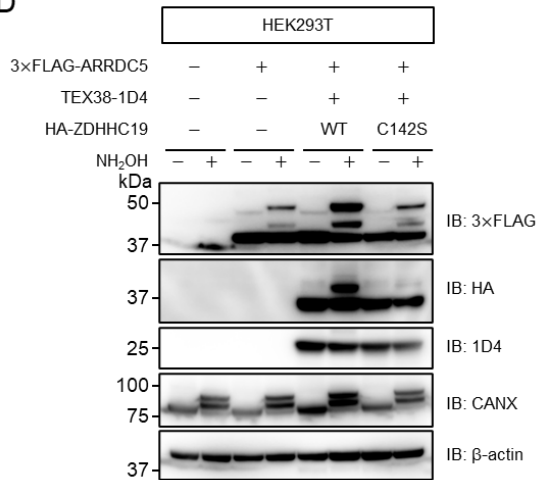
C



B

Accession	Proteins	Peptides detected by IP-MS		Palmitoylation score by ABE		Testis palmitoyl-proteome (Gao et al., 2022)	Fertility of null mice
		<i>Zdhhc19</i> ^{+/+}	<i>Zdhhc19</i> ^{C51C5}	<i>Zdhhc19</i> ^{+/+}	<i>Zdhhc19</i> ^{-/-}		
Q497K5	ARRDC5	6.2	0.1	22.9	1.0	Detected	Sterile
P97819	PLA2G6	4.1	1.1	1.3	0.4	Detected	Severe infertile
P35585	AP1M1	0.1	2.1	2.3	0.1	Detected	Embryonic lethal
Q9EP71	RAI14	1.1	4.1	0.7	0.2	Detected	Fertile
A2A8T7	TEX38	64.6	48.5	Undetected	Undetected	Undetected	Sterile
B9EIU6	ZDHHC19	49.5	30.7	Undetected	Undetected	Detected	Sterile

D



E

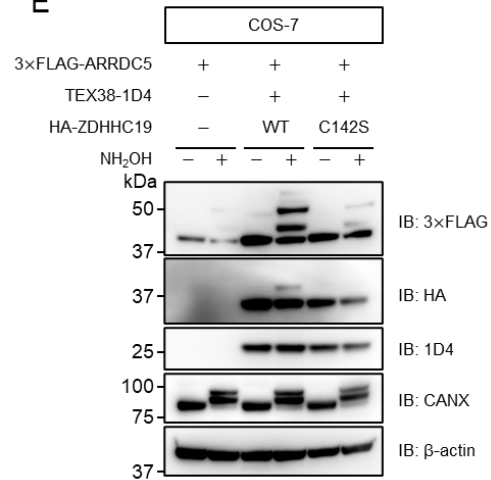


図 1-21. ZDHHC19 の基質探索。(A) 精巣における ZDHHC19 の基質探索を目的としたプロテオーム解析。co-IP/MS 解析では、WT と C142S 変異 ZDHHC19 の間で結合能が異なる 130 種のタンパク質が検出され、そのうち FC (WT/C142S) > 3 のものが 82 種、FC (C142S/WT) > 3 のものが 48 種であった。さらに、ABE/MS 解析では、79 種のタンパク質 [FC (WT/KO) > 3] が *Zdhhc19* KO 精巣よりも WT 精巣で多く検出された。(B) co-IP/MS と ABE/MS の両解析で共通して検出された ZDHHC19 の基質候補のうち、上位 4 種を示す。これらのタンパク質はいずれも、先行研究において精巣におけるパルミトイル化候補因子として報告されている⁶⁴。(C) HEK293T 細胞を用いて ZDHHC19 によるパルミトイル化を評価した AME アッセイ。(D) COS-7 細胞を用いて ZDHHC19 依存的パルミトイル化を評価した AME アッセイ。

小括・考察

精子完成期 (spermiogenesis) では、先体や鞭毛の形成、核の凝縮、細胞質除去など、精子の受精能に必須な形態的变化が生じる。これまでに、複数の遺伝子欠損マウスにおいて、精子完成期の異常に起因する雄性不妊が報告されている^{13,14,44-46}。本研究により、新たに *Tex38* がマウスの精子完成期に必須であることが明らかとなった。*Tex38* KO マウスでは、精子放出の障害に加えて精子頭部の異常な屈曲が認められた。また、*Tex38* KO 精子は子宮卵管接合部 (UTJ) を通過する能力が著しく低下しており、これが雄性不妊の主因であると考えられる。

さらに、生化学的手法を用いることで、TEX38 が ZDHHC19 と相互作用することを明らかにした。*Zdhhc19* 遺伝子の欠損も *Tex38* KO と類似した表現型を示した。両 KO マウスでは、精子頭部の屈曲が精巣上体頭部の精子で初めて観察され、この異常は精子細胞頭部における残余細胞質の異常な保持に起因する可能性がある (図 1-19D 及び E)。

先行研究では、*Tsks* KO 雄マウスが精子放出障害を伴う不妊を呈することが報告されている⁴⁷。*Tsks* KO 雄マウスでは、セルトリ細胞による異常な細胞質除去により、精子尾部に過剰な残余細胞質が生じ、精巣上体精子においてアポトーシスを誘導するが、精子頭部の核周囲における細胞質除去に異常は認められない。一方、精巣特異的細胞質タンパク質である SPEM1 の欠損マウスでは、精子頭部および頸部に細胞質が残存することで頭部の伸展が物理的に妨げられ、頭部屈曲が生じることが示されている⁴⁴。同様に、TEM を用いた超微構造解析により、*Zdhhc19* KO マウスでは核周囲に細胞質除去不全が認められ、この異常が精子頭部屈曲の原因となっていると考えられる。

近年、複数の ZDHHC 酵素がその活性・安定性・局在を制御するために補助因子を必要とすることが明らかになっている⁴⁸。たとえば、ゴルジ体に局在する膜貫通タンパク質 GCP16 は、ZDHHC9 の PAT 活性および安定性を高めることが知られている⁴⁹。*Zdhhc19* が雄性生殖能に重要であることは報告されていた^{12,50}が、精子形成過程における ZDHHC19 の調節因子および基質となるパルミトイル化タンパク質は不明であった。本研究により、TEX38 が精巣内における ZDHHC19 の安定性および細胞膜局在に必須であり、その機能は S-パルミトイル化に依存しないことが明らかになった。精子形成においてゴルジ体は小胞輸送を介して主に先体形成に寄与し、精子核形成が進行する精子形成後期には分解される³。このことから、TEX38-ZDHHC19 が精子形成後期に機能を果たすためには、ゴルジ体から細胞膜へと局在を変化させる必要があると考えられる。さらに、TEX38 の co-IP/MS 解析により、TEX38 が MARK1-4 と相互作用することが示され、同時にこれらの MARK ファミリータンパク質が ZDHHC19 の相互作用候補としても同定された。

MARK は微小管結合タンパク質 (tau, MAP2, MAP4 など) をリン酸化することで微小管の安定性を制御するキナーゼである⁵¹。先行研究では、MARK ファミリーが細胞極性

^{52,53}、細胞周期・有糸分裂紡錘体制御^{54,55}、細胞移動⁵⁶⁻⁵⁸など、多様な細胞機能に関与することが報告されている。このうち MARK2 および MARK4 は精巣で主に発現しており⁵⁹、MARK2 欠損マウスは明確な精子形態異常を示さないものの軽度の雄性不妊を呈する⁶⁰。また、MARK4 欠損マウスは雄性生殖能に必須ではない⁶¹が、ラット精巣では精子放出への関与が示唆されている⁶²。さらに、MARK2 および MARK3 が相互に機能補償することが知られており⁶³、単一遺伝子の欠損では明確な表現型が現れにくい可能性がある。我々の ABE/MS 解析および既報のパルミトイル化プロテオミクス解析⁶⁴では、MARK ファミリーの S-パルミトイル化は検出されなかったが、MARK ファミリーが TEX38-ZDHHC19 複合体と協調して精子頭部形態形成を制御している可能性がある。

さらに、co-IP/MS および ABE/MS 解析を統合することで、ARRDC5 を含む 4 種類の ZDHHC19 の有力な基質候補を同定した。in vitro 解析により、ZDHHC19 が α -arrestin ファミリーに属する ARRDC5 をパルミトイル化することを明らかにした。 α -arrestin ファミリーは膜タンパク質のエンドサイトーシスに関与することが知られている⁶⁵。AME アッセイでは、ARRDC5 に分子量の大きい 2 本のバンドが検出されたことから、2 つのシステイン残基が ZDHHC19 によりパルミトイル化されている可能性がある (図 1-21D 及び E)。ARRDC5 は他の α -arrestin ファミリーとは異なり、E3 ユビキチンリガーゼとの結合に必要な PPxY モチーフを欠き、精巣特異的に発現する^{14,66}。近年、*Arrdc5* KO マウスが精子形態異常および雄性不妊を呈することが報告されており^{13,14}、その表現型は *Tex38* KO および *Zdhhc19* KO マウスと類似している。

Liu らは、精子頭部と尾部を連結する head-tail coupling apparatus の構成要素である NDC1 および SUN5 が *Arrdc5* KO 精子で減少し、ARRDC5 が SEC22A 依存的な膜輸送を介して NDC1 および SUN5 の局在を制御することを示している¹³。また、プロテオミクス解析により、ARRDC5 がマウス精子の cytoplasmic droplet (CD) に存在することが示されている²⁸。これらの知見および本研究の結果を統合すると、ZDHHC19 の欠損により ARRDC5 依存的な膜輸送が障害され、細胞質除去、CD 形成、および精子頭部形成が破綻するというモデルが考えられる (図 1-22)。

本研究により、TEX38 が ZDHHC19 とヘテロ二量体を形成して精子細胞の細胞膜に局在し、ZDHHC19 の PAT 活性が正常な精子頭部形成に必須であることが明らかとなった。TEX38 および ZDHHC19 はいずれもヒトに保存されており、生殖細胞特異的な ZDHHC19 依存的翻訳後修飾経路の同定は、ヒト男性不妊の病態理解や、TEX38-ZDHHC19 相互作用あるいは ZDHHC19 の PAT 活性を標的とした非ホルモン性男性避妊法の開発につながる可能性がある。

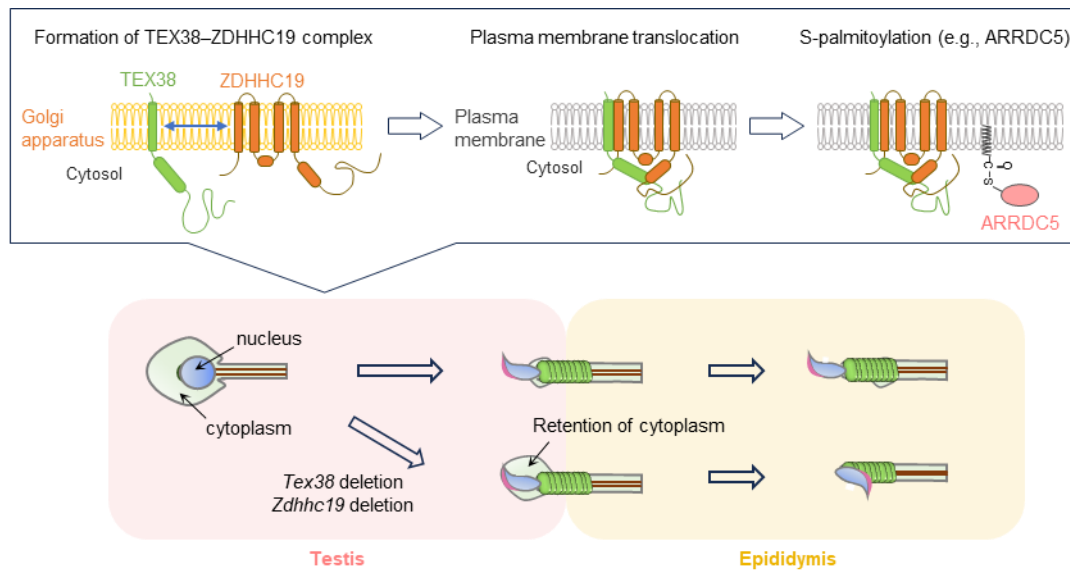


図 1-22. 本研究から推察される TEX38-ZDHHC19 の機能。精子形成過程において、TEX38 および ZDHHC19 はゴルジ体において複合体を形成し、相互に安定化する。その後、両者は精子細胞の細胞膜へと移行し、ARRDC5 などの標的タンパク質のパルミトイル化を担う。これら一連の過程は、精子形成後期における精子頭部からの細胞質除去に重要であり、精子頭部の正常な形態形成に必須である。*Tex38* 及び *Zdhhc19* 欠損マウスでは、精子頭部に細胞質が異常に蓄積し、精巣上体移行中に精子頭部の屈曲といった精子形態異常が生じ、その結果、雄性不妊に至る。⁶⁴

第二章 精巣に高発現する F-box タンパク質ファミリーの機能解析

要旨

SCF (Skp–Cullin–F-box) 複合体は主要な E3 ユビキチンリガーゼの一群であり、その構成要素である F-box タンパク質はユビキチン化の基質認識において重要な役割を果たしている。マウスでは、FBXO36 および FBXO39 を含む複数の F-box タンパク質が、他の組織に比べて精巣で高発現している。本研究では、FBXO36 および FBXO39 がマウス雄性生殖において果たす役割を明らかにすることを目的とした。

CRISPR/Cas9 システムを用いて *Fbxo36* KO および *Fbxo39* KO マウスを作製し、雄の生殖能力、精巣および精巣上体の組織構造、精子形態および運動能力を解析した。その結果、*Fbxo36* KO マウスでは雄性生殖能および精子形態に顕著な異常は認められなかった。一方で、*Fbxo39* KO 雄マウスでは生殖能力の低下に加え、精子形態および運動能力の異常が観察された。さらに精巣の組織学的解析から、FBXO39 が円形精子細胞から精子への形態変換過程で重要な役割を果たすことが示された。

以上の結果から、*Fbxo39* はマウスの精子形成に重要である一方、*Fbxo36* は雄性生殖に必須ではないことが明らかとなった。FBXO39 のさらなる解析は、男性不妊の分子機構の理解に寄与する可能性が示唆された。

序論

精子は、精巣の精細管内で進行する精子形成 (spermatogenesis) と呼ばれる特殊な過程を経て産生される。この過程は複数の段階からなり、まず精原細胞 (spermatogonia) が有糸分裂によって増殖し、精母細胞 (spermatocyte) を生じる。精母細胞は減数分裂を経て染色体数を半減させ、一倍体 (haploid) の円形精子細胞 (round spermatid) に分化する。精子形成の最終段階である精子完成期 (spermiogenesis) では、円形精子細胞が大規模な形態的・機能的再構築を受けて精子に変化する。この過程には、クロマチン再構築による核の凝縮、先体の形成、軸糸およびその付属構造を備えた鞭毛の形成、さらに精子放出 (spermiation) 時の細胞質除去が含まれる^{3,67}。これらの一連の過程は精密に制御されており、いずれかの段階で異常が生じると精子の構造や機能に障害をきたし、最終的に雄性不妊につながる³。

ユビキチン-プロテアソーム系 (UPS) は、細胞内タンパク質の分解を担う主要経路である。分解されるタンパク質はユビキチンで標識され、26S プロテアソームにより分解される^{68,69}。この経路は細胞の恒常性維持に不可欠であり、細胞周期の進行、シグナル伝達、分化など多様な生物学的過程を制御している^{68,70-72}。UPS における基質特異性は E3 ユビキチンリガーゼによって決定され、その中でも SCF (SKP1-Cullin-F-box) 複合体は代表的な E3 リガーゼとして知られている⁷³。SCF 複合体において、F-box タンパク質は基質認識サブユニットとして機能し、標的タンパク質の選択的かつ時期特異的な分解を担っている⁷³。

F-box タンパク質は C 末端ドメインの構造に基づき、ロイシンリッチリピートを含む FBXL、WD40 リピートを含む FBXW、その他または未知のドメインを有する FBXO の 3 つのサブファミリーに分類される⁷⁴。いくつかの FBXO タンパク質は精巣で高発現しており、精子形成における特異的機能が示唆されている。ノックアウト (KO) マウスを用いた解析により、*Fbxo24*、*Fbxo43*、*Fbxo47* は雄性生殖に必須である一方⁷⁵⁻⁸⁰、*Fbxo15* および *Fbxo30* は必須ではないことが報告されている^{81,82}。例えば、我々は以前に、*Fbxo24* の欠損マウスが精子鞭毛形成に重度の異常を示すことを明らかにしている⁷⁶。しかし、精巣で高発現する *Fbxo* ファミリー遺伝子の中には、その生理的機能が解明されていないものもある。

本研究では、精巣で高発現するものの機能が未解明であった *Fbxo36* および *Fbxo39* に着目し、それぞれの KO マウスを作製した。雄マウスの生殖能力、精子形態および運動能力、精巣および精巣上体の組織構造を評価した結果、*Fbxo36* は雄性生殖に必須ではない一方で、*Fbxo39* は精子完成期に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

実験方法

動物

第一章に準じて行った。

RNA の抽出及び RT-PCR

第一章に準じて行った。使用したプライマーを下記の表に示す。

プラスミドベクターの作製とトランスフェクション

第一章に準じて行った。

in silico 発現量解析

マウス各組織のトランスクリプトームデータは文献⁸³より取得し、平均遺伝子発現値を文献⁸⁴に従って Z スコアで処理・正規化した。マウスおよびヒト精巢の scRNA-seq データ³⁷は取得後、Loupe Cell Browser 3.3.1 (10X Genomics) を用いて解析した。

アミノ酸配列上の Pfam domain 解析及び構造予測

アミノ酸配列は Consensus CDS (CCDS) データベース

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcdsBrowse.cgi>) から取得した。解析には以下の配列を使用した：マウス FBXO36 (CCDS35634.1)、ヒト FBXO36 (CCDS2472.1)、マウス FBXO39 (CCDS36214.1)、ヒト FBXO39 (CCDS11082.1)、マウス RBX1 (CCDS49676.1)、マウス CUL1 (CCDS20095.1)、およびマウス SKP1 (CCDS24669.1)。タンパク質ドメインの予測は Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) (<https://smart.embl.de/>)⁸⁵ を用いて行った。構造モデルの予測は第一章に準じて行った。

CRISPR/Cas9 を使用した *Fbxo36* と *Fbxo39* KO マウスの作製

第一章に準じて行った。使用した gRNA とジェノタイピング用プライマーを下記に示す。

<u>Method</u>	<u>Symbol</u>	<u>Sequence (5'→3')</u>
RT-PCR/Cloning	<i>Fbxo36</i> Fw	<u>atgaattcatggcgctcgtggctgccggag</u>
	<i>Fbxo36</i> Rv	<u>gcgtcgacagcaagcttctctgcctggt</u>
	<i>Fbxo39</i> Fw	<u>atgatatcgccgcatggatgaagactgtgaagtgacc</u>
	<i>Fbxo39</i> Rv	<u>gcgctagccatcatgggtaggcgacgac</u>
	<i>Actb</i> Fw	<u>catccgtaaagacctctatgccaac</u>
	<i>Actb</i> Rv	<u>atggagccaccgatccaca</u>
Genotyping	<i>Fbxo36</i> KO Fw (Fw #1)	<u>actatgcctgccaacacttga</u>
	<i>Fbxo36</i> KO Rv (Rv #1)	<u>acaagtgcctctttcctggg</u>
	<i>Fbxo36</i> WT Fw (Fw #2)	<u>gcactgggctcactcatacc</u>
	<i>Fbxo36</i> WT Rv (Rv #2)	<u>ggtcagtgggacaaagcaag</u>
	<i>Fbxo39</i> KO Fw (Fw #3)	<u>cagacagcttctcactatgc</u>
	<i>Fbxo39</i> KO Rv (Rv #3)	<u>gaaaaagggaatgagggcacg</u>

	<u><i>Fbxo39</i> WT Fw (Fw #4)</u>	<u>aaatcacggtacactggctg</u>
	<u><i>Fbxo39</i> WT Rv (Rv #4)</u>	<u>aagcagctgagagtccttacc</u>
<u>iPCR</u>	<u><i>Fbxo39</i> iPCR #1</u>	<u>agtggcccagcagctctgctc</u>
	<u><i>Fbxo39</i> iPCR #2</u>	<u>accatcacgttcagcggaagg</u>
<u>gRNA</u>	<u><i>Fbxo36</i> gRNA #1</u>	<u>tacagatcatctttagatgg</u>
	<u><i>Fbxo36</i> gRNA #2</u>	<u>ccacagtgggtccgaatctcc</u>
	<u><i>Fbxo39</i> gRNA #3</u>	<u>caccactacgctgtacatca</u>
	<u><i>Fbxo39</i> gRNA #4</u>	<u>atttcctgtaaattccgt</u>

交配試験

第一章に準じて行った。

精巣と精巣上体の He-PAS 染色による組織学的解析

第一章に準じて行った。

精巣上体の免疫蛍光染色

精巣上体を 4%PFA で 4℃、3 時間固定した後、15%および 30%スクロースを含む PBS で置換した。OCT 包埋後、液体窒素中で凍結し、クリオスタットで 10 μm 厚の切片を作製した。切片の免疫染色は第一章の精巣切片の免疫染色法に準じて行った。

精子の形態観察

第一章に準じて行った。

精子運動性の測定

第一章に準じて行った。

ウエスタンブロッティング

第一章に準じて行った。使用した抗体を下記に示す。

Antibodies	Host	Source	#	Method
anti-Acetylated Tubulin	Mouse	SIGMA	T7451	IF
anti-β-actin	Rabbit	MBL	PM053	IB
anti-DDX4	Rabbit	abcam	ab13840	IF
anti-FLAG M2	Mouse	SIGMA	F1804	IB
anti-1D4 tag	Mouse	A kind gift from Dr. Martin M. Matzuk	-	IB
anti-rabbit IgG-HRP	Goat	Jackson ImmunoResearch	#111-036-045	IB

anti-mouse IgG-HRP	Goat	Jackson ImmunoResearch	#115- 036-062	IB
anti-rabbit IgG-Alexa Fluor 546	Goat	Thermo Fisher Scientific	A-11071	IF
anti-mouse IgG-Alexa Fluor 488 Highly Cross-Adsorbed	Goat	Thermo Fisher Scientific	A-11029	IF

共免疫沈降(co-IP)法

第一章に準じて行った。

TEM を用いた微細構造観察

第一章に準じて行った。

統計解析

第一章に準じて行った。

結果

第一節 *Fbxo36* および *Fbxo39* はマウス精巣で高発現しており、ヒトにおいても高い保存性を示す。

精巣で高発現する *Fbxo* 遺伝子を同定するために、Li ら⁸³が報告した成体マウス組織のトランスクリプトーム解析データを参照した。その結果、他の組織と比較して精巣で高発現する7つの *Fbxo* 遺伝子 (*Fbxo15*、*Fbxo24*、*Fbxo30*、*Fbxo36*、*Fbxo39*、*Fbxo43*、*Fbxo47*) が同定された (図 2-1A 及び B)。先行研究により、*Fbxo24* は精子形態形成に必須であることが示され⁷⁵⁻⁷⁷、*Fbxo43* および *Fbxo47* は減数分裂前期 I の進行に関与することが報告されている⁷⁸⁻⁸⁰。本研究では、これまで KO マウスの表現型が報告されていない *Fbxo36* および *Fbxo39* に着目した。複数のマウス組織を用いた RT-PCR 解析により、*Fbxo36* および *Fbxo39* はいずれも他の組織に比べて精巣で強く発現していることが確認された (図 2-1C)。

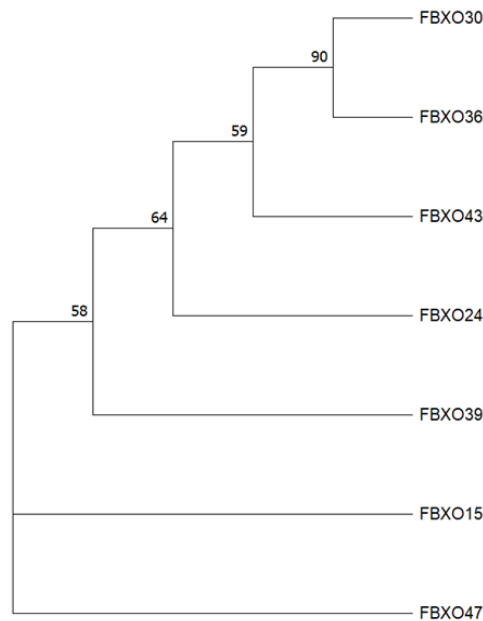
A

Gene	Br	Th	Lu	He	Li	Sp	Ki	Te	Ut	Ov	Fertility of KO mice
<i>Fbxo15</i>											Fertile
<i>Fbxo24</i>											Infertile
<i>Fbxo30</i>											Fertile
<i>Fbxo36</i>											Fertile (This study)
<i>Fbxo39</i>											Subfertile (This study)
<i>Fbxo43</i>											Infertile
<i>Fbxo47</i>											Infertile

Z-score
-3 3

B

Mouse Testis-enriched FBXO proteins



C

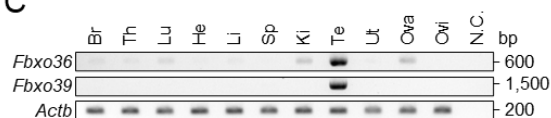


図 2-1. *Fbxo36* および *Fbxo39* は FBXO ファミリーに属し、精巣に高発現する。(A) 精巣で高発現する FBXO ファミリー遺伝子と、それぞれの KO マウスの生殖能力の一覧。精巣における Z スコアが 2.9 を超える *Fbxo* 遺伝子を選定した。(B) マウスにおける精巣高発現 FBXO の系統解析。各枝には、500 回のリサンプリングに基づくブートストラップ値 (%) を示した。(C) 成体マウスの組織由来 cDNA を用いた *Fbxo36* および *Fbxo39* の RT-PCR 解析。いずれの遺伝子も精巣で高発現していた。 *Actb* をローディングコントロールとして用いた。

マウスとヒトの進化的保存性を評価するため、EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/psa/emboss_needle) を用いてアミノ酸配列のペアワイズアラインメント解析を行ったところ、FBXO36 は 76.1%、FBXO39 は 83.7% の配列同一性を示し、両者が種を超えて高い保存性をもつことが明らかになった (図 2-2A 及び B)。また、精巣の scRNA-seq データから、*Fbxo36* の発現は精母細胞のパキテン期から上昇し、*Fbxo39* の発現は精子細胞中期で顕著になることが明らかとなった (図 2-2C 及び D)。さらに、ヒト精巣においても *FBXO36* および *FBXO39* は類似した発現パターンを示すことが確認された (図 2-2E 及び F)。

図 2-2. マウスとヒトにおける FBXO36 および FBXO39 の配列保存性と精巣発現パターン。(A) EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/psa/emboss_needle) を用いたマウスおよびヒト FBXO36 のアミノ酸配列の比較。M：マウス、H：ヒト。「|」は完全一致、「:」は物理化学的性質が近く、強い類似を示す置換、「.'」は部分的な類似を示す。(B) マウスおよびヒト FBXO39 のアミノ酸配列の比較。(C) マウス精巣の各細胞における *Fbxo36* の発現。各細胞の略称は以下の通り：未分化型精原細胞 (Ud Spg)、分化型精原細胞 A1 および A2 (A1–A2 Spg)、分化型精原細胞 A3、A4、中間型および B 型精原細胞 (A3–B Spg)、前レプトテン期精母細胞 (Prele Sc)、レプトテン期／ザイゴテン期精母細胞 (Le/Zy Sc)、パキテン期精母細胞 (Pa Sc)、ディプロテン期および第二次精母細胞 (Di/Se Sc)、初期・中期・後期円形精子細胞 (Early St、Mid St、Late St)、セルトリ細胞 (SC)、精細管周囲筋様細胞 (PTM)、ライディッヒ細胞 (LC)、および内皮細胞 (EC)。(D) マウス精巣の各細胞における *Fbxo39* の発現。(E) ヒト精巣各細胞における *FBXO36* の発現。Dif Spg：分化型精原細胞。(F) ヒト精巣の各細胞における *FBXO39* の発現。

F-box タンパク質は、F-box ドメインを介して SKP1 と相互作用し、SCF 複合体を形成する。AlphaFold3 による構造予測の結果、FBXO36 および FBXO39 はいずれも SCF 複合体の構造を高い精度で再現し、これらのタンパク質が E3 ユビキチンリガーゼ複合体の構成要素として機能する可能性が示された (図 2-3A、B、2-4A 及び B)。

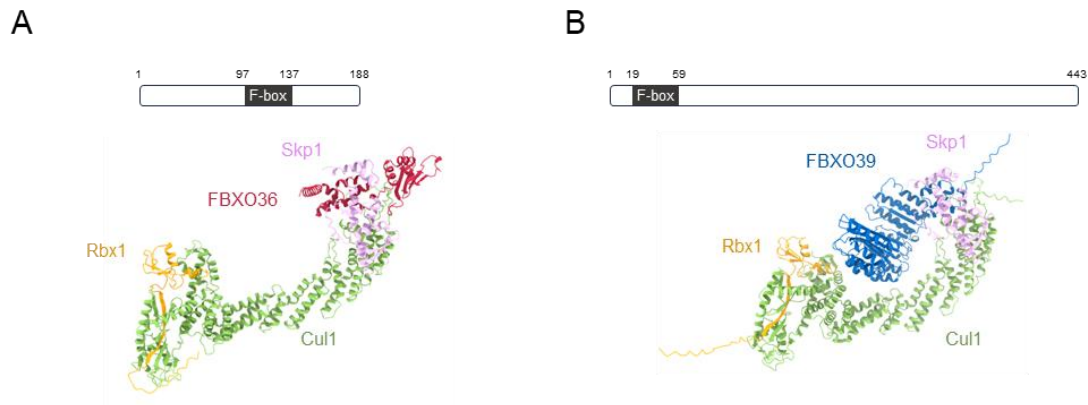
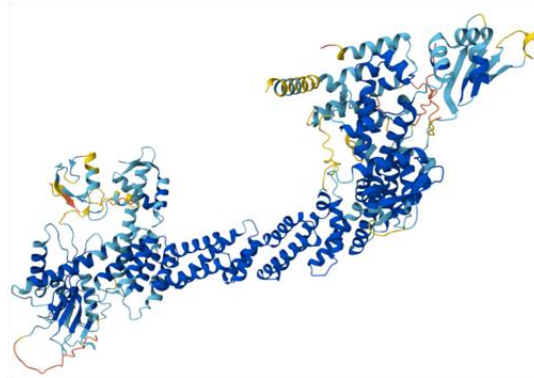


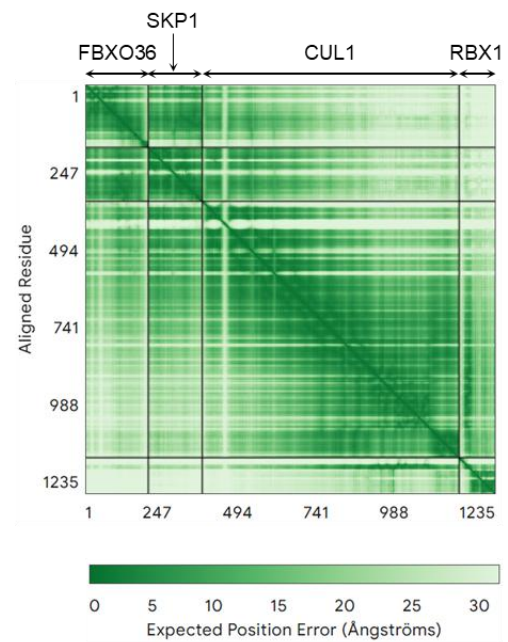
図 2-3. AlphaFold3 による SCF 複合体の構造予測。(A) AlphaFold3 を用いた SCF (FBXO36) 複合体の三次構造予測。F-box ドメインは SMART を用いて検出した。(B) AlphaFold3 を用いた SCF (FBXO39) 複合体の三次構造予測。F-box ドメインは SMART を用いて検出した。

A

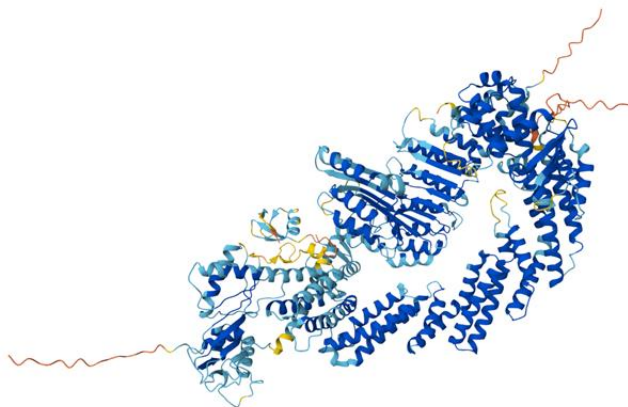


ipTM = 0.59

pTM = 0.67



B



ipTM = 0.62

pTM = 0.61

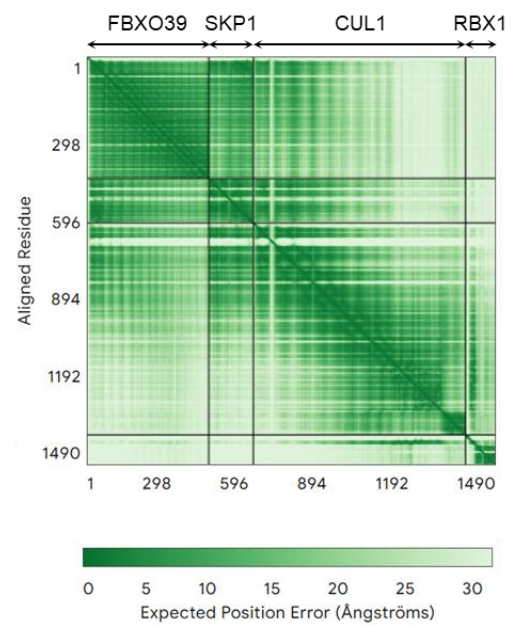


図 2-4. AlphaFold 3 によって予測されたマウス SCF 複合体の信頼度評価。 (A) マウス SCF (FBXO36) 複合体の予測構造。モデルは pLDDT スコアに基づいて着色している。右パネルには予測整合誤差 (PAE) プロットを示し、iPTM および pTM スコアも併記した。(A) マウス SCF (FBXO39) 複合体 の予測構造。モデルは pLDDT スコアに基づいて着色している。右のパネルは、予測構造に対応するアライメント誤差プロットを示している。

第二節 *Fbxo36* 欠損は雄マウスの生殖能力に影響を与えなかった。

Fbxo36 の機能を解析するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて *Fbxo36* KO マウスを作製した。*Fbxo36* の翻訳領域 (ORF) に大規模な欠失を導入するため、2 種類の gRNA を設計した (図 2-4A)。Cas9-gRNA リボヌクレオタンパク質複合体を 60 個の受精卵にエレクトロポレーションにより導入し、得られた 57 個の胚を 2 匹の偽妊娠雌マウスの卵管に移植した結果、13 匹の産仔が得られた。ジェノタイピング PCR により 7 匹のマウスで大規模欠失が確認され (図 2-4B)、サンガーシーケンス解析により 19,124 bp の欠失が示された (図 2-4C)。

雄の生殖能力を評価するため、*Fbxo36* KO 雄マウスを WT 雌マウス 3 匹と 2 か月間同居させる交配試験を行ったところ、KO 雄マウスでは WT 雄マウスと比較して交尾あたりの産仔数に有意な減少は認められなかった (図 2-4D)。この結果から *Fbxo36* が雄の生殖能力に必須ではないことが示された。さらに精巣と精巣上体の組織学的解析を行ったところ、精巣の形態および重量は両遺伝子型間で差はなく (図 2-4E 及び F)、*Fbxo36* KO マウスの精巣上体尾部から採集した成熟精子にも形態的な異常は認められなかった (図 2-4G)。また、精巣および精巣上体切片の PAS/ヘマトキシリン染色においても明らかな異常は観察されなかった (図 2-4H 及び I)。

さらに精子の運動能力を評価するために CASA を実施したところ、*Fbxo36* KO 精子では曲線速度 (VCL) がわずかに低下したものの、他の運動速度パラメータに有意な差は認められなかった (図 2-4J)。これらの結果から、*Fbxo36* の欠損はマウスにおける精子形成に顕著な異常を引き起こさないことが明らかとなった。

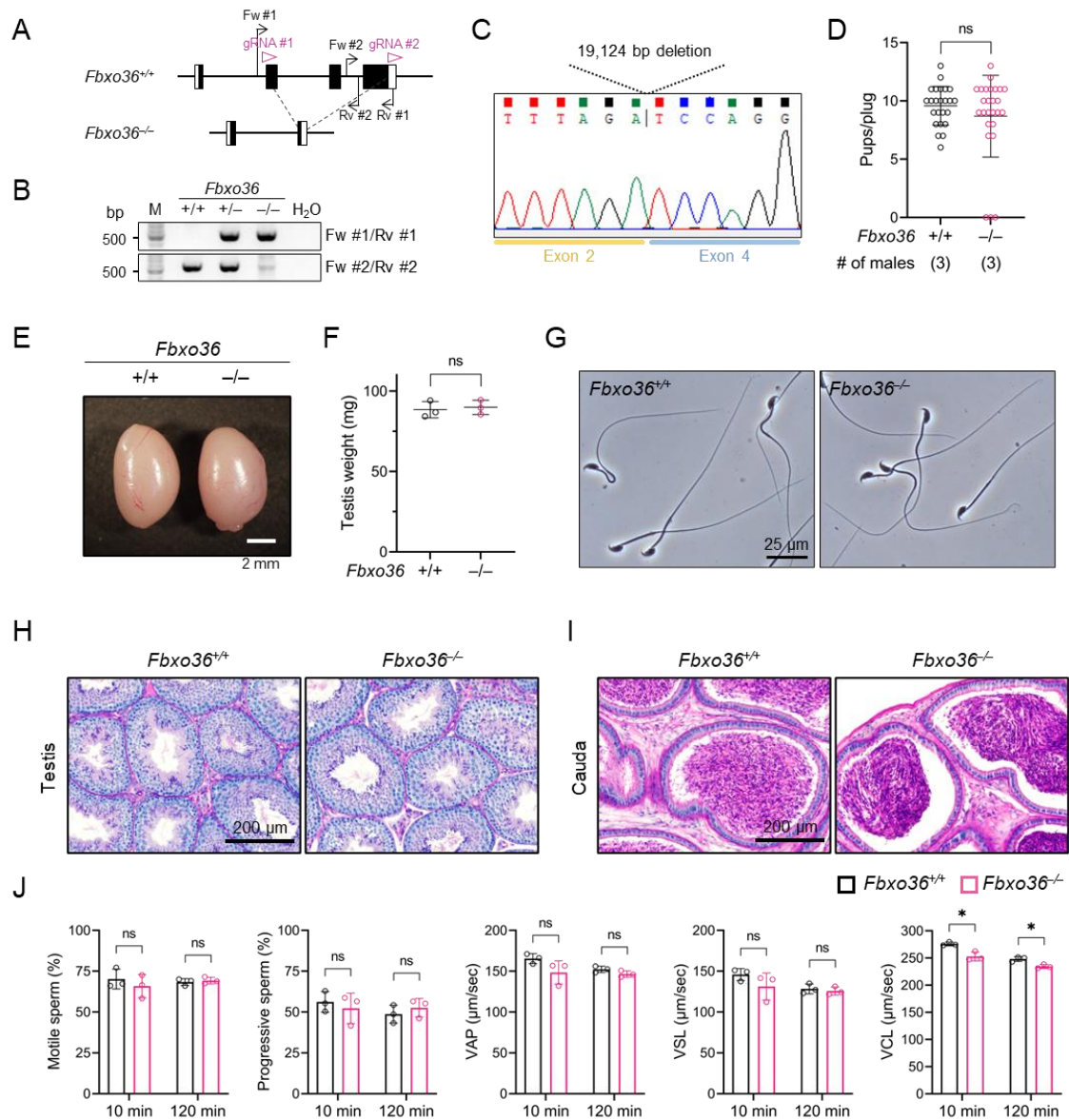


図 2-4. *Fbxo36* KO マウスの表現型解析。(A) CRISPR/Cas9 システムを用いた *Fbxo36* KO マウス作製の概略図。非翻訳領域は白枠で、翻訳領域は黒枠で示した。設計した gRNA をピンクで示し、Fw および Rv は遺伝子型判定に用いたフォワードおよびリバースプライマーを示す。(B) *Fbxo36* KO マウスの遺伝子型判定。プライマー Fw#1/Rv#1 で KO アレルを、Fw#2/Rv#2 で WT アレルを増幅した。(C) KO アレルにおける 19,124 bp の欠失をサンガーシーケンスにより確認した。(D) 交尾あたりの産仔数。各 WT または *Fbxo36* KO 雄を WT 雌 3 匹と同居させ、プラグあたりの産仔数を算出した。(E) 精巢の外観。(F) 精巢重量の測定結果。(G) WT および *Fbxo36* KO 雄マウスの精巢上体尾部から回収した精子の形態観察。(H) 精巢切片の PAS/ヘマトキシリン染色像。(I) 精巢上体尾部切片の PAS/ヘマトキシリン染色像。(J) 精子運動能解析。運動精子および前進運動精子の割合を TYH 培地で培養して 10 分および 120 分後に評価した。また、平均速度 (VAP)、直線速度 (VSL)、曲線速度 (VCL) についても測定した。

第三節 *Fbxo39* 欠損は雄マウスの生殖能力低下と精子形成異常を引き起こす。

Fbxo39 の機能を解析するため、で CRISPR/Cas9 システムを用いて *Fbxo39* KO マウスを作製した。2 本の gRNA を設計し、*Fbxo39* の ORF に大規模な欠失を導入した (図 2-5A)。Cas9-gRNA リボヌクレオタンパク質複合体を 64 個の受精卵にエレクトロポレーションで導入し、得られた 56 個の胚を偽妊娠雌 2 匹の卵管に移植したところ、22 匹の産仔が得られた。ジェノタイピング PCR により 14 匹で大規模な欠失が確認され (図 2-5B)、サンガーシーケンスにより 2,325 bp の欠失が示された (図 2-5C)。

交配試験の結果、*Fbxo39* KO 雄マウスではプラグあたりの産仔数が有意に減少しており (図 2-5D)、*Fbxo39* が正常な雄の生殖能力に重要であることが示された。続いて、FBXO39 が F-box ドメインを有することから、SKP1 と相互作用して SCF 複合体を形成する可能性を検証した。HEK293T 細胞に FBXO39 および SKP1 を共発現させたところ、野生型 FBXO39 は SKP1 と結合したが、F-box ドメインを欠損した変異体 FBXO39 は結合しなかった (図 2-5E)。この結果は、FBXO39 が SCF 複合体を形成し、E3 ユビキチンリガーゼの構成要素として機能する可能性を示唆している。

生殖能力低下の原因を調べるために、まずは精巣の形態および重量を解析したところ、両遺伝子型間で差がなかった (図 2-5F 及び G)。さらに、PAS/ヘマトキシリン染色を用いて精巣および精巣上体尾部の組織切片を解析した。WT 精巣では、円形精子細胞が核凝縮を経て伸長精子細胞へと変化し、伸長精子細胞は精細管腔に沿って規則的に配列していた。一方、*Fbxo39* KO 精巣では、核凝縮が不完全な伸長精子細胞が観察され、伸長精子細胞の数の減少や、精子放出が起こらず異常に保持された伸長精子細胞の存在が認められた (図 2-5H および 2-5I)。さらに、精巣上体尾部の PAS/ヘマトキシリン染色では、成熟精子数の減少が確認された (図 2-5J)。加えて、未分化生殖細胞マーカーである DDX4 (VASA) について精巣上体切片の免疫染色を行ったところ、本来は精巣内に限定して局在する DDX4 陽性の生殖細胞が、*Fbxo39* KO では異常に精巣上体管腔内に存在することを明らかにした (図 2-5K)。このことから、未熟な生殖細胞が正常な精子形成過程を経ずに、そのまま精巣上体へと輸送されていることが示唆された。

これらの結果から、*Fbxo39* 欠損は精子完成過程 (spermiogenesis) の異常および雄の生殖能力低下を引き起こすことが明らかとなった。

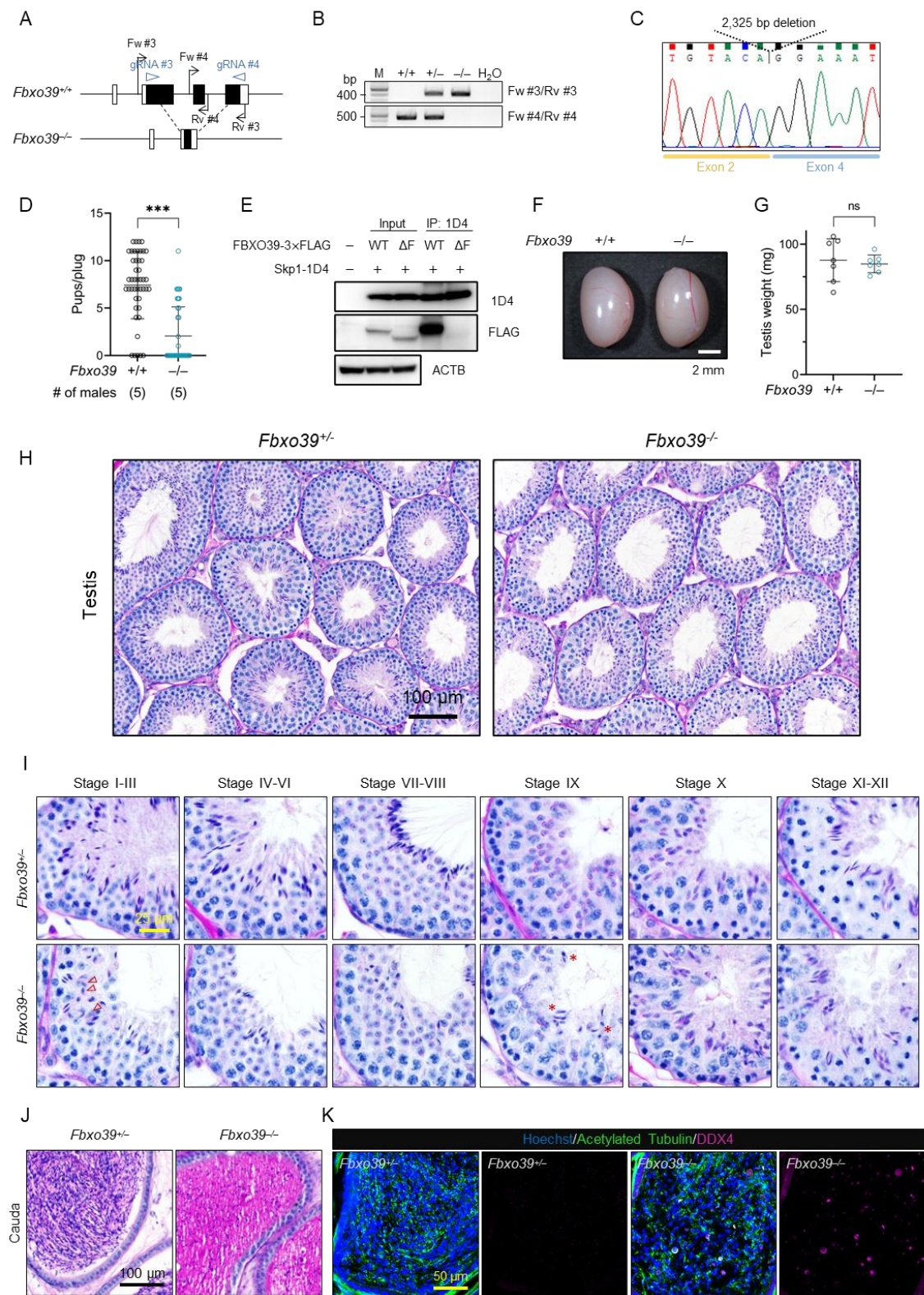


図 2-5. *Fbxo39* KO マウスの表現型解析。(A) CRISPR/Cas9 システムを用いた *Fbxo39* KO マウス作製の概略図。非翻訳領域は白枠で、翻訳領域は黒枠で示した。設計した gRNA を青で示し、Fw および Rv は遺伝子型判定に用いたフォワードおよびリバースプライマーを示す。(B) *Fbxo39* KO マウスの遺伝子型判定。プライマー Fw#3/Rv#3 で KO アレルを、Fw#4/Rv#4 で WT アレルを増幅した。(C) KO アレルにおける 2,325 bp の欠失をサンガーシーケンスにより確認した。(D) 交尾あたりの産仔数。各 WT または *Fbxo39* KO 雄を WT 雌 3 匹と同居させ、プラグあたりの産仔数を算出した。(E) HEK293T 細胞に *Fbxo39* (WT) -3×FLAG または F-box ドメイン欠損型 *Fbxo39* (ΔF) -3×FLAG を Skp1-1D4 とともに共発現させた。抗 1D4 抗体を用いて免疫沈降 (IP) を行った結果、野生型 FBXO39 は SKP1-1D4 と結合したが、ΔF 変異体は結合しなかった。ACTB をローディングコントロールとして用いた。(F) 精巣の外観。(G) 精巣重量の測定結果。(H) 精巣切片の PAS/ヘマトキシリン染色像。(I) 精巣切片の PAS/ヘマトキシリン染色像。精細管は I-III、IV-VI、VII-VIII、IX、X、XI-XII 期に分類した。赤い矢頭は異常形態の精子頭部を示し、赤いアスタリスクは精細管内に異常に保持された伸長精子細胞を示す。(J) 精巣上体尾部切片の PAS/ヘマトキシリン染色像。(K) 精巣上体尾部の免疫蛍光染色像。核は Hoechst (青)、精子鞭毛はアセチル化チューブリン (緑)、未熟な生殖細胞は DDX4 (マゼンタ) で染色した。

第四節 *Fbxo39* KO 精子は形態異常及び運動性の低下を呈した。

Fbxo39 欠損の影響をさらに評価するため、精巣上部尾部の精子を観察した。WT 精子は三日月状の頭部と長い鞭毛を有していたのに対し、*Fbxo39* KO マウスの精子では頭部や鞭毛の形態異常が認められた (図 2-6A 及び B)。さらに、CASA 解析の結果、*Fbxo39* KO マウスでは運動精子および前進運動精子の割合が有意に減少していた。また、平均速度 (VAP)、直線速度 (VSL)、および曲線速度 (VCL) がいずれも低下していた (図 2-6C)。これらの結果から、*Fbxo39* の欠損は精子の形態および運動能力の両方に影響を及ぼすことが示された。

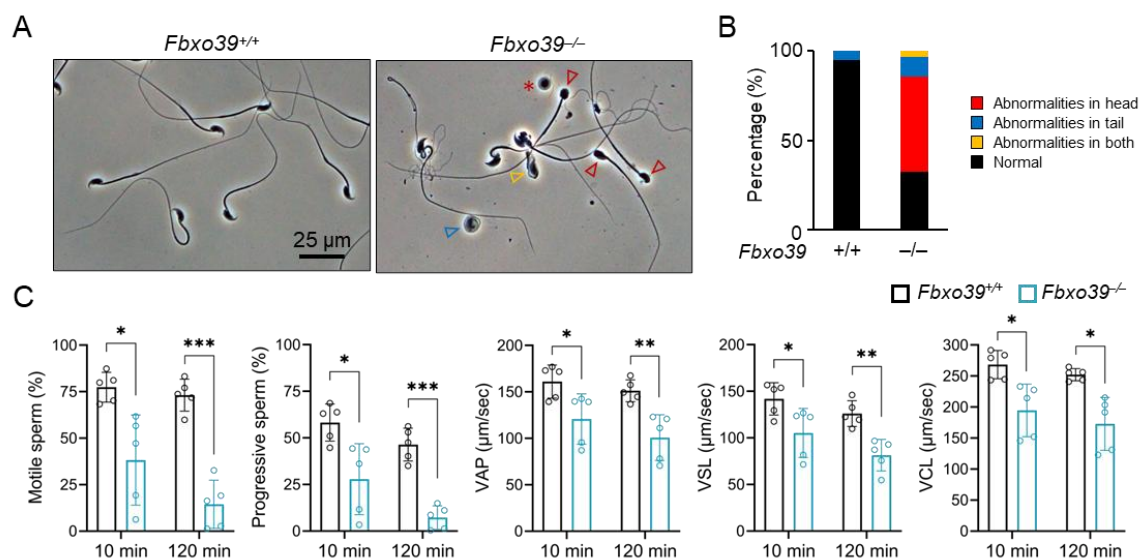


図 2-6. *Fbxo39* KO 精子の形態と運動能力の解析。 (A) WT および *Fbxo39* KO 雄マウスの精巣上部尾部から回収した精子の形態。赤色の矢頭は異常な頭部形態を示す精子、赤いアスタリスクは未熟な生殖細胞、黄色の矢頭は鞭毛欠損精子、青色の矢頭は鞭毛が巻いた精子を示す。 (B) *Fbxo39* KO マウスにおける精子形態異常の定量解析。 (C) 精子運動能解析。運動精子および前進運動精子の割合を、TYH 培地で培養して 10 分および 120 分後に評価した。また、平均速度 (VAP)、直線速度 (VSL)、曲線速度 (VCL) についても測定した。

第五節 *Fbxo39* KO マウスは精子完成期の頭部形成異常を示す。

Fbxo39 欠損による精子形成異常をさらに詳細に解析するため、精巣の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を行った。通常、精子形成過程では、円形精子細胞の核が凝縮および伸長して精子へと変化する⁸⁶⁻⁸⁸。円形精子細胞の段階では、WT および KO マウスのいずれにおいても、先体形成や核形態に顕著な異常は認められなかった (図 2-7A)。一方で、KO マウスの伸長期精子細胞では、核の凝縮不全および頭部形成異常が観察された (図 2-7B)。

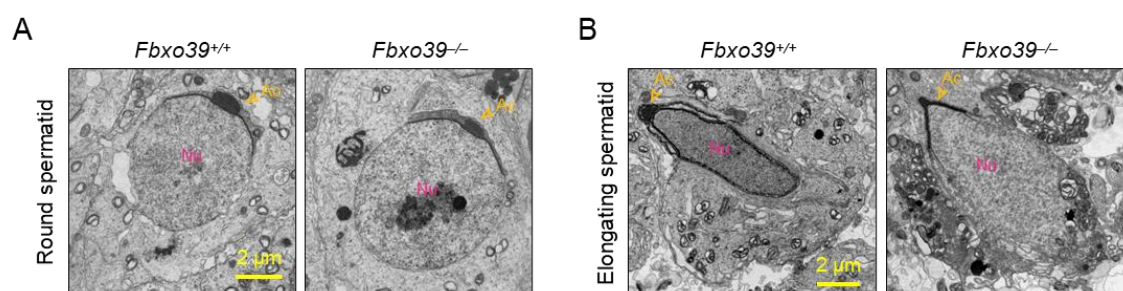


図 2-7. *Fbxo39* KO 精巣の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察。(A) 円形精子細胞の TEM 像。核 (Nu) および先体 (Ac) を示す。(B) 伸長精子細胞の TEM 像。核 (Nu) および先体 (Ac) を示す。

小括・考察

第二章では、精巣で高発現する F-box タンパク質 FBXO36 および FBXO39 の機能を解析した。これらの遺伝子はいずれもマウスとヒトの間で高度に保存されている。解析の結果、*Fbxo36* は雄マウスの生殖能力に必須ではない一方、*Fbxo39* は精子完成期に重要な役割を果たすことが明らかとなった。これらの知見は、FBXO ファミリー内での機能的多様性を示唆している。

Fbxo36 の欠損は精子形成や雄性生殖能力に顕著な異常を引き起こさなかったものの、精子運動性パラメータの一つである VCL（曲線速度）の低下が認められた。この軽度な表現型の一因として、他の FBXO タンパク質との機能的冗長性が考えられる。また、本研究で検証されなかった条件下では、FBXO36 欠損の影響がより顕著に表れる可能性も考えられる。

一方で、*Fbxo39* は正常な雄の生殖能力に不可欠であることが示された。*Fbxo39* KO 雄マウスは、生殖能力の低下、精子形態異常、さらに精子運動能力の低下を示した。組織学的および電子顕微鏡解析の結果、*Fbxo39* KO では精子完成期における精子頭部の形成異常が認められた。この異常が、精巣上体尾部の成熟精子で観察された形態異常および運動能力低下に繋がると考えられる。さらに、FBXO39 が F-box ドメインを介して SKP1 と相互作用することを見出したことから、FBXO39 が SCF 複合体の基質認識サブユニットとして機能し、精子頭部形成に必要なタンパク質の分解制御に関与していることが示唆される。

本研究で FBXO36 および FBXO39 を解析したことで、精巣で高発現する FBXO タンパク質群の KO マウスの表現型が網羅的に明らかになった。これまでの報告では、FBXO24 が精子形成過程において鞭毛形成に関与すること⁷⁵⁻⁷⁷、また FBXO43 および FBXO47 が減数分裂の進行に必須であること⁷⁸⁻⁸⁰が示されている。これらの知見と本研究の結果を統合すると、精巣で高発現する FBXO ファミリーの複数のタンパク質は異なる基質を認識し、互いに重複しない独自の役割を担っていると考えられる（図 2-8）。

男性不妊症の多くは依然として原因不明であり⁸⁹、精子形成過程に関わる遺伝子の多くが未解明のままである^{8,90}。*Fbxo39* KO マウスでは雄性生殖能力の低下が認められたことから、*FBXO39* の変異や発現異常がヒトにおいても男性不妊症の一因となり得る。Genome Aggregation Database (gnomAD) では、フレームシフトなど複数の *FBXO39* の機能喪失型変異が報告されている（例：p.Trp141Ter；対立遺伝子頻度 2.54×10^{-5} ）（図 2-9）。今後、不妊男性における *FBXO39* の変異解析とモデル動物を用いた機能解析を組み合わせることで、*FBXO39* が男性不妊の原因遺伝子として位置づけられる可能性がある。

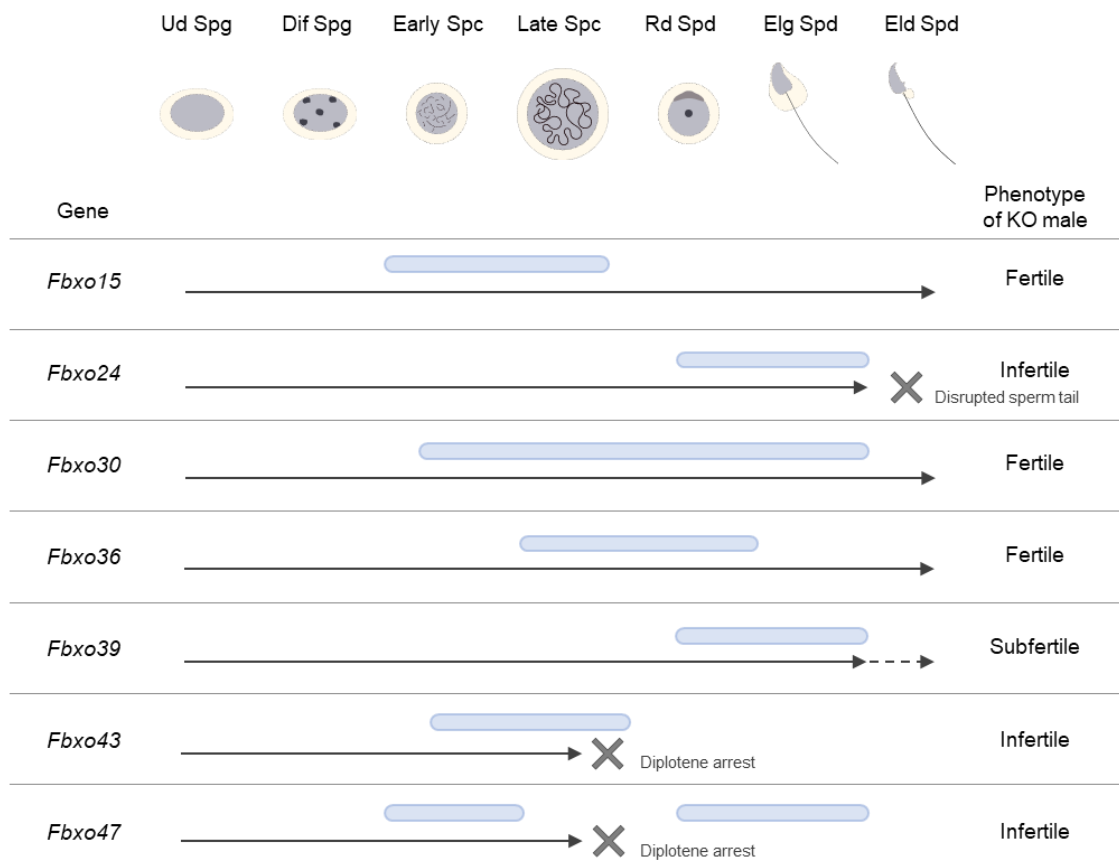


図 2-8. 精巣で高発現する *Fbxo* ファミリー遺伝子のノックアウトマウスの表現型。各遺伝子の発現データは、マウス精巣 scRNA-seq データ³⁷から取得した。発現量は Z スコアで正規化し、0.4 を超える値を青棒で示した。ノックアウト解析により、精巣で高発現する FBXO タンパク質の機能が明らかとなっている。黒矢印は遺伝子欠損の影響を受ける精子形成段階を示す。*Fbxo24* の欠損は鞭毛形成異常を引き起こす。*Fbxo43* および *Fbxo47* は減数分裂の進行に必須である。また、*Fbxo39* の欠損は、精子頭部形態の異常を引き起こす。一方、*Fbxo15*、*Fbxo30*、および *Fbxo36* KO マウスでは顕著な精子形成異常は認められない。

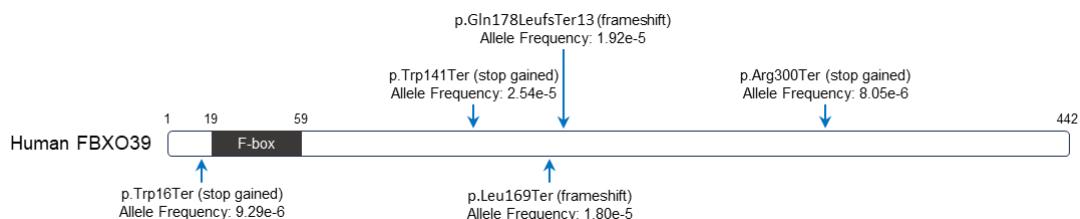


図 2-9. ヒト *FBXO39* 遺伝子の変異。gnomAD データベースにおいて対立遺伝子頻度が高い、5 つの機能喪失型 (LoF) 変異を示す。

第三編 総括

本研究では、精巣で高発現する、*Tex38*、*Zdhhc19*、*Fbxo36*、*Fbxo39* に着目し、発生工学的手法を用いて、個体レベルで遺伝子の機能解析を行った。交配試験の結果、*Fbxo36* KO では雄性生殖能力の低下は認められなかったものの、残りの3遺伝子はいずれも雄性生殖能力に重要であることが明らかになった。詳細な機能解析により、TEX38 及び ZDHHC19 は協調的に働き精子細胞質の除去に重要であること、また FBXO39 は精子頭部形成を制御する分子であることを明らかにした。

解析した4遺伝子はいずれもヒトにおいて高い保存性を示す。これらの遺伝子の機能欠損に起因する男性不妊症は現時点で報告されていないが、各民族集団のエキソーム・ゲノムデータを統合したデータベース gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) による解析では、雄性生殖能力に重要と考えられる3遺伝子において機能喪失型変異が確認されている。代表的な変異例を下表に示す。

遺伝子 (マウス)	遺伝子 (ヒト)	変異	変異体 ID	アリル頻度	ホモ変異の男性数
<i>Tex38</i>	<i>TEX38</i>	p.Trp38Ter	1-46672948-G-A	4.8E-05	0
<i>Zdhhc19</i>	<i>ZDHHC19</i>	p.Ala192ThrfsTer24	3-196208395-C-CCTTGT	1.6E-05	0
<i>Fbxo39</i>	<i>FBXO39</i>	p.Trp16Ter	17-6779916-G-A	9.3E-06	0

生殖能力維持に必須な遺伝子の機能喪失変異は次世代へ伝わりにくく、自然選択によって排除される傾向にある。しかし近年、体外受精 (IVF) や顕微授精 (ICSI) などの生殖補助医療技術の発展により、不妊を引き起こす遺伝子変異の頻度が上昇する可能性が指摘されている。そのため、生殖能力維持に関わる遺伝子群の同定は今後さらに重要性を増すと考えられる。

精子の形態は受精の成否を左右する極めて重要な要因である。近年、日本では不妊治療が社会的課題として注目されており、精子の形成や運動性に関する研究は社会的にも大きな意義を有する。本研究で得られた知見は、男性不妊症の診断および新規治療法の開発に貢献することが期待される。

第四編 謝辞

ここに博士論文として研究をまとめることができましたのは、大阪大学微生物病研究所教授 伊川正人先生のご指導、ご鞭撻の賜物であり、心より感謝申し上げます。

多くのご指導とご助言をいただいた大阪大学微生物病研究所遺伝子機能解析分野准教授 宮田治彦先生、江森千紘先生、大阪大学ヒューマン・メタバース疾患研究拠点（WPI-PRIME）特任准教授 Yongang Lu 先生、酪農学園大学准教授 嶋田圭祐先生、大阪大学微生物病研究所遺伝子機能解析学分野の皆様、感染動物実験施設の皆様、NPO 法人発生工学会の皆様に感謝いたします。

最後に、本博士論文を指導、審査してくださった指導委員の大阪大学大学院薬学研究科 橋本均先生および深田宗一郎先生に心より感謝申し上げます。

第五編 主論文・参考論文リスト

主論文

1. ***Kaneda Y**, *Lu Y, *Sun J, Shimada K, Emori C, Noda T, Koyano T, Matsuyama M, Miyata H, Ikawa M. “TEX38 localizes ZDHHC19 to the plasma membrane and regulates sperm head morphogenesis in mice”
PNAS, 2025, DOI: [10.1073/pnas.2417943122](https://doi.org/10.1073/pnas.2417943122) (*: equal contribution)

参考論文

1. **Kaneda Y**, Miyata H, Shimada K, Oyama Y, Iida-Norita R, Ikawa M. “IRGC1, a testis-enriched immunity related GTPase, is important for fibrous sheath integrity and sperm motility in mice”
Developmental Biology, 2022, DOI: [10.1016/j.ydbio.2022.05.011](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2022.05.011)
2. **Kaneda Y**, Miyata H, Shimada K, Oura S, Ikawa M. “Testis-specific proteins, TSNAXIP1 and 1700010I14RIK, are important for sperm motility and male fertility in mice”
Andrology, 2023, DOI: [10.1111/andr.13378](https://doi.org/10.1111/andr.13378)
3. **Kaneda Y**, Miyata H, Xu Z, Shimada K, Kamoshita M, Nakagawa T, Emori C, Ikawa M. “FBXO24 deletion causes abnormal accumulation of membraneless electron-dense granules in sperm flagella and male infertility”
Elife, 2024, DOI: [10.7554/eLife.92794](https://doi.org/10.7554/eLife.92794)
4. Miyata H, Shimada K, **Kaneda Y**, Ikawa M. “Development of functional spermatozoa in mammalian spermiogenesis”
Development, 2024, DOI: [10.1242/dev.202838](https://doi.org/10.1242/dev.202838)

第六編 参考文献

1. Cates, W., Farley&dagger, T. M. M. & Rowe&dagger, ; P J. *International Comparisons WORLDWIDE PATTERNS OF INFERTILITY: IS AFRICA DIFFERENT?*
2. Soumillon, M. *et al.* Cellular Source and Mechanisms of High Transcriptome Complexity in the Mammalian Testis. *Cell Rep* 3, 2179–2190 (2013).
3. Miyata, H., Shimada, K., Kaneda, Y. & Ikawa, M. Development of functional spermatozoa in mammalian spermiogenesis. *Development* 151, (2024).
4. Breucker, H., Schäfer, E. & Holstein, A.-F. Morphogenesis and fate of the residual body in human spermiogenesis. *Cell Tissue Res* 240, (1985).
5. Clermont, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52, 198–236 (1972).
6. O'Donnell, L., Nicholls, P. K., O'Bryan, M. K., McLachlan, R. I. & Stanton, P. G. Spermiation. *Spermatogenesis* 1, 14–35 (2011).
7. Ishikura, Y. *et al.* In vitro reconstitution of the whole male germ-cell development from mouse pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 28, 2167-2179.e9 (2021).
8. Yan, W. Male infertility caused by spermiogenic defects: Lessons from gene knockouts. *Mol Cell Endocrinol* 306, 24–32 (2009).
9. Fukata, Y. & Fukata, M. Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 11, 161–175 (2010).
10. Linder, M. E. & Deschenes, R. J. Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 74–84 (2007).
11. Ko, P. & Dixon, S. J. Protein palmitoylation and cancer. *EMBO Rep* 19, (2018).
12. Wu, Y. *et al.* ZDHHC19 localizes to the cell membrane of spermatids and is involved in spermatogenesis. *Biol Reprod* 106, 477–486 (2022).
13. Liu, R. *et al.* ARRDC5 deficiency impairs spermatogenesis by affecting SUN5 and NDC1. *Development* 150, (2023).
14. Giassetti, M. I. *et al.* ARRDC5 expression is conserved in mammalian testes and required for normal sperm morphogenesis. *Nat Commun* 14, 2111 (2023).
15. Hermann, B. P. *et al.* The Mammalian Spermatogenesis Single-Cell Transcriptome, from Spermatogonial Stem Cells to Spermatids. *Cell Rep* 25, 1650-1667.e8 (2018).
16. Tiscornia, G., Singer, O. & Verma, I. M. Production and purification of lentiviral vectors. *Nat Protoc* 1, 241–245 (2006).
17. Kobayashi, T. *et al.* An improved iliac lymph node method for production of monoclonal antibodies. *Dev Growth Differ* 64, 38–47 (2022).
18. Toyoda, Y., Yokoyama, M. & Hosi, T. Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro.

- The Japanese journal of animal reproduction* 16, 147–151 (1971).
19. HASUWA, H. *et al.* Transgenic Mouse Sperm that Have Green Acrosome and Red Mitochondria Allow Visualization of Sperm and Their Acrosome Reaction in Vivo. *Exp Anim* 59, 105–107 (2010).
 20. Inoue, N. *et al.* Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion. *Development* 140, 3221–3229 (2013).
 21. Ikawa, M. *et al.* Calmegin Is Required for Fertilin α / β Heterodimerization and Sperm Fertility. *Dev Biol* 240, 254–261 (2001).
 22. Yamaguchi, R., Yamagata, K., Ikawa, M., Moss, S. B. & Okabe, M. Aberrant distribution of ADAM3 in sperm from both angiotensin-converting enzyme (Ace)- and calmegin (Clgn)-deficient mice. *Biol Reprod* 75, 760–766 (2006).
 23. Ikawa, M. *et al.* Calsperin is a testis-specific chaperone required for sperm fertility. *Journal of Biological Chemistry* 286, 5639–5646 (2011).
 24. Shimada, K., Kato, H., Miyata, H. & Ikawa, M. Glycerol kinase 2 is essential for proper arrangement of crescent-like mitochondria to form the mitochondrial sheath during mouse spermatogenesis. *Journal of Reproduction and Development* 65, 155–162 (2019).
 25. Abramson, J. *et al.* Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* 630, 493–500 (2024).
 26. Goddard, T. D. *et al.* UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Science* 27, 14–25 (2018).
 27. Wan, J., Roth, A. F., Bailey, A. O. & Davis, N. G. Palmitoylated proteins: purification and identification. *Nat Protoc* 2, 1573–1584 (2007).
 28. Yuan, S., Zheng, H., Zheng, Z. & Yan, W. Proteomic Analyses Reveal a Role of Cytoplasmic Droplets as an Energy Source during Epididymal Sperm Maturation. *PLoS One* 8, e77466 (2013).
 29. Oko, R., Hermo, L., Chan, P. T., Fazel, A. & Bergeron, J. J. The cytoplasmic droplet of rat epididymal spermatozoa contains saccular elements with Golgi characteristics. *J Cell Biol* 123, 809–821 (1993).
 30. Bloom, G. & Nicander, L. On the ultrastructure and development of the protoplasmic droplet of spermatozoa. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 55, 833–844 (1961).
 31. Hermo, L., Pelletier, R. - Marc, Cyr, D. G. & Smith, C. E. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 3: Developmental changes in spermatid flagellum and cytoplasmic droplet and interaction of sperm with the zona pellucida and egg plasma membrane. *Microsc Res Tech* 73, 320–363 (2010).

32. Liu, J. *et al.* SYPL1 defines a vesicular pathway essential for sperm cytoplasmic droplet formation and male fertility. *Nat Commun* 14, 5113 (2023).
33. Fujihara, Y. *et al.* Identification of multiple male reproductive tract-specific proteins that regulate sperm migration through the oviduct in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116, 18498–18506 (2019).
34. Fujihara, Y. *et al.* Expression of TEX101, regulated by ACE, is essential for the production of fertile mouse spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 8111–8116 (2013).
35. Shen, C. *et al.* Prss37 Is Required for Male Fertility in the Mouse1. *Biol Reprod* 88, (2013).
36. Xiong, W. *et al.* Dissecting the PRSS37 interactome and potential mechanisms leading to ADAM3 loss in PRSS37-null sperm. *J Cell Sci* 134, (2021).
37. Hermann, B. P. *et al.* The Mammalian Spermatogenesis Single-Cell Transcriptome, from Spermatogonial Stem Cells to Spermatids. *Cell Rep* 25, 1650-1667.e8 (2018).
38. Lakkaraju, A. K. *et al.* Palmitoylated calnexin is a key component of the ribosome-translocon complex. *EMBO J* 31, 1823–1835 (2012).
39. Rana, M. S. *et al.* Fatty acyl recognition and transfer by an integral membrane S -acyltransferase. *Science (1979)* 359, (2018).
40. Huang, X. *et al.* S-acylation of p62 promotes p62 droplet recruitment into autophagosomes in mammalian autophagy. *Mol Cell* 83, 3485-3501.e11 (2023).
41. Bao, S. *et al.* Male Mice That Do Not Express Group VIA Phospholipase A2 Produce Spermatozoa with Impaired Motility and Have Greatly Reduced Fertility. *Journal of Biological Chemistry* 279, 38194–38200 (2004).
42. Meyer, C. *et al.* μ 1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *EMBO J* 19, 2193–2203 (2000).
43. Wu, Y. *et al.* Retinoic Acid Induced Protein 14 (*Rai14*) is dispensable for mouse spermatogenesis. *PeerJ* 9, e10847 (2021).
44. Zheng, H. *et al.* *Lack of Spem1 Causes Aberrant Cytoplasm Removal, Sperm Deformation, and Male Infertility.* www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?ORG (2007).
45. Li, C. *et al.* Spem2, a novel testis-enriched gene, is required for spermiogenesis and fertilization in mice. *Cellular and Molecular Life Sciences* 81, 108 (2024).
46. Zhang, X. *et al.* DDB1- and CUL4-associated factor 8 plays a critical role in spermatogenesis. *Front Med* 15, 302–312 (2021).
47. Shimada, K. *et al.* TSKS localizes to nuage in spermatids and regulates cytoplasmic elimination during spermiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 120,

- e2221762120 (2023).
48. Salaun, C., Locatelli, C., Zmuda, F., Cabrera González, J. & Chamberlain, L. H. Accessory proteins of the zDHHC family of S-acylation enzymes. *J Cell Sci* 133, (2020).
 49. Swarthout, J. T. *et al.* DHHC9 and GCP16 Constitute a Human Protein Fatty Acyltransferase with Specificity for H- and N-Ras. *Journal of Biological Chemistry* 280, 31141–31148 (2005).
 50. Wang, S., Qiao, H., Wang, P., Wang, Y. & Qin, D. ZDHHC19 Is Dispensable for Spermatogenesis, but Is Essential for Sperm Functions in Mice. *Int J Mol Sci* 22, 8894 (2021).
 51. Drewes, G., Ebner, A., Preuss, U., Mandelkow, E.-M. & Mandelkow, E. MARK, a Novel Family of Protein Kinases That Phosphorylate Microtubule-Associated Proteins and Trigger Microtubule Disruption. *Cell* 89, 297–308 (1997).
 52. Wu, Y. & Griffin, E. E. Regulation of Cell Polarity by PAR-1/MARK Kinase. in 365–397 (2017). doi:10.1016/bs.ctdb.2016.11.001.
 53. Cohen, D., Brennwald, P. J., Rodriguez-Boulant, E. & Mischak, A. Mammalian PAR-1 determines epithelial lumen polarity by organizing the microtubule cytoskeleton. *J Cell Biol* 164, 717–727 (2004).
 54. Lázaro-Díez, F. *et al.* Par1b links lumen polarity with LGN–NuMA positioning for distinct epithelial cell division phenotypes. *Journal of Cell Biology* 203, 251–264 (2013).
 55. Zulkiply, I. *et al.* Spindle rotation in human cells is reliant on a MARK2-mediated equatorial spindle-centering mechanism. *Journal of Cell Biology* 217, 3057–3070 (2018).
 56. Sapir, T. *et al.* Accurate Balance of the Polarity Kinase MARK2/Par-1 Is Required for Proper Cortical Neuronal Migration. *The Journal of Neuroscience* 28, 5710–5720 (2008).
 57. McDonald, J. A. Canonical and Noncanonical Roles of Par-1/MARK Kinases in Cell Migration. in 169–199 (2014). doi:10.1016/B978-0-12-800178-3.00006-3.
 58. Pasapera, A. M. *et al.* MARK2 regulates directed cell migration through modulation of myosin II contractility and focal adhesion organization. *Current Biology* 32, 2704–2718.e6 (2022).
 59. Tang, E. I. & Cheng, C. Y. MARK2 and MARK4 Regulate Sertoli Cell BTB Dynamics Through Microtubule and Actin Cytoskeletons. *Endocrinology* 163, (2022).
 60. Bessone, S. *et al.* EMK Protein Kinase-Null Mice: Dwarfism and Hypofertility Associated with Alterations in the Somatotrope and Prolactin Pathways. *Dev Biol* 214, 87–101 (1999).

61. Sun, C. *et al.* Inactivation of MARK4, an AMP-activated Protein Kinase (AMPK)-related Kinase, Leads to Insulin Hypersensitivity and Resistance to Diet-induced Obesity. *Journal of Biological Chemistry* 287, 38305–38315 (2012).
62. Tang, E. I. *et al.* Microtubule affinity-regulating kinase 4 (MARK4) is a component of the ectoplasmic specialization in the rat testis. *Spermatogenesis* 2, 117–126 (2012).
63. Sandí, M.-J. *et al.* MARK3-mediated phosphorylation of ARHGEF2 couples microtubules to the actin cytoskeleton to establish cell polarity. *Sci Signal* 10, (2017).
64. Gao, J., Li, W., Zhang, Z., Gao, W. & Kong, E. Proteome-wide identification of palmitoylated proteins in mouse testis. *Reproductive Sciences* 29, 2299–2309 (2022).
65. O'Donnell, A. F. & Schmidt, M. C. AMPK-Mediated Regulation of Alpha-Arrestins and Protein Trafficking. *Int J Mol Sci* 20, 515 (2019).
66. Zbieralski, K. & Wawrzycka, D. α -Arrestins and Their Functions: From Yeast to Human Health. *Int J Mol Sci* 23, 4988 (2022).
67. O'Donnell, L. Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis* 4, e979623 (2014).
68. Zhao, L., Zhao, J., Zhong, K., Tong, A. & Jia, D. Targeted protein degradation: mechanisms, strategies and application. *Signal Transduct Target Ther* 7, 113 (2022).
69. Coux, O. & Goldberg, A. L. *STRUCTURE AND FUNCTIONS OF THE 20s AND 26s PROTEASOMES*. *Annu Rev. Biochem.* 19% vol. 65 www.annualreviews.org (1996).
70. Ciechanover, A. & Schwartz, A. L. The ubiquitin-proteasome pathway: The complexity and myriad functions of proteins death. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 2727–2730 (1998).
71. Mani, A. & Gelmann, E. P. The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *Journal of Clinical Oncology* vol. 23 4776–4789 Preprint at <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.081> (2005).
72. Zapata - Carmona, H., Barón, L., Kong, M. & Morales, P. Role of the Ubiquitin - Proteasome System in Mammalian Male Germ Cell Differentiation and Reproductive Fitness. *Mol Reprod Dev* 92, (2025).
73. Zheng, N. *et al.* Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* 416, 703–709 (2002).
74. Kipreos, E. T. & Pagano, M. The F-box protein family. *Genome Biol* 1, 3002.1-3002.7 (2000).
75. Zheng, Y. *et al.* FBXO24 targets SLC25A26 for K6-linked polyubiquitylation to maintain mitochondrial function during spermiogenesis. *Development* 152, (2025).
76. Kaneda, Y. *et al.* FBXO24 deletion causes abnormal accumulation of membraneless electron-dense granules in sperm flagella and male infertility. *Elife* 13, (2024).

77. Li, Z. *et al.* FBXO24 modulates mRNA alternative splicing and MIWI degradation and is required for normal sperm formation and male fertility. *Elife* 12, (2024).
78. Tanno, N. *et al.* FBXO47 is essential for preventing the synaptonemal complex from premature disassembly in mouse male meiosis. *iScience* 25, (2022).
79. Ma, A., Yang, Y., Cao, L., Chen, L. & Zhang, J. V. FBXO47 regulates centromere pairing as key component of centromeric SCF E3 ligase in mouse spermatocytes. *Commun Biol* 7, 1099 (2024).
80. Gopinathan, L. *et al.* Emi2 Is Essential for Mouse Spermatogenesis. *Cell Rep* 20, 697–708 (2017).
81. Tokuzawa, Y. *et al.* Fbx15 Is a Novel Target of Oct3/4 but Is Dispensable for Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Mouse Development. *Mol Cell Biol* 23, 2699–2708 (2003).
82. Liu, Y. *et al.* Fbxo30 Regulates Mammopoiesis by Targeting the Bipolar Mitotic Kinesin Eg5. *Cell Rep* 15, 1111–1122 (2016).
83. Li, B. *et al.* A Comprehensive Mouse Transcriptomic BodyMap across 17 Tissues by RNA-seq. *Sci Rep* 7, 1–10 (2017).
84. Kaneda, Y. *et al.* IRGC1, a testis-enriched immunity related GTPase, is important for fibrous sheath integrity and sperm motility in mice. *Dev Biol* 488, 104–113 (2022).
85. Letunic, I., Khedkar, S. & Bork, P. SMART: Recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic Acids Res* 49, D458–D460 (2021).
86. Pereira, C. D., Serrano, J. B., Martins, F., da Cruz e Silva, O. A. B. & Rebelo, S. Nuclear envelope dynamics during mammalian spermatogenesis: new insights on male fertility. *Biological Reviews* 94, 1195–1219 (2019).
87. Okada, Y. Sperm chromatin condensation: epigenetic mechanisms to compact the genome and spatiotemporal regulation from inside and outside the nucleus. *Genes Genet Syst* 97, 21–00065 (2022).
88. Teves, M. *et al.* Sperm Differentiation: The Role of Trafficking of Proteins. *Int J Mol Sci* 21, 3702 (2020).
89. Agarwal, A. *et al.* Male infertility. *The Lancet* 397, 319–333 (2021).
90. Baptissart, M., Vega, A., Martinot, E. & Volle, D. H. Male fertility: Is spermiogenesis the critical step for answering biomedical issues? *Spermatogenesis* 3, e24114 (2013).