

令和元年6月6日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11121

研究課題名(和文) 脂質代謝異常による無精子症発症機構の解明

研究課題名(英文) Azoospermia caused by gene disruption of lipid metabolism related gene

研究代表者

大和屋 健二 (Yamatoya, Kenji)

東京理科大学・理工学部応用生物科学科・助教

研究者番号：80447309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ES細胞を用いた相同組み換えによって作成したPLCzのコンディショナルノックアウトマウスの妊孕性の解析を行った。その結果、floxed雄の妊孕性は認められたが、ホモ欠損マウスは精子形成不全による雄性不妊であることが明らかとなった。ホモ欠損マウスの精子形成において減数分裂まで異常は認められないが、ステージV以降から円形精子細胞が脱落し無精子症となることが明らかとなった。しかし、CRISPER/Casシステムによる遺伝子破壊では、精子形成に著しい異常はない。このことから、標的遺伝子近傍の遺伝子を含めて解析を行った結果、近傍の遺伝子に発現異常は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ES細胞を用いた相同組み換えによって作成した本研究で使用したコンディショナルノックアウトマウスは精子形成不全による雄性不妊であることが明らかとなった。CRISPER/Casシステムによる遺伝子破壊では、精子形成に著しい異常はなく、卵の活性化に重要であることが明らかにされた。このことは、このコンディショナルマウスでは単に標的遺伝子が欠損したのではなく、ドミナントネガティブな効果が現れていると考えられる。作製手法の影響を再考し、本マウスにおける雄性不妊の一端を明らかにした。今後の完全解明に重要な基礎となる。これは遺伝子操作に関して作製から表現型の解明まで慎重な解析が要求されることを示す。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the fertility of PLCz conditional knock out mice created by homologous recombination using ES cells. The floxed male mice were fertile, but the homozygous knockout male mice were infertile due to spermatogenic disorder. Spermatocytes successfully went through meiosis and became round spermatids, but sloughing of spermatids at stage V caused the azoospermia. However, the gene knockout using CRISPER/Cas system did not lead to azoospermia. We could not confirm any abnormal expression of genes in vicinity of the target gene.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精子形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

精子抽出物で卵子を人工的に活性化できることがウニで示されて以来 Sperm-borne oocyte activating factor (SOAF) として数々のタンパク質が卵活性化因子として研究されて来た。哺乳類精子において SOAF は細胞質成分ではなく、核周囲物質として構造に結合した分子であることが示されて来た。我々は globozoospermia や扁平化していない精子などは先体後部鞘の形成異常が認められ、核周囲物質が不足することから卵活性化能を失っていることを示して来た (Ito *et al*, *Human reprod* 2010)。

イノシトール3リン酸シグナルによるカルシウムイオンの上昇が卵活性化を起こすことから PLC が卵活性化因子であると考えられ、いくつかのリコンビナント PLC アイソフォームが卵子に注入されて来た。そのなかで精子特異的に発現する PLC $\zeta$  に卵活性化能があることが報告された。それ以来、精子から卵に持ち込まれた PLC $\zeta$  の酵素活性によって発生した PI3 と DAG がカルシウムオシレーションを誘起し、卵活性化にいたるというモデルがつくられた。しかし、ノックアウトマウスによる証明はなされていなかった。研究開始当初、現在主流となっている CRISPER/Cas システムではなく、従来の ES 細胞を用いた相同組み換えによる PLC $\zeta$  コンディショナルノックアウトマウス作製が進行しており、雄性不妊であるという結果を得ていた。

### 2. 研究の目的

本研究では雄性不妊である PLC $\zeta$  コンディショナルノックアウトマウスの解析を行い、雄性不妊の原因となる表現型を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) ホモ欠損雄マウスを作製し、野生型雌マウスと交配させ、膣栓を確認し、その後の妊娠を調べた。
- (2) ホモ欠損雄マウスおよび floxed 雄マウス (8 週齢以上) から精巣および精巣上体を採取し、パラフィン切片を作製し形態を比較した。
- (3) 雄マウス (8 週齢以上) から採取した精巣において、標的遺伝子近傍に存在する *Capza3* を含むメッセンジャー RNA の発現を RT-PCR により調べた。
- (4) 第 2 世代 DNA シークエンサーを用いてホモ欠損マウスのゲノムシークエンスを行った。

### 4. 研究成果

(1) Floxed 雄マウスは妊孕性があるが、ホモ欠損雄マウスと交配したメスの妊娠は認められず、本遺伝子改変マウスは雄性不妊であることを確認した。

(2) Floxed 雄マウスの精巣上体から正常精子が認められたが、ホモ欠損マウスの精巣上体から精子は認められず、変性した細胞が多く認められた。精巣は野生型と比較して小さく、空胞や多核の巨細胞など脱落した細胞を多く認めた (図 1)。

PAS 染色によりステージングを行なったところ、ステージ XII では伸長期精子細胞は認められないものの、減数分裂中期の細胞に異常は認められなかった。ステージ III においても伸長期精子細胞は認められなかったが、先体を有したステップ 3 円形精子細胞が認められ、精母細胞、精祖細胞に異常は認められなかった。ステージ IV においても同様で、伸長期精子細胞は認められなかったが、円形精子細胞が認められ、精母細胞、精祖細胞に異常は認められなかった。ステージ V では、空胞と円形精子細胞と思われる変性した細胞が多く認められたが、精母細胞、精祖細胞に異常は認められなかった。

(3) 雄マウス (8 週齢以上) から採取した精巣において *Capza3* を含む標的遺伝子近傍に存在する遺伝子の発現は、野生型と比較して異常が認められなかった。

(4) ランダムインサクションによってベクターの主要部分が組み込まれた箇所を 1 箇所同定した。しかし、近傍には偽遺伝子を含めても有力なコーディング領域はデータベース上存在しなかった。ヘテロ欠損マウスにおいても形態異常が認められるため、ドミナントネガティブ効果を示す遺伝子産物が転写されていると考えている。その遺伝子は PLC $\zeta$  である可能性は低いことを確認している。

今後、ドミナントネガティブ効果を示す遺伝子産物の同定が本動物の表現型解明に重要である。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

Iwai M, Hamatani T, Nakamura A, Kawano N, Kanai S, Kang W, Yoshii N, Odawara Y, Yamada M, Miyamoto Y, Saito T, Saito H, Miyado M, Umezawa A, Miyado K, Tanaka M. Membrane protein CD9 is repositioned and released to enhance uterine function. *Laboratory Investigation* 99(2) 200-209 2019 年 2 月 査読あり doi: 10.1038/s41374-018-0145-1



図 1. ホモ欠損マウスの精巣。実線で囲まれた中に多核細胞が認められる。

Ito C, [Yamatoya K](#), Yoshida K, Fujimura L, Sugiyama H, Suganami A, Tamura Y, Hatano M, [Miyado K](#), Toshimori K. Deletion of Eqtn in mice reduces male fertility and sperm-egg adhesion. *Reproduction* 156(6) 579-590 2018 年 12 月 査読あり doi: 10.1530/REP-18-0394

Iwai M, Harada Y, Miyabayashi R, Kang W, Nakamura A, Kawano N, Miyamoto Y, Yamada M, Hamatani T, Miyado M, Yoshida K, Saito H, Tanaka M, Umezawa A, [Miyado K](#). Chemotactic behavior of egg mitochondria in response to sperm fusion in mice. *Heliyon* 4(11) e00944 2018 年 11 月 査読あり doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00944

大和屋健二、吉田恵一. 受精における脂質の役割 *Medical Science Digest* 12(44) 758-760 2018 年 12 月 査読なし J-GLOBAL ID : 201802268364780182

Nakamura A, Kawano N, Motomura K, Kuroda A, Sekiguchi K, Miyado M, Kang W, Miyamoto Y, Hanai M, Iwai M, Yamada M, Hamatani T, Saito T, Saito H, Tanaka M, Umezawa A, [Miyado K](#). Degradation of phosphate polymer polyP enhances lactic fermentation in mice. *Genes Cells* 23:904-914 2018 年 査読あり doi: 10.1111/gtc.12639

Kang W, Ishida E, [Yamatoya K](#), Nakamura A, Miyado M, Miyamoto Y, Iwai M, Tatsumi K, Saito T, Saito K, Kawano N, Hamatani T, Umezawa A, [Miyado K](#), Saito H. Autophagy-disrupted LC3 abundance leads to death of supporting cells of human oocytes. *Biochemistry and biophysics reports* 15:107-114. 2018 年 8 月 査読あり doi: 10.1016/j.bbrep.2018.08.002

Usuki S, [Yamatoya K](#), Kawamura Y, Yamaguchi Y, Suzuki N, Katsumata K, Terashima C, Fujishima A, Kudo A, Nakata K. Denaturation of Lysozyme with Visible-light-responsive Photocatalysts of Ground Rhodium-doped and Ground Rhodium-antimony-co-doped Strontium Titanate. *Journal of Oleo Science* 67(12) 1521-1533 2018 年 8 月 査読あり doi: 10.5650/jos.ess18155

Tran MQ, Yamaguchi Y, [Yamatoya K](#), Horikoshi S, Nakata K. Rewritable superhemophobic and superhemophilic wettability pattern based on titanium dioxide with Ag loading. *Inorganic Chemistry Communications* (96) 1-4 2018 年 7 月 査読あり doi: 10.1016/j.inoche.2018.07.043

Yoshida K, Kang W, Nakamura A, Kawano N, Hanai M, Miyado M, Miyamoto Y, Iwai M, Hamatani T, Saito H, [Miyado K](#), Umezawa A. Ubiquitin-activating enzyme E1 inhibitor PYR-41 retards sperm enlargement after fusion to the egg. *Reprod Toxicol* S0890-6238(17) 30497 2018 年 査読あり doi: 10.1016/j.reprotox.2018.01.001

Yamaguchi Y, Usuki S, Kanai Y, [Yamatoya K](#), Suzuki N, Katsumata K, Terashima C, Suzuki T, Fujishima A, Sakai H, Kudo A, Nakata K. Selective Inactivation of Bacteriophage in the Presence of Bacteria by Use of Ground Rh-Doped SrTiO<sub>3</sub> Photocatalyst and Visible Light. *ACS applied materials & interfaces* (2017) 9(37), 31393-31400 査読あり doi: 10.1021/acsami.7b07786

[Yamatoya K](#), Saito K, Saito T, Kang W, Nakamura A, Miyado M, Kawano N, Miyamoto Y, Umezawa A, [Miyado K](#), Saito H. Birth weights and Down syndrome in neonates delivered after frozen-thawed embryo transfer: The 2007-2012 national registry data in Japan. *Reproductive Medicine and Biology* (2017) 16(2), 228-234. 査読あり doi: 10.1002/rmb2.12033

Saito K, [Miyado K](#), [Yamatoya K](#), Kuwahara A, Inoue E, Miyado M, Fukami M, Ishikawa T, Saito T, Kubota T, Saito H. Increased incidence of post-term delivery and Cesarean section after frozen-thawed embryo transfer during a hormone replacement cycle. *J Assist Reprod Genet* (2017) 34(4), 465-470. 査読あり doi: 10.1007/s10815-017-0869-7

Nakasuji T, Ogonuki N, Chiba T, Kato T, Shiozawa K, [Yamatoya K](#), Tanaka H, Kondo T, [Miyado K](#), Miyasaka N, Kubota T, Ogura A, Asahara H. Complementary Critical Functions of Zfy1 and Zfy2 in Mouse Spermatogenesis and Reproduction. *PLoS Genet* (2017) 13, e1006578. 査読あり doi: 10.1371/journal.pgen.1006578

[Miyado K](#), Kang W, [Yamatoya K](#), Hanai M, Nakamura A, Mori T, Miyado M, Kawano N. Exosomes versus microexosomes: Shared components but distinct functions. *J Plant Res* (2017) 130(3), 479-483. 査読あり doi: 10.1007/s10265-017-0907-7

Kang W, Kawano N, [Yamatoya K](#), Yoshida K, Yoshida M, [Miyado K](#). Critical roles of seminal

plasma on sperm migration in the female reproductive tract. *Journal of Reproduction Engineering* (2016) 18, 5-10. 査読あり  
[http://www.sreprod.jp/Contents/AdvPub/AdvPub16\\_Kang&Kawano.pdf](http://www.sreprod.jp/Contents/AdvPub/AdvPub16_Kang&Kawano.pdf)

〔学会発表〕(計 18 件)

中村悠基、石黒桜子、大和屋健二、中田一弥 精子先体局在ポリシアル化タンパク質の解析 第 41 回日本分子生物学会年会パシフィコ横浜(神奈川県) 2018 年 11 月 28 日  
石黒桜子、中村悠基、大和屋健二、中田一弥 精子先体局在ポリシアル酸の機能解析 第 41 回日本分子生物学会年会『パシフィコ横浜(神奈川県) 2018 年 11 月 28 日  
樺澤美咲、大和屋健二、倉持幸司、中田一弥 新規オキシリピン プラケブリン A の新規薬理活性と標的タンパク質の探索 第 41 回日本分子生物学会年会パシフィコ横浜(神奈川県) 2018 年 11 月 29 日  
本間莉乃、大和屋健二、中田一弥 SPESP1 の生理的機能の解明 第 41 回日本分子生物学会年会パシフィコ横浜(神奈川県) 2018 年 11 月 29 日  
寺山由夏、大和屋健二、中田一弥 SPACA1 の機能解析第 41 回日本分子生物学会年会パシフィコ横浜(神奈川県) 2018 年 11 月 29 日  
希宇佐見智子、高橋友花、大和屋健二、中田一弥 少糖の薬理活性の解析第 41 回日本分子生物学会年会パシフィコ横浜(神奈川県) 2018 年 11 月 30 日  
永井悠也、大和屋健二、寺本直純、中田一弥、八木透、宮本義孝 DMSO フリー、血清フリー保存液による細胞の凍結保存第 41 回日本分子生物学会年会パシフィコ横浜(神奈川県) 2018 年 11 月 30 日  
Yamatoya K, Kousaka M, Ito C, Yanagida M, Araki Y, Toshimori K. SPACA1 cleavage during acrosome reaction allows for translocation of IZUMO1 to the equatorial segment. Society for the Study of Reproduction, 51st Annual Meeting New Orleans, Louisiana, (USA) 2018 July 10-13,  
永井悠也、大和屋健二、寺本直純、中田一弥、八木透、宮本義孝 再生医療・細胞医療における DMSO フリー、血清フリーの細胞凍結保存液の開発 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 8 日  
瀬町崇浩、長尾将成、臼杵翔、大和屋健二、中田一弥 希少糖が種子発芽に与える影響 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 8 日  
樺澤美咲、大和屋健二、倉持幸司、池北雅彦、中田一弥 オキシリピン PlakevulinA の新規薬剤活性の探索 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 7 日  
直原沙来、井上沙樹子、大和屋健二、吉見陽児、加藤智彦、池北雅彦、中田一弥 シスタンシェおよびニトラリア植物抽出物の糖化抑制効果の解析 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 7 日  
井上沙樹子、直原沙来、大和屋健二、加藤智彦、中田一弥 ニトラリアエキス中の新規有用物質の探索 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 7 日  
小峰卓也、和田有輝子、大和屋健二、齋藤慎一、中田一弥 新規合成レチノ安息香酸のレチノイン酸およびレチノイン酸結合タンパク質への影響 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 7 日  
和田有輝子、小峰卓也、大和屋健二、吉見陽児、齋藤慎一、池北雅彦、中田一弥 新規合成レチノ安息香酸の催奇性 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 7 日  
香坂茉莉花、大和屋健二、中田一弥 SPACA1 切断酵素の探索 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 6 日  
酒井萌花、大和屋健二、中田一弥 SPESP1 切断酵素の探索 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 6 日  
高橋友花、大和屋健二、吉見陽児、池北雅彦、中田一弥 希少糖の細胞毒性メカニズムの解析 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月 6 日

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: レチノイド化合物及び医薬組成物

発明者: 齋藤慎一、大和屋健二、池北雅彦、吉見陽児、和田有輝子、小峰卓也

権利者: 学校法人東京理科大学

種類: 特許願

番号: 特願 2018-1644449

出願年: 平成 30 年

国内外の別: 国内

(1)研究分担者

研究分担者氏名：宮戸健二

ローマ字氏名：Miyado Kenji

所属研究機関名：国立研究開発法人国立成育医療研究センター

部局名：細胞医療研究部

職名：室長

研究者番号（8桁）：60324844

(2)研究協力者

研究協力者氏名：河野菜摘子

ローマ字氏名：Kawano Natsuko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。