

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：17401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2020
課題番号：17K07139
研究課題名(和文) 発生工学的手法を用いた遺伝子改変不妊モデルマウスの解析

研究課題名(英文) Analysis of transgenic male infertile mice using ART

研究代表者

竹田 直樹 (takeda, naoki)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・助教

研究者番号：90304998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト不妊疾患の原因因子と目されるプロタミン遺伝子を、マウスにおいて改変し疾患モデル動物の開発を試みた。その結果Prm1はヘテロで精子無力症様の表現形を示し、運動能の著しい減退による不妊を呈した。一方、同じファミリー遺伝子であるPrm2はホモで精子無力症様となり不妊であった。これらのことからプロタミン遺伝子の欠損や発現異常が不妊の直接的な原因であることが明らかになり、さらにPrm1とPrm2に機能的差異があることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不妊は大きな社会問題となっているが、生殖に関わるが故にその治療法や原因の解明には大きな制限がある。本研究では不妊の原因遺伝子と目されるプロタミンに着目し雄性不妊をきたす遺伝子改変疾患モデルマウスを作製し解析した。ここで習得したモデルマウス作製法や解析手法は他の不妊原因遺伝子にも応用が可能であり、新たに開発した不妊疾患モデルマウスを用いることで、新規ART(生殖補助医療)の有効性や安全性を試験できる環境を構築できるであろう。

研究成果の概要(英文)：A disease model mice were developed by modifying protamine genes, which are causative factors of infertility disease.

Prm1 KO mouse is showed asthenozoospermia in heterozygous, and was infertile due to poor motility.

However, Prm2 KO is became asthenozoospermia-like and infertile in homozygous.

These results suggest that abnormal expression of protamine genes were the direct causes of infertility, and that there is a difference in function between Prm1 and Prm2.

研究分野：発生生物学

キーワード：精子 遺伝子改変マウス 疾患モデル

1. 研究開始当初の背景

不妊は大きな社会問題である。生殖補助医療技術が進捗する一方で、不妊の原因、特に男性側の原因には不明な点が多い。個体疾患の解明にはモデル動物での解析が有用であるが、生殖に異常を来す変異体は系統の維持が困難である為に研究の進展を遅らせている。そこで発生工学的手法を用いてこれらの技術的な問題を克服し解析を試みた。

多くの臨床報告で精子特異的タンパク質であるプロタミンの発現異常が認められており、ヒトプロタミン 1 とヒトプロタミン 2 の発現量の異常比率が不妊と大きな関連がある事は明らかである。プロタミンは精子完成過程の後期に発現する DNA 結合タンパク質であり、精子体積の極小化や細胞質の離脱など特徴的な形態変化に関わるとされているが、生物学的な機能については未だ明確ではない。マウスではヒトの相同遺伝子として **Prm1** と **Prm2** が知られていることから、本研究ではこれらを不妊原因遺伝子と想定した。

2. 研究の目的

雄性不妊の要因は大きく環境的要因と遺伝的要因に分けられるが、本研究では多くの臨床報告で精子特異的核タンパク質であるプロタミンの発現異常が見出されていることから、プロタミンは不妊疾患の要因であると考えられる。プロタミンは精子発生過程において発現し、体細胞ではヒストンと結合していた DNA は、この過程においてプロタミンに置換される。そのアミノ酸配列からプロタミンは DNA と強固に結合することで化学剤および光反応、物理的傷害等から保護すると考えられているが、生物学的な機能については未だ明確ではない。精巣での精子発生過程における表現形の解析や、体外培養での受精および初期胚発生の検討をおこなうためには、遺伝子欠損個体での解析が適していることから、マウスへの遺伝子改変をおこなった。これによりプロタミン発現異常を誘導することで不妊疾患モデル動物を作製し、ヒト雄性不妊疾患との比較をおこなった。

3. 研究の方法

マウスプロタミンはヒトと同じく **Prm1** と **Prm2** の 2 つの遺伝子ファミリーからなる。ES 細胞を用いたジーンターゲティング法やゲノム編集技術を用いて、**Prm1** と **Prm2** それぞれの変異マウスを樹立した。臨床での不妊検査方法を参考に、妊孕性や精子形態、運動能の確認、精子クロマチン構造検査、生殖補助技術による表現形のレスキュー、遺伝子発現の検討をおこなった。

4. 研究成果

ヒト不妊疾患の原因因子と目されるプロタミンを、マウスにおいて遺伝子を改変し疾患モデル動物の開発を試みた。我々は既に、**Prm1** はヘテロで精子無力症様の表現形を示し、運動能の著しい減退による不妊を呈することを明らかにしている。そこで更に発展させ、

Prm1 ヘテロ欠損精子は無力精子症を示すものの、発生学的手法を用いれば受精させることが可能であったため、**Prm1** ホモ欠損マウスを作製した。その結果、精巣で精子発生過程され精巣上体へ放出されるが、顕著な精子形態異常が見られるとともに、ミトコンドリア電位も喪失していた。また、**Prm1** ヘテロ欠損精子と同様に **ART** によるレスキューを試みたが、受精発生はしなかった。これらのことから **Prm1** のホモ欠損は精巣上体での精子成熟過程で必須であることが示された。

一方、同じファミリー遺伝子である **Prm2** は **P** 前駆体タンパク質として発現し、その後 **N** 末が切断されて成熟 **Prm2** となるために、**Prm1** よりも機能的に重要と考えられていたが、意外にもヘテロでは妊孕性があり、ホモで精子無力症様となり不妊であった。**Prm2** ホモ変異精子は、**Prm1** 欠損精子と同様に、精巣での精子発生過程を経て精巣上体へ放出されるが、運動能を欠いていた。また精子形態にも明らかな異常があった。**Prm2** 変異マウスはゲノム編集技術を用いて複数の系統を作製し解析した。その結果、変異によって微妙に表現型が異なる事から、ヒト疾患モデル動物を作製する上でのこの手法の有効性が示された。

本研究においては、不妊の原因遺伝子であろうプロタミンを対象として、実験動物としては系統維持しにくい生殖不全モデルマウスの作製技術を確立した。プロタミンの発現異常が不妊の直接的原因となりうること、またプロタミンが不妊のマーカーになることを明らかにした。**Prm1** と **Prm2** は同一ファミリーでありながら、機能代替は不十分であり、その量的および機能的差異があることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹田 直樹, 荒木 喜美
2. 発表標題 プロタミン1の精子成熟過程における影響
3. 学会等名 日本動物学会 第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹田直樹、小林千余子、荒木喜美
2. 発表標題 プロタミン2遺伝子改変マウスは精子死滅症を来す
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会（札幌）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹田直樹、小林千余子、荒木喜美
2. 発表標題 プロタミン2遺伝子改変マウスの作製と解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹田直樹、小林千余子、荒木喜美
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いた不妊モデルマウスの作
3. 学会等名 平成30年度文部科学省新学術領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹田 直樹, 小林千余子, 吉永 一也, 古島 謙亮, 高宗 和史, 李 正花, 安部 眞一, 相澤 慎一, 山村 研一, 荒木 喜美
2. 発表標題 発生工学的手法を用いた 遺伝子改変不妊モデルマウスの解析
3. 学会等名 日本動物学会 第88回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------