

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15668

研究課題名（和文）外来タンパクによる細胞機能への影響ーGFP導入が引き起こす不妊の原因解明ー

研究課題名（英文）Effect of introduced protein on cell function

研究代表者

小澤 秋沙（Ozawa, Aisa）

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：80803171

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：不妊が認められたGFAP-GFP オスマウスの次世代シーケンス解析を実施したことにより導入された配列が精子形成に重要なタンパクをコードする遺伝子をノックアウトしていることが明らかとなった。この遺伝子のノックアウトにより精子の形成が異常となり不妊となることがヒトとマウスで報告されている。しかし、これまでに報告されているこの遺伝子ノックアウトマウスの精子の形態異常を伴う精巣の組織像と本研究で得られている精巣の組織像には差が認められた。GFAP-GFP マウスに導入された配列はGFAPプロモーター及びGFP配列以上の長い配列が導入ことがNGS解析から示唆されたことが関係していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当研究室のGFAP-GFPオスマウスで認められた不妊の原因について当初の目的であった外来タンパク（GFP）による影響であることは示すことはできなかったが、本研究で明らかになったGFAP-GFP配列の導入による遺伝子のノックアウトによる影響である可能性が示唆された。また、同じ遺伝子のノックアウトマウスでの精巣組織像と比較したときに異なる組織像が当研究室のGFAP-GFPマウスでは認められている。これはNGS解析により欠失した部位に挿入された配列にはGFAPプロモーターとGFP配列が繰り返し挿入されていることが示唆されていることから過剰な外来タンパクの導入による影響が考えられる。

研究成果の概要（英文）：Next-generation sequence analysis of infertility GFAP-GFP male mice revealed that the introduced sequence knocked out a gene encoding a protein important for spermatogenesis. Knockout of this gene has been reported to cause abnormal sperm formation and infertility in human and mouse. However, there was a difference between the histology of the testes with abnormal sperm morphology reported so far in this gene-knockout mouse and the histology of the testis obtained in this study. Furthermore, the NGS analysis suggested that GFAP-GFP mice were transfected with a longer sequence than the GFAP promoter and the GFP sequence. This difference in testicular histology is considered to be related to the introduction of this long-chain sequence.

研究分野：発生学

キーワード：精子形成 GFP

1．研究開始当初の背景

当研究室で管理しているグリア線維性酸性タンパク質（GFAP）のプロモーター配列に緑色蛍光タンパク（GFP）を融合したベクターが導入されたマウス、GFAP-GFP マウスでは当研究室で飼育、維持している他の遺伝子改変マウスよりも高率に不妊オスマウスが見られた（GFAP-GFP；12.9%（31 匹中 4 匹）、他の遺伝子改変マウス：0%（82 匹中 0 匹））。また、不妊オスマウスの精巢の組織学的解析では精子形成異常が認められ、正常な精子の形成がほとんど認められなかった。これまでに、GFAP-GFP マウスの DNA 上のどの部位に GFP が導入されたかは明らかにされていないが、本来 GFAP が発現している大脳、海馬などの主に中枢神経系での GFP 局在は確認され、維持されてきた系統である。ゲノム DNA の qPCR では GFP ゲノム量が不妊オスマウスでは妊孕性があるオスマウスよりも高いことから、導入され GFAP-GFP 配列の量が不妊を引き起こす可能性について検討することとした。

2．研究の目的

本研究の目的は GFP の様な外来タンパク質の導入された量と個体への影響の関連性を明らかにすることである。GFP は DNA に導入することで生きたままの細胞の挙動を観察することを可能にする生物学分野の発展に欠かせない技術である。しかし、GFP の DNA への導入による細胞または個体レベルでの影響についてはこれまで詳細に検討されてきていない。GFAP-GFP 不妊オスマウスの様に導入されたゲノム量と表現系に関連が示唆される個体について解析することで、有用である GFP のような外来タンパクの遺伝子改変における新たな導入する遺伝子量という明確な指標を示すことができると考える。

3．研究の方法

当研究室のGFAP-GFPマウスではマウスゲノムのどこの部位にどのくらいのコピー量が導入されたかが解析されていない。そのため、はじめにGFAP-GFPゲノムの次世代シーケンスを行い、GFAP-GFPの導入されている部位、コピー数を特定する。解析結果から以下の仮説1又は2について検証することとした。

仮説1：GFPが導入されたことによる遺伝子のノックアウトによる雄性不妊の可能性

仮説2：GFPの過剰発現による雄性不妊の可能性

【実験1】GFAP-GFPマウス次世代シーケンス解析

次世代シーケンスによるGFP遺伝子がどの部位にどのくらい挿入されているのかを比較を不妊オスvs妊孕性のあるオスvs妊孕性のあるメスで行い、当研究室で見られているGFAP-GFPマウス雄性不妊の原因と考えられるGFP導入部位を特定する。解析の結果、GFPが導入された部位が遺伝子をコードしている領域の場合は仮説1の検証として【実験2】へ、GFPが導入された部位が遺伝子をコードしている領域ではない場合は実験3を行う。

【実験2】GFPが導入された遺伝子のmRNA発現解析

GFPが導入された遺伝子のmRNA発現について妊孕性のあるオスvs不妊オスでの比較をqPCRで解析し、発現に差が見られる場合はその遺伝子の精子形成における機能解析を行う。

【実験3】GFPの局在による不妊の精巢内及び全身での検討

GFP が導入された部位が遺伝子をコードしていない場合、精巢内及び全身での GFP 局在が不妊を引き起こす可能性の検討をする。

4．研究成果

【GFAP-GFP マウス次世代シーケンス解析】

不妊が認められたオスマウスのゲノムを用いて次世代シーケンス（NGS）を実施した。導入されたと考えられる GFAP-GFP 配列がゲノム上に 2 箇所あること、1 箇所の導入部位ではある遺伝子のノックアウトが起こっていること、さらに、GFP 配列を含むリード量から繰り返しで配列が導入されている可能性が示唆された。しかし、短い配列を用いた NGS 解析ではどのくらいの長さで、繰り返しが何回起こっているのかは確認が困難であった。そのため長鎖配列による NGS を追加で実施することとした。長鎖配列による NGS 解析結果から繰り返し配列が少なくとも 3 回以上は含まれていることが示唆された。さらに短い配列による NGS 解析結果からゲノム上に 2 箇所あると予想された挿入部位は 1 箇所であり、挿入された配列中にマウスのゲノム配列の一部が含まれていることが明らかとなった。

【ノックアウトされていた遺伝子についての検討】

GFAP-GFP 配列が挿入されノックアウトされた遺伝子についてはすでに精子形成不全による報告があった。そのため、GFAP-GFP 不妊オスと既報の精巣組織像を比較し、GFAP-GFP マウスで認められた組織像と部分的に一致していることがわかった。しかし、GFAP-GFP マウスでは既報の精巣組織像よりも重度な異常が認められていることから、ノックアウトされた部分の違いとノックアウト部分に挿入された GFP を含む繰り返し配列が影響していると考えられた。そのため、現在は繰り返し配列を含む導入された長鎖ゲノムについて詳細な検討を継続している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 パラフィン切片の作製方法	発明者 岩下直樹、小澤秋 沙、坂上元栄	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022- 76944	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------