

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02397

研究課題名(和文) 遺伝子組換え動物を用いた生物種間に存在する生殖メカニズムの普遍性と特異性の解明

研究課題名(英文) Elucidating the universality and specificity of reproductive mechanisms between species using genetically modified animals

研究代表者

藤原 祥高 (FUJIHARA, YOSHITAKA)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：70578848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者らがゲノム編集技術CRISPR/Cas9を用いた個体での必須遺伝子スクリーニングより明らかになった遺伝子(Lcn5-10, Ly6g5b/c, Spaca4, Tex46, Dcst1/2など)について雄性生殖での機能を解明した。今回の発見は、哺乳類精子に関わる「精巣上体での精子成熟」、「透明帯通過」、そして「受精膜融合」の受精に至る重要ステップに新たな知見を見出せた。特に、SPACA4, TEX46の発見は、従来考えられてきた精子の透明帯通過に必要な精子の頭部形態と尾部が生み出す運動性に新たな分子を付け加えることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、哺乳類生殖の中でも受精へ至るまでに精子が受精能力を獲得して卵子と膜融合するまでに必要な遺伝子群の発見に成功した。これまで不明だった精子の透明帯通過に寄与する精子膜タンパク質SPACA4, TEX46の同定は、分子機構の全容解明への第一歩となる。今回発見した因子を標的に、男性不妊の原因究明や検査・診断法の開発に繋がり、精巣上体分泌因子を用いた精子受精能力の制御や試験管内再現への可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we elucidated the functions of genes (Lcn5-10, Ly6g5b/c, Spaca4, Tex46, Dcst1/2, etc.) in male reproduction that were identified through essential gene screening using the genome editing technology CRISPR/Cas9. This discovery has offered new insights into the crucial steps involved in the fertilization process of mammalian spermatozoa, including sperm maturation through the epididymis, passage through the zona pellucida (ZP), and sperm-oocyte membrane fusion. While it is known that the sperm head shape and motility are important for passage through the ZP, little is known about the molecular interactions. We discovered that two molecules, SPACA4 and TEX46, are essential for ZP penetration in mice.

研究分野：生殖発生工学

キーワード：ゲノム編集 雄性不妊 哺乳類精子 小分子化合物 遺伝子保存

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を用いた個体レベルの遺伝子スクリーニングにより、精巣及び精巣特異的な必須遺伝子の同定に成功した。それらの遺伝子は、雄性生殖の必須ステップである「精巣上体における精子成熟」、「精子の卵透明帯通過」、そして「精子の受精膜融合」で働くことが分かりつつあった。本対象とする遺伝子は、ハエや魚類からヒトまで広く保存されるだけでなく、哺乳類以外でも重要な機能を持つことが知られていることから、生物種間で普遍的な役割を担っていると予想した。

2. 研究の目的

本研究では、上記の仮説を証明するために遺伝子組換え動物を開発して、種々のモデル間での生殖メカニズムの共通性と特異性に焦点を当てて機能解析した。以下、3つのテーマに取り組んだ。

- (1) 精子の精巣上体成熟に関与する LCN ファミリー-KO マウスの解析
- (2) 精子の透明帯通過に関与する Spaca4-, Tex46-KO マウスの解析
- (3) 精子の受精膜融合に関与する Dcst1/2-KO マウスの解析

3. 研究の方法

(1) 精子の精巣上体成熟に関与する LCN ファミリー-KO マウスの解析

インシリコ解析より精巣上体特異的な発現を示す遺伝子群を絞り込んだ。候補遺伝子について、マウスの精巣上体を含む各種臓器を用いた発現解析を検討し、Lcn5-10 ファミリーおよび Ly6g5b/c に着目してゲノム編集マウスを開発して機能解析を行った。特定の染色体上にクラスターを形成するファミリー遺伝子に対しては、クラスターを挟むように設計したガイド RNA を用いて遺伝子領域の欠失（ノックアウト：KO）を試みた。開発した KO 雄マウスを用いて、生殖機能に関する一連の表現型解析を実施した。具体的には、交配試験、体外受精、精巣上体重量、精巣上体・精子の形態観察、そして精子運動性解析を行った。ファミリー遺伝子は非常に類似した塩基やアミノ酸配列を持つことから、個別に特異的な抗体を作製することは難しいため、表現型から想定される既知の関連タンパク質を割り出した。KO マウスを用いたウエスタンブロット発現解析や免疫沈降によるタンパク質間相互作用を調べた。

(2) 精子の透明帯通過に関与する Spaca4-, Tex46-KO マウスの解析

精巣および精子での局在を調べるために、それぞれに対する抗体を作製した。新鮮精子とスライドガラスに塗抹した野生型精子を用いて、細胞固定の条件検討をして免疫蛍光染色観察を行った。狙い通りに蛍光シグナルを検出できなかった遺伝子に対しては、mCherry 蛍光タンパク質をコードした一本鎖オリゴとゲノム編集を組み合わせてノックイン (KI) マウスを開発した。精巣内での精子形成を経時的に観察する目的で、以前開発された精子先体が緑色蛍光を持つトランスジェニック (TG) マウスと KI マウスを掛け合わせて、赤色蛍光を指標に目的タンパク質の動態を蛍光観察した。KO マウスを用いた一連の表現型解析とタンパク質間相互作用の検討は計画(1)と同様に行った。精子の透明帯通過異常を証明するために、卵子を3つの条件(①通常条件：卵丘細胞あり・透明帯あり、②裸化卵子：卵丘細胞なし・透明帯あり、③透明帯除去卵子：卵丘細胞なし・透明帯なし)で用意して体外受精試験により精子の受精能力を検証した。

(3) 精子の受精膜融合に関与する Dcst1/2-KO マウスの解析

精子と卵子の膜融合不全を示す DCST1/2-KO マウスを用いて、研究代表者らが近年発見した精子側の受精膜融合関連因子 (FIMP, SOF1, SPACA6, TMEM95; Fujihara et al., Noda et al. PNAS. 2020#1, 2) や IZUMO1 の局在の可否をウエスタンブロット等で検討した。蛍光タンパク質を付加した各関連因子を HEK293T 細胞に遺伝子導入して、コラゲナーゼ処理により回収した③透明帯除去卵子と 30 分間共培養することで、蛍光タンパク質を指標に細胞膜同士の接着・結合の有無を観察した。

4. 研究成果

(1) 精子の精巣上体成熟に関与する LCN ファミリー-KO マウスの解析

LCN ファミリー遺伝子はマウス 2 番染色体に位置し、Lcn5, 6, 8, 9, 10 で構成される。5 遺伝子とも、精巣上体頭部で強く発現することが RT-PCR 解析より分かった。次に、最も離れた位置にある Lcn9 とクラスターを形成する残り 4 遺伝子 (Lcn5-10) の KO マウス 2 系統の開発を試みた。研究代表者らは 100kb 以上のゲノム編集マウス作出方法を確立しているため (Fujihara et al. PNAS. 2019)、Lcn5-10 ファミリー-KO マウスの開発に成功した。交配試験の結果、Lcn9-KO マウスは生殖能力に異常は見られなかったが、Lcn5-10

ファミリーKO マウスは雄性不妊の傾向を示した。上記、一連の表現型解析を行ったところ、Lcn5-10 ファミリーKO マウスの精巣上体や精子の形態に異常は見られず、体外受精試験でも野生型と同程度の受精率を示した (KO 精子の運動性に異常はないことを証明)。しかし、KO 精子は卵子の透明帯結合能力が著しく低下することを②裸化卵子を用いた体外受精より見つけた。続けて、2 系統を交配させて 5 遺伝子 (Lcn5-10/9) KO マウスを調べたところ、Lcn5-10 ファミリーKO マウスよりも雄性不妊の表現型が増強され、精子の透明帯結合能力も失われた。また、開発した Ly6g5b/c-KO マウスも Lcn5-10 ファミリーKO マウスと非常に類似した表現型を示した。これらの表現型に関連するタンパク質の発現をウエスタンブロットにより調べたところ、精子膜タンパク質 ADAM3、CMTM2A、そして CMTM2B が Lcn5-10/9-KO 精子から消失していることが明らかになった (図 1: Lcn5-10/9-KO マウス精子のウエスタンブロット)。その一方で、同様の表現型を示す精巣上体特異的なタンパク質 OVCH2 と RNASE10 には影響が見られなかった。

以上より、精巣上体頭部に発現する LCN (5, 6, 8, 9, 10) ファミリーと LY6G5B/C は精子成熟過程で、精子膜上に局在する CMTM2A/B を介して ADAM3 の安定性に寄与することを発見した (Sakurai, Fujihara et al. *Andrology* 2022)。

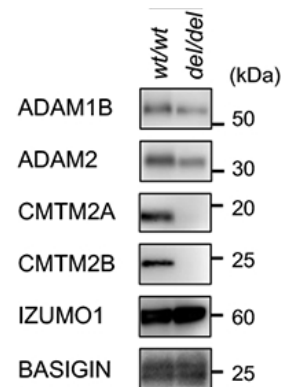


図 1. Lcn5-10/9-KO マウス精子の発現解析

Lcn5-10/9-KO (del/del) 精子は精子膜タンパク質 CMTM2A/B の消失が原因で ADAM3 が失われ不妊になった。

(2) 精子の透明帯通過に関する Spaca4-, Tex46-KO マウスの解析

作製した SPACA4 抗体で免疫蛍光染色を行ったところ、SPACA4 は先体反応後に精子頭部に露出することが観察された。一方、TEX46 は何度か作製を試みたが、検出可能な反応性を示す抗体は得られなかった。それぞれの KO マウスを CRISPR/Cas9 を介して作出して、一連の表現型解析を実施した。その結果、Spaca4-KO はマウスシステムにより雄性不妊の程度は若干異なったが、Tex46-KO 雄マウスは完全な不妊であることが交配試験より明らかになった。精巣重量については、

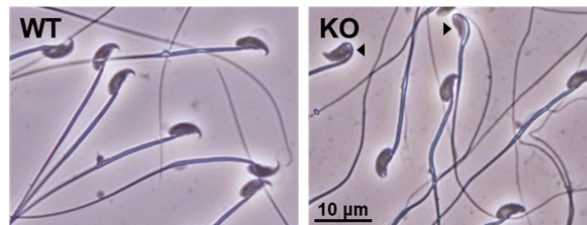


図 2. Tex46-KO 精子の形態観察

Tex46-KO マウスは精子頭部の形態異常 (先端の鈍化と頭部屈曲) により、雄性不妊になった。*矢頭は屈曲精子を示す。

Spaca4-KO マウスは野生型との違いはなかったが Tex46-KO マウスは約 10% の有意な減少が確認できた。精巣上体尾部より回収した精子の形態観察の結果、精巣重量と同様に Spaca4-KO 精子は正常だったが、Tex46-KO 精子は全ての頭部先端が鈍化して、頭部が 180 度屈曲している精子も観察された (図 2: Tex46-KO 精子の形態観察)。精子鞭毛の電子顕微鏡観察では、どちらの KO マウスシステムも構造上の異常は観察されなかったが、Tex46-KO 精子は頭部形態異常が原因で、精子運動性が野生型に比べて有意に低下することが分かった。次に体外受精試験の結果、どちらの KO マウスシステムも、①通常条件と②裸化卵子ではほとんど受精できなかったが、③透明帯除去卵子では受精できた (図 3:

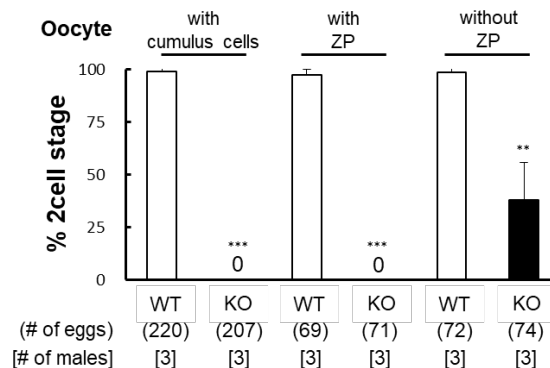


図 3. Tex46-KO 精子を用いた体外受精試験

Tex46-KO 精子は、左から①通常条件と②裸化卵子では全く受精できないが、③透明帯除去卵子では受精できることが分かった。つまり、Tex46-KO 精子は透明帯を通過できないことが主原因であった。

Tex46-KO 精子を用いた卵子 3 条件での体外受精試験)。精子頭部形成や精子の透明帯結合、そして精子の卵管移行に必要な関連タンパク質の発現をウエスタンブロットにより検証したが、どちらの KO マウスシステムも野生型との違いは見つけられなかった。そして、TEX46 の C 末端側に mCherry を付加した KI マウスを開発して、精子形成での局在を観察したところ、精子頭部形成が始まるステップ 11 辺りから赤色蛍光が検出され、頭部形成が完了する時期には精子頭部の後端部へ局在移動が観察された。さらに、精子の形態が完成する精巣内精子では頭部の屈曲が見られないことから、Tex46-KO マウスの不妊の主原因は精子頭部の先端部の鈍化であって、精巣上体を通過することで頭部屈曲の精

子が現れることが分かった(図4: Tex46-KOマウスの精巣内精子の蛍光観察)。

以上より、SPACA4とTEX46はマウス精子の透明帯通過に必要な因子であることを発見した(Fujihara et al. PNAS. 2021; PNAS Nexus 2024)。前者は卵子側の未知のパートナーとの相互作用の存在が、後者はTEX46による精子頭部の形態維持機構の存在が示唆され今後の課題が残った。

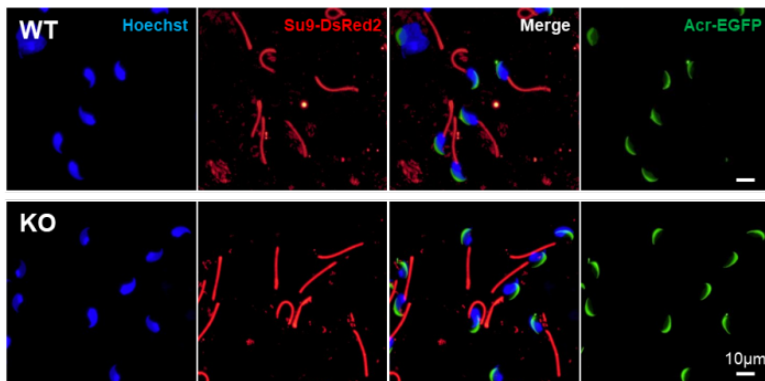


図4. Tex46-KO 精巣内精子の蛍光観察

Tex46-KO マウスの精巣内精子は、全て野生型と同様に頭部屈曲は見られなかった。つまり、TEX46は精子頭部形成に機能し、屈曲は精巣上体通過により生じることが分かった。青色は精子核、赤色は精子中片部、緑色は精子先体を示す。

(3) 精子の受精膜融合に関与する Dcst1/2-KO マウスの解析

開発した Dcst1/2-KO マウスを用いて一連の表現型解析を行い、KO 雄マウスは不妊であった。精巣重量、精子の形態、そして精子運動性には異常が見られなかったが、KO 精子は体外受精試験で①通常条件では受精できなかった。媒精後の未受精卵を観察したところ、透明帯と卵子との間の囲卵腔に KO 精子が滞留していたことから、卵子細胞膜との融合不全の可能性が高まった。そこで、精子の膜融合能力を検証するために、③透明帯除去卵子を用いた体外受精の結果、KO 精子は膜融合できないことが証明された。しかし、Dcst1/2-KO 精子にはIZUMO1が存在することがウエスタンブロットより分かった。次に、HEK293T 細胞へ IZUMO1 と DCST1/2 を発現させて、③透明帯除去卵子と共培養したところ、IZUMO1 発現細胞のみ卵子細胞膜と接着することが明らかになった。

以上より、DCST1/2 は哺乳類でも受精に必須の精子側因子で、卵子との受精膜融合に機能することを発見した(Noda, Blaha, Fujihara et al. Commun Biol. 2022)。しかし、近年発見した4因子(FIMP, SOF1, SPACA6, TMEM95)とDCST1/2を発現させた培養細胞では、IZUMO1のように卵子細胞膜との接着を再現できなかったことから、IZUMO1-JUNO 結合を起点とする哺乳類の受精膜融合の試験管内再現にはまだ材料が足りないのが現状である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Fujihara Y, Miyata H, Abbasi F, Larasati T, Nozawa K, Yu Z, Ikawa M, Matzuk MM.	4. 巻 3
2. 論文標題 Tex46 knockout male mice are sterile secondary to sperm head malformations and failure to penetrate through the zona pellucida	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 pgae108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pnasnexus/pgae108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Morohoshi A, Miyata H, Tokuhiko K, Iida-Norita R, Noda T, Fujihara Y, Ikawa M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Testis-enriched ferlin, FER1L5, is required for Ca ²⁺ -activated acrosome reaction and male fertility	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eade7607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.ade7607	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ye Q, Belabed H, Wang Y, Yu Z, Palaniappan M, Li JY, Kalovidouris SA, MacKenzie KR, Teng M, Young DW, Fujihara Y, Matzuk MM.	4. 巻 11
2. 論文標題 Advancing ASMS with LC MS/MS for the discovery of novel PDCL2 ligands from DNA encoded chemical library selections	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 808-815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.13309	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Fujihara Y, Kobayashi K, Abbasi F, Endo T, Yu Z, Ikawa M, Matzuk MM., Abbasi Ferheen, Endo Tsutomu, Yu Zhifeng, Ikawa Masahito, Matzuk Martin M.	4. 巻 11
2. 論文標題 PDCL2 is essential for sperm acrosome formation and male fertility in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 789-798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.13329	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Noda T, Blaha A, Fujihara Y, Gert KR, Emori C, Deneke VE, Oura S, Panser K, Lu Y, Berent S, Kodani M, Cabrera-Quio LE, Pauli A, Ikawa M.	4. 巻 5
2. 論文標題 Sperm membrane proteins DCST1 and DCST2 are required for sperm-egg interaction in mice and fish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03289-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Oyama Y, Miyata H, Shimada K, Larasati T, Fujihara Y, Ikawa M.	4. 巻 21
2. 論文標題 TULP2 deletion mice exhibit abnormal outer dense fiber structure and male infertility	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 e12467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12467	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nozawa K, Fujihara Y, Devlin DJ, Deras RE, Kent K, Larina IV, Umezu K, Yu Z, Sutton CM, Ye Q, Dean LK, Emori C, Ikawa M, Garcia TX, Matzuk MM.	4. 巻 20
2. 論文標題 The testis-specific E3 ubiquitin ligase RNF133 is required for fecundity in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-022-01368-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakurai N, Fujihara Y, Kobayashi K, Ikawa M.	4. 巻 -
2. 論文標題 CRISPR/Cas9 mediated disruption of lipocalins, Ly6g5b, and Ly6g5c causes male subfertility in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.13350	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oyama Y, Miyata H, Shimada K, Fujihara Y, Tokuhiko K, Garcia TX, Matzuk MM, Ikawa M.	4. 巻 24
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated genome editing reveals 12 testis-enriched genes dispensable for male fertility in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Asian Journal of Andrology	6. 最初と最後の頁 266-272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/aja.aja_63_21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fujihara Y, Herberg S, Blaha A, Panser K, Kobayashi K, Larasati T, Novatchkova M, Theussl HC, Olszanska O, Ikawa M, Pauli A.	4. 巻 118
2. 論文標題 The conserved fertility factor SPACA4/Bouncer has divergent modes of action in vertebrate fertilization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 e2108777118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2108777118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 藤原祥高、望月直樹	4. 巻 75
2. 論文標題 疾患モデル動物を用いた循環器病研究の最前線	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 国立医療学会誌「医療」	6. 最初と最後の頁 111-116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Yoshitaka Fujihara
2. 発表標題 Screening male contraceptive targets using CRISPR/Cas9-mediated KO mice
3. 学会等名 2023 National Contraception Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshitaka Fujihara
2. 発表標題 Molecular mechanism of mammalian fertilization revealed by genome-edited mice
3. 学会等名 The Fibrobesity Visitor Program and Kontinkangas Campus Seminar Series 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshitaka Fujihara
2. 発表標題 Molecular mechanisms of mammalian spermatogenesis and fertilization revealed by genome-edited mice
3. 学会等名 The Fifth Annual David H. Yawn Commemorative Lecture (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshitaka Fujihara
2. 発表標題 PDCL2 is essential for sperm acrosome formation and male fertility in mice
3. 学会等名 56th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (SSR) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshitaka Fujihara
2. 発表標題 PDCL2 is essential for sperm acrosome formation and male fertility in mice
3. 学会等名 The 22nd European Testis Workshop (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Haga S, Kobayashi K, Abbasi F, Endo T, Yu Z, Ikawa M, Matzuk MM, and Fujihara Y.
2. 発表標題 PDCL2 is essential for sperm acrosome formation and male fertility in mice
3. 学会等名 第70回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap https://researchmap.jp/Yoshitaka_Fujihara/?lang=japanese 国立研究開発法人国立循環器病研究センター先端医療技術開発部HP https://www.ncvc.go.jp/res/divisions/amt/
--

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			
オーストリア	ウィーンバイオセンター			
米国	ベイラー医科大学			
フィンランド	オウル大学			