

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25112007

研究課題名(和文)受精を介した経世代エピゲノム変化の解明と制御

研究課題名(英文)Functional analysis of fertilization related genes in mice

研究代表者

伊川 正人 (IKAWA, MASAHITO)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：20304066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 132,000,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR/Cas9システムを用いて効率的な受精卵・ES細胞のゲノム編集方法を開発し、遺伝子改変マウスを作って精子成熟・受精関連因子の機能解析を行った。その結果、精巣特異的に発現する遺伝子の多くが妊孕性に必須ではない一方で、精子カルシニューリンが精子の運動性に必須であり男性避妊薬の標的となり得ること、受精時の精子と卵子の融合に必須である卵子JUNOと精子IZUMOの相互作用ドメインの同定、精子由来の卵子活性化因子がPLCZ1であると同時に、PLCZ1非依存性の卵子活性化経路が存在すること、等を研究成果として報告した。

研究成果の概要(英文)：We applied CRISPR/Cas9 mediated genome editing in fertilized eggs and ES cells to study fertilization related genes in mice. While 54 of 80 testis-specific genes are not essential for male fertility, we found (1) sperm calcineurin is essential for sperm motility and could be male contraceptive target, (2) W62 of oocyte JUNO plays pivotal role to interact with sperm IZUMO1 and subsequent fertilization, and (3) sperm-borne phospholipase C zeta-1 ensures monospermic fertilization in mice.

研究分野：実験動物学

キーワード：ゲノム編集 生殖不全 遺伝子破壊 点変異 受精 不妊

1. 研究開始当初の背景

精子と卵子の使命は父方と母方由来のゲノム情報を受精により子に伝えることにあるが、正常な個体発生には、DNAメチル化やクロマチン修飾などを含めたエピゲノム情報の伝達と、受精後にエピゲノム情報がリプログラミングされる必要がある。減数分裂を終えた精子は、精子成熟の過程で核を最小限まで凝縮し精巣上体に貯えられる。その後、射出されて雌体内で受精するまで安定な状態を保ち、受精後は数時間の内に脱凝縮して体細胞型の核として機能し始める。受精前後の父性エピゲノムのダイナミクスについては、プロタミンに置換されないクロマチン領域や小分子RNAの存在など、新たな知見が報告されており機能解明が待たれている (Hammoud et al. Nature 2009; Ostermeier et al. Nature 2004)。

ところで体外受精という技術は安全な生殖補助医療として広く社会に受け入れられており、今や日本を含む先進諸国では約40-50人に1人が体外受精児である。しかしその一方で、乏精子症患者サンプルでのヒストン:プロタミン比の異常や、体外受精児の一部にH19座などのエピゲノム異常とそれに伴う疾病の可能性が指摘されている (Montfoort et al. Hum Reprod update 2012)。このように生殖細胞のエピゲノムダイナミクスの解明とその制御は、基礎医学・臨床医学の両方の観点から急務となっている。

申請者は一貫して、遺伝子組換え動物を用いたアプローチから受精メカニズムの研究を行ってきた。これまでに約20系統の不妊マウスを作製し、正常に見えるが受精できない精子がある一方で (Calmegin, Izumo1)、異常な精子核凝縮を示すにも関わらず人工授精により受精・発生できる精子があることなどを見出してきた (Spesp1, Spaca1), (Ikawa et al. Nature 1997; Inoue et al. Nature 2005; Inoue et al. PNAS 2011; Tokuhira et al. PNAS 2012; Fujihara et al. Development 2012)。またレンチウイルスベクターを用いたセルトリ細胞の遺伝子治療や、胎盤特異的遺伝子導入による胚性致死の治療など、不妊・不育モデルマウスの作製と治療法開発に取り組んできた実績がある (Okada et al. Nat Biotechnol 2007; Pfeifer et al. PNAS 2002, Kumasawa et al. PNAS 2011)。

申請者は、これらの研究を通じて、受精におけるエピゲノム変化に科学的興味を覚えると同時に、生殖医療とエピゲノム異常の関連性を明らかにする必要性を鑑みて本課題を提案した。

2. 研究の目的

従来のエピゲノム研究においては、DNAメ

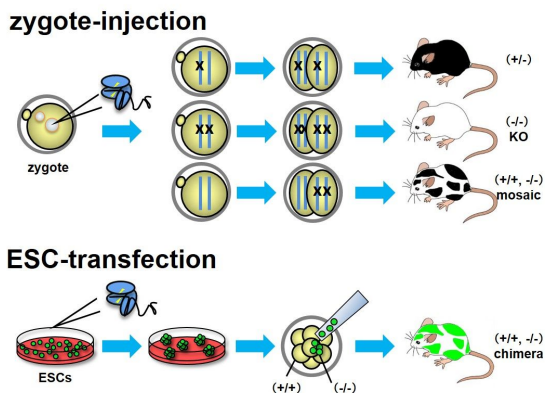
チル化酵素のノックアウト (KO) や、薬剤処理 (DNAメチル化阻害 5-azacitidine やヒストンアセチル化阻害剤 TSA) によりグローバルなエピゲノム変化を誘導するしか方法がないために、個々の遺伝子レベルでエピゲノム情報を操作・解析できない難点があった。本課題では、任意のDNA配列に結合できるTALEを利用した最新のマウスゲノム編集技術 (Sung et al. Nat Biotechnol 2013) を応用して、エピゲノム編集技術を開発するとともに、受精とエピゲノム変化を、a) 精子成熟、b) 受精、c) 卵子活性化、d) 父性エピゲノムの異常が及ぼす個体発生への影響、の4ステージに分けて調べ、生殖細胞のエピゲノム世代サイクルにおける受精の役割を解き明かすことを目的とした。

3. 研究の方法

本課題は、エピゲノム編集システムの開発と、それを応用した受精とエピゲノム変化の解析の2つを大きな柱にして研究を進めた。サブテーマを設けて目標を明確化し、連携研究者4人を配置することで、リスクの軽減と問題点の早期発見・解決を可能にした。なお研究の進展に応じて特任研究員を雇用して研究を推進した。

(1) エピゲノム編集システムの開発

CRISPR/Cas9ゲノム編集システムの導入
本研究を申請後すぐに、TALENに変わる新しいゲノム編集システムとしてバクテリア病原体由来のCRISPR/Cas9システムがScience誌に報告された。CRISPR/Cas9システムでは、ガイドRNAにより20塩基の標的配列と直下のPAM配列 (NGG) を認識し、Cas9タンパク質がPAMの直上3塩基目と4塩基目の間を平滑末端に切断する。そこで、U6プロモーター制御下にガイドRNA、Chicken b-actinプロモーターの制御下にhCas9 (コドンをヒト化したCas9) を発現するpX330プラスミドを入手して、TALENシステムと比較検討した。さらに受精卵、ES細胞などで活性を検査し、ゲノム編集マウス作製技術を開発した。【図1】



【図1】受精卵前核注入およびES細胞を用いたゲノム編集マウス作製法

エピゲノムのイメージング
山縣一夫博士・上田潤博士との共同研究により、メチル化 DNA 結合タンパク質 (MBD, H2AX) を EGFP でラベルしてグローバルなエピゲノム状態を可視化するトランスジェニックマウスを作製した。

(2) 受精とエピゲノム変化の解析

精子成熟

減数分裂を終えた精子細胞は、転写・翻訳を停止するとともに、ヒストンがプロタミンに置換されることで、形態変化を伴う核の凝縮を経て、精子となる。プロタミンを含む精子頭部成熟関連因子をゲノム編集により遺伝子破壊マウスを作製して表現型を解析した。

受精メカニズム解析

精子と卵子の融合に必須である精子 IZUMO と卵子 JUNO の相互作用について、X 線構造解析および JUNO ノックアウト卵子への mRNA 補完により重要なドメインを解析した。

卵子活性化

受精時に卵子を活性化する精子由来の可溶性因子が長年に渡って探索されている。そこで有力候補である PAWP (post-acrosomal sheath WW domain-binding protein) や PLCZ1 (phospholipase C zeta 1) などのノックアウトマウスを作製して、検証すると同時に、次世代への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) エピゲノム編集システムの開発

CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムの導入
TALEN に比較して CRISPR/Cas9 はデザインが非常に簡便であり、安価で効率良く標的遺伝子を切断することが確認できた。さらに受精卵前核へのプラスミド注入だけで、生まれた産仔の約半数で遺伝子切断アレルが検出できることを見出し論文に報告した (Mashiko et al. Sci Rep 2013, DGD 2014)。また、crRNA/tracrRNA/CAS9 複合体を前核注入したり、エレクトロポレーションによる導入でも同様の効率でゲノム編集マウスが作製できることを確認した。
次に、2 箇所切断による長領域欠損や、一本鎖、二本鎖 DNA を鋳型にした標的遺伝子組み換え等の複雑なゲノム編集については、多数処理できる ES 細胞が適していることを見出した。両アレル変異した ES 細胞を用いてキメラマウスを作製することで、交配を経ることなく遺伝子機能を解析する系を確立して論文報告した (Oji et al. Sci Rep 2017)。

エピゲノムのイメージング

メチル化 DNA 結合タンパク質 (MBD, H2AX) と EGFP の融合蛋白質を全身で発現するトランスジェニックマウスを作製し、グロー

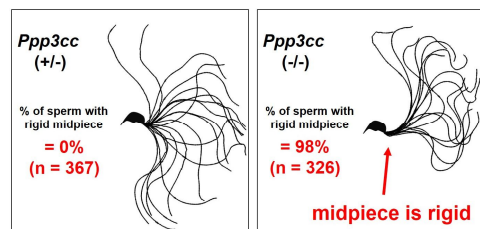
バルなエピゲノム状態を可視化する系を確立した。

(2) 受精とエピゲノム変化の解析

精子成熟

受精卵および ES 細胞で CRISPR/Cas9 により精子形成後期にヒストンと置換されるプロタミンや、精子特異的な中心小体 CETN1 の遺伝子破壊を行い、表現型を解析した。KO マウス精子が奇形となる場合には、両アレル破壊した ES 細胞を用いてキメラマウスを作製し、表現型を解析した。その他、精子形成に関連する遺伝子を多数破壊して表現型を解析した。

精巣特異的に発現するにも関わらず、単独の遺伝子欠損では野生型と同様の妊孕性を示すことから重要でないと考えられる遺伝子 54 個についてまとめて論文報告した (Miyata et al. PNAS 2016)。一方で精子成熟に関連する遺伝子群については分子メカニズムを解析して論文に報告した (Castaneda et al. PNAS 2017 など)。なかでも、精子特異的カルシニューリンが受精に必要な運動性を担保するのに必須であることを見出した成果は、男性避妊薬の可能性を示す論文として高い評価を得た (Miyata et al. Science 2015)。【図 2】



【図 2】精子カルシニューリンを欠損した精子は鞭毛中片部の異常により運動性が低下する。

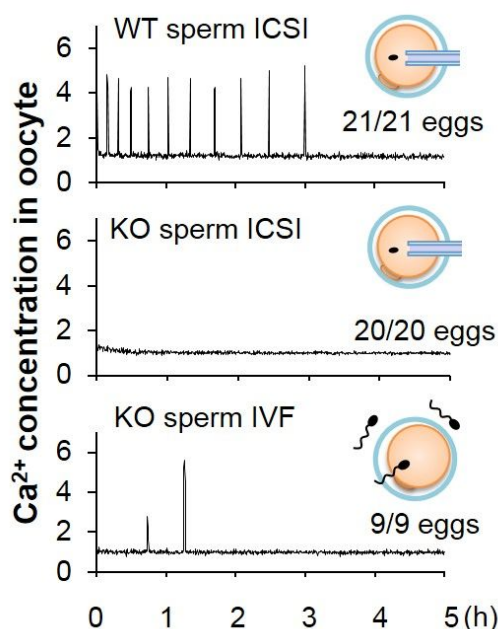
受精メカニズム解析

濡木理博士との共同研究により、卵子 JUNO の X 線構造解析から精子 IZUMO との相互作用部位を想定した。次に、CRISPR/Cas9 により JUNO ノックアウトマウスを作製し、得られた JUNO 欠損卵子に各種変異を有する Juno mRNA を注入して精子融合能力を判定した。その結果、JUNO の N 型糖鎖修飾は必要でないことを明らかにし、また 62 番目のトリプトファンが IZUMO との結合に必須であることを見出して論文報告した (Kato et al. Nat Commun 2016)。

卵子活性化

従来法により PAWP ノックアウトマウスを作製したところ、PAWP 欠損精子は、問題なく受精して卵子を活性化できることを確認した。PLCZ1 欠損マウスは精子形成不全という報告があったために、CRISPR/Cas9 システムにより 4 塩基だけを欠損するマウスと、蛋白質コード領域全長を欠損するマウス

スを作製した。そのいずれについても、精子形成には問題ないにも関わらず、顕微授精では卵子を活性化できないことを確認した。一方、興味深いことに、通常交配では少ないものの産仔を得ることができた。その後の解析から、精子膜と卵子膜の相互作用が生じる生理的な受精条件では PLCZ1 非依存性の卵子活性化機構があることを見出した。哺乳類が進化の過程で PLCZ1 を獲得することにより、単精子受精を担保することができたことを示唆するデータであり、新しい研究領域を開拓することができた (Nozawa et al. Sci Rep 2018)。【図3】なお PLCZ1 に遺伝子変異を有する男性不妊患者と同様の遺伝子変異を導入したマウスを作製し、顕微授精時に Plcz1 mRNA を補充することで卵子活性化して産仔を得ることも成功している。



【図3】PLCZ1 欠損精子は顕微授精では卵子を活性化できないが、生理的な受精条件では一部活性化能力を有している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 15 件)

Nozawa K, Satouh Y, Fujimoto T, Oji A, Ikawa M. Sperm-borne phospholipase C zeta-1 ensures monospermic fertilization in mice. Sci Rep. Jan 22;8:1315. 査読有
DOI: 10.1038/s41598-018-19497-6.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29358633>

Fujihara Y, Oji A, Larasati T, Kojima-Kita K, Ikawa M. Human Globozoospermia-Related Gene Spata16

Is Required for Sperm Formation Revealed by CRISPR/Cas9-Mediated Mouse Models. Int J Mol Sci. Oct 21;18(10):2208. 査読有
DOI: 10.3390/ijms18102208.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29065458>

Castaneda JM, Hua R, Miyata H, Oji A, Guo Y, Cheng Y, Zhou T, Guo X, Cui Y, Shen B, Wang Z, Hu Z, Zhou Z, Sha J, Prunskaitė-Hyyryläinen R, Yu Z, Ramirez-Solis R, Ikawa M, Matzuk MM and Liu M. TCTE1 is a conserved component of the dynein regulatory complex and is required for motility and metabolism in mouse spermatozoa. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Jul 3;114(27):E5370-E5378. 査読有
DOI: 10.1073/pnas.1621279114.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28630322>

Satouh Y, Nozawa K, Yamagata K, Fujimoto T, Ikawa M. Viable offspring after imaging of Ca²⁺ oscillations and visualization of the cortical reaction in mouse eggs. Biol Reprod. 2017 Mar 1;96(3):563-575. 査読有
DOI: 10.1093/biolre/iox002.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28339615>

Ueda J, Harada A, Urahama T, Machida S, Maehara K, Hada M, Makino Y, Nogami J, Horikoshi N, Osakabe A, Taguchi H, Tanaka H, Tachiwana H, Yao T, Yamada M, Iwamoto T, Isotani A, Ikawa M, Tachibana T, Okada Y, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H, Yamagata K. Testis-Specific Histone Variant H3t Gene Is Essential for Entry into Spermatogenesis. Cell Rep. 2017 Jan 17;18(3):593-600. 査読有
DOI: 10.1016/j.celrep.2016.12.065.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28099840>

Kato K, Satouh Y, Nishimasu H, Kurabayashi A, Morita J, Fujihara Y, Oji A, Ishitani R, Ikawa M, Nureki O. Structural and functional insights into IZUMO1 recognition by JUNO in mammalian fertilization. Nat Commun. 2016 Jul 15;7:12198. 査読有
DOI: 10.1038/ncomms12198.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27416963>

Young SA, Miyata H, Satouh Y, Aitken RJ,

Baker MA, Ikawa M. CABYR is essential for fibrous sheath integrity and progressive motility in mouse spermatozoa. *J Cell Sci*. 2016 Dec 1;129(23):4379-4387. 査読有
DOI: 10.1242/jcs.193151
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27802166>

Muto M, Fujihara Y, Tobita T, Kiyozumi D, Ikawa M. Lentiviral Vector Mediated Complementation Restored Fetal Viability but Not Placental hyperplasia in Plac1-Deficient Mice. *Biol Reprod*. 2016 Jan;94(1):6. 査読有
DOI: 10.1095/biolreprod.115.133454.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26586843>

Satouh Y, Nozawa K, Ikawa M. Sperm Postacrosomal WW Domain-Binding Protein Is Not Required for Mouse Egg Activation. *Biol Reprod*. 2015 Oct;93(4):94. 査読有
DOI: 10.1095/biolreprod.115.131441.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26377222>

Young SA, Miyata H, Satouh Y, Muto M, Larsen MR, Aitken RJ, Baker M, Ikawa M. CRISPR/Cas9-mediated mutation revealed cytoplasmic tail is dispensable for IZUMO1 function and male fertility. *Reproduction*. 2016 Dec;152(6):665-672. 査読有
DOI: 10.1530/REP-16-0150
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27624483>

Oji A, Noda T, Fujihara Y, Miyata H, Kim YJ, Muto M, Nozawa K, Matsumura T, Isotani A, Ikawa M. CRISPR/Cas9 mediated genome editing in ES cells and its application for chimeric analysis in mice. *Sci Rep*. 2016 Aug 17;6:31666. 査読有
DOI: 10.1038/srep31666.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27530713>

Miyata H, Castaneda JM, Fujihara Y, Yu Z, Archambeault DR, Isotani A, Kiyozumi D, Kriseman ML, Mashiko D, Matsumura T, Matzuk RM, Mori M, Noda T, Oji A, Okabe M, Prunskaitė-Hyyryläinen R, Ramirez-Solis R, Satouh Y, Zhang Q, Ikawa M, Matzuk MM. Genome engineering uncovers 54 evolutionarily conserved and testis-enriched genes that are not required for male fertility in mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Jul 12;113(28):7704-10. 査読有
DOI:10.1073/pnas.1608458113
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27357688>

Miyata H, Satouh Y, Mashiko D, Muto M, Nozawa K, Shiba K, Fujihara Y, Isotani A, Inaba K, Ikawa M. Sperm calcineurin inhibition prevents mouse fertility with implications for male contraceptive. *Science*. 2015 Oct 23;350(6259):442-5. 査読有
DOI:10.1126/science.aad0836
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26429887>

Young SA, Miyata H, Satouh Y, Kato H, Nozawa K, Isotani A, Aitken RJ, Baker MA, Ikawa M. CRISPR/Cas9-Mediated Rapid Generation of Multiple Mouse Lines Identified Ccdc63 as Essential for Spermiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2015 Oct 16;16(10):24732-24750. 査読有
DOI:10.3390/ijms161024732
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26501274>

Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep*. 2013 Nov 27;3:3355. 査読有
DOI:10.1038/srep03355
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24284873>

[学会発表](計10件)

伊川正人. CRISPR/Cas9 mediated genome editing in mice and its application for the study of reproduction. 第9回武田科学振興財団薬科学シンポジウム. 2018.02.06. 武田薬品研修所(大阪府吹田市)

伊川正人. CRISPR/Cas9 mediated genome editing in mice and its application for the study of reproduction. Bridging Biomedical Worlds 2018. 2018.02.08. Matrix Building (Singapore)

伊川正人. CRISPR/Cas9 mediated genome editing and its application for the study of reproduction. 4th World Congress of Reproductive Biology. 2017.09.30. 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

伊川正人 . Fertilization and Oocyte Activation: New Insights Using Genome Editing. 2017.07.19. Fertilization & Activation of Development. Gordon Research Conference (New Hampshire, USA)

伊川正人 . CRISPR/Cas9 mediated genome editing and its application for the study of sperm functions. 11th International Congress of Andrology. 2017.05.08 . AC Hotel Bella Sky (Copenhagen, Denmark)

伊川正人 . Lentiviral vector-mediated placenta-specific gene manipulation in mice .64th SRI meeting .2017.03.15 . Hilton Orlando Bonnet Creek (Orlando, USA)

伊川正人 . CRISPR/Cas9 Mediated Genome Editing and its Application for the Study of Reproduction . 第 20 回日米科学技術会議 . 2017.03.09 . FDA (Silver Spring, USA)

伊川正人 . CRISPR/Cas9 mediated genome editing and its application for the study of reproduction . 2016 Seoul Symposium on Epigenetics and Chromatin. 2016.11 . 09. Seoul University (Seoul, Korea)

伊川正人 . CRISPR/Cas9 mediated genome editing and its application for the study of reproduction . The 4th SKLRB Symposium on Reproductive Biology. 2016.10 . 27. UCAS international Conference Center (Beijing, China)

伊川正人 . CRISPR/Cas-Mediated Genome Editing in Mice and Its Application for the Study of Reproduction . SSR 2015 Annual Meeting . 2015.06.21 . Puerto Rico Convention Center (San Juan, Puerto Rico, USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊川 正人 (IKAWA, Masahito)
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号 : 20304066

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

磯谷 綾子 (ISOATANI, Ayako)
奈良先端科学技術大学院大学・器官発生工学・准教授
研究者番号 : 20444523

佐藤 裕公 (SATOUEH, Yuhkoh)
大阪大学・微生物病研究所・講師
研究者番号 : 40545571

藤原 祥高 (FUJIHARA, Yoshitaka)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号 : 70578848

宮田 治彦 (MIYATA, Haruhiko)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号 : 50604732

(4)研究協力者

該当なし