

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06999

研究課題名(和文) 哺乳動物の生殖を制御する細胞外マトリックスの解明

研究課題名(英文) Analysis of extracellular matrices that regulate mammalian reproduction

研究代表者

浄住 大慈 (Kiyozumi, Daiji)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教(常勤)

研究者番号：70452430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、哺乳動物の生殖を制御する細胞外マトリックスの実体と、その生理機能を検討した。生殖器官に高発現する細胞外マトリックス遺伝子のうち7遺伝子について、ノックアウトマウスの妊孕性を解析した。その結果、1遺伝子について雄が不妊であることを見出した。このノックアウトマウスの生殖器官では、当該遺伝子だけではなく他の多くの遺伝子の発現が低下していた。このうちさらに2遺伝子についてノックアウトマウスを作製したところ、1遺伝子について雄が不妊となった。以上の結果から、哺乳動物の生殖能力の制御に細胞外マトリックスが積極的に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, the molecular function of extracellular matrix in mammalian reproduction was investigated. Fertility of knockout mice of seven genes encoding extracellular matrix and highly expressed in reproductive tract were examined, and finally one knockout line was found to be male infertile. Interestingly, the expression of many other genes was downregulated in the reproductive organ of this male infertile mice. Among downregulated genes, two genes were knocked out further, and one knockout line was found to be male infertile. These results clarified that extracellular matrix factors positively concern in mammalian reproduction.

研究分野：生化学

キーワード：生殖 細胞外マトリックス ノックアウトマウス CRISPR/CAS9

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックスは細胞の周囲に構築された不溶性の超分子複合体であり、ラミニンやコラーゲンなどがその構成因子としてよく知られている。細胞外マトリックスには細胞動態を制御する様々な生理活性が組み込まれており、これまでは、主に生体から単離可能なマトリックス分子について、生化学的な解析によって研究されてきた。

生殖は種の保存の根幹を支える生命現象である。これまで受精において重要と考えられてきた因子の多くがノックアウトマウスを用いた研究から否定されており、受精・生殖研究は新たなドグマを模索しつつある。ほ乳類の配偶子形成や生殖にも、細胞外マトリックスが関与している可能性がこれまで示唆されてきたが、生化学的な検討が困難なことから、ほ乳類の生殖に関わる細胞外マトリックスの分子実体やその機能はこれまで十分に明らかにされてはこなかった。

2. 研究の目的

従来、生化学的な解析では生殖における細胞外マトリックスの機能解析には限界がある。しかし、新たな解析手法によって生殖を研究することができれば、細胞外マトリックスの未知の生理機能の解明につながる可能性がある。そこで、次世代型ゲノム編集技術を積極的に利用し、個体レベルでの機能解析を行うことによって、生殖を制御する細胞外マトリックスの実体とその生理機能を分子レベルで解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

まず、公共データベースを用いて生殖器官において高発現している遺伝子をリストアップし、そこからさらに細胞外マトリックス関連遺伝子を選別する。

次に、このリストの優先度に従って、次世代型ゲノム編集技術であるCRISPR/CAS9法を用いて遺伝子ノックアウトマウスを作製する。

作製した遺伝子ノックアウトマウスについては、交配によって得られる産児の平均数をもって妊孕性の評価を行う。

妊孕性に異常が認められたノックアウトマウスについては、さらに生殖組織の表現型解析を行うことによって、当該細胞外マトリックス因子の作用機序を検討する。

4. 研究成果

細胞外マトリックス遺伝子のリストアップ

まず、生殖における細胞外マトリックスの機能を明らかにするために、公共遺伝子発現データベースから、マウスの生殖器官に高発現する遺伝子を選出した。この中から、遺伝子アノテーション情報を

利用して、細胞外マトリックスに関連する遺伝子のみをさらに絞り込んだ。その結果、精子あるいは卵形成に関与する可能性のある機能未知の細胞外マトリックス関連因子を20種程度抽出することができた。またこの結果から、細胞外マトリックスが配偶子の形成や生理機能に寄与している可能性が示唆された。

CRISPR/CAS9法を用いた遺伝子ノックアウトマウスの作製

でリストアップされた遺伝子のうち、8種についてCRISPR/CAS9法によるノックアウトマウス作製を試みた。そのうち6種類についてノックアウトマウスの作製に成功した。一方残り2種については、繰り返し配列が多いなど当該遺伝子に固有の性質のため、目的のノックアウトマウスを得ることはできなかった。また1種類については、既に作製済みのノックアウトマウスを別途入手した。

ノックアウトマウスの妊孕性の検討

7系統のノックアウトマウスについて、交配によって妊孕性の解析を行った。その結果、1系統(以下当該遺伝子をECM1とする)について、雄の妊孕性の異常(不妊)を見出すことが出来た(図1)。残り6系統については妊孕性の顕著な異常は認められなかった。

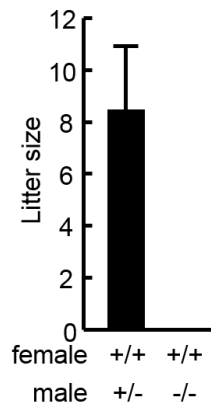


図1 ECM1 ノックアウトマウスの妊孕性。ECM1-/-雄は不妊である。

不妊の原因の解析

次に、なぜECM1ノックアウトマウスが不妊になるのかを検討した。その結果ECM1のノックアウトマウスの精子は、卵の透明体に結合出来ないこと、また子宮卵管結合部を通過できないことがわかった。

ECM1の精巢の切片を作製し組織染色によって観察したところ、精子形成過程の顕著な異常は認められなかった。また、精巢上体精子の形態についても形態学的に顕著な異常は認められなかった。精子は精巢で形成されたあと、精巢上体を

通過する間に受精能力を獲得することが知られている。そこで、ECM1 のノックアウトマウスにおいては、精巣上体の機能に異常が生じ、精子の成熟が不全になっているのではないかと仮説を立てた。精巣上体の遺伝子発現を RT-PCR や RNA シーケンシングで検討した結果、野生型と ECM1 ノックアウトマウスの間では遺伝子の発現レベルに違いが認められた (図 2)。

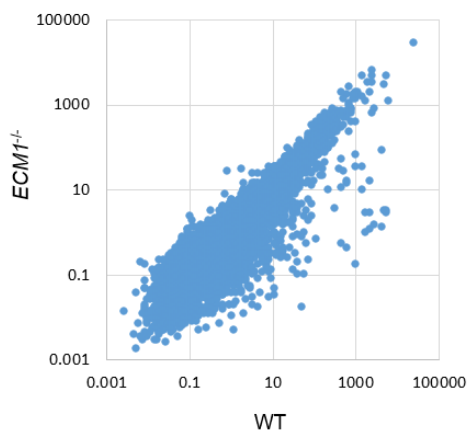


図 2 精巣上体における野生型と ECM1 ノックアウトマウスでの遺伝子発現レベルの比較。各点が個々の遺伝子の発現を表している。

この結果から、ECM1 ノックアウトマウスの精巣上体で発現が変化している遺伝子のなかに、精子の成熟に関わる因子が含まれる可能性が示唆された。そこで、CRISPR/CAS9 法によってノックアウトマウスを作製することによって、精子の成熟に関わる因子の探索を行った。

ノックアウトのターゲットとする遺伝子については、以下の選択基準で抽出した。野生型の精巣上体で遺伝子発現レベルが十分に高く、ECM1 ノックアウトマウスで発現レベルが低下している。細胞外に分泌され、直接あるいは間接的に精子に作用しうるタンパク質をコードしている。ホモログが無いあるいは少なく、遺伝子ノックアウトを行った際にホモログによる機能補償の可能性が低い。以上の選択基準に従って分泌因子 2 種 (以下 EP-1, EP-2 とする) についてノックアウトマウスの作製と妊孕性の解析を行った。

EP-1 については、エクソンに 322 塩基が挿入されたフレームシフトアレルが得られた。しかしこのアレルのホモ雄では妊孕性の異常は認められなかった。ただし、EP-1 フレームシフトアレルからは新規なスプライシングバリエントが生じていることがわかり、このバリエントが機能補償している可能性が残った。

一方、EP-2 については、1 塩基挿入のフ

レームシフトアレルが得られた。このアレルのホモ雄の妊孕性を検討したところ、雄性不妊の表現型を示すことがわかった (図 3)。この結果から、ECM1 ノックアウトマウスが示す不妊の表現型は、部分的には EP-2 の発現低下によることが明らかとなった。

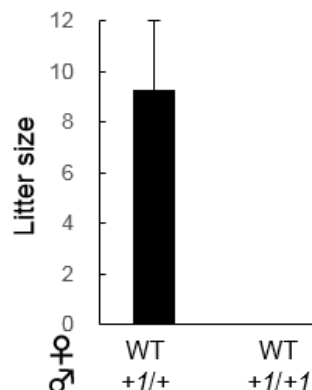


図 3 EP-2 ノックアウトマウスの妊孕性。EP-2 1 塩基挿入ホモ雄は不妊である。

以上の結果から、ECM1 のような、雄の妊孕性を制御する細胞外マトリックス因子が存在することがわかった。また、ECM1 による妊孕性の制御機構は、EP-2 のような遺伝子の発現を介した間接的な制御であることが示された。

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 1 件)

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*. 査読有 2016 Jul 12;113(28):7704-10. doi: 10.1073/pnas.1608458113.

[学会発表](計 3 件)

Daiji Kiyozumi, Ryo Yamaguchi, Masaru Okabe, Masahito Ikawa. Screening for extracellular matrix factors that may concern in male fertility. 4th World Congress of Reproductive Biology 2017 淨住大慈、山口亮、飛田知央、岡部勝、

伊川正人、Screening for extracellular matrix factors that may concern in male fertility 第 64 回日本実験動物学会総会 2017 年
浄住大慈、山口亮、飛田知央、岡部勝、伊川正人、Screening for extracellular matrix factors that may concern in male fertility 第 50 回日本発生生物学会 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
感染動物実験施設 HP :
<http://www.arcid.biken.osaka-u.ac.jp/>
遺伝子機能解析分野 HP :
<http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/information/index.html>
個人 HP :
http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/information/daiji_kiyozumi.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浄住 大慈 (KIYOZUMI, Daiji)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教
研究者番号：70452430

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

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

磯谷 綾子 (ISOTANI, Ayako)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授
研究者番号：20444523

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

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

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

森 雅司 (MORI, Masashi)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：00747941

(4) 研究協力者

()