

令和元年6月20日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06840

研究課題名(和文) 遺伝子改変動物を用いた精子成熟関連遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analyses of genes related to sperm maturation using genetically modified mice

研究代表者

櫻井 伸行 (Sakurai, Nobuyuki)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員(常勤)

研究者番号：10808281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)： 精巣上体は精子に受精能力を付与する役割を担う(精子成熟)。精子成熟の制御メカニズムを明らかにする目的で、精子の受精能力への関与が示唆される遺伝子クラスターXに注目した。マウスの全身組織において遺伝子クラスターXの発現パターンを調べた結果、構成遺伝子のほとんどが精巣上体で強く発現していた。遺伝子クラスターXの大部分(11遺伝子)をまとめて欠損した(KO)雄マウスでは妊育性が著しく低下した。KO精子の形態や運動性、体外受精能力は正常だったが、KO精子では透明帯への接着能力が低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、精巣上体における精子成熟の制御メカニズムの一端が明らかになった。特に、精子の透明帯への接着能力付与メカニズムに関与する遺伝子群を同定できたことは、精巣上体の生理学的な役割を理解する上で極めて重要である。マウスと同様に、ヒトや家畜においても精巣上体は雄の生殖能力を左右する重要な器官であり、本研究で得られた知見は、ヒト医療あるいは畜産分野において、不妊および低繁殖症の原因解明の一助になると期待できる。

研究成果の概要(英文)： In mammal, sperm obtain an ability to successfully achieve fertilization with an egg when they pass through the epididymis. In this study, I focused on gene cluster X, which was known to be related with fertilization ability of sperm. Most genes constructing the gene cluster were highly expressed in the epididymis. I generated mutant mice which were deleted a part of the gene cluster, 11 genes, and the male mice were severely subfertile. There was no significant abnormality in sperm morphology and motility. In vitro fertilization ability of mutant sperm was also normal. However, mutant sperm could not attach to zona pellucida. In conclusion, the present study has demonstrated that the genes I focused on in this study are indispensable for sperm maturation.

研究分野：生殖工学

キーワード：精子成熟

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マウスを含む多くの哺乳動物において、精巣で作られて間もない精子は運動性など受精に必要な機能が不十分である。この精子は、精巣から隣接する器官、精巣上体へと送られる。精巣上体の内部は、精巣から続く長い1本の管が複雑に折りたたまれた構造をしており、精巣に近い側から「頭部」「体部」「尾部」に分けられる。精子は精巣上体を通過し、尾部に至る過程において受精に必要な機能を獲得する(これを精子成熟と呼ぶ)ことから、精子は精巣上体を通過する過程で何らかの修飾を受けることで受精能力を獲得すると考えられている。精巣上体の機能は雄の繁殖能力を左右する極めて重要なものだが、精巣上体が精子に受精能力を付加するメカニズムについては未だ不明な点が多い。

申請者はある遺伝子ファミリー(*GeneA-0*; 図1)に着目して研究を進めてきたが、マウスにおいて、このファミリーを構成する遺伝子のいくつかは精巣や精巣上体で発現することが報告されている。申請者の所属研究室では *GeneA*、*B*、*C* の遺伝子をそれぞれ欠損(KO)しても雄の妊孕性に影響はないものの、*GeneD* KO 雄マウスでは妊孕性が低下することを明らかにした。対象としたファミリー遺伝子は分泌型タンパク質をコードしていることから、転写翻訳されたタンパク質が精巣上体管内に分泌され、精子に対して直接的に作用している可能性がある。本研究では、未だ研究が進んでいない *GeneE* から *GeneO* にかけての領域を対象にした(図2)。

遺伝子名	発現する組織
<i>GeneA</i>	精巣, 精巣上体, 精嚢腺
<i>GeneB</i>	精嚢腺
<i>GeneC</i>	精巣上体
<i>GeneD</i>	精巣上体
<i>GeneE</i>	精巣
<i>GeneF</i>	精巣上体
<i>GeneG</i>	精巣上体
<i>GeneI</i>	精巣上体
<i>GeneJ</i>	精巣上体
<i>GeneL</i>	胎盤
<i>GeneM</i>	胎盤
<i>GeneN</i>	精巣上体
<i>GeneO</i>	前立腺

図1. 文献および in silico 解析による発現パターンの予測

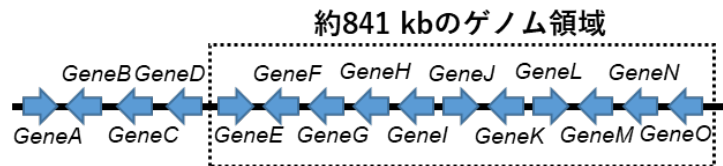


図2. 欠損領域の概略

2. 研究の目的

本研究では、*GeneE* から *GeneO* までの領域に含まれる遺伝子の機能解析を通じて、受精メカニズムにおいて精巣上体が果たす生理学的な役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現解析

野生型マウスの全身組織(16種類)からRNAを抽出した。DNase処理を施した各サンプルを逆転写することでcDNAを作製した。各組織由来のcDNAを鋳型とし、対象遺伝子のmRNA特異的なプライマーを用いてPCRを行った。

(2) KOマウスの作製

① sgRNAの選定

Cas9発現プラスミド(pX459)に遺伝子 *GeneE* および *GeneO* を標的とするsgRNA配列をそれぞれ挿入したものを複数種類作製した。続いて、標的配列を含む遺伝子領域をPCRにより増幅し、pCAG-EGxxFPプラスミドのマルチクローニングサイトに挿入した。作製したpX459-targetとpCAG-EGxxFP-targetをHEK293T細胞にトランスフェクションし、細胞を2日間培養した。蛍光顕微鏡下で観察し、蛍光シグナルの強度を基にKOマウス作製に用いるpX459-targetを選定した。

② KOマウスの作製

129S2 × C57BL/6N由来のマウスから得たES細胞(EGR-G01)に選んだ2種類のpX459-targetを導入した。目的の変異が導入されたES細胞をICR由来の受精卵に注入し、偽妊娠ICRに移植した。得られたキメラマウスをB6D2F1と交配させてヘテロKOマウスを作出した。さらに、このヘテロKOマウスを兄妹交配させて、標的領域をホモ欠損するKOマウスを作製した。

(3) KO マウスの表現型解析

① 精巣上部および精子の形態観察

性成熟を迎えたヘテロ KO およびホモ KO 雄から精巣上部を採取した後、それをブアン液に浸漬し、4 日に一晩静置することで組織を固定した。固定した組織をエタノールおよびキシレンを用いて脱水し、パラフィンに包埋した。ここからパラフィン切片を作成し、キシレンおよびエタノールを用いて脱パラフィンした上でヘマトキシリンおよびエオジンで染色した。これを顕微鏡下で観察した。

精巣上部尾部から採取した精子を PBS で懸濁した。懸濁液をスライドガラスに乗せ、顕微鏡下で観察した。

② 交配試験

性成熟を迎えたヘテロ KO およびホモ KO 雄マウスを野生型雌マウスとそれぞれ交配させた。雌の膈内にプラグが形成されたことを確認することで交配の有無を確かめた。妊孕性は 1 プラグ当たりの産仔数によって評価した。

③ 体外受精

採卵の約 62 時間前に野生型の雌マウスに PMSG (5 IU/匹) を腹腔内投与した。その 48 時間後に hCG (5 IU/匹) を腹腔内投与した。卵子-卵丘細胞複合体 (COCs) を卵管膨大部から取り出し、TYH 培地中に入れた。

ヘテロ KO およびホモ KO の雄から精巣上部を摘出し、脂肪や血液などを除去した。精巣上部尾部をノエス剪刀でカットし、出てきた精子を TYH ドロップ内に引き入れた。37 °C、5% CO₂ 気相下で 2 時間培養した。COCs が入ったドロップに精子懸濁液を添加し(精子濃度: 2×10^5 /mL)、37 °C、5% CO₂ 気相下で 6 時間培養した後、前核の有無によって受精率を算出した。

精子の透明帯への接着能力評価

ホルモン処理雌マウスから COCs を得た。ヒアルロニダーゼを用いて COCs から卵丘細胞を除去した。前項と同様に TYH 培地中で前培養した精子を 2×10^5 精子/mL になるように卵丘細胞を除去した卵子が入ったドロップに加えて、37 °C、5% CO₂ 気相下で 30 分間培養した。卵子を新しい TYH ドロップに移した後、グルタルアルデヒド (最終濃度: 0.2%) を添加し、透明帯に結合する精子数を倒立顕微鏡下で調べた。

4. 研究成果

(1) 遺伝子発現解析

本研究で対象とした 11 遺伝子の内、*GeneL* および *GeneM* を除く 9 遺伝子では、精巣ではなく、精巣上部で強い発現が認められた (図 3)。

(2) KO マウスの作製

① sgRNA の設計

本研究で行った試験では、gRNA の遺伝子切断活性が高いほど GFP の蛍光シグナルが強くなる。*GeneE* の領域では sgRNA#2、*GeneO* の領域では sgRNA#4 の切断効率が高かった (図 4)。

② KO マウスの作製

①で選定した pX459-target を ES 細胞に導入し、Puromycin 処理後に得られた ES 細胞クローンの遺伝子型を調べたところ、ヘテロ変異を持った ES 細胞クローンが得られた [21/48 (43.8%)]。核型が正常だった変異 ES 細胞クローンをもとに、キメラマウスを作製した。その後、交配によりホモ KO マウスを作製することに成功した (図 5)。

(3) KO マウスの表現型解析

① 精巣上部および精子の形態観察

ヘテロ KO 雄 (*del/wt*) とホモ KO 雄 (*del/del*) の精巣上部の

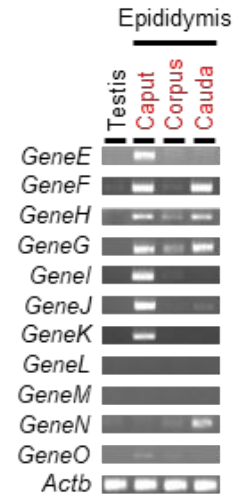


図 3. RT-PCR 解析

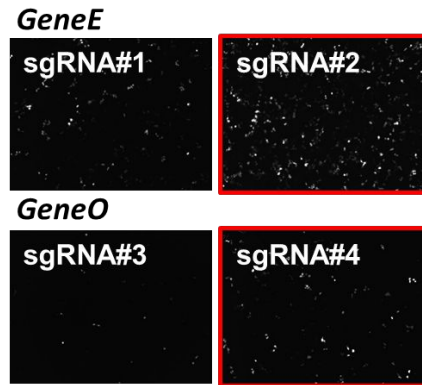


図 4. sgRNA の選定

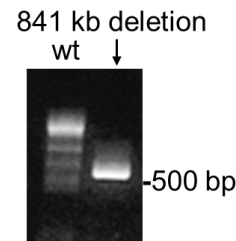


図 5. GeneE-O KO マウス作製

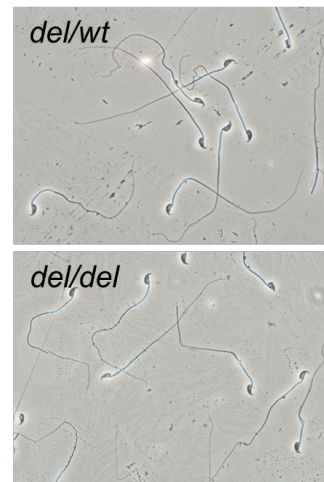


図 6. 精子の形態

組織学的解析を行ったが、両者の間で顕著な違いは認められなかった。また、K0 精子の形態に関しても、異常は認められなかった (図 6)。

②交配試験

ホモ K0 雄 (n = 4) と交配した雌は、合計 34 回プラグが確認されたが、産仔は 1 匹しか得られず、ホモ K0 雄はほぼ不妊であった。同様に試験を行ったヘテロ K0 雄 (n = 3) では、19 回プラグが確認され、合計 153 匹 (平均 8.1 匹/プラグ) の産仔が得られた。

③体外受精

受精率に関しては、ヘテロ K0 およびホモ K0 精子の間に有意な差は認められなかった。このことから、K0 精子は透明帯を通過し、卵と受精する能力を有することが明らかになった。

精子の透明帯への接着能力評価

ホモ K0 雄の不妊傾向の原因を調べたところ、ホモ K0 精子の透明帯への接着能力が低下していることが明らかになった (図 7)。透明帯への接着能力が低下した精子は、子宮から卵管への移行不全を示す例が複数の遺伝子欠損マウスにおいて報告されている。今後、ホモ K0 精子の雌性生殖道内における挙動を観察し、雄の不妊傾向の原因を突き止めたい。

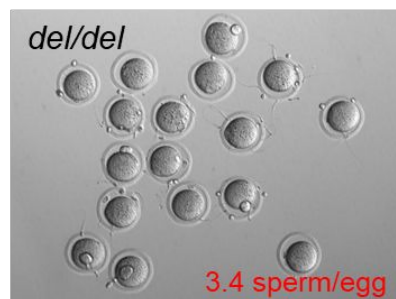
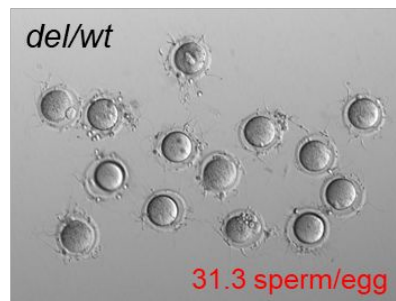


図 7. ホモ K0 精子は透明帯への接着能力が低い

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1) Noda T, Sakurai N, Nozawa K, Kobayashi S, Devlin DJ, Matzuk MM, Ikawa M. Nine genes abundantly expressed in the epididymis are not essential for male fecundity in mice. *Andrology*, 査読あり, 2019, Epub ahead of print
DOI: 10.1111/andr.12621.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

(1)大阪大学微生物病研究所 遺伝子機能解析分野
<http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/information/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。