

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07778

研究課題名(和文) CRISPR/Casを用いた不妊原因遺伝子の同定とその分子機能の解明

研究課題名(英文) Identification of male infertility genes using CRISPR/Cas system and elucidation its molecular function in mice

研究代表者

与語 圭一郎 (Yogo, Keiichiro)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：60362844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、Slc22a14とDlec1の発現様式や生理的機能についてマウスを用いて解析し、これらの遺伝子が雄の生殖能に極めて重要な遺伝子であることを見出した。例えばSlc22a14は精巣特異的かつ生殖細胞特異的に発現しており、この遺伝子を欠損すると精子の運動能・受精能が低下し、雄マウスの生殖能力が著しく低下する。また、Dlec1を欠損したマウスでは、精子分化に異常があるため、正常な精子がほとんど産生されず完全な不妊となる。Slc22a14やDlec1はヒトにも保存されていることから、これら遺伝子は潜在的なヒト男性不妊原因遺伝子であることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：We investigated expression profile and physiological role of Slc22a14 and Dlec1 in mice, and found that these genes play a crucial role for male fertility. For example, Slc22a14 is expressed specifically in sperm, and if this gene was disrupted, motility and fertilizing ability of sperm were significantly decreased and thus reproductive ability were markedly impaired. In addition, we found that Dlec1-deficient male mice are completely infertile. Sperm differentiation was abnormal and almost no sperm were seen in cauda epididymis in Dlec1-deficient mice. Since Slc22a14 and Dlec1 are conserved in humans, above results suggest that these genes are candidate causative genes of human male infertility.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精子形成 不妊 マウス 受精能獲得 Slc22a14 Dlec1

1. 研究開始当初の背景

olt/olt マウスは、劣性遺伝により精子形成不全を呈する突然変異マウス系統である。このマウスの精子形成は減数分裂を終了するまでは正常に進行するが、円形精子細胞から伸長精子細胞になる過程で異常が生じ、正常な鞭毛が形成されない。近年その変異部位が同定され、9番染色体の234-kbpの欠失であることが分かった (Runkel F et al., 2008)。この領域には、6つの遺伝子が存在するが、うち2つの遺伝子については、すでにK0マウスの解析により雄の繁殖能力には影響しないことが判明しているが、残る4遺伝子のうち、どの遺伝子が雄性不妊に関わっているのかは明らかになっていなかった。

そのような状況の中、私たちは、その4つの遺伝子のなかから、Slc22a14 (Solute Carrier family 22 member14) と Dlec1 (Deleted in lung and esophagus cancer 1) が精子分化に伴って発現上昇することを見出していた。この結果はこの2つの遺伝子のどちらか (あるいは両方) が *olt/olt* マウスの不妊原因遺伝子であることを示唆している。

2. 研究の目的

以上のような背景から、本研究では、*olt/olt* マウスにおける雄性不妊原因遺伝子を明らかにするため、Slc22a14 および Dlec1 ノックアウトマウスを作製し、その生殖能を調べることを目的とした。さらに、生殖能に関与することが分かった遺伝子については、その発現や局在、分子機能を解析し、精子形成における役割を調べた。

3. 研究の方法

各遺伝子の発現はRT-PCRにより解析した。各遺伝子のノックアウト (K0) マウスはCRISPR/Cas9 システムを用いて作製した。生まれてきたマウスの中から1匹のK0雌マウスをファウンダーとして用い、継代繁殖した。WT および K0 マウスの交配実験を行い、産仔数を調べることで生殖能力を解析した。またWT および K0 マウスの精巢・精巢上体・精巢上体精子の組織学的形態学的解析のほか、精巢上体精子数、精子運動能、体外受精における受精能なども調べた。そのほか抗体を用いてタンパク質レベルでの発現や細胞内局在についても解析した。

4. 研究成果

(1) Slc22a14 に関する研究

Slc22a14 の発現パターン

Slc22a14 遺伝子は精巢特異的かつ生殖細胞特異的に発現していた。また特異的抗体を用いて精巢における発現細胞を調べたところ、減数分裂終了後の精子細胞に発現していることが分かった。また、精巢上体尾部の精子を取り出して Slc22a14 の細胞内局在を調べた

ところ、鞭毛主部に発現していることが分かった (図1)。Slc22a14 はその一次構造の相同性から有機アニオンまたはカチオンを輸送する輸送体の1つと考えられている。以上より、Slc22a14 は精子特異的に発現し、鞭毛主部に局在する輸送体タンパク質であることが明らかになった。



図1 免疫染色による Slc22a14 の精子における局在解析。Slc22a14 (赤) は鞭毛主部に局在している。DAPI (青)

Slc22a14-K0 マウスの生殖能

野生型 (WT, 4匹) および Slc22a14-K0 雄マウス (5匹) を WT の雌マウスと交配させた。交配は雄1匹に対し雌2匹とした。WT 雄と交配した雌マウスは全8匹が出産し、平均産仔数は8.5匹であった。しかし K0 雄マウスと交配した雌は10匹中1匹しか出産せず、またその1匹は1匹の仔しか出産しなかった。この結果から Slc22a14-K0 マウスの生殖能は著しく低下していることが分かった。なお、プラグは正常に見られたことから K0 マウスの交配行動は正常であることを確認している。

Slc22a14-K0 精子の異常の解析

Slc22a14-K0 雄マウスの生殖能力低下の原因を調べるため、精巢の組織学的解析や精巢上体精子数について調べたが、WT のそれと差は認められなかった。そこで精子の運動性について調べたところ、K0 では活発に前進運動を行う精子の割合が低下していることが明らかとなった。さらに、精子の形態を詳細に観察したところ、K0 精子の鞭毛はヘアピン状あるいはV字状に異常に屈曲しているものの割合が多かった (図2)。これらの結果から Slc22a14-K0 マウスの生殖能の低下の一因は精子鞭毛の異常による運動性低下であることが示唆された。また、我々は精子が卵と受精するために必要な機能変化である受精能獲得についても調べた。その結果 Slc22a14-K0 精子では受精能獲得能が顕著に低下しており、実際体外受精を行っても野生型と比較し優位に受精率が低いことが分かった。これらの結果から、Slc22a14-K0 マウスにおける生殖能低下の原因は、精子鞭毛の異常屈曲による運動性の低下と受精能獲得能の低下が重なっておきる精子受精能力の低下によるものであることが判明した。

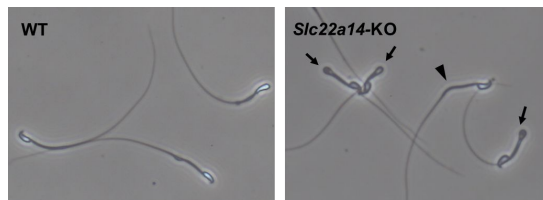


図2 Slc22a14 欠損マウス精子の形態。Slc22a14-K0 マウス精子 (右写真) は鞭毛がヘアピン状 (矢印) あるいは V 字状 (矢頭) に屈曲している。

精子鞭毛の異常屈曲の原因の解析

マウスの精子は低浸透圧の培地にさらすと、細胞内に水が浸入して膨張する結果、鞭毛がヘアピン状に屈曲することが知られている。我々は Slc22a14 が溶質輸送体であることから、Slc22a14-KO 精子では溶質の輸送に障害が起きた結果、細胞内浸透圧に異常が生じ、水が細胞内に流入して鞭毛が屈曲したのではないかと推測した。この仮説を検証するため、まず Slc22a14-KO マウス精子を高浸透圧培地にさらしたところヘアピン状の屈曲が改善されることが分った。また、界面活性剤により細胞膜透過処理を行うと通常の浸透圧下でもヘアピン状の屈曲は改善することも判明した。従って、Slc22a14-KO 精子鞭毛の異常屈曲の一因は浸透圧性細胞膨張であると考えられた。一方、高浸透圧培地への暴露や細胞膜透過処理はヘアピン状の異常屈曲を改善するものの、それらの精子は V 字状に屈曲したままであることから、他にも何らかの原因が存在していることが示唆された。そこで電子顕微鏡により KO 精子の微細構造を調べたところ、精子鞭毛の中片部と主部の間にあるアニユラスに異常が見つかった。そこでアニユラスを構成するタンパク質の 1 つで、アニユラス形成に必須の役割を果たしている Septin4 の発現・局在を調べたところ、Slc22a14 欠損マウス精子では、異常な局在を示しているものが多いほか、発現自体も低下していることが分った。これらの結果から、Slc22a14-KO マウス精子では浸透圧性細胞膨張とアニユラスの構造異常という 2 つの原因により異常屈曲が生じていることが示唆された。

(2) Dlec1 に関する研究

Dlec1 の発現パターン

マウス各組織における Dlec1 遺伝子の発現を解析したところ、精巣に比較的強い発現があったほか脳や肺などの組織にも発現していた。遺伝的に生殖細胞を欠損するマウスの精巣では Dlec1 の発現が認められなかったことから、精巣においては生殖細胞特異的に発現していることが分った。また、生後の精巣発育における Dlec1 遺伝子の発現を調べたところ、精子細胞が出現し始める生後 20 日齢以降に発現を開始することが分った。これらの結果から、Dlec1 は精子の分化に伴って発現が上昇する遺伝子で、精子細胞以降の分化段階で働く遺伝子であると考えられた。

Dlec1-KO マウスの解析

WT および Dlec1-KO 雄マウスを WT 雌マウスと交配し生殖能を調べた。雄 1 匹に対して雌 2 匹を交配した。その結果、WT 雄マウスと交配した雌は 12 匹中 9 匹が出産し、その平均産仔数は 9.2 匹であった。一方、KO マウスと交配した雌マウスは 12 匹中 1 匹も子供を産まなかった。以上より、Dlec1 は雄の生殖能力に必須の遺伝子であることが明らかにな

った。なお、Dlec1-KO マウスの交配行動は正常であることは確認している。

Dlec1-KO マウス精巣/精巣上体の組織学的解析

Dlec1-KO マウスの不妊原因を調べるため、精巣の組織学的解析を行った。その結果、KO マウス精巣においては、精細管内腔に成熟した精子が全く見られなかった。また精巣上体尾部においても精子はほとんど存在せず、また、わずかに認められる精子には頭部の形態異常や鞭毛の形成不全が認められた。

次に Dlec1-KO マウスにおいて精子形成のどの段階で異常が生じているのかを解析した。その結果、Dlec1-KO マウス精子の分化は伸長精子細胞のステップ 9 までは正常であるものの、その後、精子頭部や鞭毛が伸長する過程で形態異常が生じることが分った。これら精子形成の異常は *Olt/Olt* マウスの異常とよく一致していたことから、*Olt/Olt* マウスにおける雄性不妊の原因遺伝子は Dlec1 であることが示唆された。

Dlec1-KO マウスにおけるマンシェットの異常

Dlec1-KO 精子細胞の形態異常の解析から、Dlec1 欠損精子ではマンシェット（精子頭部を覆う特殊な微小管構造）に異常があることが推測された。そこで チューブリン抗体を用いて KO 精巣から採取した精子細胞の免疫染色を行ったところ、期待した通りマンシェット構造の異常が認められた。またこの異常は微小管モータータンパク質の 1 つである Kif3A-KO マウス精子細胞で見られる異常と非常によく似ていた。これらの結果から、Dlec1 は KIF3A と同様、微小管上の輸送に重要な働きを持っていることが示唆された。

Dlec1 の細胞内局在の解析

抗マウス Dlec1 抗体を作製し、マウス精巣組織の免疫染色を行ったが、その染色像は KO マウス精巣のものと顕著な違いが認められなかった。そこで抗原部位を変えながら、数度にわたり抗体作製を行ったが、どの抗体を用いても免疫染色では明瞭なシグナルを得ることができなかった。免疫染色や免疫沈降に利用できる特異性の高い抗体は、Dlec1 分子機能を解明するためには必須のツールである。今後いかにこのような抗体を作製するかが研究の鍵を握ると考えている。

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 2 件)

(1) Muroi T, Matsushima Y, Kanamori R, Inoue H, Fujii W, Yogo K. GPR62 constitutively activates cAMP signaling but is dispensable for male fertility in

mice. Reproduction. 2017
Dec;154(6):755-764. 査読あり
DOI: 10.1530/REP-17-0333
(2) Maruyama SY, Ito M, Ikami Y, Okitsu Y,
Ito C, Toshimori K, Fujii W, Yogo K. A
critical role of solute carrier 22a14 in
sperm motility and male fertility in mice.
Sci Rep. 2016 Nov 4;6:36468. 査読あり
DOI: 10.1038/srep36468

〔学会発表〕(計7件)

(1) Toshiya Higuchi, Momoe Ito, Wataru
Fujii, Keiichiro Yogo “The mechanism of
impaired capacitation in
Slc22a14-deficient sperm” 4th World
Congress of Reproductive Biology (WCRB
2017) 2017年

(2) 与語圭一郎, 丸山神也, 沖津優, 伊藤百
映, 伊藤千鶴, 年森清隆, 藤井涉「Oligotriche
遺伝子座に存在する不妊原因遺伝子の同定」
第61回日本生殖医学会 2016年

(3) 沖津優, 丸山神也, 江場稜将, 伊藤千鶴,
年森清隆, 藤井涉, 与語圭一郎「Oligotriche
マウスにおける不妊原因遺伝子の同定」第
109回日本繁殖生物学会 2016年

(4) 伊藤百映, 丸山神也, 伊藤千鶴, 年森清
隆, 藤井涉, 与語圭一郎「Slc22a14 遺伝子欠
損マウス精子における受精能獲得と鞭毛屈
曲異常の解析」第109回日本繁殖生物学会
2016年

(5) 丸山神也, 伊藤百映, 伊神悠祐, 沖津優,
伊藤千鶴, 年森清隆, 藤井涉, 与語圭一郎「遺
伝子欠損マウスを用いた Slc22a14 の生理機
能の解析」第11回トランスポーター研究会
年会 2016年

(6) 丸山神也, 沖津優, 藤井涉, 与語圭一郎
「Slc22a14 遺伝子の欠損がマウス生殖能力
に及ぼす影響」第121回日本畜産学会 2016
年

(7) 沖津優, 丸山神也, 藤井涉, 与語圭一郎
「Dlec1 の欠損は精子形成不全を引き起こ
す」第38回日本分子生物学会年会・第88回
日本生化学会大会合同大会 2015年

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

与語圭一郎 (YOGO, Keiichiro)
静岡大学・農学部・准教授
研究者番号: 60362844

(2) 研究分担者

藤井涉 (FUJII, Wataru)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助
教
研究者番号: 40708161

伊藤 千鶴 (ITO, Chizuru)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号: 80347054