

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17H01394

研究課題名（和文）オンデマンドゲノム編集技術の開発と実験動物学への応用

研究課題名（英文）Development of in vivo gene manipulation methods using CRISPR/Cas9 system

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） 32,100,000円

研究成果の概要（和文）：CRISPR/Cas9ゲノム編集技術を申請者が得意とするレンチウイルスベクターやES細胞などと組み合わせ、任意の遺伝子改変を可能にするオンデマンドゲノム編集システムを開発した。さらに開発した遺伝子組換え技術・動物を用いて、精巣特異的発現遺伝子の機能解析に取り組み、精子形成や精子機能獲得メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命科学研究の進展には、個体レベルで遺伝子機能を解析する手法が必要不可欠である。申請者はCRISPR/Cas9ゲノム編集技術を活用して任意の遺伝子改変マウスを作製するツールを開発した。さらに、開発した遺伝子組換え技術を用いて雄性不妊マウスを多数作製し、その原因を明らかにした。本研究成果は、社会問題にもなっている不妊症メカニズム解明と治療法開発に貢献する。

研究成果の概要（英文）：We have developed an on-demand genome editing system that enables arbitrary genetic modification by combining CRISPR/Cas9 genome editing technology with lentiviral vectors and ES cells, which are the applicant's specialties. In addition, using the developed genome editing technology and animals, we conducted functional analysis of testis-specific expressed genes to clarify the mechanisms of spermatogenesis and acquisition of sperm function.

研究分野：実験動物学

キーワード：実験動物 ゲノム編集 ウイルスベクター CRISPR/Cas9 不妊

1. 研究開始当初の背景

これまで遺伝子機能を個体レベルで解析するためには、外来遺伝子を組み込んだトランスジェニック (TG) マウスや、目的遺伝子を破壊したノックアウト (KO) マウスを作るアプローチがなされており、確実に成果を挙げてきた。特に KO マウスは個々の遺伝子機能を個体レベルで調べるために欠かせないツールとなっている。我々もこれまでに 400 系統以上の KO マウスを作製し、自らの生殖生物学研究に用いるだけでなく、広く他グループの遺伝子機能解析研究を推進してきた。しかし KO マウスの作製は容易ではなく、ターゲティングベクターの構築や胚性幹 (ES) 細胞を介したキメラマウス作製など、高度な技術や多大な労力・時間・費用がかかる問題点があった。

一方、KO マウスの表現型解析から分かることは、エクソンがコードするタンパク質がない時の生体情報に限られる。そのため実際にヒトで見られるような 1 塩基変異 (SNPs) による疾病との関連や、タンパク質をコードしない non-coding RNA や small RNA、さらにはイントロンや遺伝子間に広がる無数の塩基配列が個体に及ぼす影響を調べることは容易ではなかった。また内在性遺伝子を Tag や EGFP 等で標識することも非効率的であった。そのため、ゲノムを 1 塩基単位や染色体レベルで任意に操作できる、次世代の遺伝子改変技術、オンデマンドゲノム編集システムの開発が望まれていた。

そのような中、2013 年に黒船襲来ともいふべき、新しいゲノム編集技術、CRISPR/Cas9 システムが哺乳類細胞で機能することが報告された。ゲノム編集の原理はタンパク質により標的配列を認識する従来の人工制限酵素 (ZFN や TALEN) と同じであり、切断された DNA 二重鎖の修復機構を利用する (図 1)。ZFN や TALEN と異なり、CRISPR/Cas9 システムはガイド RNA (sgRNA) により標的配列を認識して切断するため、簡便性やコストの点で圧倒的に優れている。申請者も 2013 年の早期から導入し、受精卵に sgRNA/Cas9 発現プラスミドを注入することで KO マウスの量産に成功していた (文献)。

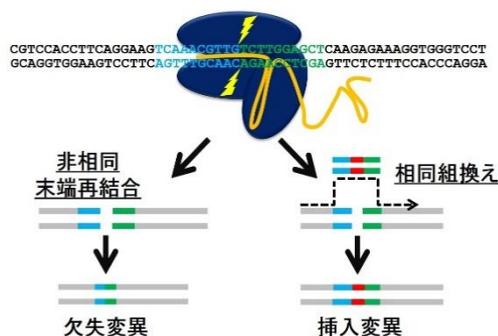


図 1 CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集
標的遺伝子座の DNA 二重鎖を Cas9 タンパク質と sgRNA の複合体により切断し、非同相末端の再結合や相同組換えを利用して遺伝子改変する。点変異だけでなく、ノックインや染色体逆位・転座など思い通りにゲノムを編集できる。

2. 研究の目的

本研究では、構造生物学的アプローチから改良された Cas9 を、申請者が開発した LV-TG 法やキメラマウス解析手法などと組み合わせることにより、1 塩基レベルから染色体レベルで任意の遺伝子改変と機能解析を可能にするオンデマンドゲノム編集システムを構築する。一方、我々の経験や、国際 KO プロジェクトの実績からも、KO マウスの 1~3 割で胚性致死や生殖不全の症状が認められている。いかに生殖・胚発生という現象が遺伝的に制御されているのかの裏返しでもある。そこで本課題では、開発したゲノム編集システムを用いて、申請者のライフワークでもある配偶子形成、受精、着床と胎盤形成という哺乳類生殖メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究は、オンデマンドゲノム編集システムの開発と、その応用である生殖不全マウスの重点解析を 2 つの大きな柱にして研究を進める。サブテーマを設けて目標を明確し、連携研究者を担当者に配置することで、問題点の早期発見・解決および効率的に研究を推進した。

(1) オンデマンドゲノム編集システムの開発

CRISPR/Cas9 システムでは、sgRNA により標的 20 塩基に加えて直下の PAM 配列 (NGG) を認識し、Cas9 タンパク質により標的配列を切断する。前述の通り、従来の Cas9 システムでは PAM 配列が標的選びを制限すること、またオフターゲット切断のリスクが問題視されている。そこで Cas9 タンパク質の X 線構造解析データを基に改良された Cas9 (NG) を用いて、in vitro, in vivo で評価し、理想のゲノム編集ツールの完成を目指した。

(2) 生殖不全マウスの重点解析

申請者や国際 KO マウスプロジェクトの実績から、KO マウスの約 3 割程度で胚性致死や不妊・不育などの生殖不全が認められている。不妊の主な原因の一つは配偶子形成不全や受精障害である。申請者の経験を生かして不妊原因を究明するとともに、当該遺伝子が生殖に担う役割を明らかにする。具体的には、KO/KI マウスを野生型マウスと交配して妊孕性を検討する。不妊と判断したマウスについて、性行動や交尾行動 (膣栓)、配偶子形成 (精巣・卵

巢の組織解析)、射精・排卵、配偶子クオリティ (形態観察や運動性など)、受精障害 (透明帯への結合と通過、卵子との融合、卵子の活性化) というステップに分けて調べ、不妊の要因を突きとめる。さらに、異常を観察することを通して、正常な受精メカニズムの解明に還元する。さらに、単純な KO マウスに加え、ヒト不妊症の点変異を加えたり、FLAG や EGFP などをノックイン (KI) したマウスを作製して用いることで、分子レベルでのメカニズムの解析が可能になる。

4. 研究成果

(1) オンデマンドゲノム編集システムの開発

東京大学の濡木らが開発した Cas9-NG は PAM 配列として NGG ではなく、NGN (NGA, NGC, NGG, NGT) を認識して切断することができる。そこで Cas9-NG を用いて、まず HEK 細胞におけるゲノム編集効率を検討した結果、HEK 細胞では予想通り NGG 以外の PAM 配列も認識して切断した (図 2)。本成果は、共同研究論文として報告した (Science 2018)。

次にマウス受精卵を用いて切断活性を検討したところ、gRNA/CAS9 混合物の前核注入法では野生型 CAS9 が 35~38% の切断活性を示したのに対し、NG 型 CAS9 は約 2% の切断活性しか示さなかった。電気穿孔法もトライしたが、切断効率の改善は認められなかった。そこでマウス ES 細胞での切断効率を検討したところ、HEK 細胞ほどではないものの、十分な切断活性を示した。

次に、NGN 型 Cas9 が優位性を発揮できる部分として、CAG リピートを対象としたゲノム編集への応用を試みた。ハンチントン病の原因となる 140-150 近い ACG リピートを有するヒト患者由来の Htt 遺伝子を有するトランスジェニックマウス系統 R6/2 の受精卵および ES 細胞を樹立して、Cas9-NG を用いた CAG 配列の切断と短縮を検討した。その結果、受精卵で CAG 短縮は難しいものの、ES 細胞では in frame で CAG リピートが 10 程度にまで効率よく短縮できることを確認した。さらに、処理 ES 細胞からキメラマウスを作製した場合には、脳でのハンチンチン凝縮が殆どみられないことを確認した。さらに次世代ではハンチントン病の症状が全くみられなかった。これらの成果を纏め、Cas9-NG を使うことで、CAG リピート病の治療の可能性を示す論文を投稿した (Communications Biology, minor revision)。

また一方、我々は ES 細胞でのゲノム編集効率が優れていることに着目し、単一遺伝子ではなく、ファミリー遺伝子をまとめて欠損させることに挑戦した。標的として、精巣および副生殖腺に多く発現する Pate ファミリー遺伝子を選択した。Pate 遺伝子群の殆どは染色体 9 番に位置し、14 遺伝子からなるクラスターを形成している。これまでに Pate1, 2, 3, 4 を単独で欠損したマウスを作製してきたが、Pate4 のみが雄の妊孕性に重要であることが分かっていた。そこで、残る Pate ファミリーを含む 840kbp のゲノム領域を ES 細胞で欠損させてキメラマウスを作製、子孫を得て表現型を解析した。その結果、Pate ファミリーを欠損すると、雄性不妊となること、さらに精子形成や運動性は正常であるにも関わらず、精子が子宮から卵管に移行できずに雄性不妊となることを明らかにした。他にも 340kbp 領域に広がるシスタチン遺伝子ファミリーを欠損した場合にも同様の結果を得ることに成功した。ゲノム編集 ES 細胞を用いる利点と合わせ、論文発表した (PNAS 2019)。

(2) 生殖不全マウスの重点解析

上記のゲノム編集ツールおよび遺伝子改変マウス作製を応用し、精巣特異的に発現する遺伝子群を標的として、KO マウスの作製と機能解析を行った。KO 雄マウスを wt 雌マウスと交配させたときに、wt 雄と同程度に産仔が得られた 62 遺伝子について、妊孕性に必須でない遺伝子として論文発表した (Andrology 2019, BOR 2019, 2020a, 2020b)。

一方、雄性不妊を示した遺伝子については、詳細な解析を進めた結果、以下に示すように多くの成果を得た。アルマジロ繰り返し配列を有する ARMC12 はミトコンドリアに局在し、TBC1D21 を介して VDAC2/3 と相互作用することで精子ミトコンドリア鞘の形成を司ることを明らかにした (図 3, PNAS 2021)。

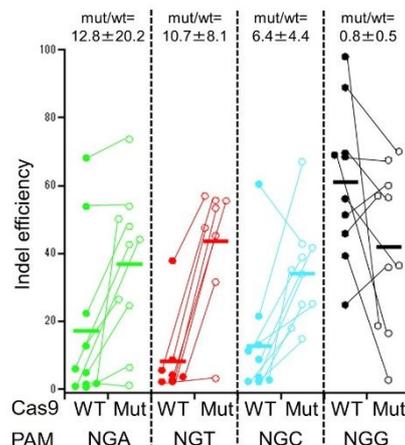


図 2 Cas9-NG を用いたゲノム編集
野生型 Cas9 が NGG を選択的に好むの
に対し、Cas9-NG は NGN 配列を認識し
て HEK 細胞のゲノムを切断した。

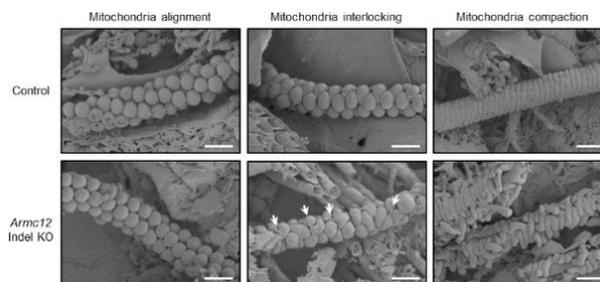


図 3 ARMC12 による精子ミトコンドリア鞘形成
ARMC12 を欠損したマウスは(下)、精子成熟過程でのミト
コンドリア鞘形成が上手くいかないために雄性不妊となる。

また KO しても精子の形態や運動性に影響せず、精子と卵の融合不全を示す遺伝子を多数、同定した。卵との融合に必要な因子は 2005 年に我々が同定した IZUM01 しかなかったが、CRISPR-KO スクリーニングにより新規に FIMP, SOF1, TMEM95, SPACA6 の 4 因子を同定した (PNAS 2020a, b)。さらに最近、線虫 SPE42/49、ハエ SNKY のオースログである DCST1/2 も卵との融合に必要な因子であることを同定した (投稿中)。これらの因子を組み合わせることで、精子/卵の融合メカニズム解明が期待される。

ところで受精卵は精子由来の因子 (SOAR: Sperm Oocyte Activation Factor) により活性化されて発生を開始する。我々は、有力な候補因子であった PLCZ1 に着目して研究を進め、PLCZ1 を欠損した精子を顕微授精 (精子を直接、卵の細胞質内に注入して受精させる方法) しても、卵は活性化されず発生しないことを見出した。このことは PLCZ1 が SOAF であることを支持している。興味深いことに、PLCZ1 欠損精子が膜融合を介した受精した場合には、一定の割合で卵が活性化されることに気づいた。つまり、精子による卵活性化には PLCZ1 を介した効率的な経路とは別に、膜融合により伝達される低活性の経路が存在することになる。一部の両生類などでは、多精子受精しないと卵が活性化されないことを考え合わせると、哺乳類は PLCZ1 を手に入れることで確実な卵活性化システムを獲得したのかもしれない (図 4, Sci Rep 2018)。

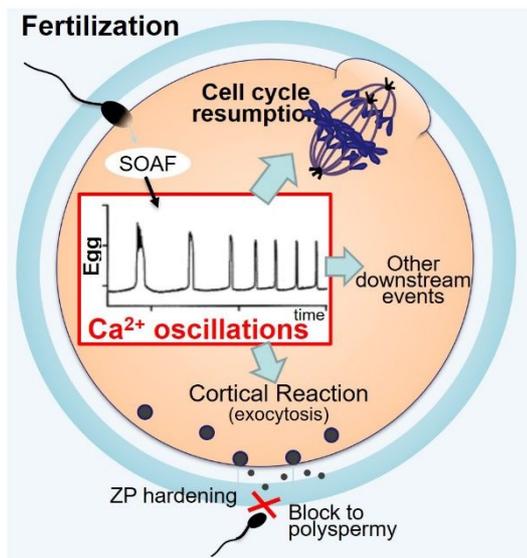


図 4 PLCZ1 による卵活性化
精子由来で卵を活性化する SOAF として、PLCZ1 を同定するとともに、膜融合により PLCZ1 非依存的な卵活性化経路があることを報告した。

さらに我々は、精巣に加えて精巣上体での精子成熟メカニズムについても検討を開始した。その結果、精巣の精細胞で作られる NELL2 因子が精細管の管腔内を通過して精巣上体に移行し、精巣上体の上皮細胞で発現する受容体 ROS1 を介して上皮細胞の分化を誘導、さらに分化した上皮細胞から分泌された OVCH2 プロテアーゼが、精子表面の ADAM3

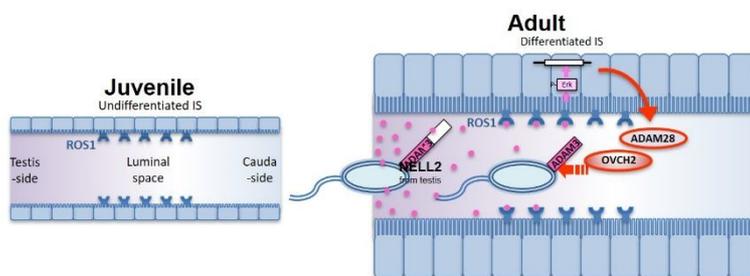


図 5 NELL2 を介したルミクリンシステムと精子成熟
精巣で作られた NELL2 が管腔内を通過して精巣上体の上皮細胞分化を誘導する。分化した上皮細胞から分泌される OVCH2 が精子 ADAM3 のトリミングを介して精子の受精能力獲得を促す。

膜タンパク質のトリミングを行うことで精子が受精可能になる一連のメカニズムを明らかにした。管腔内を通過して別組織の分化を誘導する 40 年来の謎であったルミクリンシステムを解明する成果として論文発表した (図 5, Science 2020)。

これら一連の成果は、精子形成・成熟・機能を分子レベルで明らかにすると同時に、社会的問題となっている不妊の診断・治療に還元されることが期待される。

< 引用文献 >

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. doi: 10.1038/srep03355.
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. doi: 10.1073/pnas.1608458113.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計38件（うち査読付論文 38件/うち国際共著 18件/うちオープンアクセス 38件）

1. 著者名 Abbasi Ferheen, Kodani Mayo, Emori Chihiro, Kiyozumi Daiji, Mori Masashi, Fujihara Yoshitaka, Ikawa Masahito	4. 巻 9
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing Reveals Oosp Family Genes are Dispensable for Female Fertility in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 821
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9040821	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 Morohoshi Akane, Miyata Haruhiko, Shimada Keisuke, Nozawa Kaori, Matsumura Takafumi, Yanase Ryuji, Shiba Kogiku, Inaba Kazuo, Ikawa Masahito	4. 巻 16
2. 論文標題 Nexin-Dynein regulatory complex component DRC7 but not FBXL13 is required for sperm flagellum formation and male fertility in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1008585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1008585	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 Kiyozumi Daiji, Mori Masashi, Kodani Mayo, Ikawa Masahito	4. 巻 69
2. 論文標題 Genetic mutation of Frem3 does not cause Fraser syndrome in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 104 ~ 109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.19-0088	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 Matsumura Takafumi, Noda Taichi, Muratani Masafumi, Okada Risa, Yamane Mutsumi, Isotani Ayako, Kudo Takashi, Takahashi Satoru, Ikawa Masahito	4. 巻 9
2. 論文標題 Male mice, caged in the International Space Station for 35 days, sire healthy offspring	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50128-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 -

1. 著者名 Fujihara Yoshitaka, Noda Taichi, Kobayashi Kiyonori, Oji Asami, Kobayashi Sumire, Matsumura Takafumi, Larasati Tamara, Oura Seiya, Kojima-Kita Kanako, Yu Zhifeng, Matzuk Martin M., Ikawa Masahito	4. 巻 116
2. 論文標題 Identification of multiple male reproductive tract-specific proteins that regulate sperm migration through the oviduct in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 18498 ~ 18506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1908736116	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 Lu Y, Oura S, Matsumura T, Oji A, Sakurai N, Fujihara Y, Shimada K, Miyata H, Tobita T, Noda T, Castaneda J M, Kiyozumi D, Zhang Q, Larasati T, Young S A M, Kodani M, Huddleston C A, Robertson M J, Coarfa C, Isotani A, Aitken R J, Okabe M, Matzuk M M, Garcia T X, Ikawa M	4. 巻 101
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated genome editing reveals 30 testis-enriched genes dispensable for male fertility in mice†	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 501 ~ 511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioz103	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., Sakurai N., Nozawa K., Kobayashi S., Devlin D. J., Matzuk M. M., Ikawa M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Nine genes abundantly expressed in the epididymis are not essential for male fecundity in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 644 ~ 653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.12621	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 TOBITA Tomohiro, KIYOZUMI Daiji, MUTO Masanaga, NODA Taichi, IKAWA Masahito	4. 巻 65
2. 論文標題 Lvrn expression is not critical for mouse placentation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 239 ~ 244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2018-157	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 SHIMADA Keisuke, KATO Hirotaka, MIYATA Haruhiko, IKAWA Masahito	4. 巻 65
2. 論文標題 Glycerol kinase 2 is essential for proper arrangement of crescent-like mitochondria to form the mitochondrial sheath during mouse spermatogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 155 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2018-136	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 Noda Taichi, Fujihara Yoshitaka, Matsumura Takafumi, Oura Seiya, Kobayashi Sumire, Ikawa Masahito	4. 巻 100
2. 論文標題 Seminal vesicle secretory protein 7, PATE4, is not required for sperm function but for copulatory plug formation to ensure fecundity†	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 1035 ~ 1045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/i0y247	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 SENOO Manami, TAKIJIRI Takashi, YOSHIDA Nobuaki, OZAWA Manabu, IKAWA Masahito	4. 巻 65
2. 論文標題 PTBP1 contributes to spermatogenesis through regulation of proliferation in spermatogonia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 37 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2018-109	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 Suzuki Tatsuya, Okamoto Toru, Katoh Hiroshi, Sugiyama Yukari, Kusakabe Shinji, Tokunaga Makoto, Hirano Junki, Miyata Yuka, Fukuhara Takasuke, Ikawa Masahito, Satoh Takashi, Yoshio Sachiyo, Suzuki Ryosuke, Saijo Masayuki, Huang David C. S., Kanto Tatsuya, Akira Shizuo, Matsuura Yoshiharu	4. 巻 14
2. 論文標題 Infection with flaviviruses requires BCLXL for cell survival	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1007299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1007299	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 Fujihara Yoshitaka, Oji Asami, Kojima-Kita Kanako, Larasati Tamara, Ikawa Masahito	4. 巻 131
2. 論文標題 Co-expression of sperm membrane proteins CMTM2A and CMTM2B is essential for ADAM3 localization and male fertility in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	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) 10.1242/jcs.221481	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 Abbasi Ferheen, Miyata Haruhiko, Shimada Keisuke, Morohoshi Akane, Nozawa Kaori, Matsumura Takafumi, Xu Zoulan, Pratiwi Putri, Ikawa Masahito	4. 巻 131
2. 論文標題 RSPH6A is required for sperm flagellum formation and male fertility in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	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) 10.1242/jcs.221648	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 Oura Seiya, Miyata Haruhiko, Noda Taichi, Shimada Keisuke, Matsumura Takafumi, Morohoshi Akane, Isotani Ayako, Ikawa Masahito	4. 巻 68
2. 論文標題 Chimeric analysis with newly established EGFP/DsRed2-tagged ES cells identify HYDIN as essential for spermiogenesis in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 25 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.18-0071	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 Nishimasu Hiroshi, Shi Xi, Ishiguro Soh, Gao Linyi, Hirano Seiichi, Okazaki Sae, Noda Taichi, Abudayyeh Omar O., Gootenberg Jonathan S., Mori Hideto, Oura Seiya, Holmes Benjamin, Tanaka Mamoru, Seki Motoaki, Hirano Hisato, Aburatani Hiroyuki, Ishitani Ryuichiro, Ikawa Masahito, Yachie Nozomu, Zhang Feng, Nureki Osamu	4. 巻 361
2. 論文標題 Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 1259 ~ 1262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aas9129	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 Nozawa Kaori, Satouh Yuhkoh, Fujimoto Takao, Oji Asami, Ikawa Masahito	4. 巻 8
2. 論文標題 Sperm-borne phospholipase C zeta-1 ensures monospermic fertilization in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-19497-6	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 Fujihara Yoshitaka, Oji Asami, Larasati Tamara, Kojima-Kita Kanako, Ikawa Masahito	4. 巻 18
2. 論文標題 Human Globozoospermia-Related Gene Spata16 Is Required for Sperm Formation Revealed by CRISPR/Cas9-Mediated Mouse Models	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 2208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18102208	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 Fujihara Yoshitaka, Miyata Haruhiko, Ikawa Masahito	4. 巻 67
2. 論文標題 Factors controlling sperm migration through the oviduct revealed by gene-modified mouse models	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 91 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.17-0153	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 MATSUMURA Takafumi, ENDO Tsutomu, ISOTANI Ayako, OGAWA Masaki, IKAWA Masahito	4. 巻 65
2. 論文標題 An azoospermic factor gene, Ddx3y and its paralog, Ddx3x are dispensable in germ cells for male fertility	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 121 ~ 128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2018-145	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 Satouh Yuhkoh, Ikawa Masahito	4. 巻 43
2. 論文標題 New Insights into the Molecular Events of Mammalian Fertilization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Trends in Biochemical Sciences	6. 最初と最後の頁 818 ~ 828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tibs.2018.08.006	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 Shimada Keisuke, Park Soojin, Miyata Haruhiko, Yu Zhifeng, Morohoshi Akane, Oura Seiya, Matzuk Martin M., Ikawa Masahito	4. 巻 118
2. 論文標題 ARMC12 regulates spatiotemporal mitochondrial dynamics during spermiogenesis and is required for male fertility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2018355118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2018355118	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 Akincilar Semih Can, Wu Lele, NG Qin Feng, Chua Joelle Yi Heng, Unal Bilal, Noda Taichi, Chor Wei Hong Jeff, Ikawa Masahito, Tergaonkar Vinay	4. 巻 gutjnl-2020
2. 論文標題 NAL: an evolutionarily conserved lncRNA essential for licensing coordinated activation of p38 and NF- κ B in colitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 322980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2020-322980	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 Miyata Haruhiko, Abbasi Ferheen, Visconti Pablo E, Ikawa Masahito	4. 巻 103
2. 論文標題 CRISPR/CAS9-mediated amino acid substitution reveals phosphorylation residues of RSPH6A are not essential for male fertility in mice†	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 912 ~ 914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioaa161	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 Devlin Darius J, Nozawa Kaori, Ikawa Masahito, Matzuk Martin M	4. 巻 103
2. 論文標題 Knockout of family with sequence similarity 170 member A (Fam170a) causes male subfertility, while Fam170b is dispensable in mice†	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 205 ~ 222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioaa082	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 MIYATA Haruhiko, MOROHOSHI Akane, IKAWA Masahito	4. 巻 69
2. 論文標題 Analysis of the sperm flagellar axoneme using gene-modified mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 374 ~ 381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.20-0064	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 Park Soojin, Shimada Keisuke, Fujihara Yoshitaka, Xu Zoulan, Shimada Kentaro, Larasati Tamara, Pratiwi Putri, Matzuk Ryan M, Devlin Darius J, Yu Zhifeng, Garcia Thomas X, Matzuk Martin M, Ikawa Masahito	4. 巻 103
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated genome-edited mice reveal 10 testis-enriched genes are dispensable for male fecundity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 195 ~ 204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioaa084	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 Sun Jiang, Lu Yonggang, Nozawa Kaori, Xu Zoulan, Morohoshi Akane, Castaneda Julio M, Noda Taichi, Miyata Haruhiko, Abbasi Ferheen, Shawki Hossam H, Takahashi Satoru, Devlin Darius J, Yu Zhifeng, Matzuk Ryan M, Garcia Thomas X, Matzuk Martin M, Ikawa Masahito	4. 巻 103
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-based genome editing in mice uncovers 13 testis- or epididymis-enriched genes individually dispensable for male reproduction†	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 183 ~ 194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioaa083	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 Xu Zoulan, Miyata Haruhiko, Kaneda Yuki, Castaneda Julio M, Lu Yonggang, Morohoshi Akane, Yu Zhifeng, Matzuk Martin M, Ikawa Masahito	4. 巻 103
2. 論文標題 CIB4 is essential for the haploid phase of spermatogenesis in mice†	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 235 ~ 243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioaa059	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 Larasati Tamara, Noda Taichi, Fujihara Yoshitaka, Shimada Keisuke, Tobita Tomohiro, Yu Zhifeng, Matzuk Martin M, Ikawa Masahito	4. 巻 103
2. 論文標題 Tmprss12 is required for sperm motility and uterotubal junction migration in mice†	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 254 ~ 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioaa060	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 Nozawa Kaori, Zhang Qian, Miyata Haruhiko, Devlin Darius J, Yu Zhifeng, Oura Seiya, Koyano Takayuki, Matsuyama Makoto, Ikawa Masahito, Matzuk Martin M	4. 巻 103
2. 論文標題 Knockout of serine-rich single-pass membrane protein 1 (Ssmem1) causes globozoospermia and sterility in male mice†	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 244 ~ 253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioaa040	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 Kiyozumi Daiji, Noda Taichi, Yamaguchi Ryo, Tobita Tomohiro, Matsumura Takafumi, Shimada Kentaro, Kodani Mayo, Kohda Takashi, Fujihara Yoshitaka, Ozawa Manabu, Yu Zhifeng, Miklossy Gabriella, Bohren Kurt M., Horie Masato, Okabe Masaru, Matzuk Martin M., Ikawa Masahito	4. 巻 368
2. 論文標題 NELL2-mediated lumicrine signaling through OVCH2 is required for male fertility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 1132 ~ 1135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aay5134	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 Yoshitaka, Lu Yonggang, Noda Taichi, Oji Asami, Larasati Tamara, Kojima-Kita Kanako, Yu Zhifeng, Matzuk Ryan M., Matzuk Martin M., Ikawa Masahito	4. 巻 117
2. 論文標題 Spermatozoa lacking Fertilization Influencing Membrane Protein (FIMP) fail to fuse with oocytes in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 9393 ~ 9400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1917060117	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 Kobayashi Kiyonori, Endo Tsutomu, Matsumura Takafumi, Lu Yonggang, Yu Zhifeng, Matzuk Martin M., Ikawa Masahito	4. 巻 103
2. 論文標題 Prss55 but not Prss51 is required for male fertility in mice†	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 223 ~ 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iaaa041	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 Taichi, Lu Yonggang, Fujihara Yoshitaka, Oura Seiya, Koyano Takayuki, Kobayashi Sumire, Matzuk Martin M., Ikawa Masahito	4. 巻 117
2. 論文標題 Sperm proteins SOF1, TMEM95, and SPACA6 are required for sperm-oocyte fusion in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 11493 ~ 11502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1922650117	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 Miyata Haruhiko, Shimada Keisuke, Morohoshi Akane, Oura Seiya, Matsumura Takafumi, Xu Zoulan, Oyama Yuki, Ikawa Masahito	4. 巻 34
2. 論文標題 Testis enriched kinesin KIF9 is important for progressive motility in mouse spermatozoa	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 5389 ~ 5400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201902755R	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 Oji Asami, Isotani Ayako, Fujihara Yoshitaka, Castaneda Julio M, Oura Seiya, Ikawa Masahito	4. 巻 102
2. 論文標題 Tesmin, Metallothionein-Like 5, is Required for Spermatogenesis in Mice†	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 975 ~ 983
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioaa002	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 Castaneda Julio M, Miyata Haruhiko, Archambeault Denise R, Satouh Yuhkoh, Yu Zhifeng, Ikawa Masahito, Matzuk Martin M	4. 巻 102
2. 論文標題 Mouse t-complex protein 11 is important for progressive motility in sperm†	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 852 ~ 862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioz226	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

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 19件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Masahito Ikawa
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 Mediated Genome Editing and Its Application for the Study of Fertilization
3. 学会等名 Gordon Research Conference (Germ Cell Programming in Vertebrate Biology, Medicine and Biotechnology) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊川正人
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 Mediated Genome Editing in Mice
3. 学会等名 The 15th Transgenic Technology Meeting (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊川正人
2. 発表標題 ゲノム編集による遺伝子改変マウス作製と生殖医学研究への応用
3. 学会等名 第30回日本医学会総会 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊川正人
2. 発表標題 ゲノム編集と生殖医学研究
3. 学会等名 第18回生殖バイオロジー-東京シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masahito Ikawa
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 mediated genome editing and its application for the study of reproduction
3. 学会等名 CEBST2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikawa M
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 Mediated Genome Editing in Mice and Its Application for the Study of Reproduction
3. 学会等名 Yanagimachi 90th Birthday Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikawa M
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 Mediated Genome Editing in Mice and Its Application for the Study of Reproduction
3. 学会等名 7th International Conference on the Epididymis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikawa M
2. 発表標題 New Insights into the Molecular Events of Mammalian Fertilization
3. 学会等名 Fifth International Oocyte Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊川 正人
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 mediated genome editing in mice and its application for the study of reproduction
3. 学会等名 第9回武田科学振興財団薬科学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊川 正人
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 mediated genome editing in mice and its application for the study of reproduction
3. 学会等名 Bridging Biomedical Worlds 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊川 正人
2. 発表標題 Fertilization and Oocyte Activation: New Insights Using Genome Editing
3. 学会等名 Fertilization & Activation of Development(Gordon Research Conference) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊川 正人
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 Mediated Genome Editing and its Application for the Study of Reproduction
3. 学会等名 JST戦略的国際共同研究プログラム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊川 正人
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 mediated genome editing and its application for the study of sperm functions
3. 学会等名 11th International Congress of Andrology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊川 正人
2. 発表標題 ゲノム編集を利用した遺伝子治療および最先端ゲノム編集技術とその安全性
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊川 正人
2. 発表標題 最新の方法と将来の展望 ゲノム編集技術と遺伝子改変動物の作成
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊川 正人
2. 発表標題 精子カルシニューリン（PPP3cc/PPP3r2）と精子受精能力
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊川 正人
2. 発表標題 ゲノム編集マウスが切り開く受精研究の最前線
3. 学会等名 第38回日本受精着床学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masahito Ikawa
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 Mediated Genome Editing and Its Application for the Study of Fertilization in Mice
3. 学会等名 The University of Kansas Medical Center seminar（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊川 正人
2. 発表標題 ゲノム編集と受精研究への応用
3. 学会等名 第17回熊本大学生命資源・研究センターシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ
<https://egr.biken.osaka-u.ac.jp/>

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		
米国	Baylor College of Medicine	University of Hawai	
韓国	Seoul National University		
シンガポール	Institute of Molecular and Cell Biology		