

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2021
課題番号：18K16735
研究課題名(和文) Discovery of genes essential for male fertility using CRISPR/Cas9-based genome editing technology
研究課題名(英文) Discovery of genes essential for male fertility using CRISPR/Cas9-based genome editing technology
研究代表者
Lu Yonggang (Lu, Yonggang)
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：00817033
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：代表者は精巣特異的遺伝子を欠く複数のノックアウトマウス系統を作製し、結果として生じる表現型を詳細に解析しました。この研究は、CRISPR/Cas9を介したノックアウト戦略を使用して男性の生殖に不可欠な遺伝子を特定することの実現可能性と効率性を示しています。大規模なin vivoスクリーニングを通じて、精子の運動性と精子と卵子の融合を調節する役割を果たす必須遺伝子Lrrc23、C2cd6、Sof1、Tmem95、およびFimpを発見しました。関連する研究成果は、国際的な査読付きジャーナルに掲載されています。

研究成果の学術的意義や社会的意義

My work provides explanations for idiopathic male infertility. The identified molecules may serve as biomarkers for male infertility and potential targets for non-hormonal male contraception.

研究成果の概要(英文)：During the four-year funding period, the applicant has generated multiple knockout mouse lines lacking testis-specific genes and analyzed the resultant phenotype. This study demonstrates the feasibility and efficiency of using the CRISPR/Cas9-mediated knockout strategy to identify genes essential for male reproduction. Through the large-scale in vivo screening, we have discovered essential genes Lrrc23, C2cd6, Sof1, Tmem95, and Fimp, which play roles in regulating sperm motility and sperm-egg fusion. The relevant research outcomes have been published in international peer-reviewed journals.

研究分野：Reproductive biology

キーワード：Male reproduction Sperm-egg fusion Fertilization

1 . 研究開始当初の背景

It has been estimated that one in six couples in this world suffer from infertility during their reproductive lifespan and 40 to 50% of all infertility cases are attributed to defects in the male germline. In Japan, however, male factor infertility attracts less concern from both the general public and qualified medical professionals compared with female infertility. According to a survey conducted in Japan recently (Yumura et al. 2017), over 80% of male infertility arises from impaired testicular function with the clinical presentation of abnormal sperm production. Thus, the discovery of genes indispensable for male reproduction is of immense importance for the sake of clinical purposes and has provoked a great deal of attention from researchers.

2 . 研究の目的

In this project, we aim to uncover and analyze essential genes that are indispensable for male infertility. The genes we initially focus on are predominantly expressed within the mouse male germline and highly conserved in humans. With the assistance of our optimized CRISPR/Cas9 genome editing method, knockout mice will be generated to determine if these testis-enriched genes are required for male fertility. The cellular, molecular and genetic mechanisms underlying male sterility-associated phenotype, which originates from the absence of indispensable genes, will be further investigated in detail. The research outcomes would have profound and novel implications for pathogenesis of paternally mediated infertility and rational development of non-hormonal contraceptives.

3 . 研究の方法

From the generation of gene knockout mice to the investigation of gene functions, each cycle of genetic research is subdivided into four stages. The experiments within different stages will be conducted consecutively or simultaneously. As a portion of candidate genes will be ruled out due to their functional redundancy in male reproduction (i.e., KO mice can still sire pups), the applicant will screen and analyze more candidate genes in additional cycles.

Stage 1: The pattern of tissue expression is verified using RT-PCR. Knockout mice are generated for testis-enriched genes by introducing crRNA/tracrRNA/Cas9 complex into zygotes. Alternatively, ES cells will be utilized to generate mutant mice if the gene null mutation has a phenotype association to lethality or complicated gene editing will be involved. Mutant chimeric mice will be generated by introducing the ribonucleoprotein complex into GFP-tagged ES cells. Sperm carrying the mutation are distinguished by green fluorescence and separated using fluorescence-activated cell sorting for further analysis.

Stage 2: The fertilization capacity of knockout mice will be initially examined by natural mating. Once male sterility is detected, the gene-null germ cells will be systematically investigated using assisted reproductive technologies [e.g., in vitro fertilization (IVF) and embryo transfer, and intracytoplasmic sperm injection (ICSI)] to identify the defects. IVF can be utilized to determine if sperm that are unable to penetrate zona pellucida can fuse with zona-free oocytes and ICSI can be employed to examine if completely immotile sperm can activate oocytes.

Stage 3: Depending on the genetic null defects identified during the previous stage, histological and morphological analyses in certain organs and cells will be conducted to reveal the underlying pathophysiological mechanism. In addition, a wide range of techniques in molecular and genetic biology will also be employed to acquire a more comprehensive understanding of gene function at the molecular level. For instance, proteomics approaches, such as western blot, immunoprecipitation and mass spectrometry, will be adopted to clarify the protein functions and interactions when necessary.

4 . 研究成果

During the four-year funding period, the applicant has generated multiple knockout mouse lines lacking testis-specific genes and analyzed the resultant phenotype. This study demonstrates the feasibility and efficiency of using the CRISPR/Cas9-mediated knockout strategy to identify genes essential for male reproduction. In addition to the biological relevance, the identified molecules may serve as biomarkers for male infertility and potential targets for non-hormonal male contraception. Through the large-scale in vivo screening, we have discovered essential genes *Lrrc23*, *C2cd6*, *Sof1*, *Tmem95*, and *Fimp*, which play roles in regulating sperm motility and sperm-egg fusion. The relevant research outcomes have been published in international peer-reviewed journals.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 11件／うちオープンアクセス 11件）

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 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 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/ioaa041	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 Qu Yongcun, Chen Qi, Guo Shanshan, Ma Chiyan, Lu Yonggang, Shi Junchao, Liu Shichao, Zhou Tong, Noda Taichi, Qian Jingjing, Zhang Liwen, Zhu Xili, Lei Xiaohua, Cao Yujing, Li Wei, Li Wei, Plachta Nicolas, Matzuk Martin M., Ikawa Masahito, Duan Enkui, Zhang Ying, Wang Hongmei	4. 巻 N/A
2. 論文標題 Cooperation-based sperm clusters mediate sperm oviduct entry and fertilization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protein & Cell	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13238-021-00825-y	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 Yonggang, Oura Seiya, Matsumura Takafumi, Oji Asami, Sakurai Nobuyuki, Fujihara Yoshitaka, Shimada Keisuke, Miyata Haruhiko, Tobita Tomohiro, Noda Taichi et al.	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 Taichi, Blaha Andreas, Fujihara Yoshitaka, Gert Krista R., Emori Chihiro, Deneke Victoria E., Oura Seiya, Panser Karin, Lu Yonggang, Berent Sara, Kodani Mayo, Cabrera-Quio Luis Enrique, Pauli Andrea, Ikawa Masahito	4. 巻 5
2. 論文標題 Sperm membrane proteins DCST1 and DCST2 are required for sperm-egg interaction in mice and fish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03289-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 該当する

1. 著者名 Hwang Jae Yeon, Wang Huafeng, Lu Yonggang, Ikawa Masahito, Chung Jean-Ju	4. 巻 38
2. 論文標題 C2cd6-encoded CatSper targets sperm calcium channel to Ca ²⁺ signaling domains in the flagellar membrane	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110226 ~ 110226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.110226	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 Matsumura Takafumi, Noda Taichi, Satouh Yuhkoh, Morohoshi Akane, Yuri Shunsuke, Ogawa Masaki, Lu Yonggang, Isotani Ayako, Ikawa Masahito	4. 巻 9
2. 論文標題 Sperm IZUM01 Is Required for Binding Preceding Fusion With Oolemma in Mice and Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.810118	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 Zhang Xin, Sun Jiang, Lu Yonggang, Zhang Jintao, Shimada Keisuke, Noda Taichi, Zhao Shuqin, Koyano Takayuki, Matsuyama Makoto, Zhou Shushu, Wu Jiayan, Ikawa Masahito, Liu Mingxi	4. 巻 134
2. 論文標題 LRRC23 is a conserved component of the radial spoke that is necessary for sperm motility and male fertility in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 1 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.259381	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------