

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和5（2023）年度 中間評価用〕

令和5年3月31日現在

研究期間	2021～2025
課題番号	21H05033
研究課題名	ゲノム編集による雄性不妊モデルマウスの開発と受精現象の包括的理解
研究代表者氏名（ローマ字）	伊川 正人（IKAWA Masahito）
所属研究機関・部局・職	大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号	20304066

研究の概要：

本研究は、①CRISPR/Cas9 ゲノム編集に、ウイルスベクター、ES 細胞キメラ解析、生殖工学などを組み合わせてゲノム編集マウス作製・解析プラットフォームを完成させ、②精巣特異的に発現する遺伝子を網羅的にノックアウトし、表現型解析から哺乳類の精子・受精のバイオロジーを究める研究である。さらに雄性不妊モデルマウスの開発・応用を通して社会還元を目指す。

研究分野：実験動物学、生殖生物学

キーワード：ゲノム編集、精子形成、精子機能、受精

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳類の命は、精子と卵を介した受精により連綿と受け継がれる。これまで、培養して増やすことができない精子の形成・機能の解析には、主に生化学的なアプローチが取られてきた。しかし近年の遺伝子破壊（ノックアウト：KO）マウスを用いた解析から、それまで受精に必須と考えられてきた因子（Acrosin, GalTase, Fertilin など）が必須でないことが示されたり、Calmegin や ACE のように無関係とされていた因子が表舞台に現れたりした例が少なくない。また、WHO の統計ではカップルの6組に1組が不妊とされ、その半数が男性に起因し、さらにその7割以上で精子形成不全がみられる。精子形成や精子機能を理解して不妊症との関連を調べることは社会ニーズの高い喫緊の課題でもある。

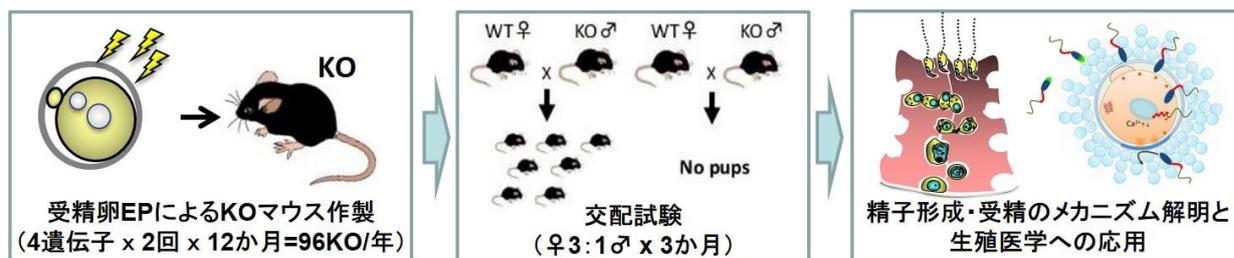
2. 研究の目的

本研究では、精巣特異的に発現する遺伝子を網羅的に KO して表現型を解析し、精子形成・受精の研究を究め、雄性不妊モデルマウスの開発・応用を通して社会に還元することを主目的とした（図1）。

3. 研究の方法

公開されている RNAseq データベースを再解析し、解析対象とする精巣特異的に発現する遺伝子を絞り込む。次に、各標的遺伝子について、guide RNA (gRNA) を複数設計し、CAS9 タンパク質と一緒に受精卵に導入することで、タンパク質コード領域を大きく抜き取った KO マウスを作製する（図1左）。得られた KO 雄マウスの妊孕性を交配試験により判定する（図1中）。我々の経験から、約3割の遺伝子が妊孕性に必須となることが期待される。不妊雄マウスについては、精巣における精子形成、精巣上体における精子成熟、成熟精子の受精能などについて、組織解剖学的解析および細胞生物学的解析から表現型を明らかにして不妊となる原因を特定する（図1右）。特に、見かけは正常な精子であるにも関わらず受精できない場合には、電子顕微鏡観察、CASA (Computer Assisted Sperm Analysis)、体外受精や顕微授精、胚移植などを駆使して、ステップごとに受精不全の原因を究明する。加えて、特異的抗体の作製もしくはペプチド標識により、標的遺伝子産物の組織内・細胞内での局在や相互作用因子を同定し、分子レベルで生理機能を明らかにすることを目指す。さらに、マウス内在性遺伝子をヒト型（野生型および疾患型）に置換して、男性不妊症の治療法開発や薬効評価モデルとして研究を展開する。

なお、遺伝子改変マウス作製技術は日進月歩で進んでいることから、CRISPR/Cas9 ゲノム編集に、ウイルスベクター、ES 細胞キメラ解析、生殖工学などを組み合わせることで、常にゲノム編集マウス作製・解析技術の最新化、効率化を行うこととした。



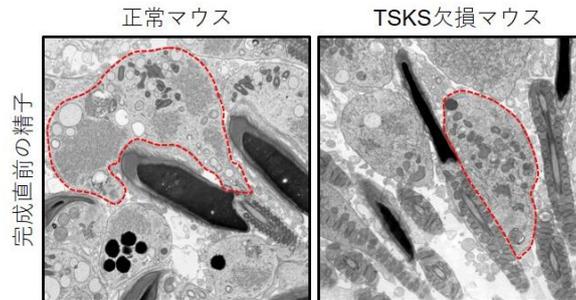
【図1】ゲノム編集技術を駆使して精巣特異的発現遺伝子の KO マウスを作製・解析し、精子形成・機能のバイオロジーを究め、不妊モデルとして活用することで、社会還元を目指す。

4. これまでの成果

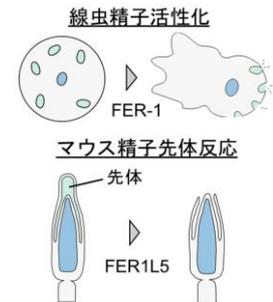
公開 RNAseq データベースの再解析により、精巣での発現量が TPM10 以上、他組織の 10 倍以上を指標に 1262 遺伝子を精巣特異的発現遺伝子とした (表 1)。既に KO マウスの報告がある遺伝子等を除き、解析対象を 469 遺伝子に絞り研究を開始した。これまでに 170 遺伝子について KO マウス作製に着手、118 遺伝子について KO 雄マウスの交配試験を終えている。主な研究成果として、TSKS による精子細胞内の液-液相分離と不要タンパク質の除去メカニズム解明 (図 2、論文 1)、I15 による受精融合因子の品質管理メカニズム解明 (論文 2)、Ca 依存性に先体反応を制御する FER1L5 の発見 (図 3、論文 3)、受精融合における IZUMO1 の結合因子としての役割の発見 (論文 5)、が挙げられる。いずれも KO マウスにより初めて重要性が明らかにされた因子であり、精子・受精研究者に大きなインパクトを与えた。また、TMEM95 がヒトでも受精融合に関わっていることを証明するなど (論文 4)、KO マウスを使わない研究も展開した。

進捗状況	遺伝子数
精巣特異的	1262
解析対象	469
KO作製開始	170
交配試験済	118
不妊	39
妊孕性低下	13

【表 1】プロジェクト進捗状況



【図 2】TSKS による液-液相分離と不要タンパク質除去



【図 3】FER1L5 による先体反応

5. 今後の計画

CRISPR/Cas9 ゲノム編集による KO マウス作製は順調に進んでおり、そのまま継続する。なお、国内外で情報共有することで無駄な重複作製を減らし、効率的に研究資本を注入する。興味深い表現型を示した KO マウスについては、前述のとおり、組織学・細胞生物学・分子生物学的アプローチから解析を進め、当該遺伝子と精子形成・機能の分子カスケードを明らかにする。また、類似表現型を示す KO マウスが増えてくることが予想されることから、KO マウスから得られる画像、動画、RNAseq, Proteome データなどを集積して再解析することで、遺伝子間機能連携などの解明に役立つ。

KO マウスの作製と解析には、最新ゲノム編集ツールの活用が必要不可欠となる。CRISPR/Cas9 が登場して 10 年、Cas9 を凌駕するゲノム編集ツールはない。本課題では、ゲノム編集ツールを効率よく受精卵、ES 細胞、生殖系列細胞に導入するために、顕微注入やウイルスベクターなどの従来法に加え、新規モダリティの開発にも取り組む。なお、その他の最新解析技術を取り入れることを怠らない

本研究は、10 名以上の博士研究員と同数程度の大学院生を配置する大型研究課題である。優れた成果を挙げるとともに、国際共同研究を活発化させて人材交流・頭脳循環を計り、次世代の生殖研究者を育成する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

責任著者として発表した本研究関連論文 25 報から主な 5 編を記載。すべて査読有

1. TSKS localizes to nuage in spermatids and regulates cytoplasmic elimination during spermiation. Shimada K, Park S, Oura S, Noda T, Morohoshi A, Matzuk MM, Ikawa M. *PNAS* 14;120:e2221762120 (2023)
2. 1700029I15Rik orchestrates the biosynthesis of acrosomal membrane proteins required for sperm-egg interaction. Lu Y, Shimada K, Tang S, Zhang J, Ogawa Y, Noda T, Shibuya H, Ikawa M. *PNAS* 21;120:e2207263120 (2023).
3. Testis-enriched ferlin, FER1L5, is required for Ca²⁺-activated acrosome reaction and male fertility. Morohoshi A, Miyata H, Tokuhiko K, Iida-Norita R, Noda T, Fujihara Y, Ikawa M. *Sci Adv* 25;9:eade7607 (2023)
4. Human sperm TMEM95 binds eggs and facilitates membrane fusion. Tang S, Lu Y, Skinner WM, Sanyal M, Lishko PV, Ikawa M, Kim PS. *PNAS* 119:e2207805119 (2022)
5. Sperm IZUMO1 Is Required for Binding Preceding Fusion With Oolemma in Mice and Rats. Matsumura T, Noda T, Satouh Y, Morohoshi A, Yuri S, Ogawa M, Lu Y, Isotani A, Ikawa M. *Front Cell Dev Biol.* 12;9:810118 (2022)

受賞：科学技術分野の文部科学大臣表彰 科学技術賞(研究部門)：伊川正人 (令和 5 年 4 月 19 日受賞予定)

7. ホームページ等

研究室 HP: <https://egr.biken.osaka-u.ac.jp>