

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19175

研究課題名（和文）精子の質的不均一性発生機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of generation of sperm heterogeneity

研究代表者

原 健士朗（Hara, Kenshiro）

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60551546

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：動物の精子の品質低下が報告されており、家畜生産性を低下させる問題となることがあるが、有効な対策は存在せず、精子の品質を構築するメカニズムの解明が求められている。本研究ではマウスをモデルとして雄体内における精子の品質に影響する要因を解析するための基盤技術開発を進めた。予定していた遺伝子組み換えマウスの作製に時間を要したため研究は一部遅れたが、精子に蛍光標識を入れその後のオス体内長期追跡を可能にする系の開発を進めることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、ほ乳動物のオス体内における精子の追跡を可能にするものであり、精子の品質制御の理解に資する解析技術の基礎となるものである。この技術シーズの利活用を通じて、将来的に、ほ乳動物の精子の品質を決める新しい分子メカニズムの理解が期待される。その知見を家畜の人工授精の効率化、野生動物の繁殖制御、さらには男性不妊症の研究に応用することで、農学的・医学的に有用な生殖技術へと発展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The decline in the quality of animal sperm has been reported as a problem that can reduce livestock productivity. However, effective methods to address this issue do not currently exist, and there is a need to understand the mechanisms that govern sperm quality. In this study, we have made progress in developing foundational techniques to analyze factors that influence the quality of sperm in the male body, using mice as a model. While there were some experiments that did not proceed as planned, there were also certain advancements, such as the development of a system that incorporates fluorescent labeling into the sperm, enabling long-term tracing.

研究分野：繁殖生物学

キーワード：精子

1. 研究開始当初の背景

ほ乳動物のオスにおいて、精液中に含まれる精子集団の受精能や発生能は、妊孕性を決定する重要なファクターである。精液中には、形態的な不均一性など、品質の異なる精子が混在することが知られているが、その後生的な発生メカニズムは殆ど明らかになっていない。重要なことに、この数十年間で、ヒトや家畜の精子の品質低下に関する報告がなされ、生殖補助医療や食糧問題に関連する課題となっているが、確たる要因は明らかになっておらず、また、再現性のある効果的な対処法は確立されていない。このような農学および医学的な要請に応えるためには、ほ乳類のオスの体内において精子の品質が決まる要因に関する基礎的な学術知見の蓄積が必須である。

本研究では精子の成熟を司る精巣上体に着目する。精巣上体は長い上皮管から構成され、同環境において、精巣で作られた未成熟な精子は受動的に輸送され、この輸送の過程において、個々の精子が精巣上体内に滞在する時間にはばらつきが生じることが予想される。このことから、雄体内における精子の滞在時間の長短が精子の品質に違いを生む可能性が考えられ、この関係を調べることで精子品質構築機構の一端を明らかにできると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、精子の雄体内滞在時間と受精能との関係を解析するためのツールを開発し、精子の品質構築メカニズムを探索することである。

3. 研究の方法

精子の精巣上体内での滞在時間と受精能との関係を明らかにするためのレポーターマウスを作製する。同マウスは、CreER/LoxP システムを用いて任意のタイミングで精子の前駆細胞の細胞膜に蛍光標識を入れることが可能な仕掛けを計画した。CreER マウスについては、CreER 発現のプロモーターに用いる遺伝子は、精子形成過程で一過的に発現すること、その際の発現期間がなるべく短いこと、生殖系列での発現特異性が高いこと、ヘテロにしても精子形成に異常が生じないことが報告されていること、を指標としたスクリーニングで選定し、その発現を免疫組織化学染色で確認した後、同遺伝子のプロモーターの下流に CreER を導入したベクターを作製し、胚性幹 (ES) 細胞内での相同組換えを行う。得られた組換え ES 細胞を正常型の胚盤胞にインジェクションし、レシピエントメスマウスに移植することで、キメラを作成する。その後、同キメラオスマウスを正常型メスマウスと交配することにより、目的の遺伝子改変マウスを得る。Cre による組換えによって特異的に精子の前駆細胞を蛍光標識できるレポーターマウスについては、生殖細胞の細胞膜に蛍光タンパク質を取り込める既報のレポーターマウスを第一候補として考え、同マウスを導入し、上述の CreER マウスおよびレポーターマウスを掛け合わせることで、精子滞在時間測定への使用可能性を検証する。以上のマウス系統を樹立後、同 2 重遺伝子改変マウスを用いて精子が雄体内に滞在する時間の分布を測定する。さらに、長く滞在する精子と短く滞在する精子間の受精能の違いを、体外受精や自然交配によって解析する。

4. 研究成果

CreER 遺伝子改変マウス作成については、前述の条件に該当する遺伝子 A を選択し、その発現を免疫組織化学染色で確認した後、同遺伝子のプロモーターの下流に CreER を導入したベクターを作製し、ES 細胞内での相同組換えを行った。得られた組換え ES 細胞を正常型の胚盤胞にインジェクションし、毛への高い寄与が確認されたキメラを 2 系統作成し、F1 を得るための交配試験を実施したが、生殖系列への寄与度が小さく、F1 個体を得ることが出来なかった。このため代替法として、同様の条件を満たす別の遺伝子 B に着目し、当該遺伝子の下流に 2A ペプチドと CreER を連結したコンストラクトを作成し、同様の方法で遺伝子組換え ES 細胞の作成とそれを胚盤胞へと移植することでキメラ作成を行った。現在までに被毛への高い寄与が確認されたキメラを 8 系統作成しており、研究終了時の段階ではまだ交配を進めているところである。Cre による組換えによって特異的に精子の前駆細胞を蛍光標識できるレポーターマウスについては、生殖細胞の細胞膜に蛍光タンパク質を取り込める既報のレポーターマウスの導入を完了し、精巣上体における精子膜上での蛍光の安定性について検討を行った結果、約 2 週間経っても蛍光を維持しており、本研究目的に使用可能であることを見出した。今後、以上の 2 系統を使って、当初目的としていた精子の滞在時間と品質との関係性を検証していきたい。なお、同マウス作成後の解析に必要な検討として、マウス精子イメージング技術の改良および内分泌かく乱による精巣上体での精子移動への摂動について検討した。また、ウシへの応用を見据え、老齢ウシ精巣上体において精子が減少することを見出し、さらに、未成熟精子輸送に関わる精細管の筋様細胞

の体外培養下での性質変化についての解析を推進した (Kawahara et al., 2021; Kawabe et al., 2022)。以上のように、遺伝子改変マウスの作製に関して、当初の目標の一部のみを達成するにとどまったが、研究材料やウシへの応用に向け一定の前進があったと判断している。本研究で得られた成果の利活用を通じ、野生動物や産業動物のオス繁殖能制御に資する技術への発展が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawahara Terumichi, Kanouchi Miki, Naniwa Yousuke, Koyago Masanori, Numabe Takashi, Mizutani Keishi, Tanemura Kentaro, Hara Kenshiro	4. 巻 92
2. 論文標題 Persistence of undifferentiated spermatogonia in aged Japanese Black cattle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13572
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13572	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 Kawabe Yusuke, Numabe Takashi, Tanemura Kentaro, Hara Kenshiro	4. 巻 609
2. 論文標題 Characteristics of alpha smooth muscle actin-positive peritubular cells in prepubertal bovine testes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 48～53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.03.149	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 -

〔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
研究分担者	盧 尚建 (roh sanggun) (90322130)	東北大学・農学研究科・教授 (11301)	

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