

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20972

研究課題名（和文）精子in vivoスクリーニングによる精子の尾部形成機構解明と男性避妊薬開発への挑戦

研究課題名（英文）Establishment of In Vivo Genome-Wide Screening Toward Spermatogenesis

研究代表者

野口 勇貴（NOGUCHI, YUKI）

京都大学・高等研究院・研究員

研究者番号：30965562

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：個体を構成する各臓器は、個々の細胞で起こる様々な生化学反応が連動することで機能を発揮しています。生化学反応の各過程を制御するタンパク質は、遺伝子に情報がおさめられており、それぞれの細胞で発現する遺伝子を同定することで生化学反応が理解されてきました。これまでは、細胞株を用いて特定の生化学現象に注目した網羅的な遺伝子の解析（CRISPR-Cas9/sgRNAライブラリースクリーニング）が行われてきましたが、個体の臓器レベルでのスクリーニングを行うことは困難でした。本研究は、個体臓器、特にマウスの精巣を用いた遺伝子スクリーニング系を開発し、精子の品質を決定する遺伝子を同定することに成功しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、世界的な人口爆発を解決すべく、女性のみならず男性も使用可能な避妊薬（男性避妊薬）の開発が希求されており、Bill & Melinda Gates Foundationに代表される財団が大規模なグラントを提供している。本研究で樹立した、精巣を標的とするin vivoスクリーニング法は、このような男性避妊薬や不妊症治療薬などの創薬ターゲットを網羅的に同定することができる可能性があり、基礎医学的にも社会的にも波及効果が期待される。また、精巣のみならず、その他の臓器に対しても同様のスクリーニングを適用することで、さまざまな基礎的な分子メカニズム、病態理解、そして創薬開発に繋がることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The CRISPR/Cas9 sgRNA library screening has been a powerful method for exploring molecular mechanisms in biology, particularly useful for studying cancer cell proliferation and aiding drug development. Challenges arise when the screening targets biochemical reactions unrelated to cell growth, requiring stable experimental setups to reduce false positive hits. Implementing these methods in live animals, especially mice, has been difficult. To establish the in vivo genome-wide screening system, this study applied a repeated library reconstruction technique, called revival screening, to mouse testes. By utilizing this novel in vivo screening system to analyze biochemical reactions in mature sperm, we successfully identified crucial factors affecting sperm quality during spermatogenesis.

研究分野：ゲノミクス、発生生物学

キーワード：in vivo スクリーニング CRISPR-Cas9 sgRNAライブラリースクリーニング 精子形成

## 1. 研究開始当初の背景

CRISPR/Cas9 sgRNA ライブラリーを用いたゲノムワイドスクリーニング法は分子生物学的メカニズムを解明する上で強力な方法として広く使用されてきた。特に、細胞の増殖性をスクリーニングの標的にすることで、がん細胞の増殖メカニズムなどが明らかにされ、創薬開発などが促進されてきた。一方で、細胞の増殖とは直接関連のない細胞内の生化学メカニズムをスクリーニングの標的とする場合には、多くが一過的で不安定である生化学反応を細胞内で安定的に誘導し、偽陽性の sgRNA を可能な限り抑えながら補足可能な実験系を構築する必要があった。このような状況に対して基礎的なアプローチの樹立を目指し、申請者の所属する京都大学 iCeMS 鈴木淳研究室では「リバイバルスクリーニング法」を樹立し、いかなる不安定な生化学反応においても正しく反応を誘導・補足しスクリーニングを実施することを可能にした。しかしながら、マウス個体の臓器内でこのようなゲノムワイドスクリーニング法(in vivo スクリーニング法)を実施することは未だに困難なままであった。近年、脳や心筋、そして肝臓などを標的にした in vivo スクリーニング法が提案されてきたが、これらは細胞の増殖性に依存したスクリーニングに留まり、生化学反応を直接標的とする in vivo スクリーニング法は実現できていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、生化学反応を直接標的とする in vivo スクリーニング法の樹立を目指し、リバイバルスクリーニング法をマウスの精巣に応用し、成熟した精子の生化学反応を指標として、精子形成における精子の品質決定因子を網羅的に同定することを試みた。

## 3. 研究の方法

上述したリバイバルスクリーニング法をマウスの精巣に応用する上で、本研究では、①：センダイウイルスのエンベロープタンパク質を有するレンチウイルスベクターを用いることで、高い効率で sgRNA ライブラリーを精子幹細胞へ導入可能にする方法論、②：成熟した精子の生化学反応(精子のカルシウム流入)を適切に誘導し補足できる方法論、③：プライマーゼを用いた全ゲノム増幅法を用いることで数が少ない精子からでもゲノム DNA を回収し、ロスなく sgRNA 領域を読み出すことで遺伝子を同定できる方法論を1つずつ樹立した。また、同定した遺伝子群の機能を、組織を構成する細胞種単位で推定可能にするツール「Hub-Explorer」を開発し、Wet 解析(in vivo スクリーニング)で得られた結果を Dry 解析(Hub-Explorer)によって解釈し、より深くかつ網羅的な洞察を得ることができるパイプラインを構築した。

## 4. 研究成果

図1に示すように、申請者は精子のカルシウム流入レベルを精子の完成度のインジケータとして捉え、1:センダイウイルスをエンベロープに有するレンチウイルスを用いた sgRNA ライブラリーの導入、2:カルシウム流入の誘導・ソーティング、3:プライマーゼを応用した全ゲノム増幅法を用

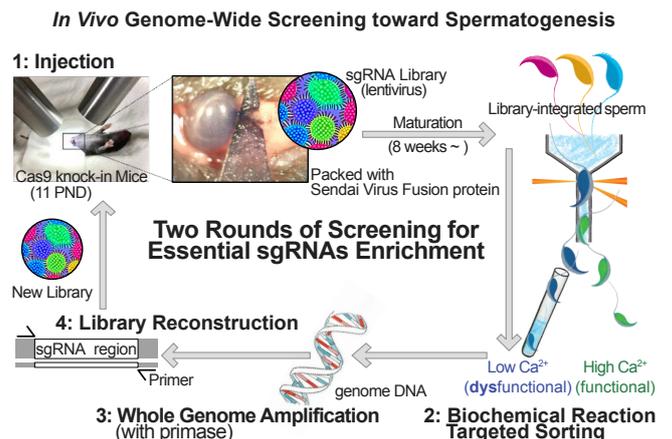


図1: in vivo スクリーニング法

いた精子ゲノム DNA の回収、4 : PCR による sgRNA 領域の増幅とライブラリーの再構成から構成される「精巢を標的とした in vivo スクリーニング法」を樹立し、これらのステップを合計 2 度繰り返すことで、重要な sgRNA の濃縮を目指した。結果、1 度目のスクリーニングでは 42 種類の遺伝子の同定に成功し、2 度目のスクリー

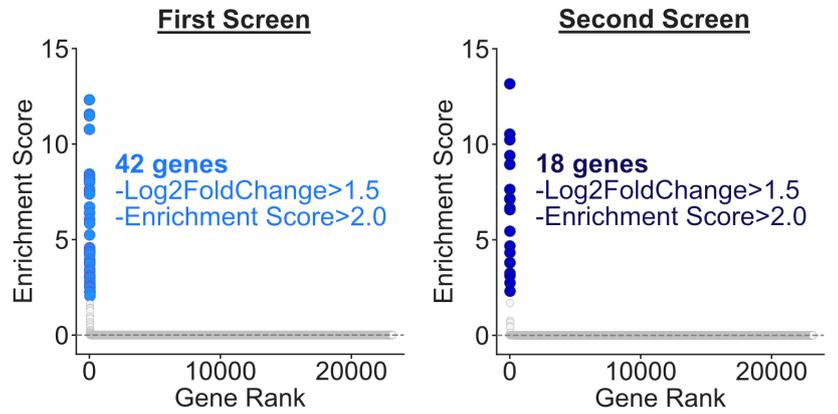


図 2 : in vivo スクリーニングによる遺伝子の濃縮

ニングではこれらの遺伝子が 18 種類に濃縮された(図 2)。最終的にこれら 18 個の遺伝子の中で 1 度目よりも 2 度目のスクリーニングでカウント数が多くなったものに着目した結果、9 つの遺伝子が候補遺伝子として同定された(図 3)。

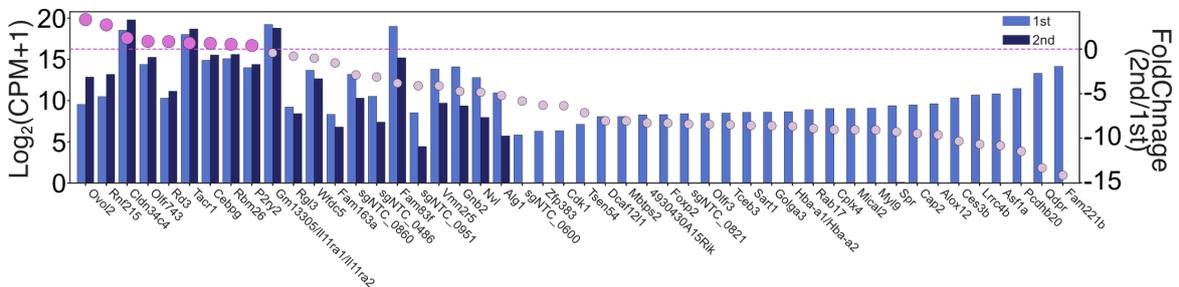


図 3 : in vivo スクリーニングで同定された遺伝子のプロファイル

最終的に、精巢の重さ、精子数、そして精子のカルシウム流入レベルを指標にこれらの遺伝子の機能的なバリデーションを実施した結果、精子の品質決定に関与する因子として RD3(Retinal Degeneration 3) 遺伝子の同定に成功した(図 4)。

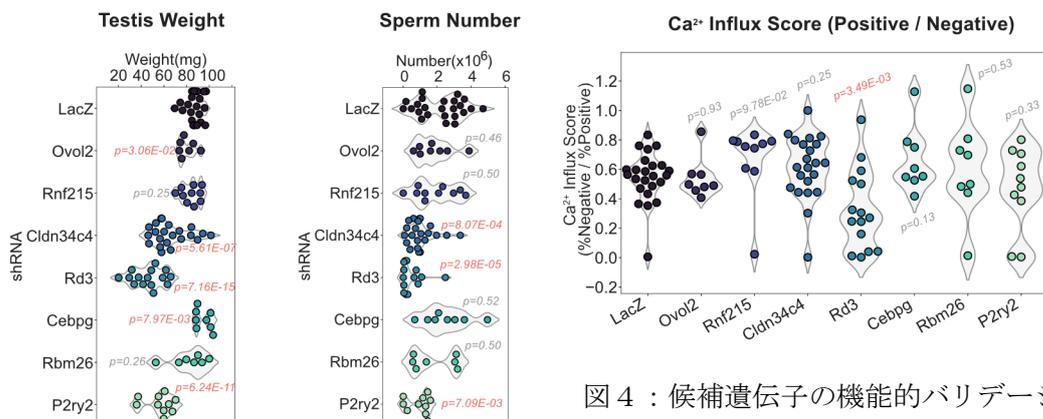


図 4 : 候補遺伝子の機能的バリデーション

以上の結果を受け、精巢における RD3 の機能解析を目指し、申請者ははじめに公共データベースの再解析によって、RD3 の発現パターンを調べた。結果として、RD3 は網膜および、精巢で高発現しており、また、細胞種においては精巢では円形精子と呼ばれる細胞種で RD3 の発現量が高くなることが明らかとなった(図 5 : 次ページ)。

精巣細胞における RD3 の発現プロファイルの結果より、円形精子における RD3 の機能解明へ焦点を当てて研究を推進することとした。この目的のために、申請者は、Spot タグで標識した RD3 を発現させた Y-79 細胞を用いてプロテオミクス解析を実施したところ、RD3 はミトコンドリアと相互関連していることが明らかとなった。

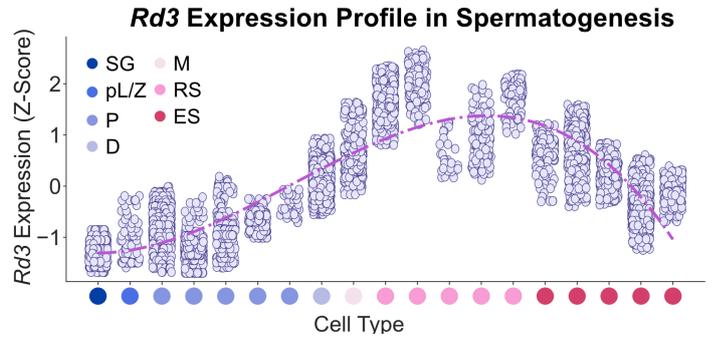


図 5 : RD3 発現精巣細胞種のプロファイル

加えて、円形細胞におけるどのようなシグナルがこれらの関連を制御しているのかを明らかにするために、プロテオミクスの結果と上述した、細胞種特異的な分子シグナル経路推定ツール「Hub-Explorer」を用いて、円形精子特異的なシグナル経路の推定を実施した(図 6)。結果として、RD3 は繊毛形成シグナル下でミトコンドリアと相互関連していることが示唆された。これら「Wet での in vivo スクリーニング結果を Dry での Hub-Explorer で解釈する」方法論を精巣に適用することで、円形精子特異的な RD3 の新しい役割を明らかにすることができた。

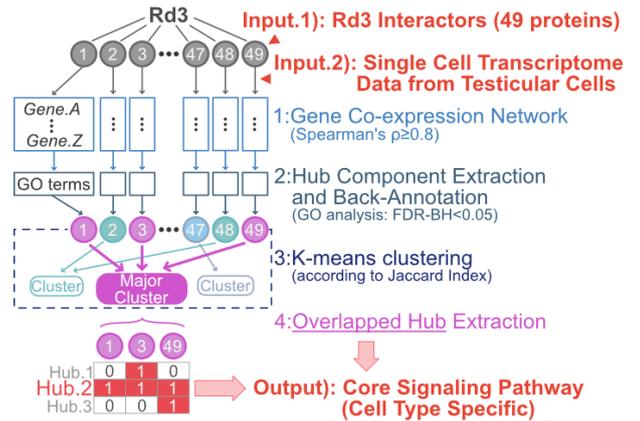


図 6 : Hub-Explorer

しかし、「RD3 とミトコンドリア関連および、繊毛形成能における直接的な関係性」は未だ不明であったので、これらの関係性を実験的に検討することとした。細胞株を用いた解析を進めた結果、RD3 は細胞内でミトコンドリアの分散を促進することで繊毛形成誘導時に蓄積する活性酸素(Reactive oxygen species: ROS)由来の酸化ストレスを軽減することが明らかとなった(図 7)。

### Speculated Model of ROS Mitigation during Ciliogenesis via Rd3-Mediated Mitochondria Dispersion

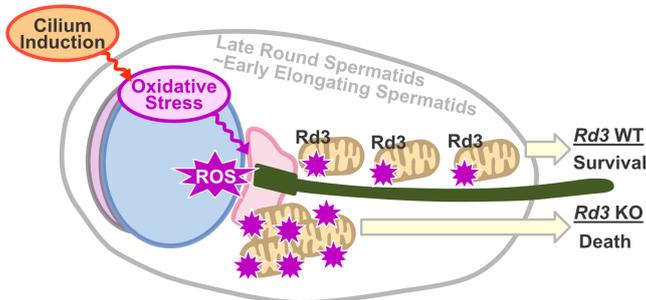


図 7 : 円形精子における RD3 とミトコンドリアの相互関連

以上、本成果は、精子形成を制御する分子メカニズムの網羅的な解明を可能にする方法論と、計算機を用いた細胞種特異的な分子シグナル経路の機能推定法を提案するものであり、これまでノックアウトマウスなどを用いて遺伝子の機能を 1 つずつ明らかにするような従来の雄生殖細胞の研究手法に網羅的アプローチという新たな切り口を与え、将来の更なる重要な発見を後押しする意義があると考えられる。また本研究成果は、Noguchi Y, Onodera Y, Miyamoto T, Maruoka M, Kosako H, Suzuki J. “In vivo CRISPR screening directly targeting testicular

cells” *Cell Genomics (Cell Press)*. 2024;4(3):100510にて発表済みである。

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 1件）

1. 著者名 Noguchi Yuki, Onodera Yasuhito, Miyamoto Tatsuo, Maruoka Masahiro, Kosako Hidetaka, Suzuki Jun	4. 巻 4
2. 論文標題 In vivo CRISPR screening directly targeting testicular cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Genomics	6. 最初と最後の頁 100510 ~ 100510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xgen.2024.100510	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 Yuki Noguchi, Risa Matsui, Jaeyeon Suh, Yu Dou, Jun Suzuki	4. 巻 25
2. 論文標題 Genome-Wide Screening Approaches for Biochemical Reactions Independent of Cell Growth	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Annual Review of Genomics and Human Genetics	6. 最初と最後の頁 17.1~17.26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Noguchi Yuki
2. 発表標題 Sperm in vivo genome-wide screening identified SRCF as an essential regulator of spermatogenesis
3. 学会等名 The International Symposium "Totipotency and Germ Cell Development" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Noguchi Yuki
2. 発表標題 How to establish the in vivo genome-wide functional screening targeting spermatogenesis?
3. 学会等名 Minisymposium-Kyoto University & Academia Sinica (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------