

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830056

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9を用いた精子無力症モデルマウスの作製と解析

研究課題名(英文) Generation and analysis of asthenozoospermia mouse models using CRISPR/Cas9 system

研究代表者

宮田 治彦 (MIYATA, HARUHIKO)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：50604732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：不妊症の約半分は男性に起因し、その原因の約20%は精子運動能の低下(精子無力症)であると言われている。本研究では、精子無力症の原因遺伝子の同定を目指し、CRISPR/Cas9システムを用いて、精子運動能に関わると示唆されている遺伝子のノックアウト(KO)マウスを作製した。その結果、精子の運動能低下や鞭毛形成不全のために生殖能力が低下するKOマウスを8ライン作製することができた。これら遺伝子のうち、Ppp3r2とCabyrについて詳細な解析を行った。他のKOマウスについても引き続き解析を行っていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Of all infertility cases, half are due to male infertility and approximately 20% of male infertility is thought to be due to impaired sperm motility (asthenozoospermia). In this study, we knocked out genes that are implicated in sperm motility using the CRISPR/Cas9 system to find genes that cause asthenozoospermia. As a result, we generated 8 lines that exhibit male subfertility or sterility because of impaired sperm motility or abnormal sperm tail formation. Among these genes, we analyzed the functions of Ppp3r2 and Cabyr extensively. Analyses of other genes will be conducted subsequently.

研究分野：生殖生理

キーワード：ゲノム編集 受精 精子 鞭毛

### 1. 研究開始当初の背景

日本を含む先進諸国では約 10 組に 1 組のカップルが不妊に悩んでいるとされ、少子高齢化が進む中、不妊症は重大な社会問題となっている。不妊症の約半分は男性に起因し、その原因の約 20% は精子運動能の低下(精子無力症)であると言われている (Curi et al., Arch. Androl. 2003)。精子無力症は精子運動能の制御機構が破綻するために起こると考えられるが、発症機構はほとんど分かっていない。

申請者は、精子無力症の原因遺伝子を同定するために、胚性幹 (ES) 細胞を用いる従来方法でノックアウト (KO) マウスを作製してきたが、ターゲティングベクターの構築や 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・費用がかかるという問題点があった。また KO マウスを網羅的に作製する国際プロジェクト (KOMP; Knock-Out Mouse Project) が進行中であるが、ほとんどは遺伝子破壊された ES 細胞の状態凍結保存されているため、キメラマウスを介して個体復元をしなければならぬ。培養の間に ES 細胞が全能性を失うこともあり、その場合には初めから作製し直す必要があった。

しかし最近、この ES 細胞を用いた従来方法とは異なる CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子改変技術が報告された (Cong et al., Science 2013, Mali et al., Science 2013)。これは Cas9 ヌクレアーゼによって DNA 二本鎖が切断され、切断部分が修復される時に起こるエラーを利用するものである。CRISPR/Cas9 システムを用いると、約 2 か月で KO マウスを作製することができる (Wang et al., Cell 2013, Mashiko et al., Sci. Rep. 2013)。これは KO マウス作製までに約 1 年かかる従来法よりも明らかに早く、さらに労力と費用もかからないため、今まで以上に網羅的な KO マウスの作製が可能になった。

### 2. 研究の目的

本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いて候補遺伝子の網羅的な KO マウスの作製と解析を行い、精子無力症の原因遺伝子の同定を目指す。鞭毛に局在しているタンパク質は様々な生物で既に報告されており、これらのうちヒトでも保存されている遺伝子を候補とする。

### 3. 研究の方法

Cas9 と sgRNA を発現するプラスミド (pX330) を受精卵の前核に打ち込むことによって、KO マウスを作製した。得られた KO 雄マウスを野生型の雌マウスと交配し、生殖能力を調べた。不妊の KO マウスが得られた時は、精子の形態や運動能など詳細な解析を行った。

### 4. 研究成果

精子の運動能低下や鞭毛形成不全のために生殖能力が低下する KO マウスを 8 ライン作製することができた。このうち下記の 2 ラインについて詳細な解析を行った。

#### (1) *Ppp3r2*

PPP3R2 (protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha isoform) は精子に存在するカルシニューリン (カルシウム依存性の脱リン酸化酵素) の調節サブユニットである。触媒サブユニットである PPP3CC (protein phosphatase 3, catalytic subunit, gamma isoform) を KO すると、精子運動能が低下し、雄マウスが不妊になることを既に明らかにしていた。そのため、PPP3R2 も精子運動能の制御に関わると予想し、KO マウスを作製した。*Ppp3cc*・KO マウスと同じように、*Ppp3r2*・KO マウスは精子の運動能が低下し (精子中片部が屈曲できず)、雄性不妊となった。精子を用いて免疫プロット法を行うと、*Ppp3r2*・KO 精子では PPP3R2 に加えて PPP3CC も検出されなかった (図 1)。よって、PPP3R2 と PPP3CC が結合して互いに安定化していることが明らかになった。

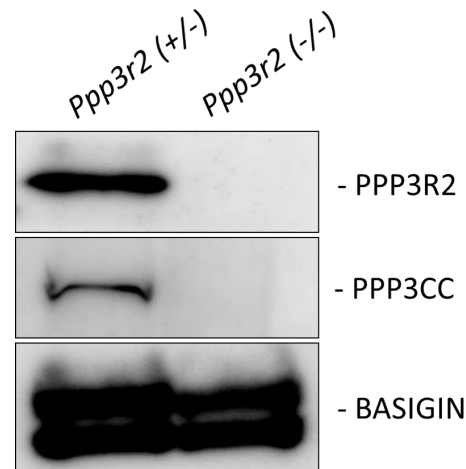


図 1. *Ppp3r2*・KO 精子では、PPP3R2 に加えて PPP3CC も欠失していた。

カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリン A (CsA) と FK506 は免疫抑制剤として汎用されている。これら薬剤を 2 週間、野生型の雄マウスに投与すると、*Ppp3r2*・KO マウスと同じように精子中片部が屈曲せず、雄マウスは不妊になった (図 2)。投与を中止すると 1 週間で生殖能力が回復したことから (図 2)、PPP3CC/PPP3R2 を特異的に阻害できれば、短期間で効果があり可逆的な男性避妊薬の開発に繋がる可能性がある (Miyata et al., Science 2015)。

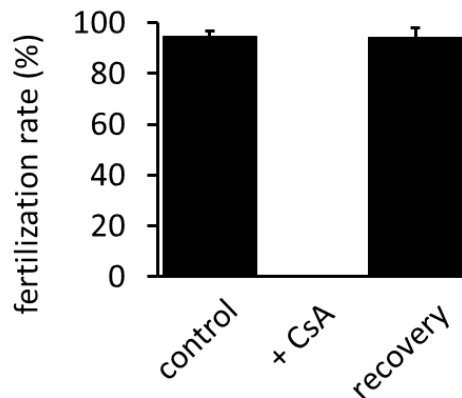


図 2. CsA を投与すると雄マウスは不妊になった。投与を中止すると1週間で生殖能力が回復した。

## (2) *Cabyr*

CABYR (calcium binding tyrosine phosphorylation regulated)は精子鞭毛の繊維鞘と呼ばれる部分に局在していることが知られているが (Naaby-Hansen et al., Dev. Biol. 2002)、生理的な機能は不明であった。そこで *Cabyr*・KO マウスの作製を行った。作製した KO 雄マウスの精子運動能は低下しており、生殖能力も著しく低下していた。体外受精を行ってみると、*Cabyr*・KO 精子は卵子の周りにある細胞外マトリックス (透明帯) を通過できなかった。光学顕微鏡で観察してみると精子形態に明らかな異常は見つからなかったが、透過型電子顕微鏡で観察してみると、繊維鞘の形態異常が見つかった(図3)。さらに、運動装置である微小管が繊維鞘の外側など異所で観察された(図3)。よって、CABYR は繊維鞘の正常な形成に必須であり、KO されて繊維鞘の構造が異常になると、微小管の配置にも問題が生じると考えられる。ヒトでも繊維鞘の形態異常と微小管の異所局在を示す不妊患者の報告があり (Escalier et al., Fertil. Steril. 2006)、CABYRがその原因遺伝子の可能性がある (Young et al., J. Cell. Sci. 2016)。

今後は本研究で作製した KO マウスを材料に、精子運動能の調節機構に関わる遺伝子の機能解析を行い、精子無力症の発症機構のさらなる理解を目指したい。

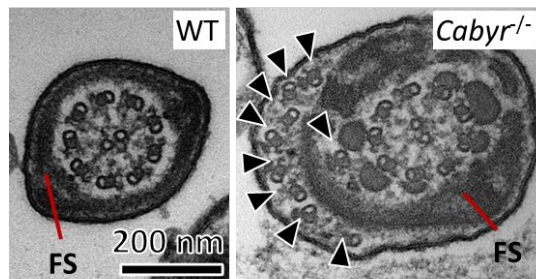
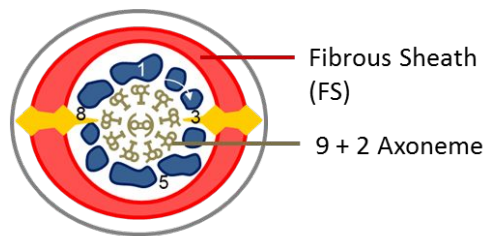


図 3. 精子鞭毛の断面図。*Cabyr*・KO 精子では繊維鞘(FS)の異常に加えて、微小管の異所局在(矢じり)が観察された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Young SAM, Miyata H, Satouh Y, Aitken RJ, Baker MA, Ikawa M. CABYR is essential for fibrous sheath integrity and progressive motility in mouse spermatozoa. *J Cell Sci*. 査読有、129、2016、4379-87. DOI: 10.1242/jcs.193151.

Young SAM, Miyata H, Satouh Y, Muto M, Larsen MR, Aitken RJ, Baker MA, Ikawa M. CRISPR/Cas9-mediated mutation revealed cytoplasmic tail is dispensable for IZUM1 function and male fertility. *Reproduction*. 査読有、152、2016、665-72. DOI: 10.1530/REP-16-0150.

Oji A, Noda T, Fujihara Y, Miyata H, Kim J, Muto M, Nozawa K, Matsumura T, Isotani A, Ikawa M. CRISPR/Cas9 mediated genome editing in ES cells and its application for chimeric analysis in mice. *Sci Rep*. 査読有、6、2016、31666. DOI: 10.1038/srep31666. Miyata H<sup>\*</sup>, Castaneda JM<sup>\*</sup>, Fujihara Y<sup>\*</sup>, Yu Z<sup>\*</sup> (contributed equally), 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 USA*. 査読有、113、2016、7704-10. DOI:

10.1073/pnas.1608458113.

Miyata, H, Satouh, Y, Mashiko, D, Muto, M, Nozawa, K, Shiba, K, Fujihara, Y, Isotani, A, Inaba, K, Ikawa, M. Sperm calcineurin inhibition prevents mouse fertility with implications for male contraceptive. *Science*. 査読有、350、2015、442-5. DOI:

10.1126/science.aad0836.

Young, SAM\*, Miyata, H\* (\*contributed equally), Satouh, Y, Kato, H, Nozawa, K, Isotani, A, Aitken, RJ, Baker MA, Ikawa M. CRISPR/Cas9-Mediated Rapid Generation of Multiple Mouse Lines Identified *Ccdc63* as Essential for Spermiogenesis. *Int J Mol Sci*,. 査読有、16、2015、24732-50. DOI:

10.3390/ijms161024732.

〔学会発表〕(計8件)

宮田治彦、ゲノム編集技術を用いた精子機能の解析、第122回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017.03.30、長崎大学、長崎

Miyata, H, Sperm-specific calcineurin is necessary for midpiece flexibility and male fertility、The 12th Scientific Conference of Chinese Association for Laboratory Animal Sciences、2016.10.11、Nanning、China

Miyata, H, Satouh, Y, Mashiko, D, Muto, M, Nozawa, K, Shiba, K, Fujihara, Y, Isotani, A, Inaba, K, Ikawa, M, Sperm-specific calcineurin is necessary for midpiece flexibility and male fertility、SSR 2016 Annual Meeting、2016.7.17、San Diego、USA

宮田治彦、佐藤裕公、増子大輔、武藤真長、野澤香織、柴小菊、藤原祥高、磯谷綾子、稲葉一男、伊川正人、精子カルシニューリンは尾部中片部の屈曲能とオスの生殖能に必須である、第63回日本実験動物学会総会、2016.05.18、ミューザ川崎シンフォニーホール、川崎

Miyata, H, Satouh, Y, Mashiko, D, Muto, M, Nozawa, K, Shiba, K, Fujihara, Y, Isotani, A, Inaba, K, Ikawa, M, Sperm Calcineurin is Necessary for Midpiece Flexibility and Male Fertility、Biophysical Society 60th Annual Meeting、2016.2.28、Los Angeles、USA

Miyata, H, Satouh, Y, Mashiko, D, Muto, M, Nozawa, K, Shiba, K, Fujihara, Y,

Isotani, A, Inaba, K, Ikawa, M, Sperm-specific calcineurin is necessary for midpiece flexibility and male fertility、国際シンポジウム "生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御"、2016.2.17、京都大学、京都

Miyata, H, Satouh, Y, Mashiko, D, Muto, M, Nozawa, K, Shiba, K, Fujihara, Y, Isotani, A, Inaba, K, Ikawa, M, Ca<sup>2+</sup>-Dependent Phosphatase and Sperm Motility、Gordon Research Conferences: Fertilization & Activation of Development、2015.7.20、Holderness、USA

Miyata, H, Mashiko, D, Fujihara Y, Satouh, Y, Young, SAM, Ikawa, M, Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing hCas9/gRNA complex、The 12th International Symposium on Spermatology、2014.8.11、Newcastle、Australia

〔図書〕(計5件)

宮田治彦、伊川正人、科学評論社、精子カルシニューリンはオスの生殖能に必須である(臨床免疫・アレルギー科)、2016、94(66-71)

宮田治彦、伊川正人、医歯薬出版株式会社、精子カルシニューリンが受精能力に必要(医学のあゆみ)、2016、71(866-867)

宮田治彦、伊川正人、学研メディカル秀潤社、カルシニューリンは精子中片部の屈曲能とオスの生殖能に必須である(細胞工学)、2016、276(230-231)

宮田治彦、伊川正人、羊土社、マウスの生殖能力に必須な精子カルシニューリンは男性避妊薬の標的となりうる(実験医学)、2016、644(596-599)

宮田治彦、伊川正人、エヌ・ティー・エス、ゲノム編集技術による疾患モデルマウスの作出(進化するゲノム編集技術)、2015、386(123-132)

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/information/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 治彦 (MIYATA, Haruhiko)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：50604732