

令和 元 年 7 月 30 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年

受付番号 633

氏 名 野澤 香織

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: ヒューストン (国名: 米国)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

遺伝子改変動物を用いた哺乳類における受精時の卵活性化機構の解析

3. 派遣期間: 平成 29 年 7 月 1 日 ~ 令和 元年 6 月 30 日

4. 受入機関名及び部局名

Baylor College of Medicine, Pathology and Immunology

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 書式任意(A4判相当3ページ以上、英語で記入も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

受精は、精子と卵子という2種類の異なる配偶子が出会い、融合して新たな生命を生む特殊な現象であり、どちらかが欠けては成り立たない。哺乳類の受精において、排卵後、停止していた卵の細胞周期を再開させる卵活性化は必要不可欠なステップであり、健康な産子を得るために重要な役割を果たしている。これまで我々は、精子特異的に発現するタンパク質 Phospholipase C zeta 1 (PLCz1) が、精子由来の卵活性化因子 Sperm Oocyte Activation Factor (SOAF) であることを *Plcz1* ノックアウト (KO) マウスを作製・解析して示してきた。また同時に PLCz1 に依存しない卵活性化経路が存在することも発見し、新たな課題が生まれた。精子がどのように卵を活性化するかについては依然として謎が多い。本研究課題では遺伝子改変動物を用いて、受精に必須な新規因子を探索することを目的とした。

これまでに、「遺伝子改変動物を用いた哺乳類における受精時の卵活性化機構の解析」について、解析結果をまとめ、2018年に論文を発表した(2018, Scientific report)。この論文は現在までに17本の論文に引用されている。また、これらの成果は2つのアメリカ国内学会(ポスター発表)および1つの国際学会(口頭発表)の発表演題に採択され、周辺研究者たちと議論を行った。このうち、国際学会である The Society of Study Reproduction においては、若手研究者の中から優れた発表演題に与えられる Lalor Foundation Merit Award に採択され、口頭発表を行った。さらにその口頭発表を行った6名の中から、次席である 2nd prize を受賞するなど国際的にも評価を得た。

さらに、CRISPR/Cas9 システムを使用し、新たに不妊候補遺伝子 6 種の遺伝子 KO マウスの作製に成功した。

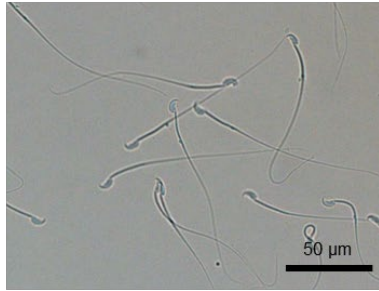
これらの遺伝子 KO マウスの雄を野生型 (Wild-Type:WT) の雌マウスと交配させたところ、雌マウスから正常な産仔が生まれ、産仔数も野生型の雄マウスと比べ遜色がなく、それらの遺伝子はマウスにおいて雄の妊孕性に影響しないことが分かった。また、雄の KO マウスから得られた精子の形態も正常であった。このうち、1 遺伝子について、成果をまとめ国際論文誌にて共著者として発表した(2019、Andrology、下図)。

精子像

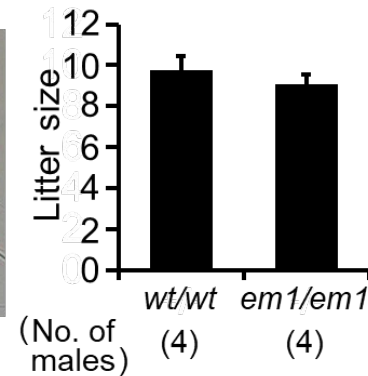
WT マウス由来



KO マウス由来



産仔数



他の遺伝子についても、結果をまとめ、国際論文誌に報告することを計画している。

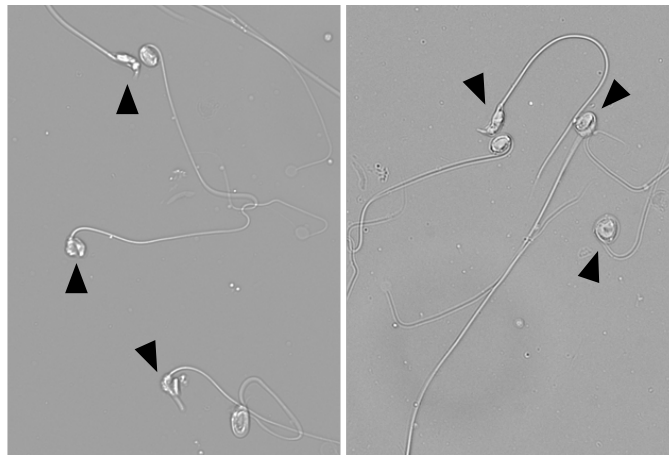
また、先述の遺伝子とは別に、不妊の原因遺伝子 1 種を同定し、解析を進めた。この遺伝子の発現は RT-PCR により精巣特異的であることを確認している。KO マウスの雄を、野生型の雌と 4 か月間交配させたところ、雄マウスの交配行動には異常がなかったにもかかわらず、全ての個体において産仔を得ることができず、精巣重量も野生型と比較して減少していた。そこで精巣上体から精子を採取し観察したところ精子形態が異常であることが分かった (頭部円形精子、下図右)。また、精子運動測定装置を使用してこの精子の運動能を測定した際も、WT の精子に比べ著しく減少していることを発見した。

精子像

WT マウス由来



KO マウス由来



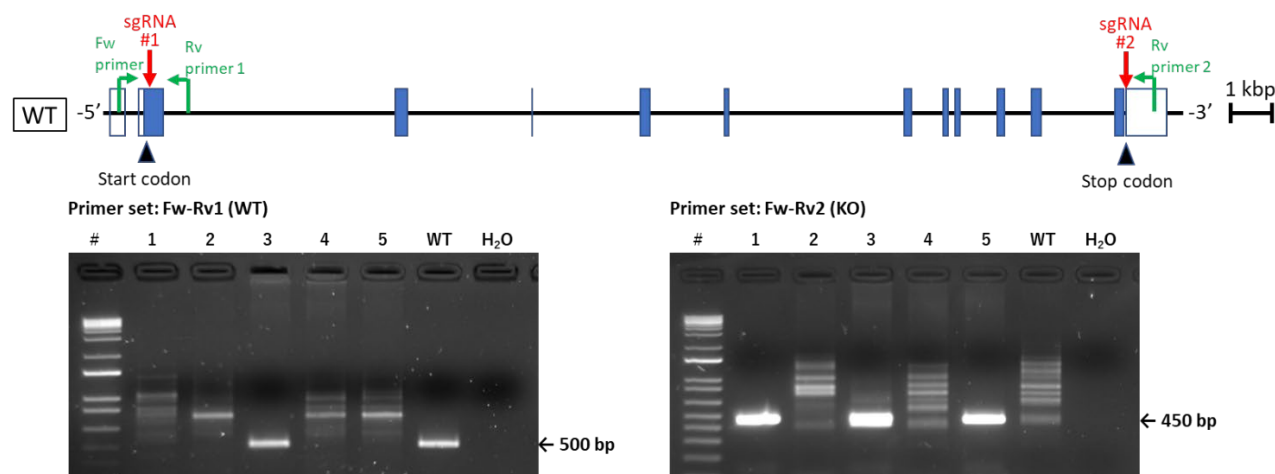
成熟精子の形態。KO マウス精子(中央および右写真)は頭部が円形状を示した。

異常精子の原因を調べるため、KO マウスの精巣における精子形成過程を透過型電子顕微鏡を用いて観察したところ、減数分裂が完了する円形精子細胞までは WT との違いは見られないが、精子細胞が伸長する過程において、異常が生じることを発見した。更に、抗マウス Golgin97 抗体および精子先体マーカーとなる PNA (Peanut Agglutinin) -FITC を使用して、マウス精巣組織

の免疫染色を行ったところ、精子先体形成に異常は見られず、精子細胞内におけるゴルジ体および細胞小器官の細胞内輸送に異常があることが分かった。

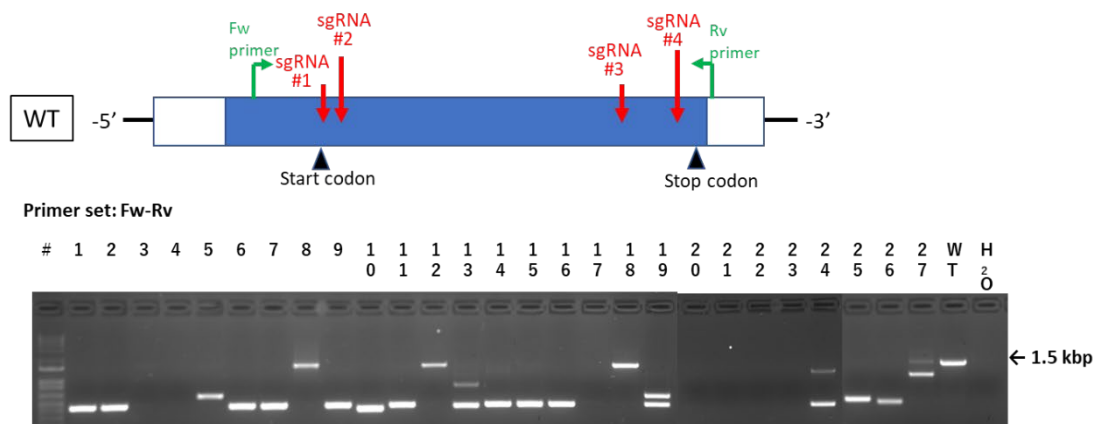
この成果は、3つのアメリカ国内学会（ポスター発表）および1つの国際学会（ポスター発表）の発表演題に採択され、現地の研究者たちと議論を行った。得られた結果は、今後国際論文誌に投稿、発表予定である。

また、卵子特異的に発現している遺伝子をターゲットとした遺伝子改変マウスについてもCRISPR/Cas9システムを用いて獲得した。以下は、標的遺伝子におけるターゲット配列を有するガイドRNAの位置およびCas9タンパク質とガイドRNAを共に受精卵に導入し、胚移植を行って得られた産仔の遺伝子型を解析した結果である。



36個の胚を移植した結果、5匹の産仔を得た。4個体で野生型の遺伝子配列が欠損しており（下図左）、また3個体で large deletion（～24 kb 欠損）が起きたことが示唆された（下図右）。

更に、ほか1遺伝子についても、遺伝子改変マウスの作製に成功している。



98個の胚を移植した結果、43匹の産仔を得た。24個体で large deletion（～1 kb 欠損）が起きたことが示唆された（下図）。

上記の遺伝子改変マウスが得られた2系統については、ホモ KO マウスを得ることを目的に交配を進めた。今後は、性成熟した KO マウスが得られ次第、妊孕性の有無や産仔数、体外受精や顕微授精を通した精子および卵子の卵活性化能の判定など詳細な解析に供されることが期待される。