

Title	CRISPR/Cas9システムを用いた新規雄性不妊原因遺伝子の探索とそれらの機能解析
Author(s)	小林, 清訓
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/92133
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (小林清訓)

論文題名

CRISPR/Cas9システムを用いた新規雄性不妊原因遺伝子の探索とそれらの機能解析
(Search for novel genes involved in male infertility and analysis of their
functions using CRISPR/Cas9-mediated genome editing)

論文内容の要旨

日本において、6組に1組の夫婦が不妊に悩んでいるとされており、その原因の約半数が男性側に原因があると言われている。男性不妊症の原因の90%が精子形成障害であり、精子がほぼ作られない無精子症、数が少ない乏精子症、精子が運動していない精子無力症などがあげられるが、それらの原因は不明なものが多い。また、精子が作られ場でもある精巣はヒト・サル・マウスなどの動物種においても精巣は最も発現遺伝子数が多い臓器であり、遺伝子発現レベルで見てもそれだけ精子形成が複雑で高度に制御された生命現象であることが伺える。さらに精巣に特異的に発現する遺伝子の数も1000以上と多く、それらの遺伝子は精子形成に何らかの機能を果たしていることが予測される。

しかしながら精子形成及び受精にかかわる遺伝子の解析を行うにあたり、in vitro で精子形成を再現する系が存在しない、また精子では遺伝子の転写が起こらず、容易に過剰発現やノックダウンなどの実験が行えないことから、細胞レベルでの解析は困難であった。また個体レベルでの解析は遺伝子改変動物を用いる必要があり、これまで多くの時間と労力を要していた。しかし近年、ゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9システムを用いることで迅速かつ簡便に遺伝子改変マウスを作製することが可能になった。そこで私はCRISPR/Cas9システムを用いノックアウト (KO) マウスを複数作製し、個体を用いた交配スクリーニングにより、効率よく精子形成及び受精に関わる新規遺伝子の同定しその機能の解析を行うこととした。このスクリーニングにより複数の不妊原因遺伝子の同定に成功した。スクリーニングにより著しい妊孕性の低下を示すことが明らかになった雄の生殖器官特異的に発現するシスタチンファミリー遺伝子クラスター領域 (Re-Cst family) を欠損させたマウスの表現型解析 (第2章) と不妊の表現型の示す *Prss55* KOマウスの機能解析 (第3章) を行い、ともに雌性生殖路内の精子の移行に必須の遺伝子として同定した。なぜ、雌性生殖路内を精子の移行できなくなるのかについては今後の課題ではあるが、CRISPR/Cas9システムを用いた個体レベルでのスクリーニングにより効率よく精子形成及び受精に関わる新規遺伝子を同定できれば、精子形成・受精にかかわる因子の包括的な理解、ないしは機能メカニズムの解明につながると確信している。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (小林清訓)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 原 英二
	副 査	教授 立花 誠
	副 査	教授 林 克彦
	副 査	教授 石谷 太
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本研究は、精巣および精巣上体に特異的に発現する遺伝子を対象にCRISPR/Cas9システムを用いて標的とした遺伝子の欠損マウスを作製し、機能の解析を試みたものである</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 精巣および精巣上体特異的に発現する遺伝子を欠損させたマウスを複数作製し、交配試験により妊孕性の有無をスクリーニング的に判定し、雄の生殖能力に重要な遺伝子を5遺伝子と1遺伝子群（複数同時遺伝子欠損）を同定した。 2. スクリーニングにより同定された、雄の生殖組織特異的に発現するシスタチンファミリー遺伝子群（Re-Cst family）と<i>Prss55</i>の遺伝子欠損マウスを用いた解析により、遺伝子欠損した精子は雌性生殖路内のUterotubal junction (UTJ)を通過する能力、および卵子透明帯に結合する能力を失っていることを突き止めた。また遺伝子欠損した精子から精子膜に存在し妊孕性に必須とされるADAM3タンパク質の発現が認められず、ADAM3タンパク質の制御に関与した因子である可能性を示した。 <p>以上、本論文はCRISPR/Cas9システムを用いて複数の遺伝子改変マウスを作製し、機能を解析することで新たにRe-Cst family遺伝子群と<i>Prss55</i>が雄の生殖能力に必須であることを明らかにしたものであり、博士の学位を授与するに値するものと認める。なお、チェックツール“iThenticate”を使用し、剽窃、引用漏れ、二重投稿等のチェックを終えていることを申し添えます。</p>		