



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	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

博士論文

題目 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)

大阪大学大学院生命機能研究科

生命理工学講座/がん生物学研究室

氏名 小林清訓

Summary

It is estimated that one out of every six couples in Japan has infertility, and about half of these infertility cases are caused by the male side. 90% of male infertility is caused by spermatogenesis disorders, including azoospermia, in which almost no sperm are produced, and oligozoospermia, in which the number of sperm is low. However, the causes of these disorders are unknown in many cases. Also, the testis, the site of sperm production, is the organ with the highest number of expressed genes in all animal species, including humans, monkeys, and mice, indicating that spermatogenesis is a complex and highly regulated biological phenomenon even when viewed as the gene expression level. Furthermore, the number of genes specifically expressed in the testis is more than 1,000, and these genes are predicted to have some function in spermatogenesis and fertilization.

Analysis at the individual level requires the use of genetically modified animals, and until now, it has required much time and effort. The CRISPR/Cas9 system, a genome editing technology, has recently made it possible to quickly and easily produce genetically modified mice. Therefore, I decided to efficiently identify novel genes involved in spermatogenesis and fertilization and analyze their functions by screening for mating using xx lines of knockout (KO) mice generated by the CRISPR/Cas9 system. This screening succeeded in identifying several genes responsible for infertility. Phenotypic analysis of mice lacking the cystatin family gene cluster region (Re-Cst family), explicitly expressed in male reproductive organs, and functional analysis of Prss55 KO mice, which show an infertile phenotype and identified both genes as essential for sperm migration in the female reproductive tract

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、精子が作られる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娠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。

目次

略語一覧

第一編 緒論

第二編 本論

第一章 ゲノム編集技術を用いた雄性不妊原因遺伝子の探索

第二章 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の表現型解析

第三章 *Prss55*、*Prss51* 遺伝子の機能解析

第三編 考察

第四編 結論

第五編 謝辞

第六編 主論文・参考論文リスト

第七編 参考文献

略語一覧

bp	: base pair
cDNA	: complementary deoxyribonucleic acid
Cas9	: CRISPR-Associated Proteins 9
CRISPR	: clustered regularly interspaced short palindromic repeats
Del	: deletion
DKO	: double knockout
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	: Enhanced Green Fluorescent Protein
ES	: embryonic stem
FBS	: fetal bovine serum
hCG	: human chorionic gonadotropin
He-PAS	: hematoxylin-Periodic Acid-Schiff
IVF	: in vitro fertilization
KO	: knockout
KSOM	: K+ Simplex Optimization Media
mRNA	: messenger ribonucleic acid
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
PAM	: Proto-spacer Adjacent Motif
PBS	: phosphate buffered saline
PCR	: polymerase chain reaction
PFA	: paraformaldehyde
PMSG	: pregnant mare serum gonadotropin
PVDF	: Poly vinylidene fluoride
Re- <i>Cst</i> family	: reproductive- <i>Cst</i> family
RT-PCR	: reverse transcription polymerase chain reaction
sgRNA	: single-guide RNA
TBS	: Tris-Buffered Saline
TBS-T	: Tris-Buffered Saline with Tween20
Tg	: transgenic

UTJ	: utero-tubal junction
VAP	: Average Path Velocity
VCL	: Curvilinear Velocity
VSL	: Straight-line Velocity
WT	: wild-type

第一編 緒論

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。1つずつではあるがCRISPR/Cas9システムを用いた個体レベルでの解析により精子形成及び受精に関わる新規遺伝子を同定していくことできれば、精子形成・受精にかかる因子の包括的な理解、ないしは機能メカニズムの解明、そしてヒト不妊症の理解や治療法開発、避妊薬の開発、また家畜生産など動物生命科学分野への応用も期待できる。

第二編　　本論

第一章　ゲノム編集技術を用いた雄性不妊原因遺伝子の探索

序文

精子形成及び受精にかか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なため、個体レベルで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。

実験方法

標的遺伝子を認識する sgRNA/Cas9 発現ベクターの作製

MGI (<http://www.informatics.jax.org/>) で得たゲノム情報を取得した。
CRISPR direct (<https://crispr.dbcls.jp/>) を用いて、開始コドン付近または上流、終止コドン付近または下流にそれぞれ NGG (N には A, T, G, C のいずれかが入る) の PAM 配列 (Proto-spacer Adjacent Motif) を-3'側に有する 20 塩基の gRNA を設計した。gRNA の選定には PAM 配列の上流 12~14 塩基が一致する配列 (オフターゲット配列) がゲノム上に少ないものを標的配列として優先した。参考文献[1]を参考にし、Cas9 タンパク質と sgRNA を発現する pX459 プラスミドベクター(Addgene #62988, <https://www.addgene.org/62988/>) を作製した。具体的には、標的配列の相補

鎖にそれぞれ制限酵素 BbsI (New England BioLabs) の認識配列を付加したオリゴヌクレオチドを 95°C; 5 分- 60°C; 5 分- 16°C; 30 分の条件でアニーリングし、二本鎖 DNA にした。この産物を制限酵素 BbsI (New England BioLabs) で切断した pX459 プラスミドに挿入し、目的のプラスミドを得た。それぞれの遺伝子の gRNA の配列は以下に示す。

遺伝子		標的配列 (5'-3')	PAM 配列
<i>Cst family</i>	#1	CACAGCAGTCTGCCGGCAT	TGG
	#2	AGATTGTCCCATGTAACACT	TGG
<i>Prss51&55</i> DKO	#1	CACACTGTAACTTAGGGTT	AGG
	#2	GAGGAACGCTGACTACCGGT	TGG
<i>Prss51</i>	#1	TGAAGATTAACGTGACGAGT	GGG
	#2	GAGGAACGCTGACTACCGGT	TGG
<i>Prss55</i>	#1	CTAGCTCAGGACACGTCCTT	GGG
	#2	CACACTGTAACTTAGGGTT	AGG
<i>Pdha2</i>	#1	ACTCATAGACAATTGATCA	CGG
	#2	ATGCCTGAATCCTACTTAGG	AGG
<i>Efcab9</i>	#1	ACATCTGTCACTCGGTTGAG	CGG
	#2	CATGCTCACTCGTGTGTCAC	AGG
<i>Psma8</i>	#1	CAGGACTTCCGGAGGCGGTT	GGG
	#2	TTCACCAAGAAATGCCGCTC	AGG
<i>Plac8l1</i>	#1	CTTCTAACTATGAGCTGGAT	GGG
	#2	CTAGTCCAGTGAATACTTAT	GGG

ES 細胞の培養

ES 細胞の培養は研究室のプロトコールおよび先行研究[30-31]準じて行った。具体的には、大阪大学微生物病研究所伊川教授らにより樹立された、精子の先体および全身で EGFP を発現するトランスジェニックマウス [129S2 x (cag/acr-EGFP)B6] 由来の ES 細胞 (EGR-G01) [2]を用い、フィーダー細胞に

は、Mitomycin C 処理後に凍結保存した纖維芽細胞 (MEF) を使用した[3]。フィーダー細胞を前日に播種したゼラチンコートディッシュ上で ES 細胞を培養した。(37 °C、5% CO₂ インキュベータを用いた) 繼代は 0.25% トリプシン/1 mM EDTA/PBS 処理により実施した。

ゲノム編集した ES 細胞の作製

ゲノム編集した ES 細胞の作製は研究室のプロトコールおよび先行研究[30-31]準じて行った。具体的には、ゼラチンコート処理をした 6 穴プレートに 5×10^5 個の MEF を前日に播種し接着させ、そこに 1×10^5 個の ES 細胞を播種した。6-8 時間後、Lipofectamine® LTX & Plus Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて、標的とする遺伝子に対して pX459-sgRNA を 2 種類、各 1 µg ずつトランسفェクションした。トランسفェクション後 18 時間から 1 µg/mL puromycin を含む培地で 2 日間培養することでトランسفェクションされなかった細胞を死滅させ、その後 puromycin を除去するために培地交換しコロニーを形成するまで約 3 日間培養した。コロニー形成後、それぞれの単一コロニーを 96 穴プレートで個別に培養した。それぞれの ES 細胞からのゲノム DNA を抽出し、遺伝子型判定により目的の変異を持つ ES 細胞を選定した。

遺伝子型解析

マウス指または尾・ES 細胞を lysis buffer で溶解し、得たゲノム DNA を用いて標的配列近辺を PCR により增幅させ、アガロースゲル電気泳動により遺伝子型判定を実施した。インデル変異に関してはダイレクトシークエンスにより解析を行った。それぞれのプライマーを用いて、標的配列近辺を PCR 増幅した後、ダイレクトシークエンスにより変異の解析を行った。

核型解析

遺伝子型判定により、目的の変異が導入されていた ES 細胞クローンについて、6 cm ディッシュにまで拡大培養した。コンフルエントとなった ES 細胞のを、再度 6 cm ゼラチンコートディッシュに継代し、その翌日に、200 µg のコ

ルセミド (Thermo Fisher) を加え、37 °Cで 1.5 時間培養した。コレセミド処理後、0.25% トリプシン (Thermo Fisher) を添加して ES 細胞を回収し、1 % クエン酸ナトリウム溶液で 5 分間低張処理し、カルノア固定液 (酢酸 1: メタノール 3) を加え懸濁した。細胞懸濁液をスライドグラスに数滴垂らし、Hoechst 33342 で染色した後、蛍光正立顕微鏡下で染色体数をカウントした。

キメラマウスおよび KO マウスの作製

PMSG (pregnant mare serum gonadotropin; 7.5 units, ASKA Pharmaceutical, Tokyo, Japan)、hCG (human chorionic gonadotropin; 7.5 units, ASKA Pharmaceutical) により過排卵処理を行った ICR 雌マウスと、ICR 雄マウスを交配させ、卵管から 2–4 細胞期胚を回収した。8 細胞期胚 (胎生 2.5 日) になるまで KSOM 培地中で、37 °C、5% CO₂ の条件で培養した。目的の変異を持つ ES 細胞を調整し 3-4 個を 8 細胞期胚内へ注入した。KSOM 中で 1 日間培養し、妊娠 2.5 日目の偽妊娠 ICR マウスに移植した。移植後 17 日目に自然分娩もしくは帝王切開によって産仔を得た。ES 細胞の寄与をブルーライトを用いて観察し、緑色蛍光を発するものをキメラマウスと判定した。また ES 細胞由来はアグーチの毛色を示し、ICR 由来は白色の毛色のためキメラマウスの毛色により、ES 細胞の寄与率を判定した。性成熟した雄のキメラマウスを野生型雌マウスと交配させ産仔のうち、EGFP 蛍光が観察される仔マウスの遺伝子型を調べた。その後、ヘテロで変異を持つ雄マウスと雌マウスを交配させることで両アレル変異の持つ KO マウスを作製した。

体外受精

体外受精は先行研究[20]に習い行った。具体的には、5 IU の PMSG 及び hCG を B6D2F1 雌マウスに投与して、過排卵を誘起した。hCG 投与 14 時間後に、B6D2F1 雌マウスを安樂死させて、卵管を採取した。卵管をピンセットで引き裂いて、出てきた卵子–卵丘細胞複合体を TYH 培地[4]に入れた。安樂死させた雄マウスの精巣上体尾部から精子を採取して TYH 培地で 2 時間培養した。前培養した精子を卵子–卵丘細胞複合体を含む TYH ドロップに加えた（最終濃度：2×10⁵ 精子/ ml）。媒精約 5 時間後、0.5 mg/mL Hyaluronidase (088-

07243, WAKO)で 5 分間処理して卵丘細胞を除去し、雌雄前核の有無を顕微鏡下で観察した。

受精卵への gRNA/Cas9 RNP のエレクトロポレーションによる KO マウスの作製

標的配列を認識する crRNA (Sigma-Aldrich) と tracrRNA (#TRACRRNA05N-5NMOL, Sigma-Aldrich) を nuclease-free water (non-DEPC treated, AM19914G, Thermo Fisher Scientific) に溶解し、crRNA と tracrRNA の混合液を 95°C で 1 分間加熱した。その後、室温で 1 時間ほど静置して得られたアニール産物 (crRNA-tracrRNA) を Cas9 酵素 (Thermo fisher Scientific) と混ぜて、37°C で 5 分間インキュベーションした。その後、opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) で希釈して、最終濃度を Cas9 100 ng/μL (約 660 nM)、gRNA 40 ng/μL (約 1.2 μM) に調整した。受精卵を gRNA と Cas9 の混合液で満たされた電極間に並べ、NEPA21 Super Electroporator (Nepagene) により電気パルスをかけて受精卵前核に gRNA/Cas9 混合液を導入した。その後、処理胚を偽妊娠 ICR 雌マウスの卵管膨大部へと移植し、19 日後に自然分娩または帝王切開により産子を得た。

交配実験と産仔数の計測

性成熟（生後 8 週齢以上）した雄の KO マウス 1 匹に対して、8 週齢の雌マウス 3 匹を 2 か月同居させた。その間、午前中に雌マウスへの膣栓の付着および産仔数を確認し、交配の有無と産仔数を記録した。

実験結果

標的とする遺伝子については、精巢特異的に発現しているおよそ 1000 遺伝子のうち、ヒトでも保存されており、まだ KO マウスを用いた解析が行われていないものを、NCBI の遺伝子発現データベースや、ヒト精巢と他組織を比較

し遺伝子発現を網羅的解析した報告[5]など複数の文献から検討し、14 遺伝子を選定した。この章では 2 章で取り上げる Re-*Cst* family 欠損マウスの作製を 1 例とし紹介する。なお、他の標的遺伝子については ES 細胞でゲノム編集・キメラマウス作製実験を行い、複数回の交配により系統化する方法、または、受精卵への gRNA/Cas9 RNP のエレクトロポレーションを行い複数回の交配により系統化する方法を用いて KO マウスを作製した。

Re-*Cst* family 領域に変異を持つ ES 細胞株の樹立、キメラマウスの作製

Cstl1 遺伝子の開始コドンの上流と、*Cstcd2* 遺伝子の開始コドンの上流にそれぞれ sgRNA を設計した（図 1A-B）。sgRNA を発現する 2 種類の pX459 プラスミドを ES 細胞にトランスフェクションして KO ES 細胞株を樹立した（図 1C-D）。モノクローナル化させた 24 クローンのうち、シークエンスを解析した 7 クローンにおいて、2 クローンに両アレルに変異が導入されており、また 3 クローンで片アレルに変異が導入されていた。これら 5 クローンの核型解析を行ったところ、5 クローン全てで 80% 以上の細胞が正常な染色体数（40 本）を持っていた。両アレルと片アレルに変異を持つ ES 細胞を 1 クローンずつ用いることとし、それらの ES 細胞を 8 細胞期胚にインジェクションし偽妊娠マウスに移植することでキメラマウスを得た。キメラマウスにおける ES 細胞の寄与率はマウスの体毛によって判定した（図 2A-B）。その後複数回交配させることで Re-*Cst* family 欠損マウスを作製した。

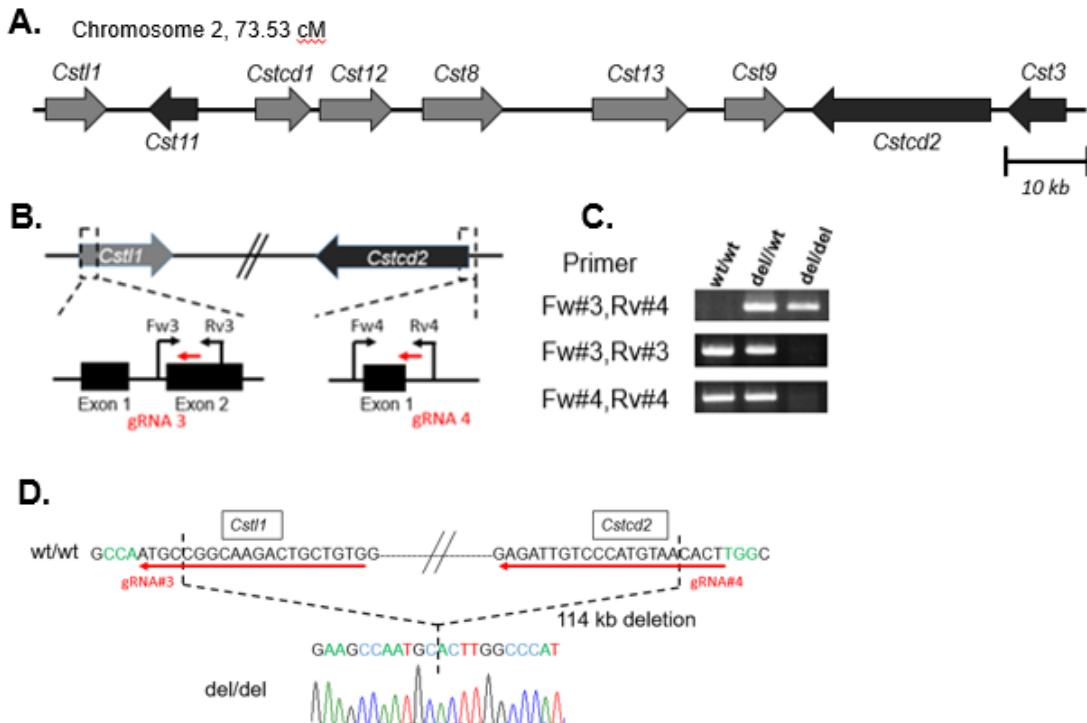


図 1

(A) マウスゲノムの染色体 2qG3 に位置するシスタチナミリー遺伝子。矢印の方向は転写の方向を示す。(B) Re-Cst family を欠損させるための gRNA のデザイン。黒矢印はプライマー、赤矢印は gRNA 標的配列を示す。(C) B で示したプライマーを用いた PCR による遺伝子型判定。(D) キメラマウス作製に使用した Re-Cst family 欠損 ES 細胞の欠損を含む領域のシークエンス。

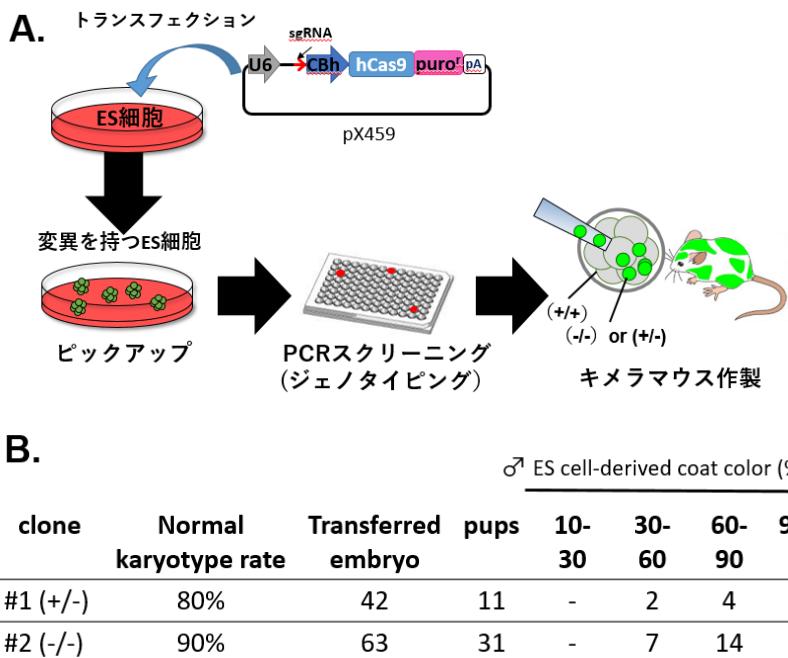


図 2

(A) 変異を持つ ES 細胞の作製から、キメラマウス作製までの概略図 (B)ES キメラマウス作製の際の、産仔数および ES キメラマウスにおける体毛による ES 細胞の寄与率の判定

交配試験による KO 雄マウスの妊娠性解析

作製した KO 雄マウスを野生型の雌マウスと 2 か月間同じケージ内で同居させ、交配試験を行うことで妊娠性を評価した。膣栓 (Plug) の有無によって当日に交配しているかどうかを判別した。その結果、複数遺伝子を同時に KO したものも含む合計 8 系統の KO オスマウスのうち、交配試験により 3 系統が完全不妊、さらに 2 系統で妊娠性が大きく低下した。つまり、赤色で示す計 5 系統で精子形成及び受精に重要とされる新規遺伝子の同定に成功した。(表 1) またそれに加え、わずかではあるが妊娠性の低下がみられる KO オスマウスを 2 系統見出した。第 2 章では *Re-Cst family* 欠損雄マウスの解析を、第 3 章では *Prss51&55 DKO* マウスと *Prss51* および *Prss55* の単独 KO の解析を行うこととする。

遺伝子系統	1交配あたりの 平均産子数	妊娠性	表現型
コントロール (WT)	9.1 ± 0.6	正常	—
<i>Efcab9</i> KO	5.4 ± 0.8	低下	精子運動性低下
<i>Plac8l1</i> KO	5.9 ± 0.6	低下	精子機能不全
<i>Cst</i> family KO	0.3 ± 0.4	低下	精子機能不全
<i>Prss51</i> KO	9.1 ± 0.2	正常	—
<i>Prss55</i> KO	0.1 ± 0.1	低下	精子機能不全
<i>Prss51-55</i> DKO	0	不妊	精子機能不全
<i>Psma8</i> KO	0	不妊	精子形成不全
<i>Pdha2</i> KO	0	不妊	精子形成不全

表 1、それぞれの遺伝子における KO 雄マウスの交配試験の結果

小括

ゲノム編集技術の 1 つである CRISPR/Cas9 システムを用いて、精巣および精巣上体に特異的に発現する遺伝子の KO マウスを複数作製し、個体レベルでの交配スクリーニングを行うことにより、新規不妊原因遺伝子を 5 系統同定することに成功した。

第2章 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の表現型解析

序文

シスタチンファミリーは分泌型システインプロテアーゼインヒビターとして機能し得ると知られており、その特徴としてシスタチン様ドメインを保有し、カルボキシル末端近くに 2 つのジスルフィド結合を持っている[6]。その中でも CST3 は、神経系、心血管系、および腎臓 (Ki) における機能が先行研究により明らかになっている[7-8]。また、シスタチンファミリーとして 8 つの遺伝子 (*Cstl1-Cstdc2*) が第 2 染色体上で連續して位置しクラスターを形成しており、それらの遺伝子は男性の生殖器官で強く発現していることが示されている[9-11]。生殖器官内でシスタチントンパクは、精巣上体管腔における精子の成熟に寄与するアミロイドマトリックスの形成に関与していると考えられているが[12-13]、精巣上体で強く発現している *Cst8* または精巣で強く発現する *Cst9* それぞれの単一の KO 雄マウスは妊娠性を有し、精子形成および成熟におおきな異常は見られなかった[14-15]。

第一章でも述べたように CRISPR/Cas9 システムでは、2 種類の sgRNA を用いることで sgRNA 間の領域欠損を誘導することができ、その領域が 100 kbp 以上でも欠損させることが可能である。また、受精卵と違って一度に多くのクローニングを処理できる ES 細胞の系を用いることで効率的に目的の変異体を得ることが可能である[13]。この章では、第一章で著しい妊娠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を行った。

実験方法

多臓器での rtPCR

8 週齢の C57BL/6N から、脳、胸腺、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、精巣上体、卵巣、子宮を摘出し、速やかに氷冷中の TRIzol reagent (15596026, Thermo Fisher Scientific) に浸した。この溶液中で組織を破碎

後、クロロホルムを添加して混合・遠心分離することで RNA を抽出した。その後ゲノム DNA を分解するため、DNase (313-03161, NIPPON GENE, Tokyo, Japan) を加え 37°C・20 分間インキュベートし、エタノール:クロロホルム:イソアミルアルコール 25:24:1 (pH5.2; 26058-54, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) にて精製、エタノール沈殿により RNA 溶液を濃縮した。逆転写は、SuperScript IV First-Strand Synthesis System (18091050, Thermo Fisher Scientific) を用いて行い、10 ng の RNA に由来する cDNA を得た。これらの cDNA を用いて PCR を行った。

精巣および精巣上体の組織学的解析

性成熟を経た雄マウスから取り出した精巣をブアン固定液(16045-1, Polysciences, Warrington, PA, USA) または 4% パラホルムアルデヒド (PFA) にて 4°C で 8-10 時間、固定した後、エタノールで段階的に脱水しキシレンに置換しパラフィンで包埋した。ミクロトーム (MICROMHM325, Thermo Fisher Scientific) を使って 5 μm 厚の切片をスライドグラス (松浪硝子工業株式会社) に張り付けて、キシレンによる脱パラフィン・エタノールによる再水和後、1% periodic acid (26605-32, Nacalai Tesque) で 15 分、Schiff's reagent (193-08445, Wako) で 20 分処理することで PAS 染色を行い、さらに、Mayer's hematoxylin solution (131-09665, Wako) に 4 分間漬けることで染色を行った。エタノールとキシレンにて脱水・置換後、Permount を用いて封入のし、正立顕微鏡 (BX53, olympus) にて観察した。

精子の形態観察

性成熟した B6D2F1 ならびに KO 雄マウスから精巣上体を採材した。ピンセットを用いて精巣上体尾部内の精子を密集させ、そこに切り込みを入れることで精子を絞り出して TYH 培地へ入れた。10 分程度培養させることで懸濁させた。その後 PBS でに入れ 10 分懸濁させ、精子懸濁液をスライドグラスに滴下、カバーガラスで封入し、光学顕微鏡で観察した。

精子の運動性解析

精子の運動性解析は先行研究[16]に習って行った。具体的には、まず、精巢上体尾部から精子を TYH 培地に回収し、37 °C・5%CO₂ 下で培養した。10 分または、120 分の培養後、CEROSII 精液分析装置 (software version 1.5.2; Hamilton Throne Biosciences, Beverly, MA) を用いて、各運動性パラメータを解析した。

精子の体外受精能の評価

体外受精の手法においては第 1 章に準ずる。

精子の体外受精能力を評価するにあたり、卵丘細胞の付帶した未受精卵 (cumulus-intact egg)、卵丘細胞を除去した未受精卵 (cumulus-free egg)、卵丘細胞と卵子透明帯を除去した未受精卵 (zona-free egg) を用いた。

cumulus-intact egg を含む TYH 培地に 0.5 mg/mL Hyaluronidase (088-07243, WAKO) を加え 37 °C 5 分インキュベートすることで、卵丘細胞を取り除いた cumulus-free egg を、また、cumulus-intact eggs を 1 mg/mL コラーゲナーゼ (C1639-50MG, Sigma-Aldrich) にて 37 °C 5 分インキュベートすることで、卵丘細胞と透明帯を取り除いた zona-free egg を準備した。

精子と卵子透明帯結合能の評価

体外受精と同様に、2 時間培養した精子を cumulus-free egg を含む TYH 培地に最終濃度 2 x 10⁵ sperm/mL となるように加える。37 °C・5%CO₂ 下にて 30 分培養した。30 分の培養後、0.2% グルタルアルデヒドを含む TYH 培地で固定し光学顕微鏡を用いて観察し、結合する精子数を測定した。

精子の雌性生殖路内の挙動観察

精子の雌性生殖路内の挙動観察は先行研究[17]と同様に行った。簡潔には、hCG を腹腔注射し 12 時間後に、その過排卵処理された雌マウスと雄マウスを同じケージに入れ交尾させる。交尾すると膣栓（プラグ）の形成が確認できるため 30 分間隔でプラグの形成を確認した。交尾の約 3 時間後、卵管と子宮をまとめて切除し、卵管を子宮角から慎重に分離して真っ直ぐにし、スライド全体に移し、カバーガラスで覆い、蛍光顕微鏡 (Olympus BX50 および Keyence Corporation BZ-8000) で観察した。

ウェスタンプロット解析

精巣や精子のタンパク質抽出液を 2X サンプルバッファー（127 mM Tris-HCL バッファー(pH6.8)、4% SDS 溶液、20% グリセロール、10% 2-メルカプトエタノール、0.007% ブロモフェノールブルー）と等倍希釈した後、98°Cで 5 分間加熱した。氷上で冷やした後、5~20% アクリルアミドゲルにアプライして、20 mA で 75 分間泳動した。Ladder はプレシジョン Plus プロテイン™ WesternC™ スタンダード (Bio-Rad) を用いた。その後、ブロッティング装置 (Bio-rad) を使って分離したタンパク質を PVDF 膜 (Merck Millipore) に転写した。得られたメンブレンを TBST (50mM Tris-HCL バッファー (pH6.8)、138mM NaCl、2.7mM KCl、0.1% Tween 20) で洗浄した後、5%スキムミルク (Becton Dickinson) でブロッキングした。その後、一次抗体を含むブロッキング溶液で 4°Cで一晩反応させた。TBST で洗浄後、HRP 標識二次抗体を入れて、2 時間インキュベーションした。TBS-T で 3 度 wash した後、ウェスタンブロッティング検出試薬 (Chemi-Lumi One Super, Nacalai, Japan) と ImgaQuant LAS 4000 mini (Cytiva) システムにより、シグナルを検出した。使用抗体と希釈倍率は以下に記載した。

一次抗体: anti-ADAM3 1:1000 (Merck, cat # MAB1929 または Santa Cruz, cat # sc-365288) ; anti-IZUMO1 1:1000 (KS64-125) ; anti-ADAM2 1:1000 (Chemicon, cat # MAB19292) ; anti-CALR3 1:1000[19]; anti-CLGN 1:1000[19]; anti-PDILT 1:1000[20]; anti-BASIGIN 1:1000; anti-PRSS55 1:500(custam, Sigma-Aldrich)

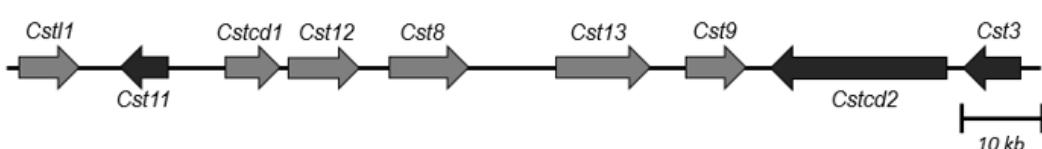
二次抗体: goat anti-Rabbit IgG HRP conjugated antibody 1:5000; goat anti-Mouse IgG HRP conjugated antibody 1:5000; goat anti-Rat IgG HRP conjugated antibody 1:5000 (全て Jackson ImmunoResearch Laboratories)

実験結果

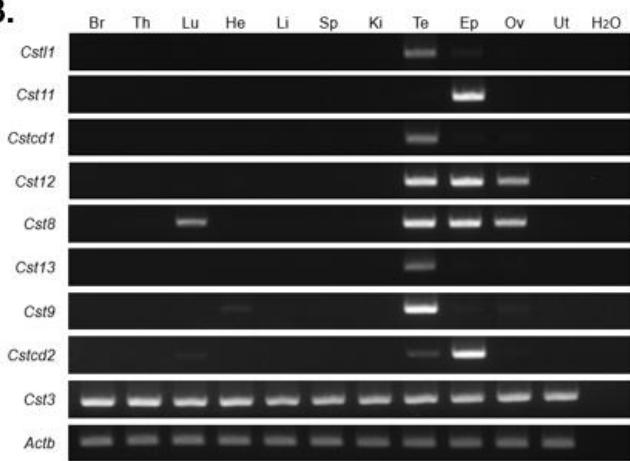
シスタチンファミリー遺伝子の組織での発現パターンと Re-Cst family 欠損マウスの妊娠性評価

シスタチンファミリー (*Cst family*) に関する 9 つの遺伝子は、マウス染色体 2qG3 遺伝子座に連続して位置しており（図 3A）、これらの遺伝子の発現パターンを、マウスの多臓器を用いた RT-PCR によって確認したところ、*Cstl1*、*Cstdc1*、*Cst9*、および *Cst13* は精巣 (Te) で強く発現し、*Cstdc2* および *Cst11* は精巣上体 (Epi) で強く発現、*Cst8* および *Cst12* は 精巣、精巣上体、および卵巣 (Ov) で豊富に発現した。また *Cst3* は全身性に発現していた（図 3B）。また Mouse ENCODE (<https://www.mouseencode.org/>) により公開された RNA-seq のデータを用いて同様の遺伝子発現パターンであることを確認した（表 2）。次に、第一章で作製した Re-Cst family 欠損 (del) 雄マウスと野生型雌マウスを交配させ妊娠性を確認したところ、Re-Cst family 欠損 (del) 雄マウスにおいて著しい妊娠性の低下が見られた（図 3C）。

A. Chromosome 2, 73.53 cM



B.



C.

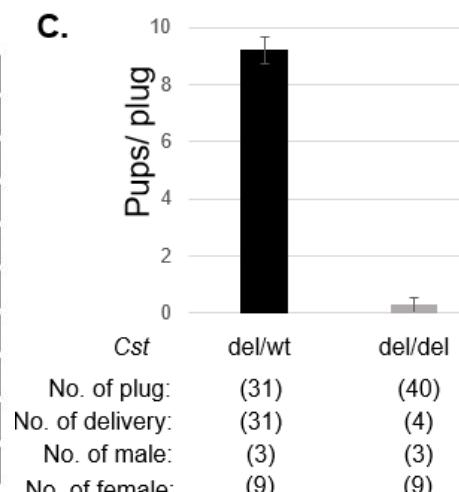


図 3

(A) マウスゲノムの染色体 2qG3 に位置するシスタチンファミリー遺伝子。矢印の方向は転写の方向を示す。 (B) RT-PCR 解析による多臓器遺伝子発現解析。 *Actb* は発現コントロールとして使用した。Br: 脳, Th: 胸腺, Lu: 肺, He: 心臓, Li: 肝臓, Sp: 脾臓, Ki: 腎臓, Te: 精巣, Ep: 精巣上体, Ov: 卵巣, Ut: 子宮 (C)雄の Re-Cst family 欠損マウスの妊娠性評価。縦軸は、胎栓あたりの産子数。del/wt マウス: 9.2 ± 0.7。del/del マウス: 0.3 ± 0.3。

	Genital fat pad	Heart	Kidney	Large Intestine	Liver	Lung	Ovary	Placenta	Small intestine	Spleen	Stomach	Testis	Thymus
<i>Cst3</i>	574.00	529.00	354.00	166.00	157.00	754.00	349.00	210.00	120.00	311.00	378.00	165.00	311.00
<i>Cst8</i>	110.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.73	1.86	0.00	0.00	0.00	0.05	50.10	0.07
<i>Cst9</i>	0.47	0.33	0.01	0.00	0.00	0.26	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	86.60	0.07
<i>Cst11</i>	228.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.03	0.01	0.00
<i>Cst12</i>	58.20	0.07	0.04	0.01	0.00	0.00	0.58	0.00	0.00	0.00	0.03	44.90	0.00
<i>Cst13</i>	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	25.60	0.00
<i>Cstdc1</i>	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	5.82	0.00
<i>Cstdc2</i>	263.00	0.10	0.00	0.02	0.00	4.06	0.10	0.00	0.00	0.00	0.09	2.59	0.02
<i>Cstl1</i>	0.11	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	37.10	0.00

表 2 シスタチンファミリー遺伝子の多臓器での RNA-seq の RPKM 値

Re-Cst family 欠損マウスの精巣および精巣上体の形態・組織学的解析 Re-Cst family 欠損 (del)マウスの妊娠性の低下の原因を明らかにするために、生後 12 週齢の Re-Cst family 欠損 (del)マウスから精巣を採取し、観察・重量の測定を行ったところ、コントロールとして用いたヘテロマウス (del/wt)と比較して形態および重量は大きく変わらなかった (図 4A-B)。また精巣・精巣上体の切片を作製し、He-PAS 染色し組織学的解析を行ったが、Re-Cst family 欠損 (del) 精巣でも異常は認められず (図 4C)、精巣上体尾部にコントロールと同等の精子の貯蔵が確認された (図 4D)。

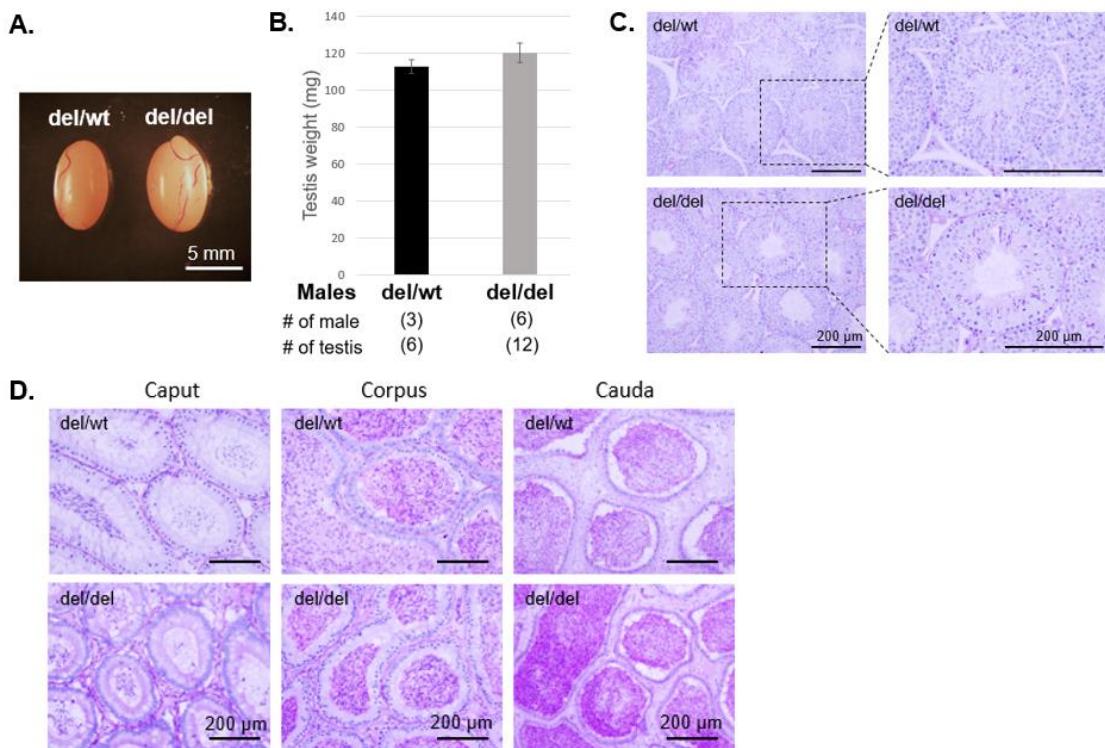


図 4

(A)精巣の形態 (B)精巣の重量。*del/wt* 精巣は 112.7 ± 9.1 mg (n=3)。*del/del* 精巣は 120.0 ± 17.9 mg (n=6)。 (C)精巣切片の He-PAS 染色。 (D)精巣上体切片の He-PAS 染色。

Caput: 頭部 , Corpus: 体部, Cauda: 尾部,

Re-Cst family 欠損マウスの精子の形態および運動性解析

Re-Cst family 欠損マウスの精巣上体尾部から精子を採取し形態観察を行ったところ、異常は見られなかった (図 5A)。次に CEROSII というソフトウェアを用いて精子運動性のパラメータ (VAP: 平均速度, VCL: 曲線速度, VSL: 直線速度)を評価した (図 5B)。すべてのパラメータにおいて大きな違いは見られず統計的にも有意な差は見られなかったため (図 5C)、著しい妊娠性低下の原因は、精子の受精能の獲得の過程に異常がある可能性が示唆された。

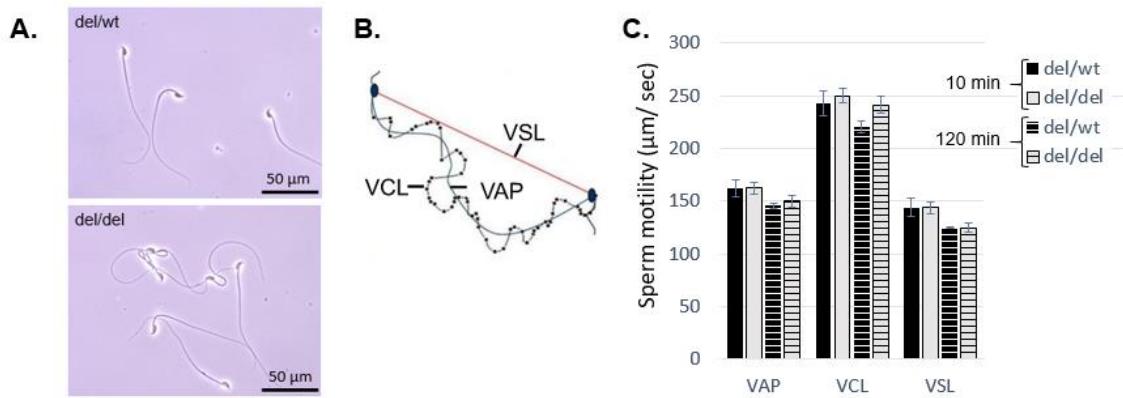


図 5

(A)精子の形態 (B) 運動性の評価に用いた3種類のパラメータ VAP・VCL・VSL
 (C)TYH 培養後、10分と120分における精子運動性の解析結果

体外受精による Re-Cst family 欠損精子の受精能の解析

ここまで Re-Cst family 欠損マウスの精巣・精子を観察してきたが、大きな異常は認められなかった。そこで著しい妊娠性低下の原因を明らかにするために、Re-Cst family 欠損精子を用いて体外受精 (IVF: In vitro Fertilization) を行うことで、精子の受精能力について評価した。まず、卵丘細胞が付帯した未受精卵 (cumulus-intact) (図 6A)を用いて IVF を行ったところ、Re-Cst family 欠損精子の受精率はコントロールと比較して減少傾向にはあるものの、高い受精率を示し、体外受精を行うことで妊娠性が回復することが示唆された (図 6B)。

次に、卵丘細胞を取り除き透明帯がむき出しの未受精卵 (cumulus - free) (図 6A)を用いて体外受精を行ったところ、Re-Cst family 欠損精子において受精率の大きな低下がみられた(図 6C)。この結果から精子と卵子透明帯の結合に異常があると考え、卵子透明帯に結合している精子数を数えることで、精子の結合能力の評価を行った。すると、Re-Cst family 欠損精子では卵子透明帯に結合する精子数に大きな減少がみられた(図 6D-E)。

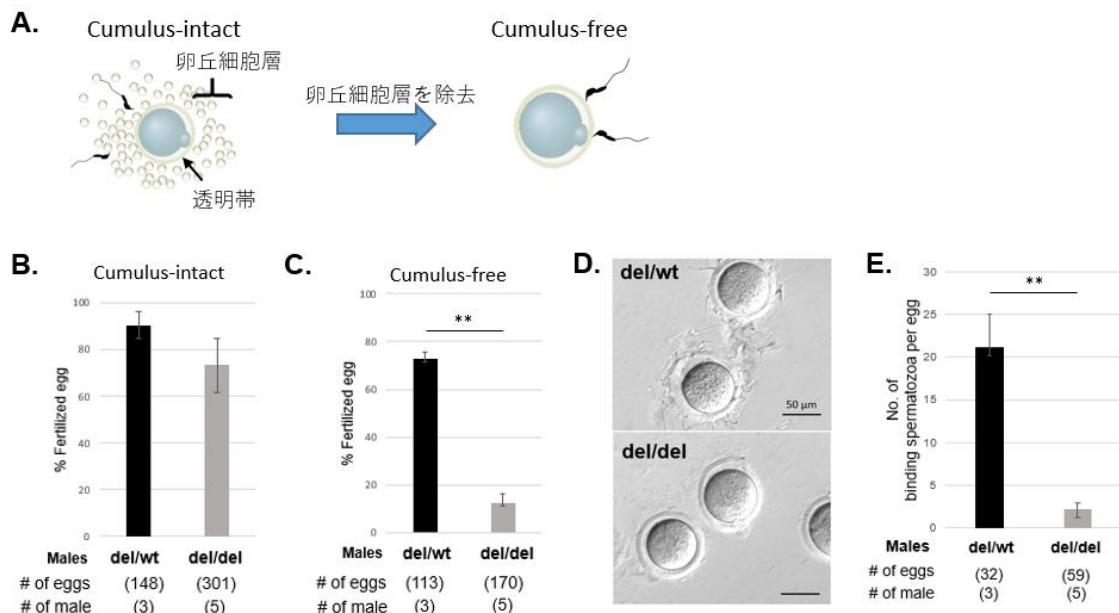


図 6

(A) 卵丘細胞が付帯した未受精卵 (cumulus-intact) と卵丘細胞を取り除き透明帯がむき出しの未受精卵 (cumulus - free) (B) cumulus-intact の未受精卵を用いた体外受精の受精率 (C) cumulus-free の未受精卵を用いた体外受精の受精率 (D) 精子と卵子透明帯結合アッセイでの観察像 (E) 卵子透明帯に結合した平均の精子数。del/wt の結合精子数は 21.2 ± 6.7 ($n=3$)。del/del の結合精子数 2.2 ± 1.6 ($n=5$)。

** $P < 0.01$, スチュードント t 検定

雌性生殖路内での Re-Cst family 欠損精子の挙動観察

体外受精の結果から精子が卵子まで到達できれば受精できる可能性が高いことが示唆されたため、交配試験の結果と合わせ、妊娠性の低下の原因を突き止めるために雌性生殖路内での Re-Cst family 欠損精子の挙動観察を行うことにした。通常、精子は子宮側から UTJ (Utero-tubal junction) と呼ばれる子宮と卵管の接合部を通過し、卵子のもとまで到着する（図 7A）。これらの精子の挙動を観察するために、精子の頭部と中片部に蛍光を持つトランスジェニック (Tg) マウスと交配させ、精子に蛍光を持つ Re-Cst family 欠損マウスを作製した（図 7B）。その Re-Cst family 欠損マウス雄マウスと野生型雌マウスを自然交配させ、3–4 時間後に雌性生殖器官を観察したところ、Re-Cst family 欠損精子は子宮と卵管の連結部分である UTJ をほとんど通過できないことが分かった（図 7C）。この異常により Re-Cst family 欠損精子は生体内で UTJ を通過できないことで卵子まで到達することができず不妊傾向を示すことが明らかになった。

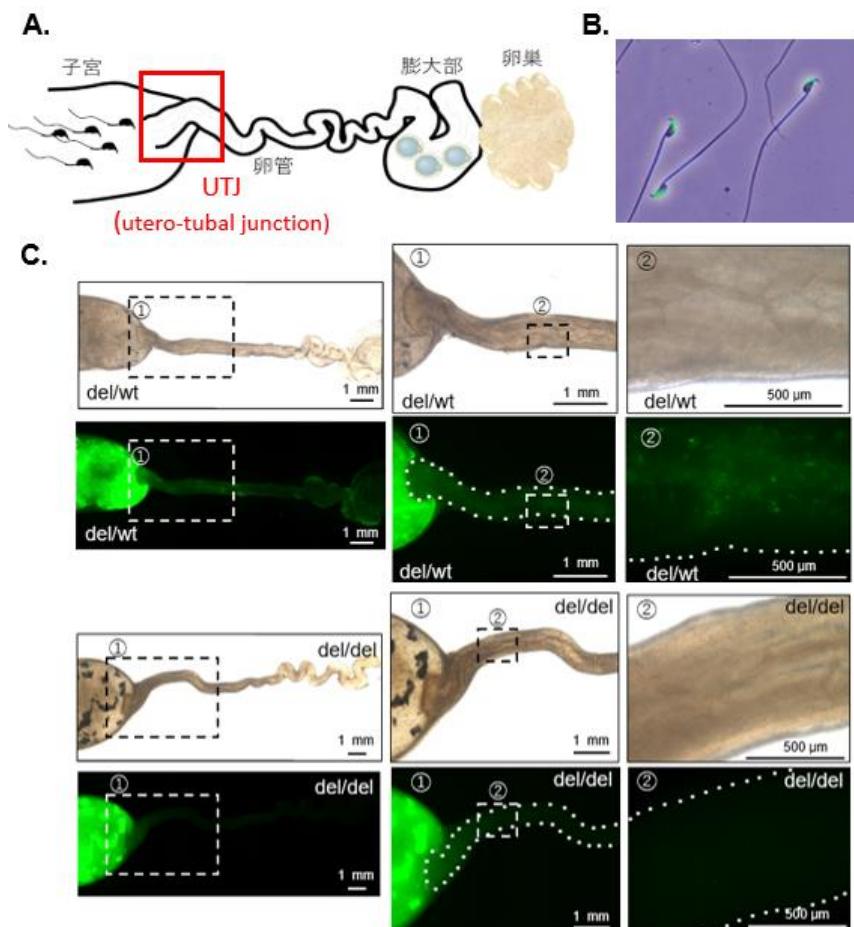


図 7

(A) 雌性生殖路内の簡略図。UTJ; utero-tubal junction (B)頭部に緑色の蛍光を持つ Tg マウスから採取した精子 (C) 雌性生殖路内での精子の挙動。

UTJ の移行に必須とされるタンパク質 ADAM3 の解析

先行研究において精子の UTJ の移行にかかわる遺伝子として *Calr3* や *Clgn*、*Tex101* など複数報告されており [18-20]、そのほとんどにおいて精子膜上に局在している ADAM3 タンパク質が異常を示すことが分かっている。また ADAM3 タンパク質は精巣精子から発現しており、精巣上体を通過する精子成熟の過程でプロセシングを受け分子量が大きく変化する（図 8A）。そこで Re-*Cst* family 欠損雄マウスから採取した精巣・精子タンパク質を用いて、ウエスタンプロット解析により ADAM3 の検出を行った。Re-*Cst* family 欠損精巣タンパク質ではコントロールと同程度の未成熟型 ADAM3 が検出できたのに対し、Re-*Cst* family 欠損精子タンパク質では、成熟型 ADAM3 が検出できなかった（図 8B）。また、ウエスタンプロットの結果から ADAM3 と関連して UTJ の移行にかかわるタンパク質として知られる ADAM2 や CALR3、PDILT などの減少は見られなかった（図 8C）。これらの結果より Re-*Cst* family は ADAM3 と関連した精子の成熟に必須の遺伝子群であることが示唆された。

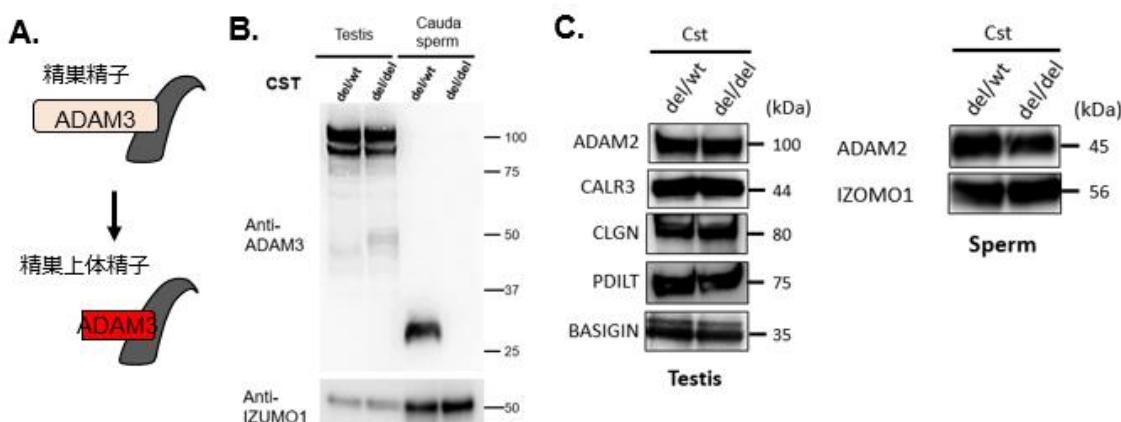


図 8

(A) 精子膜上に局在する ADAM3 タンパク質。精巣上体における精子の成熟の過程でプロセシングを受け成熟型となる (B) Re-*Cst* family 欠損精巣・精子タンパクを用いた ADAM3 のウエスタンプロット解析 (C) ADAM3 に関連したタンパク質のウエスタンプロット解析。IZUMO1 はローディングコントロールとして使用した。

小括

シスタチンファミリー遺伝子のうち、雄性生殖器官特異的な発現を示す 8 遺伝子が含まれる約 100 kbp のクラスター領域をゲノム編集技術により領域すべてを欠損させることができ、そのクラスター領域が雄の生殖能力、特に精子の受精能力に必要であることが明らかとなった。さらに表現型解析から、ADAM3 タンパク質との関連性を見出した。

第3章 *Prss55*, *Prss51* 遺伝子の表現型解析

序文

Prss51, *Prss55* とともにセリンプロテアーゼファミリーの 1 つとして知られている[21-22]。これらのセリンプロテアーゼの中には精巣で強発現し、生殖能力に重要な役割を果たすものも知られている [21, 23-26]。例えば *Prss37* は、精子形成後期に精巣生殖細胞でのみ発現し、マウスの生殖能力に必須の遺伝子として [26]、また *Prss21* の欠損マウスは、精子の運動性の低下や精子形態の異常により受精能が低下することが知られている[25]。

本章では、第一章で不妊の表現型を示した *Prss51-Prss55* ダブルノックアウト (DKO) マウスの機能解析から、さらに各遺伝子の機能を明確化するためにそれぞれ単独の KO マウスを作製し機能解析を行った。

実験方法

出生後日数ごとの精巣サンプルでの rtPCR

生後 0, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 21, 28, 35 日齢の C57BL/6N の雄マウスから精巣を採取し、速やかに TRIzol reagent (15596026, Thermo Fisher Scientific) に浸した。その後は第 2 章の 多臓器での rtPCR を参照。

系統樹作製

アミノ酸配列は NCBI Entrez Protein Database から取得し、Clustal W2.183 を用いて系統樹を作製した。

精子の体外受精能の評価

体外受精の手法においては第 1 章、第 2 章に準ずる。

第 1 章、第 2 章に加えて、精子の体外受精能力を評価するにあたり、卵丘細胞と卵子透明帯を除去した未受精卵 (zona-free egg) を用いた。cumulus-intact

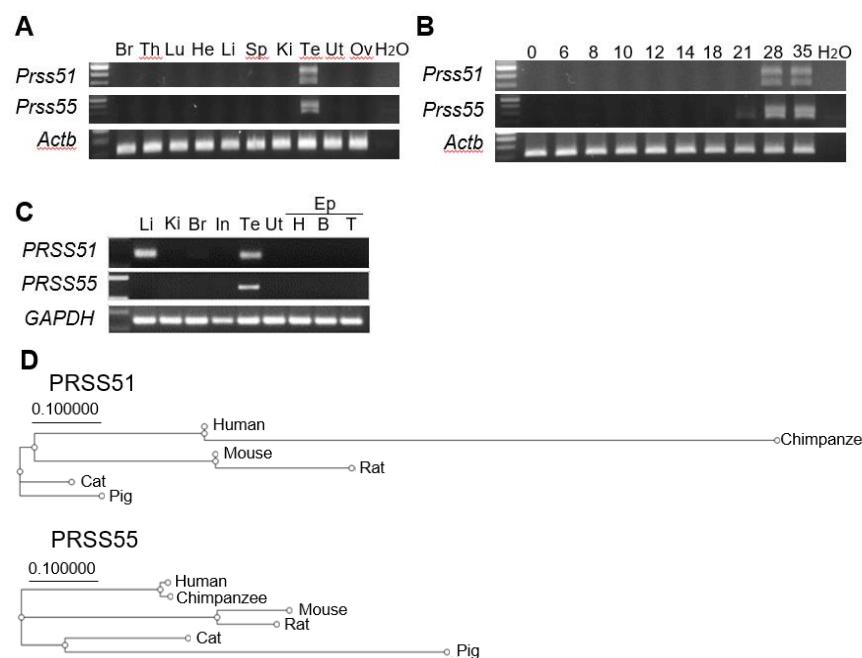
eggs を 1 mg/mL コラーゲナーゼ (C1639-50MG, Sigma-Aldrich) にて 37 °C 5 分インキュベートすることで、卵丘細胞と透明帯を取り除いた zona-free egg を準備した。

※その他の実験手法においては第 2 章に準じて行った

実験結果

Prss51, Prss55 の遺伝子発現パターンとアミノ酸配列の相同性

マウスとヒトの多臓器、またはマウスのさまざまな日齢の精巣を使用して、RT-PCR により *Prss51* と *Prss55* の発現パターンを調べた。*Prss51* と *Prss55* は、生後 28 日目 (図 9A-B) からマウスの精巣 (図 1A) で特異的に発現することが分かった。ヒトでは、PRSS51 は主に精巣と肝臓で発現し、PRSS55 は精巣で特異的に発現を示した (図 9C)。PRSS51 および PRSS55 のタンパク質の配列[9]は、マウスやヒトを含む哺乳類のさまざまな種で高度に保存されている (図 9D)。また、マウス PRSS51 と PRSS55 のアミノ酸配列をアラインメントし、配列の相同性を調べたところ、34.2% の配列同一性と 54.2% の配列類似性を示した (図 9E)。



E

mPRSS51	1	MMLFLLLALIMASKGDKDQQESVLCGHRPAFPNSSLPLRPLLVEVQHGEFPWQVSICML	60
mPRSS55	1	MILES-HILLEVAHTLERNVECGVRPLYDSRIQYSRI---IEQQPAELGEFPWQVSICES	55
mPRSS51	61	GKHCFCGGSIIIHRCWVVLIAAHCFPRTLLEI-WAVNVTVVMPIKTFSDTNLDRKVKQRDIARR	120
mPRSS55	56	DHEFCGGSILSEWWILIVAHCF--YACELSPTDLRGRVETNDLTSPVSL-EVTTTIRBK	112
mPRSS51	121	DYKPPDIDSPLCLLILLATPIQFNKDMPICLQPREN--SWDRQWMSEWAYIHHGSAKGS	178
mPRSS55	113	GFKRLNNMDNIAIALLLAKPLTFNELTVPICLPLWPAPPWHECWVAGNGVINSTDKESNS	172
mPRSS51	179	NMHPKFLRVVQISWRTIAKRVTOQLSRNMLCAWKEVGTNGKCQGDSCAPAVCANWETRRLF	238
mPRSS55	173	T-DMMKVPMRIIEEDLQMFPSTTNTMLCASYGNESYDACQGDSCGPVCTTDPGSRNY	231
mPRSS51	239	QVGVFWSWGIITSGSRGRPGIFVSVVAQFIPWILEETQREGRALALSKASKLLAGSPRYHPI	298
mPRSS55	232	QVGFIISNGKSCGKKGPGIYTVALAKTYLWEKIAQTEGKILDFRGOSSENKKNRQNNQL	291
mPRSS51	299	LLSMGSQILLAAIFSDDKSNC-----	319
mPRSS55	292	SKSPALNCPQSLLPCILLSFALLRALSNWK	321

図 9

(A) RT-PCR 解析によるマウスの多臓器遺伝子発現解析。 *Actb* は発現コントロールとして使用した。 Br: 脳, Th: 胸腺, Lu: 肺, He: 心臓, Li: 肝臓, Sp: 脾臓, Ki: 腎臓, Te: 精巢, Ep: 精巢上体, Ov: 卵巣, Ut: 子宮 (B) RT-PCR 解析によるマウス精巢における出生後日数ごとの遺伝子発現解析 (C) RT-PCR 解析によるヒトの多臓器遺伝子発現解析。 GAPDH は発現コントロールとして使用した (D) PRSS51、PRSS55 の系統樹解析 (E) マウスの PRSS51、PRSS55 アミノ酸配列の相同性解析。白抜き文字は配列が同一のものを示す

Prss51&55 の DKO マウスの作製と妊娠性の評価

第 1 章において *Prss51&55* の DKO マウスを作製した。具体的には *Prss51* の終止コドン付近と *Prss55* の終止コドン付近にそれぞれ設計した gRNA を用いて、目的の変異を持つ ES 細胞を作製し、8 細胞期胚にインジェクションすることでキメラマウスを得た。その後複数回交配させることで DKO マウスを作製した (図 10A-C)。その後、図 10C で示す 22,313 塩基欠損を持つ DKO マウスを実験に用いることとした。妊娠性の評価のために、この *Prss51&55* DKO 雄マウスと野生型雌マウスを交配させたところ 1 匹も産仔を得られず不妊の表現型を示した (図 10D)。

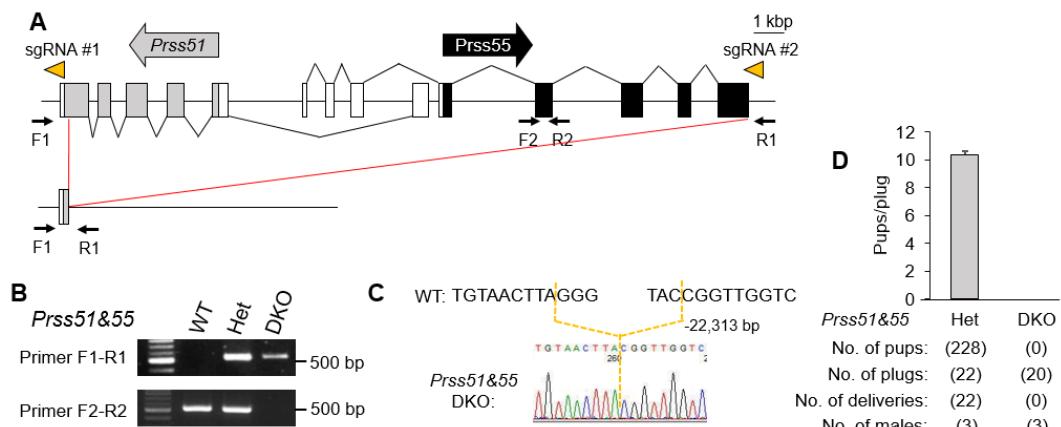


図 10

(A) *Prss51*, *Prss55* の遺伝子のマップ。遺伝子名を含む矢印は転写方向を示し、黒いボックスが *Prss55* のコード領域を、灰色のボックスが *Prss51* のコード領域を、白いボックスが非コード領域を示す。黒矢印はプライマー、黄色矢頭は gRNA 標的配列を示す。
(B) A で示したプライマーを使用した PCR による遺伝子型判定。
(C) 妊孕性解析に使用した *Prss51&55 DKO* マウス遺伝子のシークエンスの欠損を含む領域。
(D) 交配試験による妊娠性を 1 プラグ当たりの産仔数で示した

Prss51&55 DKO マウスの精子の形態および運動性解析

Prss51&55 DKO マウスの精巢上体尾部から精子を採取し形態観察を行ったところ、異常は見られなかった（図 11A）。次に CEROSII というソフトウェアを用いて精子運動性のパラメータ（VAP：平均速度、VCL：曲線速度、VSL：直線速度）を評価した。すべてのパラメータにおいて *Prss51&55 DKO* 精子では減少傾向はみられるものの、統計的にも有意な差は見られなかった（図 11B）

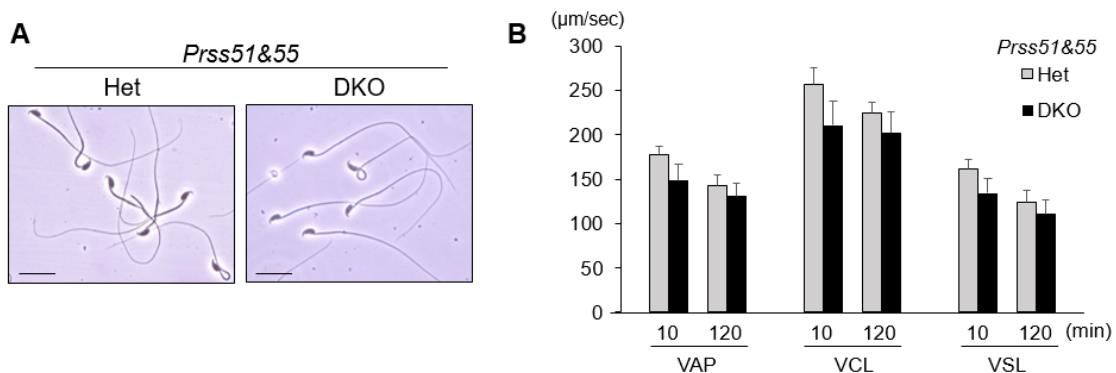


図 11

(A) 精子の形態 (B) TYH 培養後、10 分と 120 分における精子運動性の解析結果

体外受精による *Prss51&55 DKO* 精子の受精能の解析

ここまで *Prss51&55 DKO* マウスの精子を観察してきたが、大きな異常は認められなかった。そこで不妊の原因を明らかにするために、第 2 章と同様に *Prss51&55 DKO* 精子を用いて体外受精を行うことで、精子の受精能力について評価した。まず、卵丘細胞が付帯した未受精卵 (cumulus-intact) を用いて IVF を行ったところ、*Prss51&55 DKO* 精子の受精率はコントロールと比較して減少傾向はあるものの、高い受精率を示し、体外受精を行うことで妊娠性が回復することが示唆された（図 12A）。Cumulus-free の受精卵を用いて体外受精を行ったところ、*Prss51&55 DKO* 精子において受精率の大きな低下がみられた（図 12B）。この結果から精子と卵子透明帯の結合に異常があると考え、卵子透明帯に結合している精子数を数えることで、精子の結合能力の評価を行った。すると、*Prss51&55 DKO* 欠損精子では卵子透明帯に結合する精子数に大きな減少がみられた（図 12C-D）。

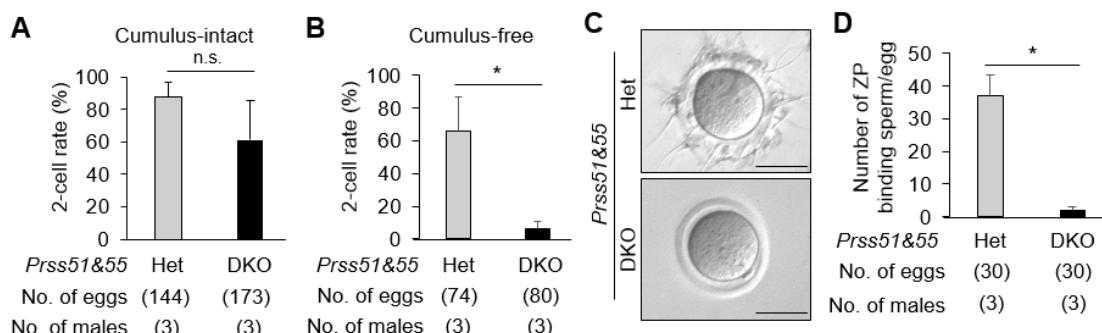


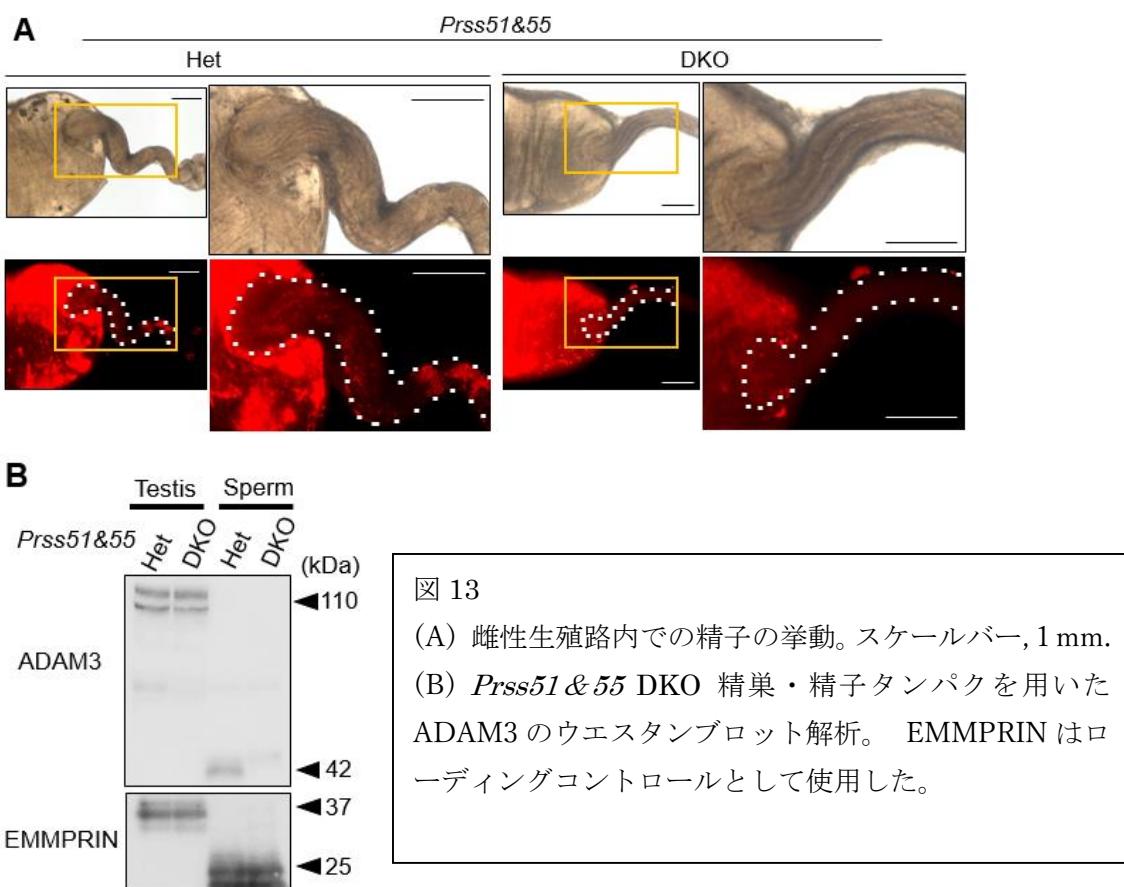
図 12

(A) cumulus-intact の未受精卵を用いた体外受精の受精率 (B) cumulus-free の未受精卵を用いた体外受精の受精率 (C) 精子と卵子透明帯結合アッセイでの観察像 (D) 卵子透明帯に結合した平均の精子数。Hetero の結合精子数は 36.9 ± 6.1 ($n=3$)。DKO の結合精子数 2.0 ± 1.1 ($n=3$)。 * $P < 0.05$, スチューデント t 検定

雌性生殖路内での *Prss51&55 DKO* 精子の挙動観察と ADAM3 タンパク質の検出

ここまで得られた結果から第 2 章で取り上げた Re-Cst family 欠損マウスと表現型が類似していたため、第 2 章と同様に雌性生殖路内での *Prss51&55 DKO* 精子の挙動の観察とウエスタンプロット解析による ADAM3 タンパク質の検出を行った。その結果、*Prss51&55 DKO* 精子は子宮と卵管の連結部分である UTJ をほとんど通過できないことが分かり（図 13A）。また ADAM3 のウエスタンプロット解析では、*Prss51&55 DKO* 精巣タンパク質はコントロールと同程度の未成熟型 ADAM3 が検出できたのに対し、Re-Cst family 欠損精子タンパク質では、成熟型 ADAM3 が検出できないことが明らかとなつた（図 13B）。

これらの結果から *Prss51&55 DKO* 精子は生体内で UTJ を通過できないことで卵子まで到達することができず不妊傾向を示すことが明らかになつた。



Prss51 単独の KO 雄マウスの作製と表現型解析

ここまで *Prss51&55 DKO* マウスを用いて解析を行ってきたが、不妊の原因となる遺伝子が *Prss51*、*Prss55* あるいは両遺伝子ともなのかの判断するためには、まず *Prss51* を欠損させたシングル KO マウスを作製した。具体的には、タンパクコード領域でかつ *Prss55* 遺伝子座と重複しない exon2 と exon6 に gRNA を設計し(図 14A)、その gRNA を用いて gRNA/Cas9 RNP 複合体の受精卵エレクトロポレーションを行い、それらの胚を偽妊娠マウスに移植することで、複数の産仔が得られた。ゲノム PCR (図 14B)とダイレクトシーケンス(図 14C)によって変異マウスの遺伝子型を決定することで *Prss51* KO マウスを得た。*Prss51* KO マウスの精巣の RT-PCR によって *Prss51* と *Prss55* の発現パターンを調べたところ、*Prss51* の発現は *Prss51* KO マウスの精巣で失われているが、*Prss55* は引き続き発現していることを確認した(図 14D)。ウェスタンプロット解析により PRSS55 が *Prss51* KO 精巣および精子(図 14E)で発現することを確認し、*Prss55* 遺伝子に影響を与えることなく *Prss51* 遺伝子を欠損できていることが分かった。次に *Prss51* KO 雄マウスの生殖能力を交配試験により評価したところ、*Prss51* KO 雄マウスからも野生型と同程度の産仔が得られた(図 14F)。この結果は *Prss51* KO 雄マウスは生殖能力があることを示していくおり、*Prss51* 遺伝子は、マウスの雄の生殖能力に必須の遺伝子ではないということが明らかになった。

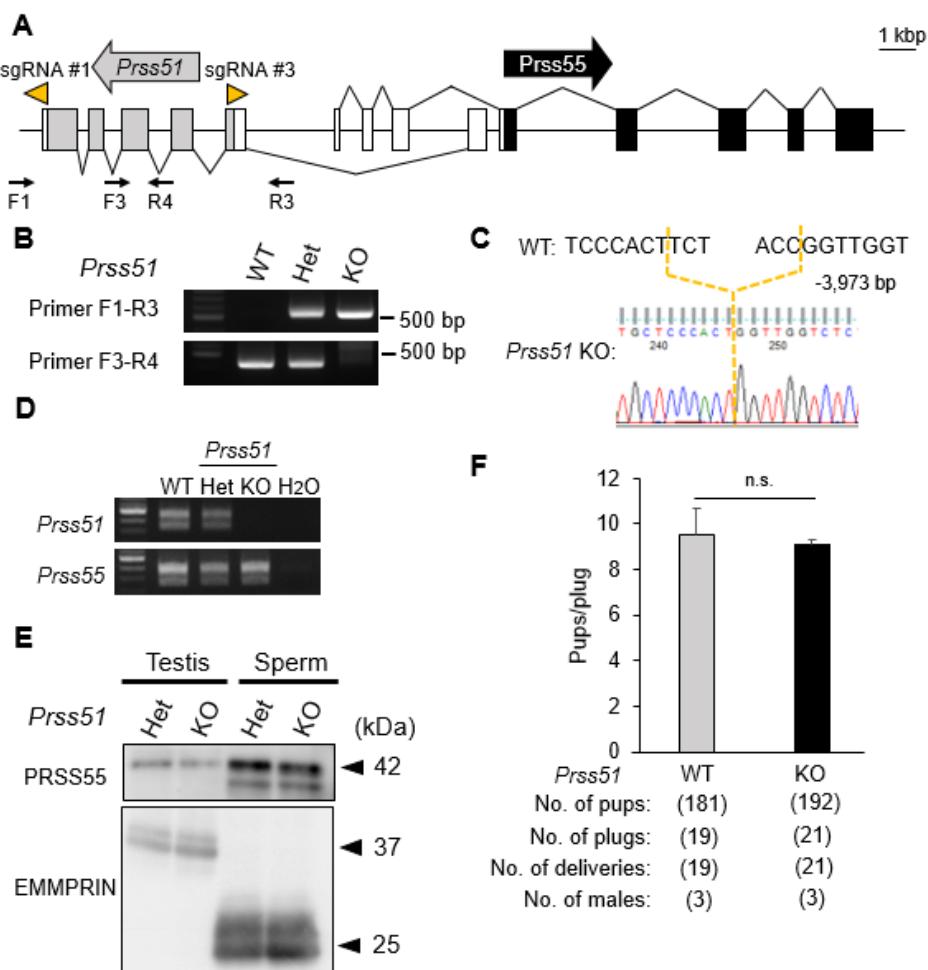


図 14

(A) *Prss51* 遺伝子を欠損させるためのコンストラクト。遺伝子名を含む矢印は転写方向を示し、黒いボックスが *Prss55* のコード領域を、灰色のボックスが *Prss51* のコード領域を、白いボックスが非コード領域を示す。黒矢印はプライマー、黄色矢頭は gRNA 標的配列を示す。 (B) A で示したプライマーを使用した PCR による遺伝子型判定。 (C)妊娠性解析に使用した *Prss51* KO マウス遺伝子のシークエンスの欠損を含む領域。 (D)Prss51KO 精巣サンプルを用いた、RT-PCR による *Prss51* と *Prss55* の遺伝子発現解析 (E)ウエスタンプロット解析による PRSS55 タンパク質の発現解析。EMMPRIN はローディングコントロールとして使用した。 (F)交配試験による妊娠性を 1 プラグ当たりの産仔数で示した

Prss55 単独の KO 雄マウスの作製と表現型解析

Prss51 を欠損させたシングル KO マウスの結果から、*Prss55* が妊娠性に必須の遺伝子であると推測し、*Prss55* を欠損させたシングル KO マウスを作製した。作製方法は *Prss51* KO マウスと同様に行った(図 15A)。ゲノム PCR (図 15B)とダイレクトシーケンス (図 15C)によって変異マウスの遺伝子型を決定することで *Prss55* KO マウスを得た。*Prss51* KO マウスと同様に *Prss55* KO マウスの精巢の RT-PCR によって *Prss51* と *Prss55* の発現パターンを調べたところ、*Prss55* の発現は *Prss55* KO マウスの精巢で失われているが、*Prss51* は引き続き発現していることを確認した(図 15D)。次に *Prss55* KO 雄マウスの生殖能力を交配試験により評価したところ、*Prss55* KO 雄マウスは著しい妊娠性の低下を示し、この結果から *Prss55* 遺伝子は、マウスの雄の生殖能力に必須の遺伝子であるということが明らかになった(図 15E)。

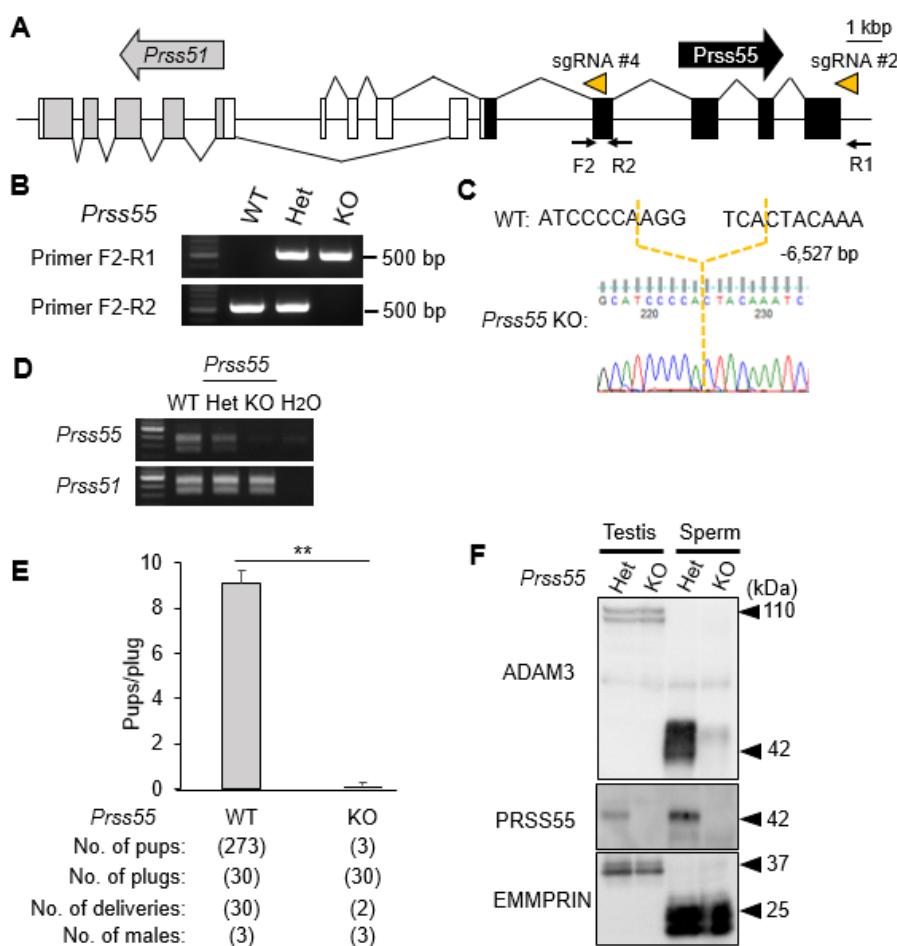


図 15

- (A) *Prss55* 遺伝子を欠損させるためのコンストラクト。遺伝子名を含む矢印は転写方向を示し、黒いボックスが *Prss55* のコード領域を、灰色のボックスが *Prss51* のコード領域を、白いボックスが非コード領域を示す。黒矢印はプライマー、黄色矢頭は gRNA 標的配列を示す。 (B) A で示したプライマーを使用した PCR による遺伝子型判定。 (C) 妊孕性解析に使用した *Prss55* KO マウス遺伝子のシークエンスの欠損を含む領域。 (D) *Prss55* KO 精巣サンプルを用いた、RT-PCR による *Prss51* と *Prss55* の遺伝子発現解析 (E) 交配試験による妊娠性を 1 プラグ当たりの産仔数で示した。 (F) *Prss55* KO 精巣・精子タンパクを用いた ADAM3 および PRSS55 のウェスタンプロット解析。 EMMPRIN はローディングコントロールとして使用した。

小括

マウスとヒトの両方で部分的に重複する遺伝子座を持つ *Prss51* と *Prss55* 遺伝子について *Prss51&55 DKO* マウスおよびそれぞれ単独の *Prss51* と *Prss55* の KO マウスを作製することにより、*Prss51* ではなく *Prss55* が雄の妊娠性に必須の遺伝子と特定でき、また精子 ADAM3 の成熟に必須であることを明らかにした。

第三編 考察

生殖器官特異的に発現するシスタチンファミリーの機能

今回私は、精巣および精巣上体に強く発現するシスタチンファミリー遺伝子に焦点を当て、シスタチンファミリー遺伝子 8 遺伝子のクラスターの領域を欠損させることにより、そのクラスター領域が雄の生殖能力、特に精子の受精能力に必要であることを明らかにした。このような遺伝子ファミリーの場合、ひとつずつ遺伝子を破壊しても他のファミリー遺伝子の発現が上昇するなど機能補償することで表現型が現れないことが考えられること、また 1 度で重要な機能を持つ遺伝子が含まれているのかを特定できるため、遺伝子ファミリーをまとめて欠損させる手法は有用である。しかしながら、より詳細な機能領域の特定や解析を行うには、領域を分割、あるいはそれぞれ単独の遺伝子欠損マウスを作製するなど、様々なパターンを考慮しなければならない。

Re-*Cst* family 欠損精子は雌性生殖路内の UTJ を移行できず、また卵丘細胞を除去した卵子を用いた体外受精では、卵子透明帯との結合能力が低下していた。これらの表現型は *Adam3* KO マウスでもみられるものであり、精子膜タンパク質 ADAM3 は、精子と卵子透明帯の結合および UTJ を介した精子の移行において極めて重要な役割を果たすと考えられている (20, 27)。図 8B の結果からも Re-*Cst* family 欠損精子において ADAM3 が消失していることから、精巣における未成熟型 ADAM3 から成熟型 ADAM3 へのプロセシングの調節に直接的あるいは間接的にでも関与している可能性が高いと考えられる。

また 8 つのシスタチンファミリー遺伝子は発現パターンによって 3 つ分ける。1 つ目が、精巣で強く発現するパターン (*Cstl1*, *Cstdc1*, *Cst13*, *Cst9*)。2 つ目が精巣上体で強く発現するパターン (*Cst11*, *Cstdc2*)。3 つ目精巣および精巣上体の両方で強く発現するパターン (*Cst12*, *Cst8*) である(図 3B)。

ADAM3 と ADAM3 との関連が示されているタンパク質とのウエスタンプロット解析の結果から、精巣内でのタンパク質量の変化はほとんど見られなかったため、今回の表現型は精巣上体での機能が影響している可能性が高いことが示唆される。

Prss51 および Prss55 遺伝子の機能

マウスとヒトの両方で部分的に重複する遺伝子座を持つ 2 つの精巣特異的な発現を示すセリンプロテアーゼ遺伝子、*Prss51* と *Prss55* の機能解析を行った。 *Prss51&55 DKO* マウスおよびそれ単独の *Prss51* と *Prss55* の KO マウスを作製することにより、PRSS51 ではなく PRSS55 が雄の妊娠性と精子 ADAM3 の成熟に必須であることを明らかにした。

最近の研究において、*Prss55* が雄の生殖能力に必要かどうかが疑問視されている。Shang によると *Prss55* KO 雄マウスが重度の雄性不妊を示すことを明らかにし [21]、Khan は、*Prss55* KO 雄マウスは生殖能力を十分有することを示している [22]。私の研究結果は、Shang らの研究結果 [21] と一致しており、それらの結果を裏付けることとなった。Khan と私や Shang との違いは、KO マウスの作製手法で、それぞれフレームシフト変異か重要なエクソンの領域欠失かであり、Khan の研究におけるインデル変異では、機能的な PRSS55 変異体をコードする、あるいは新しい転写産物を生成した可能性が考えられ、この違いが結果に大きな違いを与えた可能性がある。さらに、*Prss51* KO 雄マウスは生殖能力を持ち、*Prss51&55 DKO* 雄マウスと *Prss55* KO 雄マウスは表現型が一致し生殖能力をもたず不妊であることを見出したことから、*Prss55* は *Prss51* と異なり、マウスの雄の生殖機能に必須の遺伝子であることがわかった。

Prss55 KO マウスの精子で観察される雌性生殖路内の精子移行不全と卵子透明帯との結合能力低下という表現型は、ADAM3 タンパク質の欠失した他の KO マウスと共にしている。実際に精巣上体尾部から採取した *Prss55* KO 精子において ADAM3 タンパク質のシグナルが消失していることを見出し、PRSS55 が ADAM3 の成熟とその後の精子受精能に必要であることを示唆するものとなった。

Prss55 は精巣にのみ発現しており、精巣上体では mRNA の発現は検出されない[21]。また出生後日数ごとの RT-PCR の結果より、伸長精子または伸長精子が初めて精巣にでき始める生後 28 日目から、*Prss55* が精巣に発現していることを確認した（図 9B）。また、PRSS55 タンパク質は精巣と精巣上体尾部精

子の両方で発現していることがわかり（図 15F）、これらの結果は、PRSS55 が精巣の生殖細胞で発現し、精巣上体の精子でも保持されていることを示唆している。*Prss55* KO マウスでは、精巣上体尾部精子で ADAM3 シグナルが消失するものの、精巣での ADAM3 タンパクの質量には影響がなかった。このことから、PRSS55 は精巣の生殖細胞ではなく、精巣上体の精子において極めて重要な機能を持っている可能性がある。

PRSS55 が精子においてどのように ADAM3 に作用するのかは、まだ不明であるが、PRSS55 は、抗 PRS55 抗体による免疫沈降法で ADAM3 と直接相互作用していないことから[21]、PRSS55 は間接的に ADAM3 に影響を与える機能を持つことが示唆された。また、ADAM3 の発現に影響を与えることが報告されている少なくとも 3 つのタンパク質（ADAM2、PRSS37、tACE）は、*Prss55* KO マウスでは発現量に変化は見られなかつたため[28, 29]、PRSS55 は他の ADAM3 関連タンパク質[28-29]、あるいはまだ同定されていないタンパク質と相互作用しているのかもしれない。

精巣特異的な発現を示す遺伝子の機能を解明することは、男性不妊のさらなる原因を理解し、男性避妊薬を開発するために必要である。PRSS37 は精子形成後期の精巣生殖細胞にのみ発現し、マウスでは生殖能力に必須なタンパク質であることから[26]、PRSS37 は男性用避妊薬の開発ターゲットになりうると考えられている。私は、以下の理由から、PRSS55 が新たな避妊薬のターゲットになる可能性があると考えている。まず、*Prss55* はマウスとヒトの精巣に特異的に発現している。精巣特異的な発現は、薬物が副作用なく標的タンパク質を阻害するのに適している。第二に、PRSS55 は細胞外で機能するため、PRSS55 を阻害する薬剤は、阻害効果を発揮するために細胞内に入る必要がないことが示唆される。第三に、PRSS55 はトリプシン様セリンプロテアーゼとして知られているため、その推定酵素活性を阻害する、または基質の活性化をブロックする薬剤を開発することが可能であることがある。ただ真に PRSS55 のプロテアーゼ活性を有しているのかなど機能において未知な部分也非常に多い。PRSS55 のプロテアーゼ活性の評価や ADAM3 タンパク質のプロセシングの分子機構など、さらなる機能解析により、男性または女性の避妊薬の開発が促進されることが期待される。

第四編 結論

- I. 精巣および精巣上体に特異的に発現する遺伝子の KO マウスを複数作製し、個体レベルで妊娠性スクリーニング（交配試験）を行うことにより、効率よく、新規不妊原因遺伝子を 5 系統同定することに成功した
- II. 雄性生殖器官特異的な発現を示す 8 つのシスタチンファミリー遺伝子が含まれる約 100 kbp のクラスター領域をゲノム編集技術により、領域すべてを欠損させることができ、そのクラスター領域が雄の生殖能力、特に精子の受精能力に必要であることが明らかとなった。さらに表現型解析から、ADAM3 タンパク質との関連性を見出した。
- III. マウスとヒトの両方で部分的に重複する遺伝子座を持つ *Prss51* と *Prss55* 遺伝子について *Prss51&55 DKO* マウスおよびそれ単独の *Prss51* と *Prss55* の KO マウスを作製し解析することで、*Prss51* ではなく *Prss55* が雄の妊娠性に必須の遺伝子と特定でき、また精子 ADAM3 の成熟に必須であることを明らかにした。

第五編 謝辞

ここに博士論文としてまとめることができましたのは、大阪大学微生物病研究所教授 伊川正人先生、原英二先生のご指導、ご鞭撻の賜物であり、心より感謝申し上げます。

実験に関することで多くのご指導とご助言をいただいた大阪大学微生物病研究所遺伝子機能解析分野准教授、宮田治彦先生、遺伝子機能解析分野助教、嶋田圭祐先生、淨住大慈先生、Julio M. Castaneda 先生、江森千紘先生、Lu Yonggang 先生、同名誉教授 岡部勝先生、東京医科歯科大学疾患モデル動物解析学分野助教 遠藤墾先生、東京大学医科学研究所生殖システム研究分野准教授 小沢学先生、国立循環器病センター講師 藤原祥高先生、理化学研究所生命機能科学研究センター発生エピジェネティック研究チーム研究員 大字亜沙美博士、順天堂大学環境医学研究所研究員 飛田知央博士、中外製薬株式会社 松村貴史博士、University of Texas Southwestern Medical Center 研究員 大浦聖矢博士、大阪大学微生物病研究所遺伝子機能解析分野の諸氏に感謝いたします。

さらに、実験や論文の執筆にあたり種々のご助言をいただきました Baylor College of Medicine Martin M. Matzuk 先生に感謝いたします。

そして、本論文を指導、審査いただきました大阪大学生命機能研究科 教授 立花誠先生、林克彦先生、石谷太先生に感謝いたします。

第六編 主論文・参考論文リスト

主論文

1. Kobayashi K#, Endo T#, Matsumura T, Lu Y, Yu Z, Matzuk MM, and Ikawa M. 「Prss55 but not Prss51 is required for male fertility in mice」 Biol Reprod. 2020 Aug 4;103(2):223-234. (筆頭著者)
2. Fujihara Y#, Noda T#, Kobayashi K#, Oji A, Kobayashi S, Matsumura T, Larasati T, Oura S, Kojima-Kita K, Yu Z, Matzuk MM, and Ikawa M. 「Identification of multiple male reproductive tract-specific proteins that regulate sperm migration through the oviduct in mice」 Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Sep 10;116(37):18498-18506. (筆頭著者)

参考論文

1. Nobuyuki Sakurai, Yoshitaka Fujihara, Kiyonori Kobayashi, Masahito Ikawa 「CRISPR/Cas9-mediated disruption of lipocalins, Ly6g5b, and Ly6g5c causes male subfertility in mice」 Andrology. 2022 Nov 25. (第3著者)
2. Yoshitaka Fujihara, Kiyonori Kobayashi, Ferheen Abbasi, Tsutomu Endo, Zhifeng Yu, Masahito Ikawa, Martin M. Matzuk 「PDCL2 is essential for sperm acrosome formation and male fertility in mice」 Andrology. 2022 Oct 24. (第2著者)
3. Yamamoto T, Nakamura S, Yamano Y, Endo T, Yanagawa K, Tokumura A, Matsumura T, **Kobayashi K**, Mori H, Enokidani Y, Yoshida G, Imoto H, Kawabata T, Hamasaki M, Kuma A, Kuribayashi S, Takezawa K, Okada Y, Ozawa M, Fukuhara S, Shinohara T, Ikawa M, Yoshimori T. 「Rubicon prevents autophagic degradation of GATA4 to promote Sertoli cell function」 PLoS Genet. 2021 Aug 5;17(8): e1009688. (第8著者)
4. Yoshitaka Fujihara, Sarah Herberg, Andreas Blaha, Karin Panser, Kiyonori Kobayashi, Tamara Larasati, Maria Novatchkova, Hans-Christian Theussl, Olga Olszanska, Masahito Ikawa, Andrea Pauli. 「The conserved fertility factor SPACA4/Bouncer has divergent modes of action

in vertebrate fertilization」 Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Sep 28;118(39):e2108777118.. (第5著者)

第七編 參考文獻

1. Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep* 2013; 3:3355.
2. Fujihara Y, Kaseda K, Inoue N, Ikawa M, Okabe M. Production of mouse pups from germline transmission-failed knockout chimeras. *Transgenic Res* 2013; 22:195-200.
3. Bryja V, Bonilla S, Arenas E. Derivation of mouse embryonic stem cells. *Nat Protoc* 2006; 1:2082-2087.
4. Toyoda, Y., Yokoyama, M. and Hoshi, T. Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 16 145–151 (In Japanese) (1971).
5. D. Djureinovic, L. Fagerberg, B. Hallström, A. Danielsson, C. Lindskog, M. Uhlén, F. Pontén. The human testis-specific proteome defined by transcriptomics and antibody-based profiling. *Molecular Human Reproduction*, Volume 20 (2014)
6. V. Turk, W. Bode, The cystatins: Protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.* 285, 213–219 (1991)
7. . J. Lassus, V. P. Harjola, Cystatin C: A step forward in assessing kidney function and cardiovascular risk. *Heart Fail. Rev.* 17, 251–261 (2012).
8. S. A. Kaeser et al., Cystatin C modulates cerebral beta-amyloidosis. *Nat. Genet.* 39, 1437–1439 (2007).
9. J. Frygelius, L. Arvestad, A. Wedell, V. Töhönen, Evolution and human tissue expression of the Cres/Testatin subgroup genes, a reproductive tissue specific subgroup of the type 2 cystatins. *Evol. Dev.* 12, 329–342 (2010).
10. J. Frygelius, M. Oscarson, K. Nordqvist, A. Wedell, V. Töhönen, The reproductive tissue specific cystatin subgroup of genes: Expression during gonadal development in wildtype and testatin knockout animals. *Sex Dev.* 1, 363–372 (2007).
11. G. A. Cornwall, N. Hsia, A new subgroup of the family 2 cystatins. *Mol. Cell. Endocrinol.* 200,1–8 (2003).
12. G. A. Cornwall, H. Q. Do, A. Hewetson, A. Muthusubramanian, C. Myers, The epididymal amyloid matrix: Structure and putative functions. *Andrology* 10.1111/andr.12586 (2019).

13. S. Whelly et al., Fertility defects in mice expressing the L68Q variant of human cystatin C: A role for amyloid in male infertility. *J. Biol. Chem.* 289, 7718–7729 (2014).
14. K. M. Chau, G. A. Cornwall, Reduced fertility in vitro in mice lacking the cystatin CRE (cystatin-related epididymal spermatogenic): Rescue by exposure of spermatozoa to dibutyryl cAMP and isobutylmethylxanthine. *Biol. Reprod.* 84, 140–152 (2011).
15. V. Töhönen et al., Normal sexual development and fertility in testatin knockout mice. *Mol. Cell. Biol.* 25, 4892–4902 (2005)
16. Miyata, H. *et al.* Sperm calcineurin inhibition prevents mouse fertility with implications for male contraceptive. *Science (New York, N.Y.)* 350, 442-445, doi:10.1126/science.aad0836 (2015).
17. Yamaguchi R, Muro Y, Isotani A, Tokuhiro K, Takumi K, Adham I, Ikawa M, Okabe M. Disruption of ADAM3 impairs the migration of sperm into oviduct in mouse. *Biol Reprod* 81:142–146. 2009.
18. Yamaguchi R, Yamagata K, Ikawa M, Moss SB, Okabe M. Aberrant Distribution of ADAM3 in Sperm from Both Angiotensin-Converting Enzyme (Ace)- and Calmegin (Clgn)-Deficient Mice1. *Biol Reprod* 75(5): 760-766. 2006.
19. Ikawa M, Tokuhiro K, Yamaguchi R, Benham AM, Tamura T, Wada I, Satouh Y, Inoue N, Okabe M. Calsperin is a testis-specific chaperone required for sperm fertility. *J Biol Chem* 286(7): 5639-5646. 2011.
20. Tokuhiro K, Ikawa M, Benham AM, Okabe M. Protein disulfide isomerase homolog PDILT is required for quality control of sperm membrane protein ADAM3 and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:3850–3855. 2012
21. Shang X, Shen C, Liu J, Tang L, Zhang H, Wang Y, Wu W, Chi J, Zhuang H, Fei J, Wang Z. Serine protease PRSS55 is crucial for male mouse fertility via affecting sperm migration and sperm-egg binding. *Cell Mol Life Sci* 2018; 75:4371-4384.
22. Khan M, Jabeen N, Khan T, Hussain HMJ, Ali A, Khan R, Jiang L, Li T, Tao Q, Zhang X, Yin H, Yu C, et al. The evolutionarily conserved genes: Tex37, Ccdc73, Prss55 and Nxt2 are dispensable for fertility in mice. *Sci Rep* 2018; 8:4975.
23. Gyamera-Acheampong C, Tantibhedhyangkul J, Weerachatyanukul W, Tadros H, Xu H, van de Loo JW, Pelletier RM, Tanphaichitr N, Mbikay M. Sperm from mice genetically deficient for the PCSK4 proteinase exhibit accelerated capacitation, precocious

- acrosome reaction, reduced binding to egg zona pellucida, and impaired fertilizing ability. *Biol Reprod* 2006; 74:666-673.
24. Yamashita M, Honda A, Ogura A, Kashiwabara S, Fukami K, Baba T. Reduced fertility of mouse epididymal sperm lacking Prss21/Tesp5 is rescued by sperm exposure to uterine microenvironment. *Genes Cells* 2008; 13:1001-1013.
25. Netzel-Arnett S, Bugge TH, Hess RA, Carnes K, Stringer BW, Scarman AL, Hooper JD, Tonks ID, Kay GF, Antalis TM. The glycosylphosphatidylinositol-anchored serine protease PRSS21 (testisin) imparts murine epididymal sperm cell maturation and fertilizing ability. *Biol Reprod* 2009; 81:921-932.
26. Shen C, Kuang Y, Liu J, Feng J, Chen X, Wu W, Chi J, Tang L, Wang Y, Fei J, Wang Z. Prss37 is required for male fertility in the mouse. *Biol Reprod* 2013; 88:123.
27. . Y. Fujihara et al., SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia. *Development* 139, 3583–3589 (2012)
28. Fujihara Y, Miyata H, Ikawa M. Factors controlling sperm migration through the oviduct revealed by gene-modified mouse models. *Exp Anim* 2018; 67:91-104.
29. Fujihara Y, Oji A, Kojima-Kita K, Larasati T, Ikawa M. Co-expression of sperm membrane proteins CMTM2A and CMTM2B is essential for ADAM3 localization and male fertility in mice. *J Cell Sci* 2018; 131.
30. ヒト雄性不妊に関わるY染色体領域AZFaのマウス精子形成における機能解析 松村貴史
<https://doi.org/10.18910/72336>
31. CRISPR/Cas9システムを用いた逆遺伝学的アプローチによる精子形成メカニズムの解明 大浦聖矢 <https://doi.org/10.18910/87999>