



Title	ゲノム編集マウスのスクリーニングより得た精子運動不全マウスの解析
Author(s)	大山, 裕貴
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/96142">https://hdl.handle.net/11094/96142</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 論 文 内 容 の 要 旨

氏 名 ( 大山 裕貴 )	
論文題名	ゲノム編集マウスのスクリーニングより得た精子運動不全マウスの解析
論文内容の要旨	
<p>日本を含む先進諸国では、不妊症が大きな社会問題となっている。国立社会保障・人口問題研究所の統計調査によると、日本では夫婦の約4組に1組が不妊であるといわれており、世界保健機関の報告では不妊の約半数に男性側要因が関与している。近年、生殖補助医療技術の発展により、不妊のカップルでも子供が持てるようになってきているが、男性不妊の原因遺伝子の特定とその機能の理解は不妊症の診断や根本的な治療法確立のために求められている。精子無力症は男性不妊症の原因の1つで、精子の運動性の低下を特徴とする精子無力症の中でも完全に動かない精子をもつ患者は5000人に1人の頻度で見られる。精子無力症は原発性線毛機能不全症 (primary ciliary dyskinesia: PCD) の患者でしばしば観察されるが、これは、繊毛と精子鞭毛の両方が9+2の微小管構造からなる軸糸を運動装置として有しているためである。これまでに軸糸に関連する多数の遺伝子が精子無力症と関係することが明らかとなっており、例えば軸糸の分子モーターであるダイニンアームを構成する<i>DNAH5</i>や<i>DNAH10</i>の変異がPCDの男性で見つかっている。哺乳動物の精子鞭毛には9+2軸糸構造の他に、その周囲に外側緻密線維 (outer dense fiber: ODF)、ミトコンドリア鞘、線維鞘 (fibrous sheath: FS)、といった軸糸周辺構造が存在する。ODFは、鞭毛の中片部から主部にかけて軸糸の周りに存在する構造で、精巣上体での精子輸送中および射精中の剪断力から精子尾部を保護する役割を担っている。精子無力症患者の精子ではODFの異常が多くみられており、ODFの主要な構成要素0df1/2/3/4の発現レベルは、精子無力症患者のサンプルで低下がみられている。FSは、鞭毛の主部において軸糸の周囲を取り囲む付属構造であり、鞭毛の柔軟性を調節するだけでなく、シグナル伝達経路や代謝経路の足場としても働く。そのため、線維鞘の形成不全 (dysplasia of the fibrous sheath: DFS) は精子の運動障害につながることが知られている。FSの構成要素としては、AKAP3、AKAP4、CABYRなど多数が同定されている。<i>Akap3</i>、<i>Akap4</i>および<i>Cabyr</i>のKO雄マウスは、FSの構造欠如のために不妊であることが報告されており、これらの遺伝子の変異がヒトにおいてもDFSを引き起こす可能性が示唆されている。このように精子運動性不全には軸糸周辺構造が正しく構成されることが必要であるが、FSやODFの構造が形成される分子メカニズムについては不明な点が多い。本研究では、男性不妊の原因遺伝子を特定するため、マウスにおいて他組織よりも精巣で多く発現する遺伝子の中から、ヒトでも保存されている遺伝子を選別し、それぞれのKOマウスを作製して表現型スクリーニングを行った。その中で、単独で欠失させても雄マウスの妊娠性が低下しなかった遺伝子を第一章にまとめた。本スクリーニングでは、精子の運動性と雄マウスの妊娠性に重要な遺伝子を二つ同定した。以降の章では、KOマウスの詳細な解析を行い、<i>Tubby-like protein 2 (Tulp2)</i> 遺伝子がODF形成に重要であること (第二章)、<i>Leber congenital amaurosis 5 like (Lca5l)</i> 遺伝子がFS形成に重要であること (第三章)、を明らかにした。以上から、CRISPR/Cas9システムを用いたKOマウスの作製、および交配試験による表現型スクリーニングで、軸糸周辺構造の形成に関連する遺伝子を同定した。精子の軸糸周辺構造は体内受精を行う動物種から高度に進化しているため、今後<i>Tulp2</i>や<i>Lca5l</i>について進化的な観点から遺伝子の機能を解析することで、生物種を超えた精子形成の理解が進むと考えられる。このような基礎的な知見に加え、精子形成に必須な遺伝子の機能を理解することは男性不妊の原因究明や避妊薬の開発にも繋がるだろう。</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 大 山 裕 貴 )	
	(職)
論文審査担当者	氏 名
主 査	教授
副 査	教授
副 査	教授
副 査	教授
	伊川 正人
	水口 裕之
	辻川 和丈
	橋本 均

## 論文審査の結果の要旨

本研究はCRISPR/Cas9システムを用いて精巣特異的に発現する遺伝子を欠損したマウスを作製し、妊娠性に必須な遺伝子の同定と遺伝子の機能解析を試みたものである。

I. CRISPR/Cas9を用いて精巣特異的に発現する12遺伝子に対し、K0マウスを作製して交配スクリーニングを実施した。その結果、12遺伝子のK0雄マウスは妊娠性の低下を示さなかった。マウス個体レベルの表現型スクリーニングにより、効率的に妊娠性必須遺伝子の特定が可能であり、その遺伝子の機能解析に集中的に取り組むことができる。

II. *Tulip2* K0マウスの詳細な解析から、精子尾部の形態異常により雄の妊娠性が低下することを明らかにした。さらに、電子顕微鏡による観察から、*Tulip2* K0精子では精子中片部のODFが余分に形成されることを突き止めた。この結果は、TULP2がODFの正常な形成および維持に関与しており、ODFの配置異常が、尾部の形態異常、精子の運動障害、雄性不妊につながる可能性を示唆した。

III. *Lca5l* K0マウスの詳細な解析から、精子尾部のFS配置異常が雄妊娠性の低下の原因となることを突き止めた。さらに、近接依存ビオチン標識を用いた解析により、相互作用因子としてIFT172とPCM1を同定した。これらの結果は、LCA5LがIFT機構を介してFSの構造配置を決定している可能性を示した。

以上、本論文は、雄の妊娠性に必須な遺伝子の同定及び、精巣特異的遺伝子の機能解析を進めたことにより、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。