

Press Release

2024年2月26日

京都大学アイセムス（高等研究院 物質－細胞統合システム拠点）

科学技術振興機構（JST）

マウス精巢を用いた 個体内遺伝子スクリーニング系の開発

- ・ 個体臓器レベルでの CRISPR Cas9^{*1} システムを用いた遺伝子スクリーニングに成功
- ・ マウス精巢を用いた遺伝子スクリーニング系の確立
- ・ マウス精子の品質を決定する遺伝子の同定にも成功

京都大学アイセムス（高等研究院 物質－細胞統合システム拠点）の鈴木淳教授、野口勇貴特定研究員、圓岡真宏特定助教らの研究グループは、北海道大学の小野寺康仁准教授、山口大学の宮本達雄教授、徳島大学の小迫英尊教授らのグループと共同で、個体臓器を用いた遺伝子スクリーニング系の開発に成功しました。この成果は、3月6日（日本時間）に *Cell Genomics* 誌（Cell Press）においてオンライン公開されます。

<概要>

個体を構成する各臓器は、個々の細胞で起こるさまざまな生化学反応が連動することで機能を発揮しています。生化学反応の各過程を制御するタンパク質は、遺伝子に情報がおさめられており、それぞれの細胞で発現し機能する遺伝子を同定することにより、生化学反応の理解が進みます。これまで、特にがん細胞などの細胞株を用いて、特定の生化学現象に注目した網羅的な遺伝子の解析（スクリーニング）が行われてきました。近年では、ノーベル賞を受賞した CRISPR Cas9 システムを用いた遺伝子のスクリーニングが行われてきましたが、個体の臓器レベルでのスクリーニングを行うことは困難でした。今回、野口研究員らは、個体臓器、特にマウスの精巢を用いた遺伝子スクリーニング系を開発し、精子の品質を決定する遺伝子を同定することに成功しました。

マウス精巢内で精子幹細胞から発生する精子は、受精能獲得刺激により精子尾部・頭部において細胞外カルシウムが流入することで活性化し、卵子との受精が可能となります。ゆえに、カルシウムの流入は、精子の品質（受精獲得能）を保證する指標の一つとして適用することができます。そこで野口研究員は、受精能を有する精子の品質を規定する遺伝子を同定することを目的として研究を進めました。まず、マウス精巢の生殖細胞において遺伝子をランダムに欠損させ、成熟した精子のカルシウムの流入を指標として、精子の品質決定に関与する因子を同定することを試みました。この時、一度同定した遺伝子群を別のマウスの精巢で欠損させることで、偽陽性の遺伝子を排除し、真に関与する遺伝子のみを絞り込む方法論を確立しました。さらに、同定した因子 RD3 の結合因子とそれらの発生時における発現解析から、発生時のどのような状況下において RD3 が機能するか、計算機を用いて特定する方法論も確立しました。これらの技術を組み合わせることで、円形精子が発生の特定の時期にミトコンドリアを適切に分布させ活性酸素を減少させる巧妙な仕組みが明らかになり、それが精子の品質を保證することも分かりました。

本研究により、精子の品質を網羅的に同定する方法論が確立されました。今後、今回確立されたスクリーニング技術を改善することで、より多くの遺伝子が同定され、不妊のメカニズム

の解明、さらに避妊薬の開発が進むことが期待されます。また、同様のスクリーニングの方法論は他の臓器においても用いることができるため、今後、他の生化学現象の解明、並びに創薬標的の発見にも繋がることを期待されます。

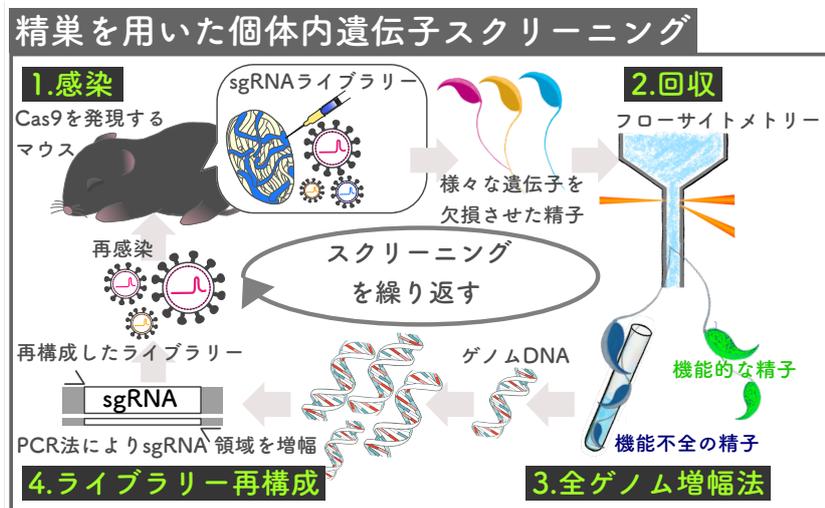
1. 背景

CRISPR/Cas9 sgRNA^{※2} ライブラリー^{※3} を用いたゲノムワイドスクリーニング^{※4} 法は特定の生物学現象のメカニズムを解明する上で強力な方法として広く使用されてきました。特に、細胞の増殖性をスクリーニングの標的にすることで、がん細胞の増殖メカニズムなどが明らかにされ、創薬開発などを促進してきました。一方で、細胞の増殖とは直接関連のない、一過的で不安定である細胞内の生物学現象のメカニズムをスクリーニングにより明らかにすることは困難でした。このような問題点を克服するために、鈴木グループでは新しいスクリーニングの方法論、「リバイバルスクリーニング法」を樹立し、不安定な生化学反応においてもスクリーニングを実施することを可能にしました（2021年 Molecular Cell 誌に発表、<https://www.icems.kyoto-u.ac.jp/news/3946/>）。

しかしながら、マウス個体の臓器内でこのようなゲノムワイドスクリーニング法(*in vivo* スクリーニング法)を実施することは未だ困難なままです。近年、脳や心臓、そして肝臓などを標的にした *in vivo* スクリーニング法が提案されてきましたが、これらは細胞の増殖性に依存したスクリーニングに留まり、生化学反応を直接標的とする *in vivo* スクリーニング法は実現できていません。こうした背景から、本研究では、生化学反応を直接標的とする *in vivo* スクリーニング法の樹立を目指し、リバイバルスクリーニング法をマウスの精巣に応用し、成熟した精子の生化学反応を指標として、精子形成における精子の品質決定因子を網羅的に同定することを試みました。

2. 研究内容と成果

上述したリバイバルスクリーニング法をマウスの精巣に応用する上で、本研究では、①センダイウイルスのエンベロープタンパク質を有するレンチウイルスベクター^{※5} を用いることで、高い効率で sgRNA ライブラリーを精子幹細胞へ導入可能にする方法、②成熟した精子の生化学反応(精子のカルシウム流入)を適切に誘導し補足する方法、③プライマーゼを用いた全ゲノム増幅法^{※6} を用いることで数が少ない精子からでもゲノムDNAを用いた解析を可能にする方法、④ゲノムDNAに組み込まれた sgRNA 領域を PCR により増幅することでライブラリーを再構築し、次のスクリーニングに用いる方法を一つずつ確立しました。その結果、精子の品質決定に関与する因子として RD3 遺伝子の同定に成功しました。加えて、精巣細胞内において、同定した RD3 がどのような分子シグナル経路で制御されているのかを推定できるソフトウェア「Hub-Explorer」を開発し、単細胞の遺伝子発現を扱うシングルセル解析と網羅的なタンパク質発現



を扱うプロテオミクス解析と組み合わせることで RD3 が精子形成期においてミトコンドリアを円形精子内で適切に分布させ、酸化ストレスレベルを制御していることを明らかにしました。

本成果は、精子形成を制御する分子メカニズムの網羅的な解明を可能にする方法と、計算機を用いた細胞種特異的な分子シグナル経路の機能推定法を提案するものであり、これまでのノックアウトマウスなどを用いて遺伝子の機能の一つずつ明らかにするような生殖細胞の研究方法に、網羅的アプローチという新たな切り口を与え、将来のさらなる重要な発見を後押しする意義があると考えられます。

3. 今後の展開

近年、世界的な人口爆発を解決すべく、女性のみならず男性も使用可能な避妊薬(男性避妊薬)の開発が希求されており、Bill & Melinda Gates Foundation に代表される財団が大規模な助成を提供しています。本研究で樹立した、精巣を標的とする *in vivo* スクリーニング法は、このような男性避妊薬や不妊症治療薬などの創薬ターゲットを網羅的に同定することができる可能性があり、基礎医学的にも社会的にも大きな波及効果が期待されると考えます。また、精巣にとどまらず、その他の臓器に対しても同様のスクリーニングを適用することで、さまざまな基礎的な分子メカニズム、病態理解、そして創薬開発につながることを期待されます。

4. 用語解説

- ※1 CRISPR/Cas9 : CRISPR/Cas9はDNAを切断する酵素で、バクテリアにおける免疫システムの一部として自然に存在し、侵入してきたファージなどのDNAを識別して切断します。
- ※2 sgRNA : short guide RNA (sgRNA) は、Cas9を特定のDNA配列に導くための短いRNAです。
- ※3 sgRNAライブラリー : さまざまなDNA配列を標的とする異なるsgRNAのミックスです。
- ※4 ゲノムワイドスクリーニング : sgRNAライブラリーを細胞に導入し、一度にさまざまな遺伝子を編集・欠損させ、網羅的な遺伝子解析を行うことを言います。
- ※5 レンチウイルスベクター : ヒト免疫不全ウイルス (HIV) などに代表されるレンチウイルスの病原性を取り除き、特定の遺伝子を細胞にデリバリーすることができるようにしたシステム。
- ※6 全ゲノム増幅法 : 非常に微量なDNAサンプルから全体のDNAを増幅する方法のことを言います。特に本研究では、プライマーゼという酵素を用いることにより、偏りのない増幅を可能にしています。

5. 研究プロジェクトについて

1. Grants-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (Grant No. 21H00230 to J.S.),
2. Japan Science and Technology Agency (JST) Fusion Oriented Research for disruptive Science and Technology (FOREST) (Grant No. JPMJFR2162 to J.S.),
3. Joint Usage and Joint Research Programs of the Institute of Advanced Medical Sciences of Tokushima University (to J.S.),
4. Grant-in-Aid for Research Activity Start-up (Grant No. 22K20972 to Y.N.),
5. Japan Science and Technology Agency (JST) Support for Pioneering Research Initiated by the Next Generation (SPRING) (Grant No. JPMJSP2110 to Y.N.)
6. Sasakawa Scientific Research Grant from The Japan Science Society (Grant No. 2022-4005 to Y.N.).

6. 論文タイトル・著者

“In vivo CRISPR screening directly targeting testicular cells”

(精細胞を標的とした個体内でのCRISPRスクリーニング)

著者：Yuki Noguchi, Yasuhito Onodera, Tatsuo Miyamoto, Masahiro Maruoka, Hidetaka Kosako, Jun Suzuki

Cell Genomics | DOI: