

課題番号 92

## 生殖細胞の受精および発生能力形成に寄与する 新規遺伝子群の探索とその機能の解析

### [1] 組織

代表者：平舘 裕希  
(東北大学大学院農学研究科)

対応者：安井 明、菅野 新一郎  
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：消耗品 3万円

### [2] 研究経過

近年のゲノム編集技術の著しい進歩により、個体レベルでの遺伝子機能欠損の影響を解析するためのノックアウトマウス作製に要する金銭的、技術的ハードルが大幅に低下し、最初にノックアウトマウスを作製し表現型をスクリーニングするという選択肢を容易に選べるようになった。本研究では未だ多くの機能不明遺伝子が多く残されている精巣を対象として、ヒトオルソログを持ち、かつタンパクレベルでの発現が報告されている幾つかの機能不明遺伝子を選定し、遺伝子機能破壊モデルを作製することにより雄性生殖細胞の分化や受精現象に対して寄与する新規責任遺伝子の同定とその機能解明を行うことを目的として研究を行なった。

以下、研究活動状況の概要を記す。安井加齢研フェロー、菅野講師とは数回訪問し、研究進捗の節目に応じてその都度メールにて打ち合わせを行い対象遺伝子のクローニング及びアミノ酸配列等からモチーフ解析を行い機能の推定を行なった。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

並行して代表者は CRISPR/Cas9 を用いた iGONAD 法 (Gurumurthy et al, 2019) を用いて幾つかの遺伝子欠損マウスモデルを作製し、交配試験によって表現型の探索を行なった。その一つとして、*Axdnd1* (Axonemal dynein light chain containing 1) 欠損雄マウスが不妊を呈すること、精巣重量が野生型と比較して有意に低下することを見出した。さらに組織切片を作製して PAS 染色を行うと、精細胞伸長時

にその形態に異常を呈し、完成段階では精子がほぼ消失することが判明し、*Axdnd1* は精子形態の完成に必要な不可欠な遺伝子であることを明らかにした。さらに TUNEL 染色により有意なアポトーシス頻度の増加が認められたことから、分化段階の生殖細胞の維持生存にも何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。以上の結果を日本生殖医学会の学会誌である *Reproductive Medicine and Biology* 誌に投稿し、リバイスの後受理された(成果資料)。

他にも精子の運動不全により不妊を呈する原因遺伝子 A を見出している。安井加齢研フェロー、菅野講師が行なったクローニングと大腸菌発現により得られた GST タグ付きリコンビナントタンパクとマウス精巣のエキストラクトを用いてプルダウンアッセイが行われ、質量分析により幾つかの重要な相互作用タンパクが同定されている。さらにまだノックアウトマウスの作製に至ってはいないものの、ユニークなモチーフを有するタンパクをコードする候補遺伝子の解析も残されており、新しい知見が期待される。以上のようにノックアウトマウスの表現型解析とともに、これら生化学的データが示す関連分子との相互作用がどのようにして受精能力の構築に寄与しているのかを明らかにしていく。

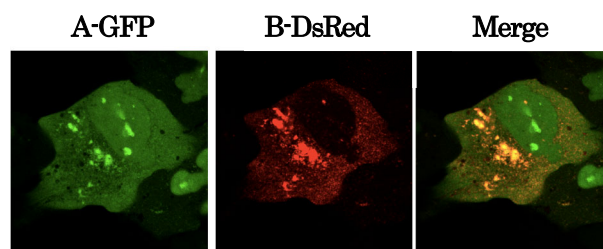


図. 同定した新規原因タンパク A とその関連タンパク B の局在。それぞれベクターで GFP と dsRed を繋げた後に USO2 細胞株に共発現させた。A は主に核に局在するが、顆粒において B と共局在することが示唆された。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

同じく *Axdnd1* がヒト無精子症の原因遺伝子であることが中国のグループにより報告された (Ma et al, 2021)。先んじられたが、代表者の選抜した遺伝子群が

重要な遺伝子を含んでいることの証左であり、他にも表現型を示す遺伝子を見出していることから、男性の不妊症に対する理解に大きく貢献する成果につながることを期待される。引き続き解析を行う。

#### 参照文献

1. Gurumurthy CB, Sato M, Nakamura A, Inui M, Kawano N, Islam MA, Ogiwara S, Takabayashi S, Matsuyama M, Nakagawa S, Miura H, Ohtsuka M. Creation of CRISPR-based germline-genome-engineered mice without ex vivo handling of zygotes by i-GONAD. *Nat Protoc*. 2019; **14**(8):2452-2482.

2. Ma Q, Cao C, Zhuang C, et al. AXDND1, a novel testis-enriched gene, is required for spermiogenesis and male fertility. *Cell Death Discov*. 2021; **7**(1):348.

#### [4] 成果資料

Yuki Hiradate, Ryua harima, Rin Yanai, Kenshiro Hara, Kazue Nagasawa, Makoto Osada, Tomoe Kobayashi, Makoto Matsuyama, Shin-Ichiro Kanno, Akira Yasui, Kentaro Tanemura ; Loss of *Axdnd1* causes sterility due to impaired spermatid differentiation in mice. *Reprod Med Biol*. 2022; **21**(1): e12452.