

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	野口 勇貴
論文題目	精子形成のインテグリティ解明に向けた生体内ゲノムワイドスクリーニング法の樹立		
(論文内容の要旨)			
<p>CRISPR/sgRNA ライブラリーを用いたゲノムワイドスクリーニング法は、網羅的な分子機能解析において効果的な手法の 1 つとされている。しかしながら、この手法は主に細胞の増殖や生存を対象としており、生化学反応を対象とすることが課題とされてきた。細胞の増殖に依存しない現象を対象とする場合には、適切な実験系の構築と sgRNA の濃縮方法の開発が必要である。この問題を解決するため、当研究室では細胞の生化学反応を捉えるためにフローサイトメトリーを用いたソーティングを行い、得られた細胞からライブラリーを再構成するリバイバルスクリーニング法を考案した。これにより、CRISPR/sgRNA ライブラリーを用いて様々な生化学反応に関与する因子を同定することが可能となっている。しかし、現在までこの手法は主に細胞株に限定されており、マウス個体組織の細胞には適用されていない。そこで、申請者は、リバイバルスクリーニング法をマウス精巣に適用し、精子形成のインテグリティの決定機構を網羅的に明らかにすることを試みた。具体的には、雄生殖細胞特異的なレンチウイルスによる sgRNA ライブラリーの導入方法、精子の生化学的な機能 (カルシウム流入) に基づいた精子形成能の評価法、精子のゲノム DNA を増幅後ゲノムに組み込まれた sgRNA を読み出しライブラリーを再構成する方法を確立し、精巣を対象とした <i>in vivo</i> スクリーニング法の基盤を構築した。このスクリーニング系を用いて、精子形成のインテグリティに関わる因子を探索した結果、レーバー先天性黒内障の原因遺伝子として知られる Retinal Degeneration 3(RD3)を同定した。遺伝子発現解析により、RD3 は精巣、特に円形精子に高発現していることが明らかとなった。さらに、細胞株を用いたプロテオミクス解析と精巣タンパク質の密度勾遠心解析により、RD3 は円形精子においてミトコンドリアと相互作用していることが示唆された。さらに、RD3 とミトコンドリアの相互作用を制御するシグナル経路を同定するために、細胞種特異的なシグナル経路同定ツール「Hub-Explorer」を開発した。これにより、RD3 は円形精子において繊毛形成誘導時にミトコンドリアと相互作用することが示された。また、繊毛形成誘導時には活性酸素の蓄積が誘導されることが明らかとなり、RD3 はミトコンドリアの細胞内での分散を促進することで、酸化ストレスによる細胞損傷を軽減する役割を担うことが分かった。本研究は、個体臓器を用いた新しいスクリーニング系を確立し、それを用いて精巣のインテグリティに関与する因子を同定し、その機能を解明したことに意義がある。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

細胞が示す様々な現象の分子機構の解明には、網羅的な遺伝子解析が有効である。現在、異なる細胞の遺伝子発現を比較することにより、特定の現象に関わる遺伝子を同定する試みが盛んであるが、注目する現象に特化した機能的スクリーニングは遺伝子同定において強力なアプローチの一つである。申請者が所属する研究室では、CRISPR/sgRNA ライブラリーを細胞株に用いて、死にゆく細胞や増殖しない細胞を用いても機能的スクリーニングが可能なリバイバルスクリーニング法を開発してきた。しかしながら、同様の手法を個体臓器に適用することは困難であった。本論文で申請者は、この課題に取り組み、個体臓器を用いたリバイバルスクリーニング法を開発した。細胞株を用いたスクリーニングとは異なり、個体臓器（本論文では精巣）を用いると、①特定の細胞に遺伝子を導入する技術、②不均一とされる集団を用いて注目する現象を的確に評価する実験系の確立、③標的細胞を集め、ゲノム DNA を増幅し sgRNA 領域を読み出す技術の確立など、細胞株を用いた実験とは異なる障壁が存在する。申請者はそのような課題を 1 つずつ解決することにより、精巣以外の他の臓器にも適用可能な *in vivo* リバイバルスクリーニング法を樹立した。またこの手法を用いて精子のインテグリティを決定する分子をスクリーニングした結果、RD3 を同定し、それが円形精子においてミトコンドリアの分散を制御することで活性酸素の蓄積を抑制することを見出した。本スクリーニングによって、精子のインテグリティを制御する因子の一つが同定されたものの、遺伝子同定の網羅性は細胞株を用いた場合と比較して低く、今後、実験系の改良を重ねることによってその網羅性を高めることができると考えられた。さらに、RD3 が高発現する網膜と精巣における RD3 の機能の共通性に関して、RD3 は、異なる種類の細胞における繊毛発生時の酸化ストレスを軽減することがその共通の機能として考えられた。また遺伝子発現の様式はこれら 2 つの臓器で異なることから、発現量の調節も重要であることが議論された。さらに、申請者が開発した細胞種特異的なシグナル経路同定ツール「Hub-Explorer」においては、発生等の時間軸が入ることによりシグナル同定を可能としているが、同じ細胞からなる細胞株を用いても、薬剤やリガンド投与後の時系列データを組み合わせることでシグナル同定が可能となる汎用性のある技術であることも議論された。

以上のように本論文は、生命科学の理解・発展に寄与する新しい知見、技術開発を含み、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。更に、令和 6 年 3 月 11 日に、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。（ただし、学位規則第 8 条の規定により、猶予期間は学位授与日から 3 ヶ月以内を記入すること。）