

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10638

研究課題名(和文)核周囲物質と中心体関連分子を指標とした哺乳動物精子の卵活性化能評価の開発

研究課題名(英文) Study for the evaluation method for mammalian sperm oocyte-activation ability with perinuclear theca and centrosome-related molecules as indicator

研究代表者

伊藤 千鶴 (ITO, Chizuru)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：80347054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：精子核周囲物質(PT)と卵活性化能との関係を解析するために、PTと複合体を形成する先体膜タンパク質エクアトリン(Eqtn)の受精過程における役割をEqtn欠損マウスを作製して解析した。その結果、Eqtnは、Izumo1やCd9とは独立して卵子-精子細胞膜接着に関与するとともに、卵活性化を含めた胚発生にも関与することが示唆された。抗Eqtn抗体を用いてヒト精子の質の評価を検討した。中心体関連分子Odf2-4-mCherryトランスジェニックマウスを作製し、Odf2欠損マウスやOdf2-2a-EGFPマウスと比較解析することによってOdf2 isoformの受精機能解析を開始した。

研究成果の概要(英文)：Equatorin (Eqtn) is an acrosomal membrane protein that forms a complex with perinuclear substances of spermatozoon. To clarify the role of perinuclear substance-related molecules in oocyte activation, we generated and analyzed Eqtn-deficient mice. The results suggested that Eqtn was involved not only in the sperm-egg membrane adherence independent of Izumo1 and Cd9 but also in embryonic development including oocyte activation. We analyzed the difference of Eqtn localization in sperm of fertile volunteers and male infertile patients to evaluate the validity of anti-Eqtn antibodies for the quality of sperm. We generated Odf2-4-mCherry transgenic mouse line and started to analyze the function of Odf2 isoforms comparing with Odf2-deficient mice and Odf2-2a-EGFP transgenic mice that were generated previously.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精子 受精 卵子活性化 男性不妊症 エクアトリン Odf2

1. 研究開始当初の背景

受精卵の減数分裂再開には精子の赤道部から先体後領域の核周囲物質が関与し、ヒトやウシではその後の雌雄前核の融合に関与する精子星状体の形成には精子中心体が必要であると考えられている。核周囲物質や中心体には数種類の分子が存在することが判っていたが、詳細不明で局在もはっきりしないものが多く、卵活性能を評価できる指標はほとんどない。申請者らは、ヒトを含むほ乳類の精子先体膜に特異的に局在するタンパク質である Equatorin (Eqtn) に注目し、先行する研究課題で作成した Eqtn-EGFP トランスジェニック (Tg) マウスを用いて、精子形成と受精現象を高解像蛍光顕微鏡で解析した結果、Eqtn は先体形成時に先体外膜と先体内膜に配備され、外先体膜に配備された Eqtn の一部は先体反応過程で精子-卵子細胞膜融合の場である精子頭部赤道部の細胞膜に移動し、内先体膜に配備された Eqtn は受精過程で核周囲物質と複合体を形成し卵細胞内に取り込まれることを明らかにした。これらの結果と抗 Eqtn 抗体が受精を阻害することから、Eqtn は受精において複数の機能を持つことが考えられたため、申請者らは Eqtn 欠損マウスを作成した。その結果、雄 Eqtn 欠損マウスの産仔数が有意に低いことが分かった。中心体に関しては、中心体関連分子 Odf2 を欠損する雄性不妊モデルマウスと Odf2-2a-EGFP Tg マウスを作製して、先行研究課題から継続して研究を続けていた。以上より、Eqtn と Odf2 の不妊の原因を明らかにし、卵活性化能の評価の指標に使えるかを検討する必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子改変マウスを用いて、核周囲物質と複合体を形成する先体膜タンパク質 Eqtn と中心体関連タンパク質 ODF2 の詳細な性状と関連分子との相互作用を明らかにし、受精に必要な分子機構を解明することを目的とした。具体的には、(1) Eqtn 欠損マウスの産仔数減少の原因 (Eqtn の精子形成および受精過程特に卵活性における挙動と役割の解析)、(2) Odf2 isoform による局在や機能の違いについて、遺伝子欠損マウスと Tg マウスを用いて受精実験、光学顕微鏡および電子顕微鏡による形態学的解析、生化学的解析を行う。(3) 新規の雄性不妊モデルマウス (Slc22a14 欠損マウス：静岡大与語準教授と Lppta3 欠損マウス：国立医療研究センター菱川博士) の不妊と卵活性化との関連を形態学

的に解析する。(4) 不妊症マーカーとしての抗 Eqtn 抗体の効果を、検体数をふやして検証し、ヒト精子の卵活性化能評価法への臨床応用を図る。

3. 研究の方法

(1) 雄 Eqtn 欠損マウスの産仔数減少の原因の解析

① 精巣および精巣上体の形態・重量を野生型マウスと比較した。高解像光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて精子形態の異常の有無を調べた。精子運動能測定装置を用いて精子の運動能を測定して野生型マウス精子と比較した。

② 正確な産仔数および胎児体重の値を得るために、雄 Eqtn 欠損マウスと野性型雌マウスを交配し、膣栓形成後 17 日目に帝王切開により胎児を得、野生型同士を交配して得た胎児 (コントロール) と比較した。

③ In vivo での 2 細胞形成率と前核形成率を解析するために、雄 Eqtn 欠損マウスと野性型雌マウスを交配し、膣栓形成後 24 時間後の卵管膨大部から採取した受精卵の 2 細胞形成率、5 時間後と 10 時間後の前核形成率を、野生型同士を交配して得た卵 (コントロール) と比較した。

④ In vivo での受精の進行過程を解析するために、雄 Eqtn 欠損マウスと野性型雌マウスを交配し、膣栓形成後 5 時間と 10 時間の卵管膨大部から採取した未受精卵の囲卵腔内精子数を、野生型同士を交配して得た卵 (コントロール) と比較した。

⑤ 先体反応に異常がないかを調べるために、Eqtn 欠損マウスと Acrosin-GFP Tg マウスを交配して作製した雄 Eqtn-KO-Acr-GFP Tg マウスと雄 Acrosin-GFP Tg マウス (コントロール) の精子を、カルシウムイオノフォーを用いて先体反応を惹起させ、フローサイトメーターで反応経過を比較した。

⑥ 子宮-卵管移行部から卵管膨大部までの運動能の有無を調べるために、雄 Eqtn 欠損-Acr-GFP Tg マウスと雄 Acrosin-GFP Tg マウス (コントロール) をそれぞれ野生型雌と交配させ、膣栓形成後に雌の卵管を摘出して、精子の進行を蛍光実体顕微鏡で撮影した。

⑦ Eqtn と精子に局在する他の主要受精関連分子 (Izumol, Spaca1, Snap25, Adam3, Spesp1, sperm Cd9, MN13) の関係を解析するために、抗特異抗体を用いて western blot と蛍光抗体法をおこなって、当該分子の局在の有無を調べた。

⑧ 先体反応時の Izumo-1 と卵由来 Cd9 の動

態を解析するために、雄 Eqtn 欠損マウスと雌 Cd9-EGFP Tg マウスを交配させて腔栓形成後に卵管膨大部から摘出した卵子-精子を抗 Izumo1 抗体染色して高感度蛍光顕微鏡で解析した。

⑨ Eqtn が産仔数減少の原因分子であることを確認するために、Eqtn 欠損 Tg (Eqtn) レスキューマウスを作製した。これを野生型雌と交配させ、野生型同士を交配して得た産仔数 (コントロール) と比較した。

⑩ Eqtn の先体膜への局在および輸送過程を解析するために、Eqtn-EGFP Tg マウスの詳細な解析 (超顕微鏡 STED 撮影画像および電顕的免疫染色法を用いた撮影画像の解析) を先行研究課題から継続して行った。

(2) Odf2 isoform による局在や機能の違いを解析するために、カルメジンプロモーターをもつ Odf2-4-Cherry Tg マウスを新たに作製した。また、中心体関連分子 Spatc1-Cherry Tg マウスを作製した。

(3) Slc22a14 欠損マウスと Lptta3 欠損マウスの精子および精巣を電子顕微鏡にて詳細に観察し、不妊の原因を解析した。

(4) 8 検体の男性不妊症患者精子と妊孕性のある男性ボランティアの精子を MN9 抗体と Eqtn 59-72 番目のアミノ酸残基をエピトープとする hEQT 抗体を用いて蛍光抗体法にて解析した。

4. 研究成果

(1) ① Eqtn 欠損マウスの精巣および精巣上体の大きさ・形態・重量は、野生型と差異がなかった。

② Eqtn 欠損雄マウスの産仔数(胎児数)は野生型雄に比べて有意に少なく、胎児体重は有意に低かった。

③ 腔栓形成後の 24 時間後の 2 細胞形成率、10 時間後と 5 時間後の前核形成率は有意に減少していた。

④ 腔栓形成後の 5 時間後と 10 時間後の未受精卵と囲卵腔内の精子数は有意に増加していた。

⑤ 先体反応は、野生型と同様に進行した。

⑥ Eqtn 欠損精子は、野生型と同様に子宮-卵管移行部を通過して卵管膨大部に到達した。

⑦ Eqtn 精子には、Eqtn を除いて主要な受精関連タンパク質が局在していた。

⑧ Eqtn 欠損精子に局在する Izumo1 は先体反応時に野生型と同様に先体赤道部に移動し、卵子から放出された Cd9 は Eqtn 欠損精子に付着した。

⑨ 雄 Eqtn 欠損 Tg (Eqtn) レスキューマウスの

産仔数は、野生型と同じに回復した。

これらのことから、Eqtn は、Izumo1 や Cd9 とは独立して精子-卵子細胞膜接着に関与していると考えられた。また、Eqtn 欠損マウスが父親である胎児の体重が同日齢の野生型と比べて有意に低いこと、Eqtn-EGFP が前核形成期まで残存することから、Eqtn は受精後の胚発生に何らかの機能をもつことが考えられた。

⑩ Eqtn の精子形成過程における精子への輸送と局在に関して、先行研究課題から引き継いだ研究成果をまとめて論文発表した (Ito et al, *Microscopy* 2016)。また、ヒト精子の先体に局在する主要受精関連タンパク質の局在と機能に関するレビュー論文を発表した (Ito et al, *Anat Sci Int* 2016)。

(2) Odf2-4-Cherry Tg マウスは 3 系統の F0 マウス、Spatc1-Cherry Tg マウスは 2 系統の F0 マウスが得られた。野生型マウスとの交配によって F1 マウスを作った。Spatc1-Cherry Tg F1 マウスは、精子頸部に弱い蛍光が見られている。現在、交配により蛍光強度の強い Tg マウスを作製継続し、解析を進めている。

(3) Slc22a14 欠損マウスは、精子尾部の annulus の形成不全による奇形精子症のために不妊となり、卵活性化とは関連がなかった (Maruyama et al, *Sci Rep* 2016)。Lptta3 欠損マウスは、精子頭部の細胞質除去機構の破綻による奇形精子症のために不妊となり、卵活性化とは関連がなかった (Iizuka-Hishikawa et al, *J Biol Chem* 2017)。

(4) 健常者と男性不妊患者の射出精子では、Eqtn 陽性精子数と Eqtn の局在に違いがあることがわかった。抗 Eqtn 抗体によって卵活性化能を評価できるかどうかはさらに検討が必要であるが、精子の質を評価できるマーカーであることは証明できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Oami T, Ito C, Toshimori K, Oda S. (他 6 名, 7 番目). Blocking liver autophagy accelerates apoptosis and mitochondrial injury in hepatocytes and reduces time to mortality in a murine sepsis model. *Shock*. In press 2017.(doi:10.1097/SHK.0000000000001040) 査読有

- ② Kaneko T, Toshimori K, Iida H. Subcellular localization of MS4A13 isoform 2 in mouse spermatozoa. *Reproduction*. 154:843-857. 2017. (doi: 10.1530/REP-17-0477) 査読有
- ③ Dong Y, Ito C, Toshimori K, Koseki H (他 12 名, 8 番目). EPC1/TIP60-mediated histone acetylation facilitates spermiogenesis in mice. *Mol Cell Biol*. 37pii: e0082-17.2017. (doi: 10.1128/MCB.00082-17) 査読有
- ④ Iizuka-Hishikawa Y, H Ito C, Toshimori K, Shimizu T. (他 9 名, 10 番目) Lysophosphatidic acid acyltransferase 3 tunes the membrane status of germ cells by incorporating docosahexaenoic acid during spermatogenesis. *J Biol Chem*. 292:12065-76. 2017. (doi:10.1074/jbc.M117.791277) 査読有
- ⑤ Oami T, Ito C, Toshimori K, Oda S. (他 5 名, 7 番目) Suppression of T cell autophagy result in decreased viability and function of T cells through accelerated apoptosis in a murine sepsis model. *Crite Care Med*. 45:e77-e85.2017. (doi: 10.1097/CCM.0000000000002016) 査読有
- ⑥ Ito C, Toshimori K. (1 番目) Acrosome markers of human sperm. *Anat Sci Int*. 91:128-142.2016.(doi:10.1007/s12565-015-0323-9) **Review**. 査読有
- ⑦ Maruyama SY, Ito C, Toshimori K, Yogo K. (他 4 名,5 番目) A critical role of solute carrier 22a14 in sperm motility and male fertility in mice. *Sci Rep*. 6:36468. 2016. (doi: 10.1038/strep36468) 査読有
- ⑧ Chen C, Ito C, Toshimori K. (他 4 名,5 番目) Interaction between basigin and monocarboxylate transporter 2 in the mouse testes and spermatozoa. *Asian J Androl*. 18(4): 600-606. 2016. (doi: 10.4103/1008-682X.157650) 査読有
- ⑨ Ito C, Yamatoya K, Toshimori K. (1 番目) Analysis of the complexity of the sperm acrosomal membrane by super-resolution stimulated emission depletion microscopy compared with transmission electron microscopy. *Microscopy (Oxford)*. 64:279-287.2015.(doi:10.1093/jmicro/dfu101) 査読有
- ⑩ Kishimoto A, Ishiguro-Oonuma T, Takahashi R, Maekawa M, Toshimori K, Watanabe M, Iwanaga T. Immunohistochemical localization of GLUT3, MCT1, and MCT2 in the testes of mice and rats: the use of different energy sources in spermatogenesis. *Biomed Res (Tokyo)* 36:225-234.2015. 査読有 (doi:10.2220/biomedres.36.225.) 査読有
- ⑪ Toshimori K. Sperm-egg meeting: challenges for infertility diagnosis and treatment based on basic research. *Chibaigaku*.91:161-166.2015. (URL:http://opac.ll.chiba-u.jp/da/curator/900119049/) 査読有

[学会発表] (計 19 件)

- ① 伊藤千鶴、年森清隆、(他 5 名, 1 番目) 受精における先体膜タンパク質 Equatorin の役割 第 123 回日本解剖学会総会・学術集会 (ポスター) 2018 年
- ② 年森清隆、伊藤千鶴 卵子に進入した精子頭部の脱凝集と鞭毛の卵子内進入時期の再検討: 体内受精の解析 第 123 回日本解剖学会総会・学術集会 (ポスター) 2018 年
- ③ 年森清隆、伊藤千鶴 精子頭部脱凝集と鞭毛の卵子内進入の時期の再検討: マウス体内受精に基づく解析 第 62 回日本生殖医学会学術講演会・総会 (ポスター) 2017 年
- ④ 伊藤千鶴 受精における精子膜の変化 第 35 回日本受精着床学会総会・学術講演会 シンポジウム 6 受精のしくみ (招待講演) 2017 年
- ⑤ 菱川 (飯塚) 佳子、伊藤千鶴、年森清隆、清水孝雄 (他 9 名, 10 番目) 第 59 回日本脂質生化学会 精子形成における DHA 含有リン脂質の役割の解明 (一般講演) 2017 年
- ⑥ 伊藤千鶴 精子選別の quality control (精子の機能評価) 第 61 回日本生殖医学会学術講演会・総会 (教育講演) 2016 年
- ⑦ 伊藤千鶴、年森清隆 配偶子膜融合関連タンパク質 Equatorin と Izumo に対する抗体を用いた先体反応評価の試み 第 61 回日本生殖医学会学術講演会・総会 (ポスター) 2016 年
- ⑧ 年森清隆、伊藤千鶴 受精卵からの精子鞭毛放出: マウス受精卵発達過程 time laps 解析 第 61 回日本生殖医学会学術講演会・総会 (一般講演) 2016 年
- ⑨ 与語圭一郎、年森清隆、伊藤千鶴 (他 4 名, 6 番目) Oligotriche 遺伝子座に存在する不妊原因遺伝子の同定 第 61 回日本

生殖医学会学術講演会・総会（ポスター）
2016年

- ⑩ 伊藤千鶴、年森清隆 精子形態と精子の質 第34回日本受精着床学会総会・学術講演会 ワークショップ1「今、ICSIを考える」（招待講演）2016年
- ⑪ 沖津優、伊藤千鶴、年森清隆、与語圭一郎（他3名,4番目）Oligotriche マウスにおける不妊原因遺伝子の同定 第109回日本繁殖学会大会（口演）2016年
- ⑫ 伊藤百映、伊藤千鶴、年森清隆、与語圭一郎（他2名,3番目）Slc22a14 遺伝子欠損マウス精子における受精能獲得と鞭毛屈曲異常の解析 第109回日本繁殖学会大会（ポスター）2016年
- ⑬ 丸山神也、伊藤千鶴、年森清隆、与語圭一郎（他4名,5番目）遺伝子欠損マウスを用いたSlc22a14の生理機能の解析 第11回トランスポーター研究会年会/JTRA2016（ポスター）2016年
- ⑭ 伊藤千鶴、年森清隆 精子形成と先体反応における配偶子膜融合関連タンパク質 Equatorin と Izumo の動態 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会（ポスター）2016年
- ⑮ 伊藤千鶴、年森清隆 精子形態と精子の質 第33回日本受精着床学会総会・学術講演会 ワークショップ2「ICSIにおける精子形態選別」（招待講演）2015年
- ⑯ Toshimori K, Ito C. Sperm function and male infertility. Organization Secretariat of the 30th Annual Meeting of the Japan Society for Immunology of Reproduction-Workshop. (基調講演) 2015.
- ⑰ Toshimori K, Ito C, Yamatoya K. Sperm membrane modification leading to fertilization. International Federation of Fertility Societies (IFFS) / Japan Society of Reproductive Medicine (JSRM) International Meeting 2015. (Symposium). 2015.
- ⑱ Ito C, Yamatoya K, Toshimori K. Sperm acrosomal membrane complex analyzed by super-resolution stimulated emission depletion (STED) microscopy using Equatorin-EGFP transgenic mice. International Federation of Fertility Societies (IFFS) / Japan Society of Reproductive Medicine (JSRM) International Meeting 2015. (Poster). 2015.
- ⑲ Yamatoya K, Ito C, Toshimori K. Searching the enzyme responsible for the cleavage of sperm acrosomal protein Equatorin during

acrosome reaction. International Federation of Fertility Societies (IFFS) / Japan Society of Reproductive Medicine (JSRM) International Meeting 2015. (Poster). 2015.

〔図書〕（計7件）

- ① 年森清隆、伊藤千鶴 メジカルビュー社 カラーイラストで学ぶ 集中講義 解剖学（韓国語版）2017, 216-251.
- ② 年森清隆、伊藤千鶴 南江堂 組織細胞生物学（原書第3版）（第2刷）第VI部 生殖器系 2017, 587-683.（翻訳）
- ③ 年森清隆、伊藤千鶴 近代出版 生殖補助医療（ART）胚培養の理論と実際 IV 受精 1. 受精のメカニズムとプロセス 2017, 95-105.
- ④ 年森清隆、伊藤千鶴 中外医学社 不妊・不育診療指針 II 男性不妊症 1. 総論 B 精子形成の調節機構 2016, 601-605.
- ⑤ 年森清隆、伊藤千鶴 メディカル・サイエンス・インターナショナル 臨床のための解剖学 第2版3章 骨盤と会陰 生殖器系 2016, 315-425.（翻訳）
- ⑥ 年森清隆、伊藤千鶴 南江堂 組織細胞生物学（原書第3版）第VI部 生殖器系 2015, 587-683.（翻訳）
- ⑦ 年森清隆、伊藤千鶴 医歯薬出版株式会社 精子の質評価-精子の構造と精能の評価別冊「医学のあゆみ」 生殖医学・医療の最前線 2015, 31-37.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計1件）

名称：受精を阻害する化合物を同定する方法
発明者：年森清隆、伊藤千鶴、大和屋健二、
吉田恵一
権利者：同上

種類：特許
番号：特許第 6108338 号
取得年月日：平成 29 年 3 月 17 日
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等
生殖生物学ホームページ
URL:<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/devbiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 千鶴 (ITO, Chizuru)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：80347054

(2) 研究分担者

年森 清隆 (TOSHIMORI, Kiyotaka)
千葉大学・未来医療教育研究センター
・特任教授
研究者番号：20094097

(3) 連携研究者

武藤 透 (MUTOH, Tohru)
千葉大学・大学院医学研究院・技術専門職員
研究者番号：30422265

(4) 研究協力者

与語 圭一郎 (YOGO, Keiichiro)
静岡大学・大学院総合科学技術研究科・
准教授

菱川 佳子 (HISHIKAWA, Yoshiko)
国立国際医療研究センター研究所・研究員