

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06241

研究課題名(和文) マウス卵管での精子の機能制御機構

研究課題名(英文) Functional Regulation of Migrating Sperm in the Mouse Oviduct

研究代表者

馬場 忠 (BABA, Tadashi)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：40165056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、精子が卵管を移動する際にどのように受精能力を獲得するのかを明らかにすることを目的とした。自然交尾後のマウス精子の卵管内の移動を経時的に調べたところ、子宮側に近いところでは多くの精子が存在していたが、次第に精子数は減少して卵管の中央部以降から精子の自力遊泳が観察された。受精の場である卵管膨大部ではとても少数の精子しか見いだせず、卵子ごとにほぼひとつの先体反応をした精子が存在していた。また、この先体反応惹起で機能する卵管セリンプロテアーゼの候補を見いだすこともできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顕微授精に代表される生殖補助技術の発展によって、雌性生殖管を経由しない精子でも産子が誕生することが証明された。このことを契機として、雌性生殖管での精子の機能制御に生理的意義がないような錯覚が広がっている。本研究では、生殖補助技術によってバイパスされた卵管で起こる仕組みを明らかにしていくところに高い学術的意義がある。加えて、ヒトや家畜・野生動物での生殖技術改善、避妊薬開発などの新しい技術開発への波及効果も期待できる。

研究成果の概要(英文)：To accomplish fertilization in the ampulla of oviduct, ejaculated sperm are required to migrate through the female reproductive tract. However, this fundamental process largely remains unknown. The purpose of this work was to elucidate the mechanism that regulates the function of mouse sperm during the migration in the oviduct. After natural mating, sperm were abundantly present in the utero-tubal junction. As sperm approached the ampulla, the number of sperm dramatically decreased; the sperm numbers in the isthmus and ampulla were found to be approximately 100 and 10-20, respectively. Thus, the transport of sperm from the utero-tubal junction to the isthmus may be mainly dependent on oviduct fluid flows generated by contractions, and the sperm migration may be switched by the sperm motility near the ampulla. Importantly, only a single acrosome-reacted sperm was located close to an unfertilized oocyte in the ampulla.

研究分野：生殖生物学

キーワード：卵管 精子 受精能獲得 マウス 受精

1. 研究開始当初の背景

受精はほぼすべての動物種に普遍的な生殖繁殖戦略であり、長い間、精子と卵子透明帯との相互作用を中心として研究が進展してきた。その結果、さまざまな機能タンパク質が同定され、それらの研究データに基づく作業仮説が提唱された。しかし、精子アクトソーム(先体)反応で放出され、透明帯を限定分解すると信じられていたセリンプロテアーゼアクトシン ACR のノックアウトマウスの解析 [1] を契機として、ヒアルロニダーゼ [2-4]、メタロプロテアーゼファミリー-ADAM [5-7] など受精関連精子タンパク質の大部分が、実際には予想通りの機能をもたないことがノックアウトマウスの解析によって証明された。このため、受精機構は従来の仮説が覆されスタートラインに戻った感があった。当時の段階で、受精で必須となっている分子は、配偶子間融合で機能する IZUMO1 [8] と CD9 [9]、JUNO [10] だけであった。しかし、これらの分子も融合でどのように作用しているかの直接的な証明がなく、早期解明が期待されていた [11]。

数多くの受精関連遺伝子のノックアウトマウスが調べられていくうちに、重要なことが浮き彫りになっていた。それは、生体外で精子が受精不全であってもそのオスマウスは自然交配で妊孕性が見いだされることである(右図)。例えば、精子プロテアーゼ PRSS21 を欠損するマウス [12] は正常に産仔を生産するが、その精子は体外受精能がほとんどない。同様に、ACR と PRSS21 のダブルノックアウトマウス精子も体外受精能が皆無であるが、オスマウスはほぼ 50% の産仔産生能を有している [13]。

体外受精で精子機能不全でも自然交配によって産仔を生産できる

精子機能	ACR 欠損	PRSS21 欠損	ACR・PRSS21 ダブル欠損
自然交配産仔数	正常	正常	~50%
体外受精	ほぼ正常	~10%	不全
透明帯結合能	正常	~30%	~30%
アクトソーム反応	正常	5%以下	不全
融合能	正常	~10%	~10%
卵丘細胞層通過	遅延	正常	遅延
精子運動能	正常	正常	正常

- ・雌性生殖器は受精(精子)に対して寛容、許容がある?
- ・そもそも生体内で受精はどのように制御されているのか?

一方、受精の仕組みを知るためには、精子と卵子が融合する前の準備状況を理解することも重要である。精子側に限っていえば、受精能獲得によって起こる超活性化運動能とアクトソーム反応が受精に必須である。半世紀以上も前に、ウサギやラットの精巣上体精子に受精能力がなく、雌性生殖管から回収した精子に受精能があることが報告された [14-15]。それ以来、精子の受精能獲得は雌性生殖管で起こることが定説となっているが、その時点でも不明なままであった。そもそも、雌性生殖管、特に卵管で精子がどのような機能制御を受けているのかという基本的かつ重要な疑問がいまだに未解明であった。

2016年に、国内外の3研究室から極めて重要で革新的な研究成果が報告された [16-18]。すなわち、(ア)精子は卵管膨大部で卵子と受精するが、非常に限定された数の精子しか到達せず、しかもその大部分の精子はすでにアクトソーム反応を起こしている可能性と、(イ)精子は自力で泳いで卵管内を移動すると信じられてきたが、実際には卵管の筋収縮運動による内液フローが精子を運搬している可能性がマウスで見いだされた。このように、受精に関する研究は新たな局面を迎えており、改めて普遍的な知見を得て教科書を刷新する時期になっていた。

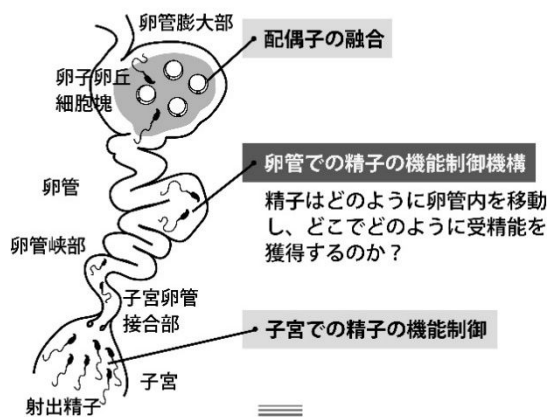
2. 研究の目的

本研究では、マウスの系を利用して精子の卵管内移動機構を詳細に調べ、その移動時に起こる精子の受精能獲得、すなわち超活性化運動能獲得とアクトソーム反応の制御機構を明確にすることを目的とした(右図)。精嚢で精子と混和され付着した精漿タンパク質 SVS2 が精子の卵管移動中に消失することを根拠として、精子からの SVS2 分解除去が受精能獲得の要因であるという仮説を立てた。この仮説を証明するために、(ア)精子の卵管移動機構と(イ)精子からの SVS2 除去機構の2項目に関して研究を行った。この研究によって、受精の新しい学術的基礎が確立され、将来のヒトや家畜、野生動物への応用研究に貢献することが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 精子の卵管移動機構の解析:精子アクトソームとミトコンドリアがそれぞれ GFP と DsRed で蛍光標識されたトランスジェニックマウスを利用し、交尾後の時間経過で卵管各部位に精子が

受精能獲得の仕組み



哺乳類の生殖に関する学術的基盤の確立

- 医療・畜産への波及的效果
- ・家畜での人工授精技術の改良
 - ・家畜胚の安定的供給
 - ・新規避妊薬、不妊症診断法の開発
 - ・さらに安心安全なART開発 など

どのように移動しているのかを明確にする。次いで、卵管の各部位から精子を回収してアクロソーム反応と運動軌道、付着した SVS2 の有無、体外受精能などを調べ、受精能を獲得し始める卵管の部位と時期を明らかにする。また、精子機能不全を示す各種ノックアウトマウスをトランスジェニックマウスと交配させて精子を蛍光標識し、上記の実験を行う。これらの解析によって、精子の卵管移動での各種受精関連タンパク質の生体内機能がさらに明確になる。

一方、卵管は収縮運動性を有するため、生じた卵管液フローが精子を運搬している可能性がある。そこで、メスマウスを精管切除マウスと交尾させ、卵管膨大部近傍へ不活性な微小の球状蛍光ビーズを注入し、ビーズの流動性を蛍光顕微鏡下でリアルタイム観察後、モーションキャプチャー技術で卵管液フローを数値化する。また、上記トランスジェニックマウスを利用し、交尾後の精子の卵管移動について蛍光を指標としてリアルタイム観察する。さらに、ムスカリン受容体拮抗薬などのマウス投与で収縮運動を抑制し、精子の挙動を比較検討する。これらの解析を行うことによって、精子が卵管内のどこまで卵管液フローで運ばれ、どこから超活性化運動能で自力遊泳するかが明確になる。

(2) 精子からの SVS2 除去機構の解析：精漿タンパク質 SVS2 は卵管中を精子が移動する際に卵管中央部付近で消失する。また、SVS2 のノックアウトマウス精子は、大部分が子宮内ですでにアクロソーム反応している。卵管での SVS2 の分解と消失が精子の受精能獲得に関与している可能性を追求するために、卵管に存在する分泌性プロテアーゼを精製し、質量分析などで同定する。また、その卵管プロテアーゼの性質の検討とノックアウトマウスの作製を行う。次いで、その卵管プロテアーゼを欠損するノックアウトマウスメスマウスを野生型オスマウスと交尾させ、卵管から回収した精子の SVS2 消失とアクロソーム反応、超活性化運動能などを調べて確認を得る。最終的には、その卵管プロテアーゼの組換え型タンパク質を作製し、交尾後に回収した子宮内精子への添加実験を行い、精子に付着した SVS2 の除去によるアクロソーム反応惹起や超活性化運動能発現を生体外の系で確認する。

4. 研究成果

(1) まず、精子の卵管移動機構を明確にするために、自然交尾後のマウス精子の卵管移動を経時的に調べたところ、卵管峡部に 200 以上の精子が存在していた。また、卵管峡部では卵管収縮によって生じた卵管液の流れによって精子が運ばれていたが、次第に精子数は減少し、卵管膨大部へ近づくにつれて精子は自力遊泳していた。卵管膨大部では 10~20 の精子が見いだされ、卵子ごとにはほぼひとつの精子が位置していた。一方、低妊孕性の ACRBP 欠損マウス精子の卵管内での挙動を野生型マウスと比較検討したところ、交尾後に卵管膨大部まで移動してきた精子はすべてアクロソーム反応をしており、卵管から回収した精子の運動性や形態は野生型精子と有意な差がなかった。したがって、ACRBP 欠損精子の低妊孕性は、精子の子宮から子宮卵管接合部への移行不全よりも、不完全なアクロソーム反応のためであると推察した。

(2) 次に、精子からの精漿タンパク質 SVS2 除去機構を明らかにする目的で、SVS2 を特異的に分解する卵管プロテアーゼの検索を行った。排卵誘導した野生型マウスの卵管液を調製し、SVS2 の分解反応を調べた。高塩基性条件下では SVS2 が時間依存的に分解され、卵管由来のセリンプロテアーゼの SVS2 分解への関与が示唆された。実際に、いくつかのセリンプロテアーゼ阻害剤を添加すると、SVS2 分解は著しく抑制された。また、卵管液から部分精製した SVS2 を用いたザイモグラフィを行った結果、150kDa、80kDa および 70kDa のプロテアーゼが検出された。さらに、質量分析を行い、セリンプロテアーゼを含めた候補タンパク質を同定することに成功した。

<引用文献>

- [1] Baba T, Azuma S, Kashiwabara S, Toyoda Y. Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J Biol Chem* 1994; 269: 31845-31849.
- [2] Baba D, Kashiwabara S, Honda A, Yamagata K, Wu Q, Ikawa M, Okabe M, Baba T. Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg. *J Biol Chem* 2002; 277:30310-30314.
- [3] Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara S, Baba T. Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:18028-18033.
- [4] Kimura M, Kim E, Kang W, Yamashita M, Saigo M, Yamazaki T, Nakanishi T, Kashiwabara S, Baba T. Functional roles of sperm hyaluronidases, HYAL5 and SPAM1, in fertilization in mice. *Biol Reprod* 2009; 81:939-947.
- [5] Cho C, Bunch DO, Faure JE, Goulding EH, Eddy EM, Primakoff P, Myles DG. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science* 1998; 281:1857-1859.
- [6] Nishimura H, Kim E, Nakanishi T, Baba T. Possible function of the ADAM1a/ADAM2 fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface. *J Biol Chem*

- 2004; 279:34957-34962.
- [7] Kim E, Yamashita M, Nakanishi T, Park KE, Kimura M, Kashiwabara S, Baba T. Mouse sperm lacking ADAM1b/ADAM2 fertilin can fuse with the egg plasma membrane and effect fertilization. *J Biol Chem* 2006; 281:5634-5639.
 - [8] Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 2005; 434:234-238.
 - [9] Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A, Okabe M, Mekada E. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* 2000; 14:321-324.
 - [10] Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* 2014; 508:483-487.
 - [11] Ikawa M, Inoue N, Benham AM, Okabe M. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J Clin Invest* 2010; 120:984-994.
 - [12] Yamashita M, Honda A, Ogura A, Kashiwabara S, Fukami K, Baba T. Reduced fertility of mouse epididymal sperm lacking Prss21/Tesp5 is rescued by sperm exposure to uterine microenvironment. *Genes Cells* 2008; 13:1001-1013.
 - [13] Kawano N, Kang W, Yamashita M, Koga Y, Yamazaki T, Hata T, Miyado K, Baba T. Mice lacking two sperm serine proteases, ACR and PRSS21, are subfertile, but the mutant sperm are infertile in vitro. *Biol Reprod* 2010; 83:359-369.
 - [14] Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951; 168:697-698.
 - [15] Austin CR. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res* 1951; 4:581-596.
 - [16] Spina FAL, Molina LCP, Romarowski A, Vitale AM, Falzone TL, Krapf D, Hirohashi N, Buffone MG. Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Dev Biol* 2016; 411:172-182.
 - [17] Muro Y, Hasuwa H, Isotani A, Miyata H, Yamagata K, Ikawa M, Yanagimachi R, Okabe M. Behavior of mouse spermatozoa in the female reproductive tract from soon after mating to the beginning of fertilization. *Biol Reprod* 2016; 94:80.
 - [18] Ishikawa Y, Usui T, Yamashita M, Kanemori Y, Baba T. Surfing and swimming of ejaculated sperm in the mouse oviduct. *Biol Reprod* 2016; 94:89.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hirose M, Honda A, Fulka H, Tamura-Nakano M, Matoba S, Tomishima T, Mochida K, Hasegawa A, Nagashima K, Inoue K, Ohtsuka M, Baba T, Yanagimachi R, Ogura A.	4. 巻 117
2. 論文標題 Acrosin is essential for sperm penetration through the zona pellucida in hamsters.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA	6. 最初と最後の頁 2513-2518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1917595117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Sasaki K, Shiba K, Nakamura A, Kawano N, Satouh Y, Yamaguchi H, Morikawa M, Shibata D, Yanase R, Jokura K, Nomura M, Miyado M, Takada S, Ueno H, Nonaka S, Baba T, Ikawa M, Kikkawa M, Miyado K, Inaba K.	4. 巻 2
2. 論文標題 Calaxin is required for cilia-driven determination of vertebrate laterality.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-019-0462-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Park S, Kim YH, Jeong PS, Park C, Lee JW, Kim JS, Wee G, Song BS, Park BJ, Kim SH, Sim BW, Kim SU, Triggs-Raine B, Baba T, Lee SR, Kim E.	4. 巻 33
2. 論文標題 SPAM1/HYAL5 Double Deficiency in Male Mice Leads to Severe Male Subfertility Caused by a Cumulus-Oocyte Complex Penetration Defect.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 14440-14449
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201900889RRR.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nagashima K, Usui T, Baba T.	4. 巻 65
2. 論文標題 Behavior of ACRBP-deficient mouse sperm in the female reproductive tract	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 97-102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2018-137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小林瑠乃、石川祐、馬場忠
2. 発表標題 カルシウム結合タンパク質EFCAB2欠損マウスでの上皮細胞繊毛の運動異常
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 須郷卓也、相田千尋、兼森芳紀、柏原真一、馬場忠
2. 発表標題 Acrbp pre-mRNAの選択的スプライシング機構の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Runo Kobayashi, Yu Ishikawa-Yamauchi, Kiyoshi Nagashima, Kazuo Inaba, Kogiku Shiba, Yukio Ichitani, Tadashi Baba
2. 発表標題 Abnormal motility of ependymal cilia by loss of mouse EFCAB2
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yu Ishikawa-Yamauchi, Takahide Kashiwagi, Runo Kobayashi, Masahito Ikawa, Tadashi Baba
2. 発表標題 A possible role of EFCAB2 in flagellarmotility of mouse sperm
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	石川 祐 (ISHIKAWA Yu)		
研究協力者	永島 聖 (NAGASHIMA Kiyoshi)		
研究協力者	柏木 崇秀 (KASHIWAGI Takahide)		
研究協力者	小林 瑠乃 (KOBAYASHI Runo)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------