

平成21年 6月 2日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19800004

研究課題名（和文） 子宮の細胞外環境と精子の受精能獲得機構

研究課題名（英文） Effects of uterine fluids on fertilization of Prss21-deficient sperm in vitro

研究代表者

山下 美鈴（YAMASHITA MISUZU）

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・研究員

研究者番号：90451690

研究成果の概要:精巣特異的GPIアンカー型セリンプロテアーゼPRSS21欠損マウスの解析から、PRSS21は卵子透明帯上での先体反応に機能していることを明らかにした。受精能回復実験を行い、PRSS21欠損精子の体外受精における受精能低下が子宮内分泌液への暴露によって回復することを示した。しかし、PRSS21欠損精子の卵子透明帯上での先体反応能低下は回復していなかった。以上の結果から、PRSS21欠損精子の受精能は子宮内因子によって補われていることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,370,000	0	1,370,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：分子発生生物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：生殖、受精、応用動物、マウス、精子

1. 研究開始当初の背景

生殖過程の大部分が体内で進行する哺乳類の生殖機構の分子的解析は、生体内での現象を適切に観察する系が乏しいことから生体外の場合に比べ殆どなされていない。一方で、体外受精をはじめとした生殖補助技術の発展は目覚ましいものがある。ここ数年の統計では、全出生数に占める生殖補助技術の介在率が50人に一人の割合に近づいてきている。このような分子メカニズムの解明が乏しいままでの技術先行状態は軽視されるものではないと考える。

研究代表者らは受精メカニズムを明らかに

すべくこれまでに様々な精子膜上タンパク質について解析を行ってきた。その結果、精巣特異的GPIアンカー型セリンプロテアーゼTESP5/PRSS21欠損マウスの精巣上体精子は野生型マウスとは異なり体外受精できないことを見出した。そこで、このPRSS21欠損マウスを手掛かりに、マウス子宮内環境での精子の受精能獲得機構を明らかにし、体内で進行する哺乳類の生殖機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究課題では、主に以下の2つの目標を軸

に研究を進めた。

(1) PRSS21 を介した精子先体反応メカニズムの解明

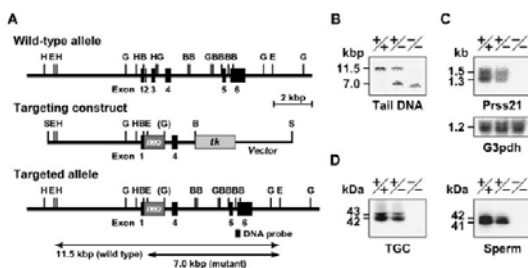
精子の先体反応は 50 年以上前から報告されており、先体反応の誘起メカニズムにはいくつもの説が提唱されている。しかしながら、現在に至るまで哺乳類では先体反応に直接関与する精子接着因子でさえも見出されていない。このように、精子先体反応は受精に必須の現象でありながらその全貌はいまだ不明である。PRSS21 欠損精巢上体精子は体外では先体反応を誘引されない特異的な表現型を示すことから、PRSS21 のプロテアーゼとしての機能や GPI アンカー型膜タンパク質としての役割の解明が先体反応機構解明への糸口になると期待される。

(2) 子宮内における受精能促進因子の同定と解析

哺乳類の精子は射出された時点では十分な受精機能を保持していない。多くの場合、雌性生殖器官内を遡上することで様々な生化学的環境変化を受け活性化する。研究代表者らは PRSS21 欠損精子の解析を行い、排卵期直前のマウス子宮内に精子の卵子透明帯結合能力を促進させる因子の存在を見出した。子宮には重炭酸イオンや pH、コレステロールなどによる精子活性化=受精能獲得機構があることは知られているが、今回見出した因子はこのいずれにも当てはまらないことから新規の精子活性化物質である可能性がある。また、精子側にもその因子に応答する分子が存在するかもしれない。そこで、子宮内因子に応答する精子側因子の探索を試みる。

3. 研究の方法

(1) PRSS21 欠損マウスの作製



PRSS21 の機能を解析するために、相同組み換えによる欠損マウス作製を試みた (図 A)。遺伝子の組み換えをサザンブロットで (図 B)、発現をノーザンブロットおよびウェスタンブロットで確認した (図 C)。

(2) PRSS21 欠損マウス精巢上体精子を用いた体外受精実験

成熟した野生型マウスおよび PRSS21 欠損マウスの精巢上体尾部から精子を回収し、体外受精用培地 (TYH メディウム) にて活性化処理を行った。過排卵処理メスマウスの卵管膨

大部から未受精卵を回収し、必要に応じて卵丘細胞層および卵子透明帯の除去を行い実験に使用した。

(3) 卵子透明帯上での先体反応の検出および精子の卵子透明帯通過実験

先体反応後の精子特異的に結合する IZUMO1 抗体を用い、卵子透明帯上で誘起される先体反応の検出を行った。実験は論文③で報告した方法で行った。共染色には核を特異的に染色する Hoechst33342 を使用し、実験のコントロールとして先体反応の誘起が抑制されている PLC δ 4 欠損精子を用いた。さらに、精子が卵子に到達することで受精が成立することから、卵子透明帯の通過能について PRSS21 欠損精子で検証した。CD9 欠損卵子を使用し、卵子透明帯を通過して困卵腔に貯留した精子の数を比較した。

(4) PRSS21 欠損精子の受精能獲得能の検証 PRSS21 欠損精子の受精能獲得状況を精子タンパク質のチロシンリン酸化と自然発生的な先体反応率とで確認した。培養時間ごとに回収した精子タンパク質を抗チロシンリン酸化抗体で検出した。また、培養時間ごとに回収した精子を CBB 染色に供し先体タンパク質の残っている精子の率を測定した。さらに、PRSS21 欠損精子および野生型マウス精子から抽出したタンパク質から受精に寄与する精子タンパク質の比較を行った。

(5) 子宮内環境暴露による PRSS21 欠損精子のレスキュー

自然交配における PRSS21 欠損マウスの正常な産仔を再現するため、PRSS21 欠損精巢上体精子を回収後、ホルモン処理により排卵を誘導されたメスマウス子宮に注入し、人工授精を試みた。また、射出過程の必要性を検証するために、自然交配で子宮内に射出された精子を回収、体外で培養後、体外受精を試みた。

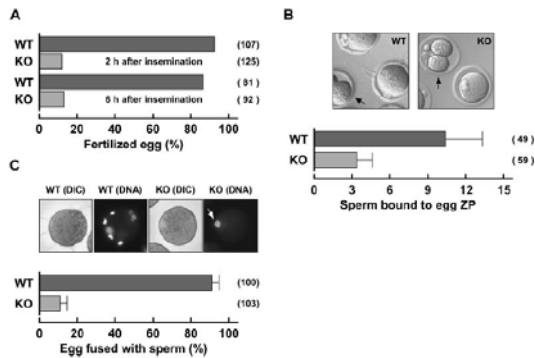
(6) 子宮内分泌液の回収と PRSS21 欠損精子への処理

マウスは発情周期を持つことから、その性周期によって子宮内環境に変化があると考えられる。膣垢検査 (スメアテスト) によって判別した性周期ごとに子宮内分泌液を還流法によって回収した。得られた子宮内分泌液を体外受精用の TYH メディウムに添加後、PRSS21 欠損精巢上体精子を媒精し、受精能獲得状況を調べた。

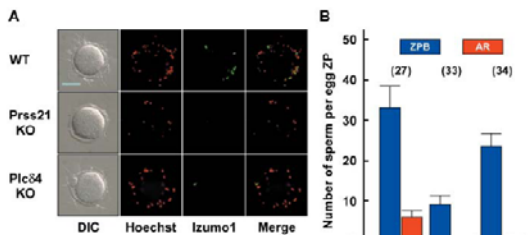
4. 研究成果

(1) PRSS21 欠損マウスの作製と体外受精による受精能低下

作出された PRSS21 欠損マウスは、自然交配では正常な産仔であったが、精巢上体精子を用いた体外受精では野生型に比べ①受精率 (図 A) ②卵子透明帯への精子の結合数 (図 B) ③卵細胞膜との融合 (図 C) いずれにおいても顕著な低下が認められた。

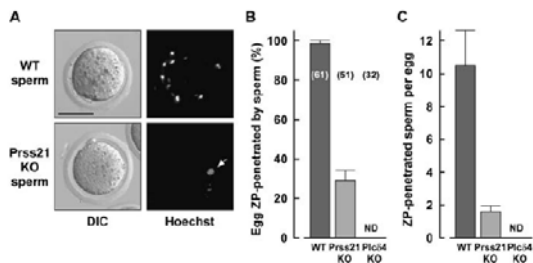


(2) PRSS21 欠損精子の卵子透明帯上における先体反応能低下



先体反応のマーカである IZUMO1 抗体による免疫染色の結果 (図 A)、野生型に比べ PRSS21 欠損精子は卵子透明帯への結合だけでなく、結合に後誘起される先体反応率も低下していた。そして、その率は細胞増殖に関与し先体反応に機能することが知られている PLC δ 4 を欠損した精子とほとんど同じであった (図 B)。

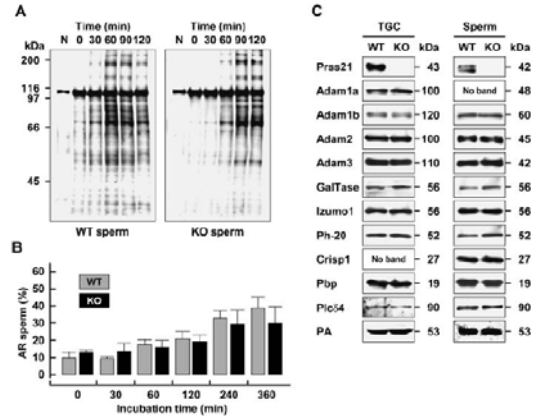
(3) PRSS21 欠損精子の卵子透明帯通過不全



PRSS21 欠損精子は卵子透明帯上での先体反応低下がみられることから、卵子透明帯通過能を確認したところ、PRSS21 欠損精子ではほとんど通過できないことが確認できた (図 A, B)。

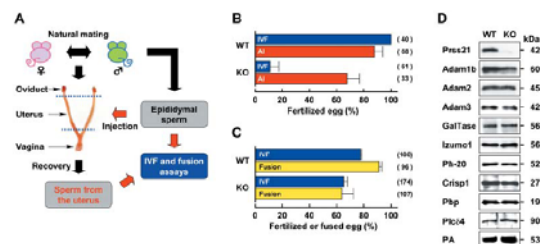
(4) PRSS21 欠損精子における受精能獲得機構

PRSS21 欠損精子が卵子透明帯上での先体反応能が抑制されていることから、通常精子が先体反応時に必要とされている受精能獲得機構について検証を行った。その結果、受精能獲得のマーカである精子タンパク質のリン酸化 (図 A) や自然発生的な先体反応数 (図 B) は、野生型においても PRSS21 欠損精子においてもほぼ変わらず起きていた。また、卵子透明帯への結合が減少していたことから、精子膜タンパク質に影響が出ていないかウェスタンブロット解析で確認を行った。



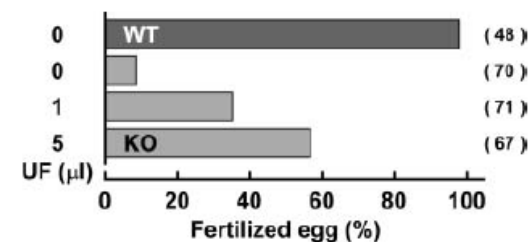
その結果、PRSS21 欠損精子と野生型精子では大きな違いがないことが判明した。

(5) 子宮内環境における PRSS21 欠損精子の受精能回復



体外では受精能のほとんど見られない PRSS21 欠損精巣上体精子を子宮内環境に暴露し、受精能の回復を試みた (図 A)。その結果、①人工授精 (A I) によって子宮内に戻された PRSS21 欠損精子でも受精卵が確認された (図 B)。また、自然交配によって子宮内に射出された PRSS21 欠損精子を用いた体外受精においても、有意に受精能の回復が認められた (図 C)。このことから、PRSS21 欠損精子は一度でも子宮内環境に暴露されれば、例え射出過程がなくとも受精能を会得していることが明らかになった。

(6) 子宮内抽出液による PRSS21 欠損精子のレスキュー



子宮内から回収した子宮内分泌液を用いて PRSS21 欠損精子の受精能回復を試みたところ、子宮内分泌液の量依存的に受精率が回復することが示された。この結果から、子宮内に存在する受精能付与因子の存在を確認した (図)。

以上の結果から PRSS21 欠損精子の子宮内分泌液での受精能回復は、先体反応能には依存

していないこと。また、生体内では子宮内因子は複数存在しそれぞれの活性によって受精が成し遂げられていることが明らかになった。これらの研究成果は論文①として発表済みである。今後はさらにこれら因子の同定・解析を進めることで、哺乳類における生体内での受精現象の解明に繋げる。

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 3件)

①山下美鈴、本多新、小倉淳郎、柏原真一、深見清子、馬場忠、Reduced fertility of mouse epididymal sperm lacking Prss21/Tesp5 is rescued by sperm exposure to uterine microenvironment. 査読有、*Genes Cells* 13:1001-1013 (2008)

②金一均、山下美鈴、木村正紀、本多新、柏原真一、馬場忠、Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucid 査読有、*Int. J. Dev. Biol.* 52:677-682 (2008)

③山下美鈴、山縣一夫、津村啓子、中西友子、馬場忠、Acrosome reaction of mouse epididymal sperm on oocyte zona pellucid a. 査読有、*J. Reprod. Dev.* 53:225-262 (2007)

[学会発表] (計 4件)

①山下美鈴、子宮内因子による受精能回復機構の解析、第31回日本分子生物学会年会、2008年12月11日神戸

②山下美鈴、Mouse Sperm lacking serine protease Prss21/Tesp5 barely undergo the zona pellucida-induced acrosome reaction, but do fertilize the egg. World Congress of Reproductive Biology 2008年5月24日アメリカ合衆国・ハワイ

③山下美鈴、受精におけるセリンプロテアーゼTesp5の役割、第30回日本分子生物学会年会、2007年12月12日横浜

④山下美鈴、精子セリンプロテアーゼ Tesp5 欠損マウスの作製と応用、第24回日本疾患モデル学会総会、2007年9月1日つくば

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 美鈴 (YAMASHITA MISUZU)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・研究員

研究者番号：90451690

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし