

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26890004

研究課題名(和文) 雌性生殖器内における効率的な受精機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of efficient fertilization mechanism in the female genital tract

研究代表者

山下 美鈴(山田美鈴)(YAMASHITA, MISUZU)

筑波大学・研究推進部研究企画課・助教

研究者番号：90451690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：精子先体反応は受精に必須な現象であるが、雌性生殖器内での誘起機構は未だ不明な点が多い。本研究では蛍光標識精子による継時観察から、卵管内精子の運動性および卵管内における先体反応誘起箇所の特定を行った。そして、体外では先体反応が起こらない精巣特異的GPIアンカー型セリンプロテアーゼPRSS21欠損精子の人工的な先体反応誘起による精子卵子膜融合能の回復を試みた。その結果、PRSS21欠損精子の精子卵子融合能は人工的な先体反応誘起だけでなく、雌性生殖器や卵胞腔に存在するリン脂質を含む小胞により回復することが見いだされた。以上の結果から、雌性生殖器内での受精における介助機構の存在を示した。

研究成果の概要(英文)：Only acrosome-reacted sperm have the capacity for fertilization. Despite this importance, the mechanism by which acrosome reaction (AR) occurs in female reproduct remains unclear. We thus analyzed AR and sperm-motility in the female genital tract in vivo, using the transgenic mice's sperm expressing a fluorescent protein. In addition, we also investigated whether artificial AR induction by treatment of calcium ionophore A23187 could promote in vitro fertilization ability of the sperm lacking PRSS21, a GPI-anchored sperm-specific serine protease. We found that A23187 application restored the fusion ability of PRSS21 mutant sperm. Moreover we showed that treatment of vesicles, isolated from the female reproductive organs and perivitelline spaces, which contain phospholipids was also effective to recover impaired fusion ability when PRSS21 is absent. Together, our data suggest the presence of a mechanism to support sperm's ability for fertilization in the female genital tract.

研究分野：生殖

キーワード：生殖 受精 応用生物 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受精機構の分子的解析は、これまで体外で行われることが多く、生体内での現象を適切に観察することが難しいとされてきた。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く、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27人に一人の割合に近づいてきている。受精現象の解明が乏しいままの技術先行状態を打開する手掛かりのひとつとして、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。例えば、精巣特異的 GPI アンカー型セリンプロテアーゼ PRSS21 欠損マウスの精巣上体精子は自然交配での産仔が正常にも拘らず、体外受精できない。本研究計画ではこの PRSS21 欠損マウスを手掛かりに、マウス精子の受精能獲得機構の解明を試みた。さらに、雌性生殖器内での精子の運動性について継時観察を行い、卵管の自律運動が精子の遡上機構へ与える影響についての解析を行った。

### 2. 研究の目的

本研究では雌性生殖器で起きる現象そのものについて以下の2点に焦点を当て、生体内の基礎的な受精過程の解明を目指した。  
(1) 子宮、卵管内受精機構の可視化と局在変化の解析

子宮に射出されたマウス精子は、子宮卵管接合部(UTJ)を通過し卵管内に侵入する。卵管内で精子は超活性化により激しい運動性を示すが、卵管をどのように遡上し卵子まで到達するのかが明らかになっていない。また、受精の場である卵管膨大部へ到達する精子は十数匹とごく僅かでも十分妊孕性を示すことについても長年の疑問であった。研究代表者らは、本研究計画の根拠となるデータとして、マウスにおいて遡上精子が卵管膨大部手前で先体反応することを確認した。これは、長年信じられていた先体反応は卵子透明帯上で起きるといふ説とは大きく異なる。また、特定の卵管内環境や雌性生殖器由来の因子による先体反応誘起を暗示している。そこで、「卵管機能」と「受精能促進因子」2つの仮説について検証を行った。

### (2) 精子セリンプロテアーゼ PRSS21 および ACR の精子先体反応への関与とその機構

精子頭部の先体胞内には各種タンパク質分解酵素が含まれており、先体反応により放出される。それらは卵子を囲む卵丘細胞層や卵子透明帯通過に機能すると考えられてきた。また、卵子に到達した精子の中でも先体反応を起こしたものだけが受精に至ることも知られている。このように精子の先体反応は受精に必須の現象でありながら、その全貌は未だに不明である。PRSS21 欠損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考えられる。先行研究において、ACR 欠損精子は正常な受精率を示すこと、また、リコンビナント PRSS21 タンパク質には先体反応誘起作用が見られないことから、プロテアーゼ活性以外の機能の関与が予測される。まず、体外における先体反応不全が受精に与える影響について検証するために強制的に先体反応を誘起させた PRSS21 欠損精子による解析を行う。そして GPI アンカー型タンパク質としての PRSS21 の先体反応誘起への影響は、プロテアーゼ活性を欠失した PRSS21 を発現するトランスジェニック個体で明らかにする。さらに、生体内では PRSS21 欠損精子は正常な受精率を示し、ACR/PRSS21 ダブル欠損精子では受精率の改善がみられることから、雌性生殖器由来の受精能回復機構について、各種抽出液を用いた解析を行い新規受精の関連因子の探索を試みた。

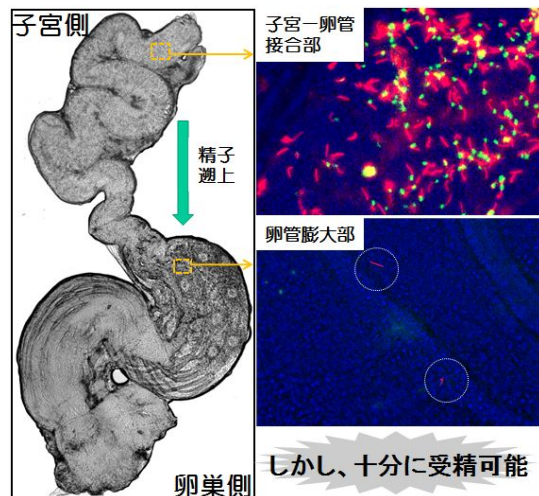


図: 精子先体を緑色蛍光、尾部を赤色蛍光で標識した TG精子を用い、卵管遡上を観察。卵管側に行くほど精子数は少なく、先体のシグナルも消失(先体反応)する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 子宮、卵管内受精機構の可視化と局在変化の解析

雌性生殖器内での精子活性化および先体反応誘起領域の特定

マウス卵管はいくつものカーブを持つ管が螺旋状に巻かれた複雑な形状を示す。このマウス卵管を形態的に7つの領域に区分けし、先体反応誘起の正確な時期や箇所を確定するために、先部先体を緑色蛍光タンパク質、尾部を赤色蛍光タンパク質で標識したトランスジェニック蛍光標識精子による継時観察を試みた。また、体外受精で受精能低下の見られる各種精子タンパク質欠損マウスの蛍光精子を作製し、卵管内におけるこれら精子タンパク質欠損による影響の有無について比較した。

卵管分節運動の精子遡上への影響

卵管は消化器官と同様に自律神経運動を行う。特に発情、排卵期に活発な分節運動が見られ、卵管遡上中の精子は常に曝される。そこで精子遡上および精子運動性に与える影響を検証するために、合成鎮痙剤投与により卵管の自律運動性を抑制した雌マウス卵管内各領域について精子の遡上数を調べた。併せて受精率を比較することで、卵管運動の受精への関与について検証した。

#### (2) 精子セリンプロテアーゼ PRSS21 および ACR の精子先体反応への関与とその機構

##### 先体反応誘起による効率的な生体内受精システムの分子的解析

体外受精で PRSS21 欠損精子は卵子透明への結合および先体反応誘起数の低下が認められる。そこでカルシウムイオノフォアの添加による強制的な先体反応誘起が PRSS21 欠損精子の受精能に与える影響について調べた。精子セリンプロテアーゼ Acrosin をも欠損するダブル欠損精子(ACR/PRSS21 欠損)は生体内においても卵子透明帯の通過が著しく低下する。そこでセリンプロテアーゼ阻害剤 *p*-Aminobenzamide (pAB) 処理による先体反応前および反応後精子の受精能変化を比較することで、先体反応後精子のセリンプロテアーゼの重要性について解析を試みた。さらに、PRSS21 欠損精子は自然交配で産仔を得る事が可能なことから、PRSS21 欠損精子を用い、雌性生殖器官内に存在する受精能促進因子の探索を試みた。

##### PRSS21 の GPI アンカー型タンパク質としての機能と役割

GPI アンカー型の膜タンパク質は細胞膜上でマイクロドメインを形成しシグナル受容体として機能することが知られている。また、受精においても GPI アンカーを切断する酵素の処理により、精子・卵子ともに融合能力の大幅な低下することも報告されている。そこで、精子 GPI アンカー型タンパク質 PRSS21 の先体反応におけるシグナル伝達への関与について調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 子宮、卵管内受精機構の可視化と局在変化の解析

蛍光標識精子を用いた解析から、射出後卵管に侵入した精子は卵管峡部(R1)で最も多く観察され、卵管膨大部(R7)に近づくにつれ減少し、卵管膨大部へ到達する精子は平均 13 個であった。また、卵管膨大部に到達した精子はすでに先体反応を起こしており、多くの精子は卵管上流部(R5, R6)で先体反応が誘起していることが判った。精子の卵管遡上数および先体反応率は各種精子タンパク質欠損精子(ACR, PRSS21, SPAM1)いずれにおいても同程度確認されたことから、これら体外受精で受精能が低下する精子の『生体内での受精能の回復』が卵管内で行われている事が示された。

一方で、排卵前後の卵管では数分単位での収縮が起こることから、精子の卵管遡上への影響が考えられる。そこで合成鎮痙剤パドリンを断続的に投与したマウスを用いて受精率を調べたところ、優位に受精能の低下が認められた。投与したパドリンの量に依存的に卵管収縮回収は低下しており、子宮卵管接合部の精子の侵入数および卵管膨大部の精子存在数に大幅な減少が見られた。その結果、受精率の低下を引き起こしていることが明らかになった。さらに、蛍光標識精子の卵管内運動の動画から、卵管収縮による精子輸送は卵管の子宮側で積極的に誘発されており、卵管上流部および卵管膨大部では、卵管の伸縮運動というよりは精子の鞭毛による運動性がより大きく受精能に関わることを示した。以上の結果は論文として発表した。

### (2) 精子セリンプロテアーゼ PRSS21 および ACR の精子先体反応への関与とその機構

以前の研究から、PRSS21 欠損精子は体外受精において卵子透明帯への結合および先体反応誘起率が減少することで体外受精率が低下することを示した。そこで、人工的な先体反応誘起物質であるカルシウムイオノフォア A23187 を用い、強制的に先体反応を起こすことで受精能への影響を見た。その結果、PRSS21 欠損精子のイオノフォアによる先体反応誘起率は野生型と変わらず十分に起きていたものの、体外受精能の回復は認められなかった。しかし、卵丘細胞層や卵子透明帯を除去した卵子に対する精子卵子膜融合に関しては優位に回復していることが示された。さらに、セリンプロテアーゼ阻害剤 pAB の添加は精子卵子膜融合率を著しく減少させるが、A23187 で先体反応を誘起した精子は pAB に影響されなかった。PRSS21 は ACR 同様精子頭部で機能するトリプシン様セリンプロテアーゼ活性を持つが、この結果から、PRSS21 のプロテアーゼ活性は先体反応後の精子卵子膜融合には関与しないことが示唆された。

一方、PRSS21 欠損精子を手掛かりに受精能回復因子の探索を行った結果、リン脂質の一種である IP(Phosphatidylinositol)および PIP2(Phosphatidylinositol

4,5-bisphosphate)に PRSS21 欠損精子の精子卵子膜融合回復活性が確認された。通常細胞膜上でこれら分子は脂質 2 重膜の内側に局在することが知られている。しかし、卵子と卵子透明帯に囲まれた囲卵腔に存在する小胞は単層の脂質膜であることが報告されている。そこで、PIP2 を特異的に標識する PLC(phospholipase C)PH ドメインに GST タグを融合させたタンパク質をプローブに免疫染色を行った結果、囲卵腔に局在する PIP2 のシグナルを得た。さらに、回収した囲卵腔内小胞の添加により、PRSS21 欠損精子の精子卵子膜融合能が添加量依存的に回復した。これらの結果は、PRSS21 欠損精子の受精を回復

させる因子が精子卵子膜融合の場には存在し、機能している可能性を示すものである。今後このリン脂質のさらなる解析を試みることで、これまで明らかにされてこなかった精子と卵子の膜融合メカニズムに新たな知見を加えることが出来ると考えている。

#### 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 1件)

石川 祐、臼井 智之、山下 美鈴、兼森 芳紀、馬場 忠、Surfing and swimming of ejaculated sperm in the oviduct, *Biology of Reproduction*, 査読有、Vol.115、2016、135418、DOI 10.1095

[学会発表](計 8件)

石川 祐、臼井 智之、山下 美鈴、馬場 忠、Involvement of oviductal peristalsis in fertilization of the mouse The 9th Tsukuba Medical Science Meeting 2014年9月29日 つくば国際会議場(茨城県つくば市)

臼井 智之、山下 美鈴、石川 祐、兼森 芳紀、馬場 忠、Difference of the fertilization mechanism between in vivo and in vitro 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月27日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

車崎 貴将、山下 美鈴、石川 祐、武尾 里美、馬場 忠、Calcium ionophore rescued the fusion ability of PRSS21-deficient mice 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月27日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

石川 祐、臼井 智之、山下 美鈴、馬場 忠、Involvement of oviductal peristalsis in fertilization of the mouse 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月29日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

石川 祐、臼井 智之、山下 美鈴、兼森 芳紀、馬場 忠、Surfing and swimming of sperm in the oviduct The Gordon Research Seminar (GRS) on Fertilization and Activation of Development 2015年7月18日19日 Boston, (USA)

石川 祐、臼井 智之、山下 美鈴、兼森 芳紀、馬場 忠、Surfing and swimming of sperm in the oviduct The Gordon Research Conference (GRC) on Fertilization and Activation of

Development 2015年7月19日~24日 Boston, (USA)

臼井 智之、山下 美鈴、石川 祐、兼森 芳紀、馬場 忠、Mechanism of mouse sperm migration through the oviduct 第108回日本繁殖生物学会大会 2015年9月17日~20日 宮崎大学(宮崎県宮崎市)

石川 祐、臼井 智之、山下 美鈴、兼森 芳紀、馬場 忠、Surfing and swimming of ejaculated sperm in the oviduct 第38回日本分子生物学会年会 2015年12月01日~04日 ポートアイランド(兵庫県神戸市)

[その他]

ホームページ等

<http://agbi.tsukuba.ac.jp/~acroman/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

山下 美鈴 (YAMASHITA MISUZU)  
筑波大学・研究推進部研究企画課・助教  
研究者番号：90451690

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：