

## 自己評価報告書

平成 23 年 4 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2013

課題番号：20062008

研究課題名（和文） 受精のメカニズムと受精前後における生殖細胞のエピゲノム調節

研究課題名（英文） Mechanism of fertilization and epigenomic regulation of germ cells.

研究代表者

岡部 勝 (OKABE MASARU)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：30089875

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：生殖細胞、遺伝子組換え動物、不妊、異種キメラ

## 1. 研究計画の概要

生殖系列細胞は、精子と卵子へ分化・成熟し、受精していったん消滅するが、胚から個体へと発生していく過程で新たに誕生する。この新たな生殖系列細胞も生理的、エピジェネティック的に受精能を有し個体として発生できる「機能する配偶子」へと分化していく。本研究では、この連続と続く生殖系列の世代サイクルを分子生物学的に明らかにするために、受精現象とその前後のエピゲノム調節に焦点を当て、試験管内では再現できない現象について遺伝子操作動物をもちい解き明かす。

## 2. 研究の進捗状況

(1) 精巣特異的に発現する6種類の遺伝子 (*Clgn, Adam1a, Adam2, Adam3, tACE, Calr3*) のノックアウトマウスの精子は、共通してADAM3が欠損していることを明らかにした。これらのノックアウトマウスの精子は輸卵管への移行異常と透明帯への結合異常を示し雄性不妊となり、精子上のADAM3が精子の機能に重要な役割をもっていることが示唆された。

(2) 精子が卵子に融合するために必須な分子として見出したIZUMO1の糖鎖に着目し解析した。その結果、糖鎖部分が直接的に融合に機能している証拠は得られなかったが、タンパク質の安定性の維持に寄与していることを明らかにした。さらに、IZUMOと精子上で複合体を形成している分子としてACE3を同定し解析した。Ace3ノックアウト精子は正常に受精し、IZUMO1と同じ局在を示すにもかかわらず、受精に必須の分子ではないことが分かった。また、これまでに受精に関わる因子として考えられてきたSPESP1は、そのノックアウトマウスの解析より精子が卵子

と融合する以前の「機能する配偶子」形成の過程で膜構造の安定化に機能することを見出した。

(3) 受精前後の生殖細胞のエピゲノム調節について、XX型性転換マウスに精子幹細胞を移植する系を用いて解析した。その結果、これまでの報告とは異なり、XX型の精巣は少なくとも1度は完全な精子形成を支持することを見出した。さらに、ラットES細胞を樹立し、異種間のマウス⇄ラットESキメラを作製したところ、ラット特有の精子頭部をもつ精子への分化が確かめられた。このことから、精原細胞の移植の場合とは異なり、生の初期の段階から異なった種の環境にさらされた場合においても、精子形成が起ることを明らかにした。

(4) 遺伝子発現を調整するノンコーディングRNA群の中で我々はmiRNAに着目し、精巣で減数分裂開始頃に発現のピークを示すmiR-200bのノックアウトマウスを作製した。その結果、雄の精子形成に異常は見られなかったが、下垂体機能不全により雌が不妊になることを明らかにした。

## 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

雄性配偶子である精子の機能のうち、卵子の透明帯に結合する能力と輸卵管内へ移行する能力はこれまでお互いに独立した事象であると考えられてきた。しかし、精巣特異的発現遺伝子群のノックアウトマウスを解析した結果から、精子の透明帯への結合能と輸卵管への移行能とが密接に結びついていることを明らかにし、受精過程における相互認識に新たな知見を示すことができた。この結果は、配偶子形成や受精過程を各種のマーカー蛋白質によって可

視化できるモニターマウスを作製したことで可能となり、これまでに見えなかった現象をとらえたデータがそろいつつある。

さらに、精巣で発現している遺伝子群について、新規のノックアウトマウスを作製し解析を進めており、順調に当初の計画通り研究が進展している。

#### 4. 今後の研究の推進方策

「機能する配偶子」が作られる過程で起っている現象を分子生物学的に明らかにするため、受精と、その前後のエピゲノム調節にフォーカスを絞りながら、効率的に研究を進める。

(1) 配偶子の相互認識と融合現象について、複数の遺伝子改変動物を用いた研究から受精に必須の因子が数多く同定されており、今後はそれらの相互関係を明らかにすると同時に、新たな遺伝子改変動物を作製し受精現象をより深く解析する。さらに、精子の挙動を追跡可能にした RBGS マウスに加え、精子形成過程をモニターできるマウスなどを新たに作製し、受精の分子生物学的な理解を深める。

(2) 「機能する配偶子」が形成される過程でおきるエピゲノム調節について、精子形成の場と精子幹細胞から作られる環境に着目し、詳細な解析を行う。ES 細胞と胚盤胞を用いた作製されるキメラマウスは、ES 細胞の株やどのマウス株に由来する胚盤胞を用いるかによって、ES 細胞が生殖細胞に寄与する割合が大きく異なる。この現象を明らかにし、生殖細胞の運命を時間・空間的にトレースできるモニターES 細胞とマウスを用い、蛍光イメージング法により生きたまま生殖細胞の挙動を観察する系を確立する。この系を応用することで、XX 性転換マウスの雌細胞から作られる精巣環境での精子形成や、マウスやラットの異なる種から形成される環境内での精子形成について解析を行うことで、受精前後の精子形成をはぐくむニッチの形成に必要な条件を明らかにする。

#### 5. 代表的な研究成果

(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 5 件)

1. Isotani A, Hatayama H, Kaseda K, Ikawa M, Okabe M. Formation of a thymus from rat ES cells in xenogeneic nude mouse↔rat ES chimeras. *Genes to Cells* 2011; Apr; 16(4):397-405., 査読有
2. Ikawa M, Tokuhiko K, Yamaguchi R, Benham AM, Tamura T, Wada I, Satouh Y, Inoue N, Okabe M. Calsperin is a testis specific chaperone required for sperm fertility. *J Biol Chem* 2011; 18;286(7):5639-5646., 査読有

3. Kumasawa K, Ikawa M, Kidoya H, Hasuwa H, Saito-Fujita T, Morioka Y, Takakura N, Kimura T, Okabe M. From the Cover: Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:1451-1455., 査読有
4. Inoue N, Kasahara T, Ikawa M, Okabe M. Identification and disruption of sperm-specific angiotensin converting enzyme-3 (ACE3) in mouse. *PLoS ONE* 2010; 5:e10301., 査読有
5. Fujihara Y, Murakami M, Inoue N, Satouh Y, Kaseda K, Ikawa M, Okabe M. Sperm equatorial segment protein 1, SPESP1, is required for fully fertile sperm in mouse. *J Cell Sci.* 2010 May 1;123(Pt 9):1531-6., 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. Masaru Okabe, Mechanisms of Fertilization – A View Through Gene Manipulated Mice, American Society of Andrology ASA 35th Annual Meeting (招待講演), 2010 年 4 月 13 日, Houston, TX Omni Houston Hotel (USA)
2. 岡部 勝, 遺伝子改変動物を通して見る精子と卵子の出会い, 第 57 回日本実験動物学会総会 (招待講演), 2010 年 5 月 13 日, 京都市南区 京都テルサ
3. Masaru Okabe, Regulation of sperm migration into the oviduct, 2010 Reproductive Tract Biology Gordon Research Conference, 2010 年 8 月 17 日, Andover, NH Proctor Academy (USA)
4. Masaru Okabe, Fertilization in vivo and Fertilization in vitro, International Symposium for Immunology of Reproduction joint meeting in conjunction with The 25th Annual Meeting of Japan Society for Immunology of Reproduction, 2010 年 8 月 29 日, 大阪府吹田市大阪大学銀杏会
5. Masaru Okabe, The Gene-Manipulated Animals and Research in Mechanism of Fertilization, 4th AFLAS Congress Academic Committee, 2010 年 11 月 10 日, 台湾台北市 Taipei International Convention Center (中華民国)

[その他]

ホームページ

<http://kumikae01.gen-info.osaka-u.ac.jp/tg/greenmouse.cfm>