

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008 ～ 2012

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 mammalian fertilization and epigenomic regulation of germline 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

研究成果の概要（和文）：

精子の受精能形成に *Spespl*, *Calsperin*, *Pdilt*, *Pmis2*, *Tex101* をなどが必須であることをこれらの遺伝子改変マウスを新たに作製することにより証明した。受精不全となるマウスを観察することにより精子が雌性生殖路内において受精に至る様子をライブイメージングなどにより明らかにすることができた。また、ノンコーディング RNA の一種であるマイクロ RNA の miR-200b と miR-429 が排卵に至る必須の因子であることも遺伝子改変マウスを用いて明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

Spermatozoa must have fertilizing ability other than to have sperm specific shape and moving ability. We clarified that *Spespl*, *Calsperin*, *Pdilt* and *Tex101* are all essentially required for spermatozoa to establish their fertilizing ability by making gene-manipulated animals. We also revealed the precise mechanism of sperm dynamics in female reproductive tract using these gene-manipulated animals and live-imaging systems. Furthermore, miR-200b and miR-429 were shown to be essential for female ovulation by gene-disruption experiments.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	21,500,000	0	21,500,000
2009年度	21,500,000	0	21,500,000
2010年度	21,500,000	0	21,500,000
2011年度	21,500,000	0	21,500,000
2012年度	21,500,000	0	21,500,000
総計	107,500,000	0	107,500,000

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：マイクロRNA、エピジェネティック、ノックアウトマウス、生殖細胞、遺伝子組換え動物、不妊、分子シャペロン、受精

1. 研究開始当初の背景

精子形成は精子の受精能の形成をもって完結するが、精子の受精能とは何であるのかが

よくわかっていなかった。社会的にも 10 組に 1 組が不妊であると言われており、不妊につながる基本的な知識が不足していた。これ

らの背景をもとに研究目標を設定した。

2. 研究の目的

受精のメカニズムを明らかにするために、体外受精という形で受精卵が得られる過程を観察することができる。しかしながらたとえば試験管内で多数の精子が必要とされることから、体外受精と個体の中で起こっている受精とのあいだには、かなり条件的に異なった事象が起こっているのではないかと思われる。そこで個体内でどのようなことが起こっているのかについて焦点をあてることにより、真の受精のメカニズムを明らかにすべく研究を行った。

3. 研究の方法

精巢内、あるいは精子に特異的に発現する遺伝子について、ES細胞を用いた相同組換えにより、それらの遺伝子が欠損した遺伝子改変動物を多種作製した。これらの中から不妊になるものを選定した。また精子の持つタンパク質に蛍光タンパク質を結合した融合遺伝子を作製し、精子に発現させた。このことにより蛍光タンパク質を持ち、特別な染色を行わなくても、輸卵管などの壁越しに観察できる精子を作製した。これらを様々な遺伝子が欠損させた不妊の雄の精子の遺伝的バックグラウンドに導入したうえで、低侵襲性のニポウディスクを用いたレーザー蛍光ライブイメージング顕微鏡を用いて観察した。このような方法により、古くから検討されてきた受精のメカニズムについて最新の技術見直すと共に基礎的な検討を行加えた。

4. 研究成果

これまでに知られていた、精子の受精能に必須の因子以外に、あらたに精子の形に影響を与える遺伝子を発見することができた。また、それ以外にも形や運動性には全く影響を与えないが、精子の受精能形成に必須な遺伝子群として新たに *Spespl*, *Calsperin*, *Pdilt*, *Pmis2*, *Tex101* などの遺伝子群が存在することを明らかにした。またこれら不妊マウスを詳細に検討することにより、輸卵管内への精子の侵入が受精にとって非常に大切なステップであることが浮き彫りにされた。さらに、精子が受精能を獲得するためには精子の先体部分の膜が融合する先体反応を起こす必要があるが、これまでこの反応は精子が卵子の透明帯に結合した刺激により起こされると考えられてきた。今回、先体部分の状態をモニターできる蛍光タンパク質で標識した精子を使うことにより、これまでの仮設が間違っていることが証明された。またマイクロマニピュレーターと遺伝子改変により融合不全となった精子や卵子を使い、一度卵子の透明帯を通過した精子を取り出して、

新たに卵子に加えると、再び卵子の層を通過できることも示し、先体反応の時期に関して新たな見方を導入することができた。

さらに、受精におけるノンコーディング RNA の役割についても検討を加えた。哺乳類の雌性における排卵のメカニズムは古くからよく研究されており、特に脳下垂体と卵巣との関係は、フィードバックシステムとして生命機能調節の根幹をなす最も有名な例のひとつとして知られてきた。ところがこの系には、今回新たにマイクロ RNA を欠損させたマウスを作製することにより、マイクロ RNA が排卵調節に必須の因子として働いていることがあきらかになった。生殖のメカニズム中におけるノンコーディング RAN の重要性を示す重要な知見が得られた。

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 25 件)

1. Hasuwa H, Ueda J, Ikawa M, Okabe M Micro RNAs miR-200b and miR-429 are Essential for Female Fertility in the Mouse by Ensuring Ovulation. Science, in press [査読有]

2. Fujihara Y, Tokuhiko K, Muro Y, Kondoh G, Araki Y, Ikawa M, Okabe M. Expression of TEX101, regulated by ACE, is essential for the production of fertile mouse spermatozoa. PNAS, 110(20), 8111-6 (2013) [査読有] doi:10.1073/pnas.1222166110

3. Satouh Y, Inoue N, Ikawa M, Okabe M. Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUM01. Journal of Cell Science, 125, 4985-4990 (2012) [査読有] doi:10.1242/jcs.100867

4. Fujihara Y, Satouh Y, Inoue N, Isotani A, Ikawa M, Okabe M. SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia. Development, 139, 3583-9 (2012) [査読有] doi:10.1242/dev.081778

5. Mice expressing aberrant sperm-specific protein PMIS2 produce normal-looking but fertilization-incompetent spermatozoa. Mol Biol Cell, 23, 2671-9 (2012) [査読有]

doi:10.1091/mbc.E11-12-1025

6. Yamaguchi R, Fujihara Y, Ikawa M, Okabe M, Tokuhiko K, Ikawa M, Benham AM, Okabe M. Protein disulfide isomerase homolog PDILT is required for quality control of sperm membrane protein ADAM3 and male infertility, Proc Natl Acad Sci U S A, 109, 3850-5 (2012) [査読有]
doi:10.1073/pnas.1117963109

7. Inoue N, Satouh Y, Ikawa M, Okabe M, Yanagimachi R. Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. Proc Natl Acad Sci U S A, 108, 20008-20011 (2011) [査読有]
doi:10.1073/pnas.1116965108

8. Kumasawa K, Ikawa M, Kidoya H, Hasuwa H, Saito-Fujita T, Morioka Y, Takakura N, Kimura T, Okabe M. Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. Proc Natl Acad Sci U S A, 108, 1451-5 (2011) [査読有]
doi: 10.1073/pnas.1011293108

[学会発表] (計 30件)

1. Masaru Okabe, Production of organs from ES cells in xenogeneic mouse<->rat chimera. TT2013 International Advisory Committee. 2013. 02. 25、広州白雲交際会議センター, China.

2. 岡部 勝, Gene manipulated animals and the mechanism of fertilization. 第2回アロ認証国際シンポジウム/2nd Allo-authentication meeting in conjunction with 5th Egg-coat meeting. 2012. 11. 12、ホテル名古屋ガーデンパレス

3. Masaru Okabe, Mechanism of Fertilization Observed by Gene Manipulated Animals. The 2nd SKLRB Symposia on Frontiers in

Reproductive Biology. 2012. 05. 11、Beijing Xijiao Hotel (Ginkgo Hall), China.

4. Masaru Okabe, Evolving Concepts in Sperm Capacitation and fertilization.

2011 SSR meeting of the Society for the Study of Reproduction.

2011. 07. 31、Oregon Convention Center, USA.

5. Masaru Okabe, Establishment of a rat ES cell line and a formation of chimeric animals by injection of rat ES cells into mouse blastocyst.

International Symposium on Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells.

2010. 11. 22、九州大学医学部百年講堂

6. Masaru Okabe, The Gene-Manipulated Animals and Research in Mechanism of Fertilization.

4th AFLAS Congress Academic Committee.

2010. 11. 09、Taipei International Convention Center, 中華民國

7. 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. 08. 28、Osaka University

8. Masaru Okabe, Regulation of sperm migration into the oviduct.

2010 Reproductive Tract Biology Gordon Research Conference.

2010. 08. 15、Proctor Academy, USA.

〔図書〕（計 1 件）

1. 岡部 勝（編）、羊子社、顕微鏡活用なるほど Q&A、（2008）、203

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/information/contents.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

磯谷 綾子（ISOTANI AYAKO）

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授

研究者番号：20444523

蓮輪 英毅（HASUWA HIDETOSHI）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：50343249