

平成22年6月18日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18208029

研究課題名（和文） 雌性生殖器での精子機能制御の仕組み

研究課題名（英文） Regulatory Mechanism of Sperm Function in Female Reproductive Tract

研究代表者

馬場 忠 (BABA TADASHI)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：40165056

研究成果の概要：

精子が雌性生殖器内で子宮から輸卵管へ移動し、卵管膨大部で卵子と融合するまでの過程で起こるさまざまな仕組みを明らかにするために研究を行った。精子セリンプロテアーゼ PRSS21 の欠損マウス精子を調べ、子宮や卵管分泌液中には精子の受精能を賦与する因子が存在することを発見した。また、PRSS21 が透明帯上での精子アクロソーム反応で重要な役割を果たしていることも明確にした。さらに、精子ヒアルロニダーゼ HYAL5 と SPAM1 の欠損マウス精子を解析し、受精にはヒアルロニダーゼが必須ではないことを証明し、卵子卵丘細胞複合体に精子排除機構があることを提唱した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
2007年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
2008年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
年度			
年度			
総計	28,500,000	8,550,000	37,050,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：受精、子宮、輸卵管、精子機能、マウス

1. 研究開始当初の背景

体外受精技術やクローン技術によって、雌性生殖器を経由しなくても受精できることが実験的に証明された。これを契機として、精子の子宮や輸卵管通過での精子機能制御に生理的意義がないかのような錯覚が広がっている。さらに、顕微授精技術の開発により、精子と卵丘細胞や卵子透明帯・細胞膜との相互作用についてもその重要性が顧みられなくなった。したがって、先端技術によってバイパスされた雌性生殖器で起こる精子機能制御の仕組みを明らかにすることは重

要である。それらの諸過程が精子の選択性を担っており、より良い精子だけを卵子に導く仕組みであると仮定した。もし、これらの仕組みを解明できれば、従来とは異なるまったく新しい着想とアプローチによる受精研究の展開と、新しい生殖補助技術の開発が期待できる。また、いくつかの認識応答制御過程を破綻に導くことで受精を阻害することができれば、避妊法の開発につながり、全世界的な人口増加問題解決のひとつの糸口になる可能性もある。さらに、ヒト不妊症治療だけでなく、家畜繁殖や絶滅危惧種存続に対す

る技術開発の点からもこの研究の社会的要
求性は高いと考えた。

2. 研究の目的

この研究では、各種ノックアウトマウスを
利用して、精子が雌性生殖器内で子宮から輸
卵管へ移動し卵管膨大部で卵子と融合する
までの過程で起こるさまざまな仕組みを明
らかにすることを目的とした。具体的には、
次の4項目に関して研究を行う計画を立案
した。

(1) マウス子宮での精子受精能獲得の分子 機構

精子細胞膜に局在する GPI アンカー型セリ
ンプロテアーゼ PRSS21 の欠損マウス精巢上
体精子を指標として、マウス子宮上皮細胞か
ら分泌される受精能獲得に関与する因子
(群)を同定することを試みる。また、それ
らの因子の機能を調べることによって子宮
での受精能獲得の分子機構を明らかにする。

(2) 子宮から輸卵管への精子移動制御機構

子宮から輸卵管への精子移動制御機構を
明らかにするために、排卵などでどのような
分子が分泌され精子移動で機能しているの
かに関して検討を加える。

(3) 輸卵管での精子接着・離脱の分子機構

子宮から輸卵管に移動した精子は、前方部
の isthmus 部上皮細胞に接着・結合し排卵刺
激などによって離脱する。輸卵管上皮細胞へ
の接着に関与する精子側の分子と精子の離
脱を促進させる輸卵管由来の分子の同定、お
よびそれらの諸性質の検討を通して、輸卵管
での精子接着・離脱の仕組みを明らかにする。

(4) 精子と卵子の相互認識応答の分子機構

精子の卵丘細胞層通過、卵子透明帯結合、
および卵子との融合に焦点を絞り、配偶子間
相互認識応答の分子機構を明確にする。

以上の研究を行い、哺乳動物雌性生殖器で
の精子機能制御機構に関して総括的にまと
める。

3. 研究の方法

(1) マウス子宮での精子受精能獲得の分子 機構に関する研究

PRSS21 欠損マウスの精巢上体精子は、野生
型マウスと異なり、メディウム中で受精能獲
得ができない。このことを利用して、性腺刺
激ホルモンによる過排卵処理と処理なしの
メスマウス子宮より子宮分泌液を調製する。
それを TYH メディウムに添加して、PRSS21 欠
損マウス精巢上体精子の受精能獲得状況を
調べる。次に、各種クロマトグラフィーによ
って子宮由来の受精能付与分子の精製と同
定を試みる。

また、受精能獲得に関与する精子タンパク
質の探索を行うために、精巢上体精子の膜タ
ンパク質を調製して二次元電気泳動を行い、

PRSS21 欠損と野生型マウスで比較検討する
ことによって、受精能獲得に関与する候補タ
ンパク質を探索する。さらに、大腸菌や動物
培養細胞で組換え型 PRSS21 を調製し、それ
を PRSS21 欠損マウス精子に作用させること
によって遊離してくるタンパク質を調べる。
これらの遊離タンパク質は、プロテオミクス
分析によって同定する。このように、PRSS21
欠損マウス精巢上体精子を用いながら、マウ
ス子宮上皮細胞から分泌されている受精能
獲得に関与する因子(群)を同定するととも
に、それによって機能変換される精子タン
パク質の特定を行い、精子受精能獲得の仕組
みを理解する。

(2) 子宮から輸卵管への精子移動制御機構 に関する研究

ADAM1A は精巢精細胞小胞体だけに存在し
ており、ADAM2 との複合体形成によって ADAM3
を精子細胞膜へ輸送している。このため、
ADAM1A 欠損マウス精子はその表層で ADAM3 も
欠損している。ADAM1A 欠損オスマウスは子宮
から輸卵管への精子移動不全のために不妊
になるので、ADAM3 をはじめとするいくつか
の精子膜タンパク質が同時に欠損しており、
排卵によって輸卵管から分泌・拡散される細
胞外シグナルを受容できない可能性がある。
そこで、ADAM3 を指標として、どのような輸
卵管分泌シグナル分子が ADAM3 に結合してい
るのか、また子宮輸卵管ジャンクション上皮
細胞のどのようなタンパク質と結合してい
るのかに関して研究を進める。

(3) 輸卵管での精子接着・離脱の分子機構 に関する研究

精子は輸卵管の子宮側前方部 isthmus で接
着し、排卵刺激などにもなって離脱すると
考えられている。接着に関与する精子側の分
子と精子の離脱を促進させる輸卵管分泌因
子の同定を行うために、それぞれから膜タ
ンパク質を調製し、プルダウンアッセイなど
によって目的のタンパク質を同定する。次に、
同定したタンパク質を指標として、輸卵管分
泌因子の同定も行う。また、それらの諸性質
の検討を通して、輸卵管での精子接着・離
脱の分子機構を明らかにする。

(4) 精子と卵子の相互認識応答の分子機構 に関する研究

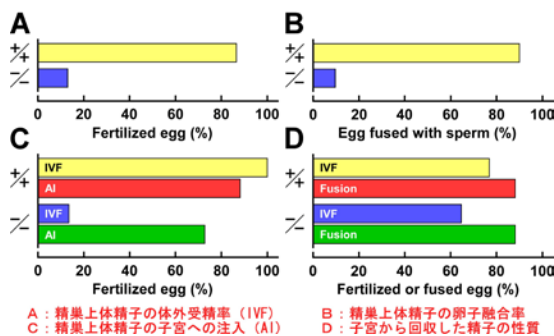
各種ノックアウトマウス精巢上体精子を
用いて、精子の卵丘細胞層通過、卵子透明帯
結合、および卵子との融合の諸過程で機能す
るヒアルロニダーゼ HYAL5 や SPAM1、ADAM
タンパク質、セリンプロテアーゼ PRSS21 など
を中心として配偶子間相互認識応答の分子
機構を調べる。

4. 研究成果

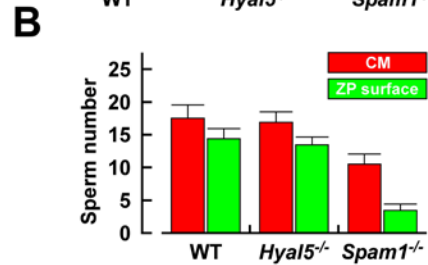
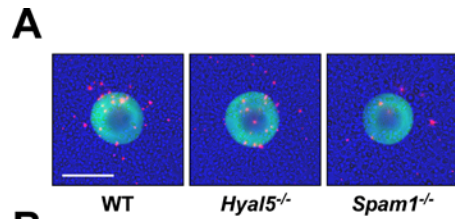
まず、精子セリンプロテアーゼ PRSS21 の欠
損マウスを ES 細胞経由で作製した。その欠損

マウスの妊孕性は正常であったが、精巣上体精子は体外受精能が顕著に低下していた。次に、その精巣上体精子を子宮内に注入し24時間後に受精卵を回収すると、野生型マウスと同程度の受精率であった。また、自然交尾後直ちに子宮から PRSS21 欠損精子を回収して体外受精試験を行うと、著しい受精率の上昇が認められた。体外受精の際に子宮分泌液を添加した場合にも、PRSS21 欠損精子の受精能だけでなく、卵子透明帯結合能や卵子との融合能が有意に増加した。しかし、その欠損精子の透明帯上でのアクロソーム反応は子宮分泌液添加でも改善されなかった。これらの結果から、子宮や卵管分泌液中には精子の受精能を賦与する因子が存在することが明らかになった。また、PRSS21 は精子の卵子透明帯上での精子アクロソーム反応で機能していることも明確になった。国内外に先駆けて、精子の受精能を賦与する因子を見いだしたことは、この研究のひとつの大きな発見であった。

Prss21/Tesp5ノックアウトマウス精子の性質



一方、精子ヒアルロニダーゼ HYAL5 と SPAM1 の欠損マウス精子を解析し、SPAM1 欠損により精子の卵子卵丘細胞複合体への侵入と卵子透明帯への到達が極端に遅延することが判明した。HYAL5 欠損精子は、野生型精子との機能的な差異が見いだせなかった。また、卵子卵丘細胞複合体からの卵丘細胞分散に関与する精子タンパク質の同定を試み、HYAL5 と SPAM1 のほかにセリンプロテアーゼ ACR や PRSS21 が分散を促進させていることが明らかになった。このように、卵子卵丘細胞複合体には精子排除機構があることが明確になった。また、精子の卵丘細胞層通過にヒアルロニダーゼは必須ではなく、透明帯へ到達する以前にアクロソーム反応を起こしており、それによって卵丘細胞層通過を容易にしている可能性が見いだされた。精子ヒアルロニダーゼが発見されてからすでに半世紀ほどが経過しているが、実際の生体内機能に関しては確固たる実験的証明がなかった。その意味からも、この研究成果が非常に重要なものであるといえる。



マウス精子の卵丘細胞層通過

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23件)

- ① Kimura, M., Kim, E., Kang, W., Yamashita, M., Saigo, M., Yamazaki, T., Nakanishi, T., Kashiwabara, S., and Baba, T. Functional roles of mouse sperm hyaluronidases, HYAL5 and SPAM1, in fertilization. *Biol. Reprod.* 81: 939-947 (2009) 査読あり
- ② Yamashita, M., Honda, A., Ogura, A., Kashiwabara, S., Fukami, K., and Baba, T. Reduced fertility of mouse epididymal sperm lacking Prss21/Tesp5 is rescued by sperm exposure to uterine microenvironment. *Genes Cells* 13: 1001-1013 (2008) 査読あり
- ③ Kim, E., Yamashita, M., Kimura, M., Honda, A., Kashiwabara, S., and Baba, T. Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *Int. J. Dev. Biol.* 52: 677-682 (2008) 査読あり
- ④ Yamashita, M., Yamagata, K., Tsumura, K., Nakanishi, T., and Baba, T. Acrosome reaction of mouse epididymal sperm on oocyte zona pellucida. *J. Reprod. Dev.* 53: 255-262 (2007) 査読あり
- ⑤ Kim, E., Yamashita, M., Nakanishi, T., Park, K.-E., Kimura, M., Kashiwabara, S., and Baba, T. Mouse sperm lacking ADAM1b/ADAM2 fertilin can fuse with the egg plasma membrane and effect fertilization. *J. Biol. Chem.* 281: 5634-5639 (2006) 査読あり

[学会発表] (計 27 件)

① Baba, T.

Role of hyaluronidase in sperm penetration through cumulus matrix. *20th International Symposium on Glycoconjugates*. Puerto Rico, Nov. 29-Dec. 4, 2009 (招待講演)

② 山下美鈴、河野菜摘子、康 宇鎮、柏原真一、馬場 忠

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、第 81 回日本生化学会大会合同大会：神戸、2008 年 12 月 9-12 日

③ Yamashita, M., Honda, A., Ogura, A., Kashiwabara, S.I., Fukami, K., and Baba, T.
Mouse sperm lacking serine protease Prss21/Tesp5 barely undergo the zona pellucida-induced acrosome reaction, but do fertilize the egg. *World Congress on Reproductive Biology*. Hawaii (USA), May 24-25, 2008 (招待講演)

④ Baba, T.

Functional defects of Tesp5-deficient mouse sperm in fertilization *in vitro* are restored by sperm transit through the uterus. *Gordon Research Conferences*. New Hampshire (USA), July 15-20, 2007 (招待講演)

⑤ Yamashita, M., Honda, A., Ogura, A., and Baba, T.

Role of testicular serine protease TESP5 in sperm fertilization. *International Symposium on Spermatology*. Madrid (Spain), Sep 17-22, 2006

[その他]

ホームページ等

<http://www.acroman.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 忠 (BABA TADASHI)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：40165056

(2) 研究分担者

中西 友子 (NAKANISHI TOMOKO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：10344863