

平成21年5月15日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007年～2008年

課題番号：19591878

研究課題名（和文） 哺乳動物の精子中心体の新しい機能評価法に関する研究

研究課題名（英文） Study on a new assay for the function of mammalian sperm centrosome.

研究代表者

氏名（ローマ字）：伊藤 千鶴（ITO CHIZURU）

所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：80347054

研究成果の概要：

精子中心体機能を評価するために、マウス実験系を確立し、ヒト精子中心体機能評価のためのシステムを構築することを最終目標とし、（1）中心体関連タンパク質 ODF2 がマウス精巣において発現する時期を同定した。（2）培養細胞にて他の中心体関連タンパク質と共存する ODF2 のアイソタイプを同定した。（3）ODF2 キメラマウスからヘテロマウスが生まれない原因が、精子頸部の脆弱性によることを明らかにした。また、ODF2 遺伝子改変マウスが精子中心体の機能解析のためのマウス実験系にふさわしい疾患モデルマウスであることを示した。

（4）ODF2 の生体での機能解析のため、ODF2-EGFP トランスジェニックマウスを作製した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,400,000	720,000	3,120,000
20年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：アンドロロジー、不妊症、精子中心体、精子機能

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト胚発生には精子中心体が必須であるが、特異的抗体は少ない。また、疾患モデルマウスもなく、精子形成から胚発生に至るまでの中心体関連タンパク質の機能はよく分かっていない。しかし、精子構成タンパク質 ODF2 が中心体に普遍的に存在することを研究協力者である月田早智子教授等が世界に先駆けて発表し、その後、野田哲生博

士（癌研究会研究所所長：研究協力者）らとともに ODF2 キメラマウスを作製した結果、キメラマウスからはヘテロマウスが生まれないことがわかった。申請者らはその解析に加わり、その原因が精子中心体にある可能性を見出した。

ヒト精子中心体は、卵子内に取り込まれた後に「精子星状体」を形成する。もし形成されなければ、卵子内で微小管が形成さ

れないため初期発生段階で発生が停止し、不妊となる。また、不妊治療として、精子のみならず精細胞を用いた卵子内精子注入法 (ICSI) が広く行われているが、中心体が正常に機能しない場合は、発生が停止する。したがって、中心体が、精子形成過程でどのように形成され、受精過程でどのように機能しながら正常な胚発生に至るか、またその破綻がどのようにして不妊につながるかについて、経時的に解析し、基礎データを集積することは、今後の配偶子相互作用を研究する上で極めて重要なことであり、世界的に見ても緊急な課題となっている。

## 2. 研究の目的

精子中心体機能を可視化して評価するために、マウス実験系を確立し、ヒト精子中心体機能評価のためのシステムを構築することを最終目標とした。その目的のために次の4つの段階的目的を設定した。

(1) ODF2 タンパク質の精子形成過程における(特に頸部での)発現時期を特定する。また、成熟精子における ODF2 と精子中心体との関連を探る。

(2) 培養細胞を用いて ODF2 と他の中心体関連タンパク質との関係を解明する。

(3) ODF2 キメラマウスの成熟精子を解析し、ODF2 遺伝子改変マウスが精子中心体機能解析に適しているかどうかを判定する。

(4) ODF2-EGFP トランスジェニック(TG)マウスを作製し、ODF2 と精子中心体との関連の解析につなげる。

## 3. 研究の方法

(1) 野生型マウス精巣を抗 ODF2 抗体を用いた間接蛍光染色法および免疫組織化学法により解析した。成熟精子を抗 ODF2 抗体による間接蛍光抗体法で解析した。

(2) ODF2 の4つのアイソタイプ(1 $\alpha$ , 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ , 4)および中心体関連タンパク質 mouse-centrin、および human-centrin、ODF2 のスプライシングバリエントである mouse-cenexin および human-cenexin に、緑色蛍光タンパク質 EGFP と赤色蛍光タンパク質 Cherry を発現する遺伝子をそれぞれつないだベクターを作製した。これらを HEK293T

細胞に共発現させて局在を解析した。

(3) ODF2 キメラマウス成熟精子を光学顕微鏡および電子顕微鏡レベルで解析した。野生型およびキメラ成熟精子を抗 ODF2 抗体と F10 抗体 (ODF2 を認識する異なる現用の抗体) や抗  $\gamma$ -tubulin 抗体等を用いて間接蛍光抗体法にて比較解析し、中心体関連タンパク質の挙動を分析した。

(4) ODF2 に緑色蛍光タンパク質 GFP を発現する遺伝子をつなぎ、ODF2-EGFP TG ベクターを作製し、精巣特異的発現プロモーターを装備したベクターに組換えた。常法 (B6 系の前核期受精卵の男性前核に注入するマイクロインジェクションによる遺伝子導入) により、遺伝子改変マウスを作製した。

## 4. 研究成果

(1) 野生型マウス精巣において、ODF2 が強く発現する時期を同定した。成熟精子において、ODF2 は、頸部および尾部に強く発現することがわかった。

(2) ODF2 の4つのアイソタイプ (1 $\alpha$ , 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ , 3 $\beta$ , 4) のうち、ODF2-2 $\alpha$ , mouse-centrin, human-centrin, mouse-cenexin, human-cenexin は、共に中心体領域に集積することを確認した。

(3) ODF2 キメラ精子には、正常な形態の精子と脆弱な頸部をもつ精子が混在することを明らかにした。さらに、脆弱頸部をもつ精子を野生型卵にインジェクションすることによってヘテロマウスを作製することに成功した。ヘテロ雄は不妊であった。キメラ頸部脆弱精子と野生型精子では、両者間の ODF2 タンパク質や中心体関連タンパク質の局在に違いがあることが判明した。

以上の結果より、ODF2 遺伝子改変マウスは、精子中心体機能解析の実験系としてふさわしいと考えた。

(4) 遺伝子導入により ODF2-EGFP マウスを作製した。PCR で genotyping を行なった結果、ODF2-EGFP が導入されていることを確認した。現在、ODF2-EGFP TG マウスを交配し、実験に使うためのマウスを作製中である。

## 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 14 件)

1. 年森 清隆, 伊藤千鶴. 受精障害の検出. 卵子学. 京都大学学術出版会. In press. (2009) 査読有
2. Suzuki R, Saino-Saito S, Sakagami H, Toshimori K, Abe H, Kondo H. Localization of EFA6A, a guanine nucleotide exchange factor for ARF6, in spermatogenic cells of testes of adult mice. **J Mol Histol** 40: 77-80. (2009) 査読有
3. Toshimori K. Dynamics of the mammalian sperm head: modifications and maturation events from spermatogenesis to egg activation. **Anatomy, Embryology, Development and Cell Biology** 204: 1-108. (2009) 査読有
4. Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa A. The fusing ability of sperm is bestowed by CD-9-containing vesicles released from eggs in mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 105: 12921-12926. (2008) 査読有
5. Tomizawa M, Toyama Y, Ito C, Toshimori K, Iwase K, Takiguchi M, Saisho H, Yokosuka O. Hepatoblast-like cells enriched from mouse embryonic stem cells in medium without glucose, pyruvate, arginine, and tyrosine. **Cell Tissue Res** 333: 17-27. (2008) 査読有
6. Toshimori K. Imaging of the mechanisms of sperm entry into the ooplasm in mammals. **Microscopy** 43 supplement1: 124-127. (2008) 査読有
7. Tokuhiko K, Hirose M, Miyagawa Y, Tsujimura A, Irie S, Isotani A, Okabe M, Toyama Y, Ito C, Toshimori K, Takeda K, Oshio S, Tainaka H, Tsuchida J, Okuyama A, Nishimune Y, Tanaka H. Meichroacidin containing the MORN motif essential for spermatozoa morphogenesis. **J Biol Chem** 283: 19039-19048. (2008) 査読有
8. Sato Y, Baba T, Zubair M, Miyabayashi K, Toyama Y, Maekawa M, Owaki A, Mizusaki H, Sawamura T, Toshimori K, Morohashi K, Katoh-Fukui Y. Importance of forkhead transcription factor Fkhl18 for development of testicular vasculature. **Mol Reprod Dev** 75: 1361-1371. (2008) 査読有
9. 年森 清隆, 伊藤千鶴. 精子形成: 形態学的・超微細形態学的側面 産婦人科治療 (特集: ART の New Trend) 57: 51-59. (2008) 査読有
10. Toyama Y, Suzuki-Toyota E, Maekawa M, Ito C, Toshimori K. Disruption of ectoplasmic specializations between Sertoli cells and maturing spermatids by anti-neectin-2 and -3 antibodies. **Asian J Androl** 10: 577-584. (2008) 査読有
11. Toshimori K and Ito C. Human sperm ultrastructures and fertility. **J Mamm Ova Res** 25: 232-239. (2008) 査読有
12. Ishimaru Y, Komatsu T, Kasahara M, Katoh-Fukui Y, Ogawa H, Toyama Y, Maekawa M, Toshimori K, Chandraratna RAS, Morohashi K, Yoshioka H. Mechanism of asymmetric ovarian development in chick embryos. **Development** 135: 677-685. (2008) 査読有
13. Suzuki-Toyota E, Ito C, Toyama Y, Maekawa M, Yao R, Noda T, Iida H, Toshimori K. Factors maintaining normal sperm tail structure during epididymal maturation studied *GOPC*<sup>-/-</sup> mice. **Biol Reprod** 77: 115-119. (2007) 査読有
14. Sato B, Katagiri Y-U, Miyado K, Akutsu H, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Preferential localization of SSEA-A in interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos. **BBRC** 364: 838-843. (2007) 査読有

[学会発表] (計 33 件)

1. 伊藤千鶴, 大和屋 健二, 吉田 恵一, 前川 眞見子, 外山 芳郎, 鈴木-豊田 二美枝, 年森 清隆. 配偶子膜融合関連タンパク質 Equatorin の発現と局在化 第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会 岡山理科大学 (岡山県) 2009 年 3 月 29 日
2. 吉田 恵一, 伊藤千鶴, 大和屋 健二, 古瀬 諒二, 荒木 基行, 前川 眞見子, 外山 芳郎, 鈴木-豊田 二美枝, 年森 清隆. Equatrin

- をマーカーにした先体反応進行の評価 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会 岡山理科大学 (岡山県) 2009年3月29日
3. 大和屋 健二、吉田 恵一、伊藤 千鶴、前川 眞見子、柳田 光昭、荒木 慶彦、宮戸 健二、外山 芳郎、鈴木-豊田 二美枝、年森 清隆。MN9抗原 Equatorin O型糖鎖は配偶子膜融合に重要である 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会 岡山理科大学 (岡山県) 2009年3月29日
  4. 外山 芳郎、鈴木-豊田 二美枝、前川 眞見子、伊藤 千鶴、大和屋 健二、吉田 恵一、年森 清隆。一次精母細胞に見られた奇妙な膜性細胞内小器官について 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会 岡山理科大学 (岡山県) 2009年3月29日
  5. 前川 眞見子、荒木 基行、古瀬 諒二、大和屋 健二、吉田 恵一、伊藤 千鶴、外山 芳郎、鈴木-豊田 二美枝、年森 清隆。マウス精子における膜糖タンパク質ベシジン分子の動態 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会 岡山理科大学 (岡山県) 2009年3月29日
  6. 年森 清隆。哺乳動物精子の卵子内進入のイメージング 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会 (シンポジウム) 岡山理科大学 (岡山県) 2009年3月28日
  7. 年森 清隆。雄性生殖細胞を用いた顕微受精と核移植 第4回 日本生殖再生医学会 第4回学術集会 大手町サンケイプラザ3F (東京都) 2009年3月15日
  8. 伊藤 千鶴、阿久津 英憲、八尾 良司、京野 廣一、鈴木-豊田 二美枝、外山 芳郎、前川 眞見子、野田 哲生、年森 清隆。卵活性化能は精子頭部の扁平化とperi-nuclear theca 構成物質の存在に関連する 第33回日本顕微鏡学会関東支部講演会 工学院大学 新宿キャンパス (東京都) 2009年3月7日
  9. 年森 清隆。良好な精子をいかに選択するか 第10回 浜通り不妊治療勉強会 (医) いわき婦人科カンファレンスルーム (福島県) 2009年2月21日
  10. 年森 清隆。Live image cell biology ちば Basic & Clinical Research Conference 京成ホテル ミラマーレ (千葉県) 2009年2月7日
  11. 年森 清隆。受精障害の検出: 機能形態学的アプローチ 第8回東海不妊内分泌研究会 グランシップ静岡 10F 会議室 1001-2 (静岡県) 2009年1月31日
  12. Ito C and Toshimori K. Recent advancement in human reproductive genetics. (Symposium) 1st Symposium Indonesian Society of Reproductive Immunology & Genetics (HIGERI). Horison Hotel Bandung (Indonesia) 2009.1.8-10
  13. Toshimori K. DNA fragmentation in sperm and its application for ART. (Symposium) 1st Symposium Indonesian Society of Reproductive Immunology & Genetics (HIGERI). Horison Hotel Bandung (Indonesia) 2009.1.8-10
  14. 伊藤 千鶴、阿久津 英憲、鈴木-豊田 二枝美、八尾 良司、外山 芳郎、前川 眞見子、野田 哲生、年森 清隆。先体後部鞘関連タンパク MN13 は伸長核精子に存在し、卵活性化能と相関する。第6回アンドロロジーカンファレンス 目黒東急ビル6F 2008年9月28日
  15. 吉田 恵一、伊藤 千鶴、大和屋 健二、前川 眞見子、外山 芳郎、鈴木-豊田 二枝美、年森 清隆。受精に伴う、精子頭部タンパク質の挙動-EQUATORIN の変化を中心に- 第6回アンドロロジーカンファレンス 目黒東急ビル6F 2008年9月28日
  16. 大和屋 健二、吉田 恵一、伊藤 千鶴、前川 眞見子、柳田 光昭、荒木 慶彦、宮戸 健二、外山 芳郎、鈴木-豊田 二枝美、年森 清隆。配偶子膜融合阻害抗体 MN9 の抗原決定基の同定: 受精における重要なタンパク修飾 第6回アンドロロジーカンファレンス 目黒東急ビル6F 2008年9月28日
  17. 小埜 清、中條 弘隆、兼子 智、石川 博通、伊藤 千鶴、年森 清隆。r-hFSH, hCG 治療後の精子出現症例に対する精子形態的検討 第26回日本受精着床学会総会・学術講演会 福岡国際会議場 (福岡県) 2008年8月28日
  18. Toshimori K, Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Mackawa M, Toyama Y, Suzuki-Toyota F. Human Sperm Equatorin Analyzed by Anti-Equatorin Antibodies, MN9 and EQ<sub>70-83</sub>. The Society for the Study of Reproduction (SSR) 2008 Annual Meeting. Kailua-Kona, Hawaii (America) 2008.5-27-30



19. Suzuki-Toyota F, Ito C, Maekawa M, Toyama Y, Toshimori K. Adhesion between the plasma membrane and the outer mitochondrial membrane in relation with the migration of the cytoplasmic droplet in guinea-pig spermatozoa. The Society for the Study of Reproduction (SSR) 2008 Annual Meeting. Kailua-Kona, Hawaii (America) 2008.5-27-30
20. Yoshida K, Ito C, Yamatoya K, Furuse R, Araki T, Maekawa M, Wada K, Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Toshimori K. Mouse Sperm Equatorin Analyzed by Anti-Equatorin Antibodies, MN9 and EQ70-83. The Society for the Study of Reproduction (SSR) 2008 Annual Meeting. Kailua-Kona, Hawaii (America) 2008.5-27-30
21. Yamatoya K, Yoshida K, Ito C, Maekawa M, Yanagida M, Araki Y, Miyado K, Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Toshimori K. Mammalian Sperm MN9 Antigen N-, O-sialylglycoprotein Equatorin: Biochemical Characterization and Identification of the Gene. The Society for the Study of Reproduction (SSR) 2008 Annual Meeting. Kailua-Kona, Hawaii (America) 2008.5-27-30
22. Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Maekawa M, Ito C, Toshimori K. Function of Ectoplasmic Specializations between the Sertoli Cells and Maturing Spermatids. The Society for the Study of Reproduction (SSR) 2008 Annual Meeting. Kailua-Kona, Hawaii (America) 2008.5-27-30
23. 伊藤千鶴, 阿久津英憲, 鈴木-豊田二美枝, 八尾良司, 前川眞見子, 外山芳郎, 野田哲生, 年森清隆. 先体後部鞘関連タンパク質 MN13 は伸長核精子に存在し、卵活性化能と相関する。第113回日本解剖学会総会・全国学術集会 大分大学医学部 (大分県) 2008年3月27~29日
24. 年森清隆, 伊藤千鶴, 大和屋健二, 吉田恵一, 前川眞見子, 外山芳郎, 鈴木-豊田二美枝. ヒト EQUATORIN 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会 大分大学医学部 (大分県) 2008年3月28日
25. 前川眞見子, 伊藤千鶴, 宮戸健二, 阿久津英憲, 吉田恵一, 大和屋健二, 外山芳郎, 鈴木-豊田二美枝, 年森清隆. ベイシジン-GFP トランスジェニックマウスの確立と解析 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会 大分大学医学部 (大分県) 2008年3月27~29日
26. 鈴木-豊田二美枝, 伊藤千鶴, 前川眞見子, 外山芳郎, 年森清隆. モルモット精子の精巢上体内成熟に伴う細胞質小滴の移動と中片部の構造変化 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会 大分大学医学部 (大分県) 2008年3月27~29日
27. 吉田恵一, 大和屋健二, 伊藤千鶴, 古瀬諒二, 荒木基行, 前川眞見子, 和田邦生, 外山芳郎, 鈴木-豊田二美枝, 年森清隆. マウス精子 EQUATORIN: EQUATORIN 抗体と MN9 抗体による染色性の相違 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会 大分大学医学部 (大分県) 2008年3月27~29日
28. 大和屋健二, 吉田恵一, 伊藤千鶴, 前川眞見子, 柳田光昭, 荒木慶彦, 宮戸健二, 和田邦生, 外山芳郎, 鈴木-豊田二美枝, 年森清隆. 哺乳類精子 MN9 抗原 EQUATORIN: 遺伝子の同定と分子の解析 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会 大分大学医学部 (大分県) 2008年3月27~29日
29. 和田邦生, 前川眞見子, 外山芳郎, 伊藤千鶴, 大和屋健二, 吉田恵一, 鈴木-豊田二美枝, 年森清隆. モノクローナル抗体 F10 を用いた精子尾部の解析 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会 大分大学医学部 (大分県) 2008年3月27~29日
30. 小嶋清, 中條弘隆, 兼子智, 伊藤千鶴, 年森清隆. ゴナールエフ、プロファシー治療後の精子出現症例に対する精子形態学的検討 第5回関東アンドロロジーカンファレンス・プログラム 目黒東急ビル会議室場6階 (東京) 2008年3月22日
31. 伊藤千鶴, 大和屋健二, 吉田恵一, 前川眞見子, 外山芳郎, 鈴木-豊田二美枝, 年森清隆. 精子先体 EQUATORIN の発現と組織化 日本顕微鏡学会第32回講演会 東京工業大学 大岡山キャンパス (東京都) 2008年3月8日
32. 吉田恵一, 伊藤千鶴, 大和屋健二, 前川眞見子, 外山芳郎, 鈴木-豊田二美枝, 年森清隆. 精子先体 EQUATORIN の性状 日本顕微鏡学会第32回講演会 東京工業大学大岡山キャンパス (東京都) 2008年3月8日

33. Kawa S, Ito C, Toyama Y, Maekawa M,  
Yoshida N, Toshimari K, Yamamoto T. Azoo-  
spermia in mice with targeted disruption of the  
Brek/Lmtk2 (brain-enriched kinase/lemur  
tyrosin kinase 2) gene. 第30回日本分子生物  
学会年会 第80回日本生化学会大会合同  
大会 パシフィコ横浜(横浜市) 2007年12  
月12日

[図書] (計 1件)

1. 年森 清隆、伊藤 千鶴、臨床のための解剖学 (Clinically Oriented Anatomy) 第3章 骨盤と会陰 343-461 (翻訳) メディカル・サイエンス・インターナショナル (2008年)

[その他]

○受賞歴 (計 1件)

1. 日本顕微鏡学会関東支部会 第32回講演会 最優秀ポスター賞 東京工業大学 大岡山キャンパス (東京都) 2008年3月8日

○Home page URL

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/devbiol/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 千鶴 (ITO CHIZURU)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：80347054

(2) 研究分担者

年森 清隆 (TOSHIMORI KIYOTAKA)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：20094097

(3) 連携研究者

豊田 二枝美 (TOYOTA FUMIE)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号：60009751

外山 芳郎 (TOYAMA YOSHIRO)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号：70009637

前川 眞見子 (MAEKAWA MAMIKO)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：20181571

神村 今日子 (KAMIMURA KYOKO)  
千葉大学・大学院医学研究院・技術専門職員

研究者番号：20422264

武藤 透 (MUTOH TOHRU)  
千葉大学・大学院医学研究院・技術専門職員  
研究者番号：30422265

吉田 恵一 (YOSHIDA KEIICHI)  
千葉大学・大学院医学研究院・協力研究員  
研究者番号：90365437

大和屋 健二 (YAMATOYA KENJI)  
千葉大学・大学院医学研究院・協力研究員  
研究者番号：80447309

(4) 研究協力者

幡野 雅彦 (HATANO MASAHIKO)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：20208523

月田 早智子 (TSUKITA SACHIKO)  
大阪大学・生命機能研究科・教授  
研究者番号：00188517

野田 哲生 (NODA TETSUO)  
癌研究所・所長  
研究者番号：10183550

八尾 良司 (YAO RYOJI)  
癌研究所・細胞生物部・主任研究員  
研究者番号：80291095

阿久津 英憲 (AKUTSU HIDENORI)  
国立成育医療センター 研究所・室長  
研究者番号：50347225

宮戸 健二 (MIYADO KENJI)  
国立成育医療センター 研究所・室長  
研究者番号：60324844