

## 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 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22800041

研究課題名（和文） 遺伝子組換え動物を用いた精子頭部形成の分子メカニズムの解析

研究課題名（英文） Analysis of the molecular mechanism of sperm head formation using gene-manipulated animals

研究代表者

藤原 祥高 (FUJIHARA YOSHITAKA)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員

研究者番号：70578848

研究成果の概要（和文）：

SPACA1 は、哺乳類精子の赤道面に局在し、精子と卵子の融合に機能することが報告されている膜タンパク質である。我々は *Spaca1* 遺伝子欠損マウスを作製し、欠損雄マウスが不妊であることを明らかにした。しかし、この不妊の原因は、ヒトの巨大円形精子症(globozoospermia) と酷似する精子頭部の形態異常であることが判明した。SPACA1 が欠損することで、精子形成過程で精子細胞にある先体内膜と核膜との間に存在する nuclear plate の消失を引き起こした。これは精子先体の緩みと一致し、成熟精子から先体の奇形および消失を導いた。つまり、SPACA1 は精子形成において必須の因子であり、globozoospermia に至る分子メカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

SPACA1 is a membrane protein that localizes in the equatorial segment of spermatozoa in mammals and is reported to function in sperm-egg fusion. We produced a *Spaca1* gene-disrupted mouse line and found that the male mice were infertile. However, the cause of this sterility turned out to be abnormal shaping of the sperm head reminiscent of globozoospermia in humans. Disruption of *Spaca1* led to disappearance of the nuclear plate, a dense lining structure of the nuclear envelope facing the inner acrosomal membrane. This coincided with the failure of acrosomal expansion during spermiogenesis and resulted in the degeneration and disappearance of the acrosome in mature spermatozoa. Thus, one of the mechanisms leading to globozoospermia has been clarified.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,260,000 | 378,000 | 1,638,000 |
| 2011年度 | 1,160,000 | 348,000 | 1,508,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,420,000 | 726,000 | 3,146,000 |

研究分野：生殖生物学

科研費の分科・細目：医歯薬学・実験動物学

キーワード：遺伝子組換えマウス、精子形成、巨大円形精子症、SPACA1 タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

精子形成は雄の生殖細胞を作り出す重要な過程であり、ヒトを含む多くの哺乳類の雄は

正常精子と共に多くの奇形精子を産生し、奇形精子が受精能の低下を引き起こすと考えられている。今回、申請者は近交系マウスの

奇形精子に関するこれまでの報告 (Krzanowska, 1981; Kot and Handel, 1987) から、奇形率が非常に高い(60-80%)BALB/c 系統の精子に着目し、奇形率の低い BDF1 系統との比較により新たに SPACA1 タンパク質の減少を見つけた。

SPACA1 タンパク質の成熟精子における局在部位を調べたところ、SPACA1 は精子頭部にのみ存在し先体反応前後で局在が変化しないこと、さらにはアミノ酸配列より一回膜貫通型のタンパク質であることが分かった。

BALB/c 系統の精巣での SPACA1 の減少と SPACA1 の生理的機能を明らかにするために、申請者は C57BL/6 系統由来のマウス ES 細胞を用いて、*Spaca1* 遺伝子 KO マウスを作製した。ヘテロ欠損型マウス同士の交配により得られたホモ欠損型(KO)マウスを用いて、初めに野生型との交配により生殖能力を調べた。その結果、ヘテロ欠損型の雄マウスや KO 雌マウスの生殖能力は正常であったが、KO 雄マウスは完全に不妊であることが明らかとなった。さらに解析を進めると、精巣重量や精巣切片の観察からは野生型との大きな違いは見られなかったが、成熟精子を観察したところ KO マウスでは全ての精子が奇形を示し、その形態はヒト不妊症のひとつである巨大円形精子症 (globozoospermia) と酷似していることが明らかとなった (図 5、未発表データ)。この巨大円形精子症の主な原因は、精子の先体(acrosome)と呼ばれる部分の形成異常により引き起こされる疾病であると言われているが、詳細な発症の分子メカニズムは明らかになっていない。そこで今回得られた遺伝子改変動物を globozoospermia の疾患モデルマウスとして使用し、奇形精子症の分子メカニズムの解明を目指した。

## 2. 研究の目的

生殖細胞とは、生物の遺伝情報を次世代へと伝えることのできる唯一の細胞であり、哺乳類では精子と卵子がその役割を担っている。申請者はこれまでに実験動物として多用されているが、奇形精子を多く産生することが知られている BALB/c 系統マウスに着目し、奇形精子の原因遺伝子の探索を行った。その結果、新たに *Spaca1* (sperm acrosome associated 1) 遺伝子を候補として見つけ、生理的機能の解析を行うために *Spaca1* 遺伝子ノックアウト(KO)マウスを作製した。本研究課題では、申請者が新たに作製した *Spaca1* 遺伝子 KO マウスを用いて、SPACA1 の精子形成における機能解析を行い、奇形精子発症の分子メカニズムを明らかにすることを目的に解析を進める。

## 3. 研究の方法

本研究では、前述の通り申請者が作製した *Spaca1* 遺伝子 KO マウスを解析の中心に置きながら、さらにその解析を正確かつ効率的に行うことを可能にする Tg マウスを加えて個体レベルでの解析を行う。奇形精子症および精子頭部形成の分子メカニズムを二年間という限られた期間で効率よく行うために、以下の 3 つのテーマに分けて解析を進めた。(1) *Spaca1* 遺伝子 KO マウス精巣の表現型解析、(2) 巨大円形精子症(globozoospermia)の分子メカニズムの解析、(3) トランスジェニック(Tg)マウスを用いた SPACA1 の機能ドメインの探索

## 4. 研究成果

申請者が新たに作製した精巣特異的な膜タンパク質である *Spaca1* 遺伝子 KO マウスは図 1 に示すように KO 雄マウスだけが完全な不妊であることが明らかとなった。そして、その不妊の原因を探ったところ、図 2 に示すように KO マウスが産生する精子が全て奇形であった。その奇形精子はヒト不妊症の原因のひとつである巨大円形精子症 (globozoospermia) に酷似する表現型を示すことが分かった。

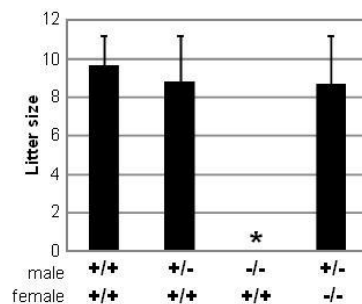


図 1. *Spaca1* 遺伝子 KO マウスの平均産子数、KO 雄マウスは完全に不妊だった。

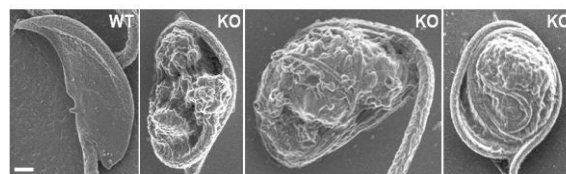


図 2. KO 精子の電子顕微鏡観察、KO 精子は野生型(WT)精子の形態とは大きく異なり、ヒト不妊症のひとつである巨大円形精子症で見られる奇形精子と酷似していることが明らかとなった。*Spaca1* 遺伝子 KO マウスはヒト疾患モデルマウスとして奇形精子症の分子メカニズムの解明に貢献できると考えられる。

22年度は実験計画通り、共焦点レーザー顕微鏡を用いて精子形成時の SPACA1 タンパク質の局在を詳細に観察した。その結果、膜タンパク質である SPACA1 は精子先体形成の初期より出現し、完成精子形成時まで先体内膜全体に広く分布し続けることが明らかとなった。また、膜タンパク質である IZUMO1 との共染色により精子先体膜のダイナミックな挙動を観察することができた。これにより、これまでの電顕観察とは異なり精子形成を立体的に理解する上で有用な知見であると考えられる。

次に、先体に GFP を持つ Tg マウスと KO マウスを掛け合わせて、先体を GFP で指標した KO 精巣を詳細に観察すると、KO は step5 辺りまでは WT との大きな差は見られないが、その後の先体の伸長が顕著に悪くなることが明らかとなった。つまり、SPACA1 が欠損することで精巣内の半数体精子細胞はごく初期の段階で先体に形成異常を来し、奇形精子が産生されることが分かった。23年度は、*Spaca1* 遺伝子 KO マウスと同じ表現型を示す KO マウスを用いて、それぞれの因子(GOPC, ZBPB1 など)の精子形成における関連及び役割を検証した。

図 3 に示すように、野生型マウス精巣では GOPC は生後すぐに、ZBPB1 は 3 週齢より発現することから 4 週齢から発現する SPACA1 より早い時期に発現を開始することが分かった。入手した GOPC と ZBPB1 の KO マウスを用いて、KO 精巣における SPACA1 タンパク質の存在を調べた。その結果、精巣内での発現時期に関連して GOPC 及び ZBPB1 の KO 精巣から SPACA1 タンパク質が消失していることが明らかとなった。これらの結果から、これまでに報告のある因子の中で、SPACA1 が精子頭形成過程における最下流の因子であることが分かった。



図 3. SPACA1 の精巣での発現時期のウェスタンブロット。現在報告のある因子の中で SPACA1 は精子頭形成において最下流の因子である。

## 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 2 件)

- ① 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」, 『Journal of Cell Science』, Company of Biologists, 査読有、123 号、pp1531-1536、2010、doi: 10.1242/jcs.067363

② Kobayashi S., Fujihara Y., Mise N., Kaseda K., Abe K., Ishino F., Okabe M., 「The X-linked imprinted gene family *Fthl17* shows predominantly female expression following the two-cell stage in mouse embryos」, 『Nucleic Acids Research』, Oxford University Press, 査読有、38 号、pp3672-81、2010、doi: 10.1093/nar/gkq113

[学会発表] (計 5 件)

① 藤原祥高、徳弘圭造、室悠子、荒木慶彦、伊川正人、岡部勝

「精巣内生殖細胞特異的な発現を示す *Tex101* ノックアウトマウスの作製と機能解析」, 『第 34 回日本分生学会年会』, 横浜、2011 年 12 月 13 日

② 藤原祥高、佐藤裕公、井上直和、磯谷綾子、伊川正人、岡部勝

「精子形成における IZUMO1 および SPACA1 タンパク質の局在変化と機能解析」, 『第 58 回日本実験動物学会総会』, 東京、2011 年 5 月 25 日

③ 藤原祥高、佐藤裕公、井上直和、磯谷綾子、伊川正人、岡部勝

「*Spaca1*, sperm acrosome associated 1, is required for acrosome formation in mice」, 『BMB2010 (第 33 回日本分生学会年会、第 83 回日本生化学会大会)』, 神戸、2010 年 12 月 7 日

④ Y. Fujihara, M. Murakami, N. Inoue, Y. Satouh, K. Kaseda, M. Ikawa, M. Okabe, 「Sperm equatorial segment protein 1, SPESP1, is required for fully fertile sperm in mouse」, 『International Symposium for Immunology of Reproduction』, Osaka, Japan, (28<sup>th</sup>, Aug., 2010)

⑤ Y. Fujihara, Y. Satouh, N. Inoue, A. Isotani, M. Ikawa, M. Okabe

「*Spaca1*, Sperm acrosome associated 1, is required for sperm-head shaping」, 『11th International Symposium on Spermatology』, Okinawa, Japan, (24<sup>th</sup>, Jun., 2010)

[図書] (計 2 件)

① 藤原祥高、伊川正人、「疾患モデルマウス：臓器系：生殖細胞」, 『疾患モデルマウス表現型解析指南』, 株式会社中山書店、pp213-220、2011 年

② 森岡裕香、藤原祥高、伊川正人、「ノックアウトマウスプロジェクト」, 『モデル動物利

用マニュアル<生物機能モデルと新しいリ  
ソース・リサーチツール>』、株式会社エル・  
アイ・シー、pp459-468、2011年

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤原 祥高(FUJIHARA YOSHITAKA)  
大阪大学・微生物病研究所・特任研究員  
研究者番号：70578848

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：