

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293041

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた精子機能タンパク質発現と不妊発症に関する細胞生物学的研究

研究課題名(英文) Cellular and molecular studies on expression of sperm functional proteins relating with infertility using gene-modified mouse lines

研究代表者

年森 清隆 (Toshimori, Kiyotaka)

千葉大学・未来医療教育研究センター・特任教授

研究者番号：20094097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：精子タンパク質エクアトリンのトランスジェニック(Tg)マウスを用いて、超解像顕微鏡STED (STimulated Emission Depletion) 顕微鏡で受精に必須な先体反応に関わる先体膜を80nm前後のレベルで解析し、ライブセルイメージングへの応用の可能性を示した。精子が卵子膜との融合するために行う細胞膜や先体膜系の微細構造や生化学的変化を解析した。エクアトリン遺伝子欠損マウスを用いて、精子に起こる異常現象と関連分子の変化と相互関係について解析し、エクアトリンが必要であることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Using the established Eqtn-Tg(EGFP) and Eqtn-KO mouse lines, we analyzed live-images of the acrosome region that is the sperm fusion site for egg and molecular change from the acrosome reaction throughout to egg activation. A whole cell imaging (80-100nm acrosomal membrane complex) of sperm was obtained by new microscopy STED system without sectioning, which suggested a possibility of live cell imaging during fertilization (Microscopy, 2015). We clarified the distribution abnormality of gamete fusion-related spesp1 in the Eqtn-knockout (KO) mouse line, fertility loss of the Eqtn/Spesp1 double KO mouse line and relations with other gamete-fusion related proteins. Based on these analyses, we proposed the novel mechanism of sperm membrane modifications leading to gamete fusion in mammals including humans. Manuscripts showing these events are prepared for publication.

研究分野：精子

キーワード：精子 遺伝子改変マウス 受精 不妊 エクアトリン equatorin

### 1. 研究開始当初の背景

受精現象については古くから国内外で無数の研究がなされ、多くの仮説が提唱された。先体反応や膜融合に関わるタンパク質の gene knockout (KO) や transgenic (TG) マウスが多数作成され、それらの研究から、これまでの仮説が成立しないことが明らかになった。現在、膜融合に関わるタンパク質として、遺伝子ノックアウトマウスで証明されているものは精子 Izumo1 と卵子 CD9 のみであるが、これらの分子のみでも全てを説明することができないことがわかっている。そこで、申請者らが見つけていた、精子先体タンパク質エクアトリン equatorin (EQTN/Eqtn) に焦点を当てた実験計画を立てた。

### 2. 研究の目的

精子の機能分子は精子形成過程で精細胞の機能ドメインや膜に組み込まれた後、雄生殖管内で成熟し、雌生殖管内でさらに変化して先体反応/膜融合や卵活性の受精現象に関わる。本研究では、申請者らが見つけていた、精子先体タンパク質エクアトリン equatorin (EQTN/Eqtn) に焦点を当て、これまでに分かっている精子機能タンパク質 (Izumo1, Spesp1, Cd9, Juno) との関係を生体イメージングしながら、微細構造との対比解析を進展させること、および遺伝子改変マウスを用いて不妊発症のメカニズムを明らかにする。最終的にはこれらの情報を臨床に還元することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 精子形成における先体形成から受精過程における精子タンパク質の発現状況を、Eqtn-Tg(EGFP) マウスや Acr-Tg(EGFP) マウスと間接蛍光抗体法による live cell imaging を行い、免疫電子顕微鏡法レベルの微細形態に対応する分子ストーリーを構築する。

(2) 精子機能に関連するタンパク質のそれぞれについて、生理学的、生化学的、分子遺伝学的、物理化学的あるいは薬理的解析を行う。

(3) 先体反応から受精 (配偶子膜融合) までにおいて、配偶子融合関連タンパク質同士の間関係を Eqtn-KO マウスを用いて解析する。

### 4. 研究成果

(1) 作成した Eqtn-Tg(EGFP) を用いた蛍光観察法と免疫金電顕法で、先体形成過程においてゴルジ装置から精子先体膜系へどのように運搬され、頭部へ統合されるかについて解析し、装備された先体膜のエクアトリンが受精過程においてどのように挙動して機能する過程を解析した (Cell Tissue Res. 2013)。

(2) ガラクトース転移酵素 Galnt3 遺伝子欠損マウス精子ではエクアトリンを含む糖鎖の精子細胞内配備がおかしくなるため、精子形成過程における詳細な解析を行った結果、エクアトリンのアミノ酸配列スレオニン138か

ら分岐する MN9 エピトープ部の糖鎖が O-グリコシレーションされて伸張するためには Galnt3 が関与することを共同して発見し、Galnt3 が欠損した精子は円形頭部を示すなどの形態異常が起こり雄性不妊になることを示した (Histochem Cell Biol, 2013)。

(3) 光学顕微鏡・超顕微鏡 STED (STimulated Emission Depletion) では、通常固定細胞の EGFP を解析することは困難であるが、本研究では Eqtn-Tg(EGFP) 精子を切片を作成することなく、精子そのまま免疫金電顕法と対比検索し、受精に必須な先体反応に関わる先体膜を 80-100nm レベルで観察できることを示した。この結果は、光顕でも通常分解能である 200 nm を超えて観察し画像を取得できることを予測させたため、この方法をライブセルイメージングへ応用できる可能性を示した (Microscopy, 2015)。

(4) ヒト精子先体のマーカーとなるタンパク質について、申請者らのデータを含めて総説として紹介した (Ana Sci Int. 2016)。

(5) ほ乳動物精子の構造と機能の最新の知見について、申請者らのデータを含めて解説した: Toshimori, K and Eddy, EM (NIH) "Physiology of Reproduction (TM. Plant and A. Zeleznik, Eds, 4th ed. Academic Press, 2014)"; 本書は生殖医学関係のバイブルと称されている。

(6) 配偶子膜融合関連タンパク質は精子 Izumo1 と卵子 CD9 のみであるとされているが、Eqtn-KO マウスを検索した結果、完全不妊にはならなかったが、Izumo1, Spesp1, Cd9, Juno 等とは独立して機能していた。Spesp1 のみは Eqtn-KO マウス精子において、局在異常が起こったため、Eqtn-Spesp1-ダブルノックアウト (DKO) マウスを作成した結果、完全な雄性不妊マウスもあった。Eqtn-Tg(EGFP) マウスと Acr-Tg(EGFP) マウスを flow cytometry 法で比較解析すると先体反応は正常に起こっていた。エクアトリンの授精過程におけるライブイメージングとして解析した。エクアトリンは、受精過程においても先体基質との関連が重要であったが、生化学的には共沈して精製することはできなかった。現在、これらをまとめて、投稿中である。

### 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 12 件)

1. Ito C, Toshimori K. Acrosome markers of human sperm. *Anat. Sci. Int.* 91(2):128-142. 2016.(doi:10.1007/s12565-015-0323-9)

Review 査読あり

2. Ito C, Yamatoya K, Toshimori K. Analysis of the complexity of the sperm acrosomal membrane by super-resolution stimulated emission depletion microscopy compared with transmission electron microscopy. *Microscopy (Oxford)*. 64(4): 279-287. 2015. (doi: 10.1093/jmicro/dfu101) **査読あり**
3. Kishimoto A, Ishiguro-Oonuma T, Takahashi R, Maekawa M, Toshimori K, Watanabe M, Iwanaga T. Immunohistochemical localization of GLUT3, MCT1, and MCT2 in the testes of mice and rats: the use of different energy sources in spermatogenesis. *Biomed Res. (Tokyo)* 36(4): 225-234.2015. (doi: 10.2220/biomedres.36.225.) **査読あり**
4. Toshimori K. Sperm-egg meeting: challenges for infertility diagnosis and treatment based on basic research. *Chibaigaku*. 91:(4) 161-166. 2015. **査読あり**
5. Chen C, Maekawa M, Yamatoya K, Nozaki M, Ito C, Iwanaga T, Toshimori K. Interaction between basigin and monocarboxylate transporter 2 in the mouse testes and spermatozoa. *Asian J Androl*. 17:1-7. 2015. (doi: 10.4103/1008-682X.15765) **査読あり**
6. Takasaki N, Tachibana K, Ogasawara S, Matsuzaki H, Hagiuda J, Ishikawa H, Mochida K, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Noce T, Ito C, Toshimori K, Narimatsu H. A heterozygous mutation of GALNTL5 affects male infertility with impairment of sperm motility. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111(3):1120-1125. 2014. (doi: 10.1073/pnas.1310777111) **査読あり**
7. Udagawa O, Ito C, Ogonuki N, Sato H, Lee S, Tripvanuntakul P, Ichi I, Uchida Y, Nishimura T, Murakami M, Ogura A, Inoue T, Toshimori K, Araki H. Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking ORP4, a sterol-binding protein in the OSBP-related protein family. *Genes Cells*. 19(1):13-27. 2014. (doi: 10.1111/gtc.12105) **査読あり**
8. Toyama Y, Chen C, Yamatoya K, Maekawa M, Ito C, Toshimori K. Unique structures of organelles observed in primary spermatocytes after micro-injection of protein solutions such as immunoglobulin into the lumen of the seminiferous tubules in mice and rats. *Andrologia*. 45(6):402-408. 2013. (doi: 10.1111/and.12030) **査読あり**
9. Funaki T, Kon S, Tanabe K, Natsume W, Sato S, Shimizu T, Yoshida N, Wong WF, Ogura A, Ogawa T, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Mochida K, Endoh K, Yomogida K, Fukumoto M, Horai R, Iwakura Y, Ito C, Toshimori K, Watanabe T, Satake M. The Arf GAP SMAP2 is necessary for organized vesicle budding from the trans-Golgi network and subsequent acrosome formation in spermiogenesis. *Mol Biol Cell*. 24(17):2633-2644. 2013. (doi: 10.1091/mbc.E13-05-0234) **査読あり**
10. Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Fujimura L, Hatano M, Miyado K, Toshimori K. Integration of the mouse sperm fertilization-related protein equatorin into the acrosome during spermatogenesis as revealed by super-resolution and immunoelectron microscopy. *Cell Tissue Res*. 352(3):739-750. 2013.(doi: 10.1007/s00441-013-1650-y) **査読あり**
11. Mizuno Y, Ninomiya y, Nakachi Y, Iseki M, Iwasa H, Akita M, Tsukui T, Shimosawa N, Ito C, Toshimori K, Nishimukai M, Hara H, Maeba R, Okazaki T, Alodaib AN, Al Amoudi MA, Jacob M, Alkuraya FS, Horai Y, Watanabe M, Motegi H, Wakana S,

Noda T, Kurochkin IV, Mizuno Y, Schönbach C, Okazaki Y. Tysnd1 deficiency in mice interferes with the peroxisomal location of PTS2 enzymes, causing lipid metabolic abnormalities and male infertility. *PLoS genet.* 9(2): e1003286. 2013. (doi: 10.1371/journal.pgen.1003286) **査読あり**

12. Miyazaki T, Mori M, Yoshida CA, Ito C, Yamatoya K, Moriishi T, Kawai Y, Komori H, Kawane T, Izumi S, Toshimori K, Komori T. Galnt3 deficiency disrupts acrosome formation and leads to oligoasthenoteratozoospermia. *Histochem and Cell Biol.* 139(2): 339-354. 2013. (doi: 10.1007/s00418-012-1031-3) **査読あり**

[学会発表](計20件)

1. 伊藤千鶴、年森清隆 精子形成と先体反応における配偶子膜融合関連タンパク質 Equatorin と Izumo の動態 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会 (ポスター) ビッグパレットふくしま(福島県 郡山市) 2016年3月29日
2. 伊藤千鶴、年森清隆 精子形態と精子の質 第33回日本受精着床学会総会・学術講演会 The 33rd Annual Meeting of Japan Society of Fertilization and Implantation (ワークショップ) T F Tホール(東京都 江東区) 2015年11月26日
3. Toshimori K, Ito C. Sperm function and male infertility. Organization Secretariat of the 30th Annual Meeting of the Japan Society for Immunology of Reproduction-Workshop. (基調講演) くまもと県民交流館パレア(熊本県 熊本市) 2015年11月22日
4. Toshimori K, Ito C, Yamatoya K. S3-4 Sperm membrane modification leading to fertilization. International Federation of Fertility Societies (IFFS) / Japan Society of

Reproductive Medicine (JSRM) International Meeting 2015. (Symposium). パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市). 2015年4月26-29日

5. Toshimori K, Ito C, Yamatoya K. S44 Equatorin-mediated sperm-egg interaction. Proceedings of the 120th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan (Symposium). Kobe Convention Center (兵庫県 神戸市). 2015年3月21-23日
6. Ito C, Yamatoya K, Toshimori K. Sperm acrosomal membrane complex analyzed by super-resolution stimulated emission depletion (STED) microscopy using Equatorin-EGFP transgenic mice. International Federation of Fertility Societies (IFFS) / Japan Society of Reproductive Medicine (JSRM) International Meeting 2015. (Poster). パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市) 2015年4月26-29日
7. Yamatoya K, Ito C, Toshimori K. Searching the enzyme responsible for the cleavage of sperm acrosomal protein Equatorin during acrosome reaction. International Federation of Fertility Societies (IFFS) / Japan Society of Reproductive Medicine (JSRM) International Meeting 2015. (Poster). パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市) 2015年4月26-29日
8. Ito C, Yamatoya K, Maekawa M, Toshimori K. S221 Sperm acrosomal membrane complex analyzed by STED using Equatorin-EGFP transgenic mice. Proceedings of the 120th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of The

- Physiological Society of Japan (Poster). Kobe Convention Center (兵庫県 神戸市) 2015年3月21-23日
9. Yamatoya K, Ito C, Maekawa M, Hatano M, Toshimori K. S219 Searching the enzyme responsible for molecular weight reduction of sperm acrosomal protein Equatorin during acrosome reaction. Proceedings of the 120th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan (Poster). Kobe Convention Center (兵庫県 神戸市) 2015年3月21-23日
  10. Yamatoya K, Ito C, Hatano M, Toshimori K. Analyses of sialylation status of sperm acrosomal protein Equatorin and enzyme responsible for molecular weight shift during acrosome reaction. The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. (Poster) パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市) 2014年11月27日
  11. Maekawa M, Cheng C, Yamatoya K, Ito C, Toshimori K. S220 Basigin interacts with monocarboxylate transporter 2 in the mouse testes and sperm. Proceedings of the 120th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan (Poster). Kobe Convention Center (兵庫県 神戸市) 2015年3月21-23日
  12. Toshimori K, Ito C, Yamatoya K. Sperm ODF2: analysis using ODF2-EGFP transgenic mice. 18th International Microscopy Congress (IMC 2014). (Poster) Prague Congress Center. (Prague, Czech Republic) 2014年9月7-12日
  13. 年森清隆、伊藤千鶴、大和屋健二 ヒト精子ミトコンドリアの形態異常と不妊症 第59回日本生殖医学会学術講演会(口演) 京王プラザホテル(東京都 新宿区) 2014年12月4日
  14. 大和屋健二、伊藤千鶴、年森清隆 SPESP1 ノックアウトマウスの先体反応に伴う先体タンパク質の局在と分子量変化 第59回日本生殖医学会学術講演会(ポスター) 京王プラザホテル(東京都 新宿区) 2014年12月4日
  15. Yamatoya K, Ito C, Hatano M, Toshimori K. Analyses of sialylation status of sperm acrosomal protein Equatorin and enzyme responsible for molecular weight shift during acrosome reaction. The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. (Poster) パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市) 2014年11月27日
  16. 年森清隆 伊藤千鶴 大和屋健二 精子頭部のキャパシテーションと先体反応 日本アンドロロジー学会第33回学術大会 第20回精子形成・精巣毒性研究会(シンポジウム) 軽井沢プリンスホテルウエスト(長野県 北佐久郡) 2014年6月12日
  17. 年森清隆 雄生殖細胞の機能形態的解析; 精子卵子膜融合関連タンパク質 Equatorin を中心として 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会(学術教育講演) 自治医科大学キャンパス(栃木県 下野市) 2014年3月28日
  18. 大和屋健二、伊藤千鶴、陳城、前川眞見子、幡野雅彦、年森清隆 精子先体赤道部糖タンパク質 equatorin の糖鎖修飾変化に関わる酵素の探索 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会(ポスター) 自治医科大学キャンパス(栃木県 下野市) 2014年3月27日
  19. 年森清隆、伊藤千鶴 精子の核DNA断片化と頭部空胞を指標にした精子の質の評価 第58回日本生殖医学会 学術講演会・総会(口演) 神戸国際会議場 神戸

ートピアホテル (兵庫県 神戸市) 2013  
年 11 月 15 日-16 日 (日本生殖医学会雑誌  
58(4): 295. 2013)

20. **Toshimori K.** Visualization of spermatogenesis and sperm function. XXIII International Symposium on Morphological Sciences (ISMS) (Symposium) Toki Messe Niigata Convention Center. Niigata (Niigata Japan) 2013.9.11.

[図書] (計 5 件)

1. **年森清隆 伊藤千鶴 神崎秀陽 編集** 精子の質評価-精子の構造と精能の評価 **Evaluation of sperm quality** 別冊「医学のあゆみ」生殖医学・医療の最前線 31-37 (総ページ数:152 ページ) 2015 年 3 月 28 日出版、医歯薬出版株式会社、東京都 (ISSN: 0039-2359 CODEN:IGAYAY)
2. **Toshimori K.** and **Eddy EM.** The Spermatozoon. In **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (TM. Plant and A. Zeleznik, Eds)**, 4th ed. Academic Press, New York. pp99-148. 2014. ISBN: 978-0-12-397175-3.
3. **宮戸健二、井上直和、伊藤昌彦、伊藤千鶴、年森清隆** 動植物の受精学 共通機構と多様性、澤田均編、総ページ数:340 ページ、2014 年 4 月 20 日出版、化学同人 DOJIN BIOSCIENCE SERIES、京都府
4. **年森清隆 伊藤千鶴** 精子の質評価-精子の構造と精能の評価 **Evaluation of sperm quality** 医学のあゆみ 生殖医学・医療の最前線 249(1): 31-37. 2014. (2014 年 4 月 5 日発行)
5. **Ito C.** **Yamatoya K.** **Toshimori K.** Equatorin-Related Subcellular and Molecular Events During Sperm Priming for Fertilization in Mice. (Chapter 7) *Sexual Reproduction in Animals and Plants*. 85-95.

2014. (Sawada H, Inoue N, Iwano M Eds)  
(doi: 10.1007/978-4-431-54589-7\_7)

[産業財産権]  
取得状況 (計 1 件)

名称: Method of identifying compounds that inhibit fertilization.  
発明者: Kiyotaka Toshimori, Chizuru Ito, Kenji Yamatoya, Keiichi Yoshida.  
権利者: National University Corporation Chiba University, Chiba(JP)  
種類: 登録特許  
番号: US 8,741,583 B2  
取得年月日: 2014 年 6 月 3 日  
国内外の別: 国外 (米国)

[その他]  
ホームページ等  
生殖生物学ホームページ  
URL: <http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/devbiol/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

年森 清隆 (Toshimori Kiyotaka)  
千葉大学・未来医療教育研究センター・  
特任教授  
研究者番号: 20094097

##### (2) 研究分担者

伊藤 千鶴 (Ito Chizuru)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号: 80347054

##### (3) 連携研究者

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 Kyouko)  
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