

氏名(本籍)	やま した み すず (埼玉県)		
学位の種類	博士(学術)		
学位記番号	博甲第4326号		
学位授与年月日	平成19年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Role of Testicular Serine Protease Tesp5 in Fertilization (受精での精子セリンプロテアーゼ Tesp5 の役割)		
主査	筑波大学教授	農学博士	馬場 忠
副査	筑波大学教授	博士(薬学)	柳澤 純
副査	筑波大学助教授	博士(農学)	柏原 真一
副査	筑波大学教授	農学博士	深水 昭吉

論文の内容の要旨

受精過程は多くの動物種で保存されており、精子の卵子透明帯への結合やアクロソーム反応、卵子透明帯通過、卵子細胞膜との融合を経て成立する。この一連の過程で精子プロテアーゼの関与が示唆されているが、いまだに不明な点が多く残されている。Tesp5 (Testicular Serine Protease 5) は、セリンプロテアーゼであるアクロシンの欠損マウス精子から同定された新規 GPI アンカー型プロテアーゼであり、精巣特異的に発現している。アクロシン欠損マウス精子が体外受精試験で時間的な遅れを生じるが受精するため、アクロシンに代わり Tesp5 が精子の卵子透明帯通過で機能していることが推測されてきた。しかし、その直接的な証明はいまだに報告されていない。そこで、この研究では受精における Tesp5 の役割を明らかにすることを目的として行った。

まず、Tesp5 遺伝子の第1, 第2, および第3エクソンをネオマイシン耐性遺伝子と置換させたようなターゲティングベクターを作製し、ES細胞経由での遺伝子相同組換え法によって目的のクローンを単離した。合計13個のESクローンが得られ、胚盤胞へ注入してキメラマウスを作製し、次いで Tesp5 のヘテロ欠損とホモ欠損マウスを得た。

Tesp5 欠損マウスの精巣上体精子は正常な形態と運動性を保持しており、自然交配による妊孕性も正常であった。しかし、体外受精試験を行うと、Tesp5 欠損精子は受精能だけでなく卵子との融合能が低下していた。また、卵子透明帯に結合した Tesp5 欠損精子を調べたところ、ほとんどアクロソーム反応を起こしていなかった。さらに、自然交配では正常に産仔が得られたため、Tesp5 欠損マウスの精巣上体精子をメスマウスの子宮に注入し人工授精を行った。その結果、24時間後に卵管内でほぼ正常な数の受精卵が確認された。加えて、自然交配したメスマウスの子宮内から Tesp5 欠損精子を回収すると、融合能と受精能が回復していた。

一般的に、精子は雌性生殖器官通過の際に受精能を獲得する。そこで、子宮内のどのような因子によって Tesp5 欠損精子の受精能が回復するのかを調べた。排卵直前の子宮分泌液の添加を行うと、Tesp5 欠損精子の卵子透明帯への結合が促進され、受精能の回復が認められた。しかし、卵子透明帯上でのアクロソーム反応は改善されてなかった。以上の結果から、Tesp5 欠損オスマウスが自然交配で正常に産仔を産生でき

るのは、子宮内で精子に透明帯結合能が付与されたためであることが示唆された。したがって、Tesp5は受精に必須のプロテアーゼではないが、アクロソーム反応の誘起で重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

審査の結果の要旨

受精の分子機構に関しては、長い研究の歴史があるにもかかわらず、いまだに不明な点が数多く残されている。特に、ノックアウトマウスの解析が進むにつれて、受精で機能すると信じられてきた多くのタンパク質が実際には無関係であり、従来の仮説が大きく覆っているのが現状である。

この研究では、Tesp5欠損マウスを用いてそのプロテアーゼの機能に関する解析を試みている。その結果、Tesp5が卵子透明帯上での精子アクロソーム反応の誘起で機能している可能性を提唱している。また、Tesp5欠損マウス精子の生体内外での受精能の違いを詳細に調べ、精子の卵子透明帯結合促進因子が子宮分泌液中に含まれていることを生化学的見地から明確にした。すなわち、現在までアウトラインしか理解されていなかった雌性生殖器官での精子の受精能獲得機構の生物学的重要性を初めて明らかにした。

セリンプロテアーゼTesp5の機能がある程度明確にした点は十分に評価できるが、その役割の普遍的な最終結論を得るまでには至っておらず、今後に残された課題も少なからずある。しかし、研究自体は非常に注意深く行われているため十分な信頼性を有しており、当該研究分野の発展に貢献したと判断できる。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。