

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700445

研究課題名（和文） 子宮内受精促進因子の同定と受精促進メカニズムの解明

研究課題名（英文） Characterization of A Uterine Factor in Fertilization

研究代表者

山下 美鈴（YAMASHITA MISUZU）

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・研究員

研究者番号：90451690

研究成果の概要（和文）：精巣特異的 GPI アンカー型セリンプロテアーゼ PRSS21 を欠損するマウス精子は、体外での受精能が著しく低下しているが、自然交配によって正常に産仔を産生することができる。この研究では、まず PRSS21 欠損精子の体外受精能低下が子宮分泌液によって回復することを明らかにした。この受精能促進活性を持つ因子は、マウス子宮だけでなく同じげっ歯類のラット、さらにウサギの子宮分泌液中にも存在していた。以上の結果から、子宮由来の因子による精子受精能の促進機構は、多くの動物種で保存されていると考えられる。

研究成果の概要（英文）： Male mice lacking a testis-specific serine protease, PRSS21, GPI-anchored on the sperm membranes exhibit normal fertility. However, the fertility *in vitro* is noticeably impaired by the loss of PRSS21 on the sperm. In this study, I found that the reduced *in vitro* fertility of PRSS21-deficient sperm is recovered by addition of mouse uterine fluids. Similar experimental results were obtained in uterine fluids of rat and rabbit. These data suggest that the female reproductive tract may assist ejaculated sperm to fertilize the oocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生殖生物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：生殖、受精、応用動物、マウス、精子

1. 研究開始当初の背景

哺乳類では生殖過程の大部分が体内で進行しているため、生体内での現象を適切に観察する実験系が乏しく、受精に関する分子機構の解析はほとんど進展していない。一方で、体外受精をはじめとする生殖補助技術の発展は目覚ましいものがある。ここ数年の統計では、全出生数に占める生殖補助技術の介在率が50人に一人の割合に近づいてきている。

このように、分子メカニズムの解明が乏しいままでの技術先行状態は軽視されるものではないと考えられる。

研究代表者らは、これまで受精機構を明らかにするために、さまざまな精子膜上タンパク質について解析を行ってきた。その結果、精巣特異的 GPI アンカー型セリンプロテアーゼ TESP5/PRSS21 欠損マウスの精巣上体精子は野生型マウスとは異なり、体外受精におい

て卵子透明帯上での先体反応能力が著しく低下しており、体外受精率も極めて低率であることを見いだした。しかし、自然交配では正常な交配能を有していた（図1、図2、および図3）。そこで、このPRSS21欠損マウス精子を利用して、子宮の細胞外環境での精子の受精能獲得機構を明らかにし、体内で進行する哺乳類生殖機構の解明を目指した。

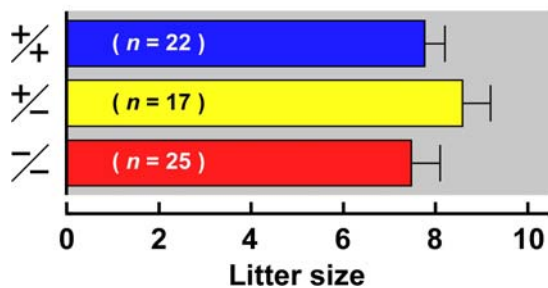
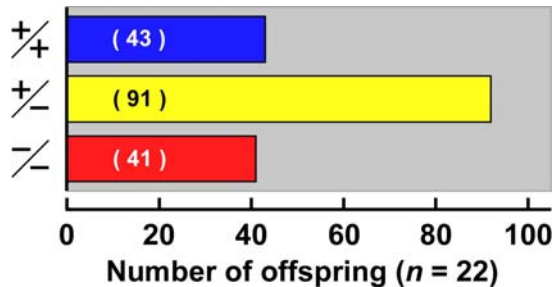


図1. PRSS21欠損オスマウスは正常な交配能力を持っている。

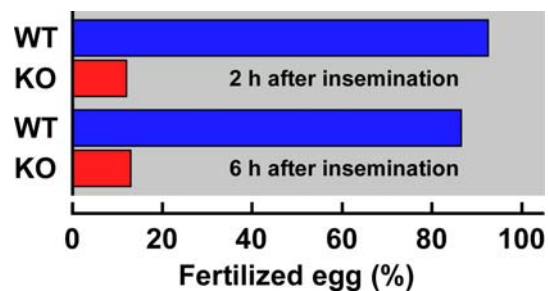


図2. PRSS21欠損マウス精子は低い体外受精率である。

2. 研究の目的

この研究課題では、受精を促進させる子宮由来の受精促進因子の同定と機能解析を目的とした。まず、受精促進因子を種々のカラムクロマトグラフィーなどで子宮分泌液から精製し、化学構造を決定することを試みた。また、精製した因子に関して、受精での機能解析を行い、受精の分子機構に関する新しい概念を提唱することも目標にした。

3. 研究の方法

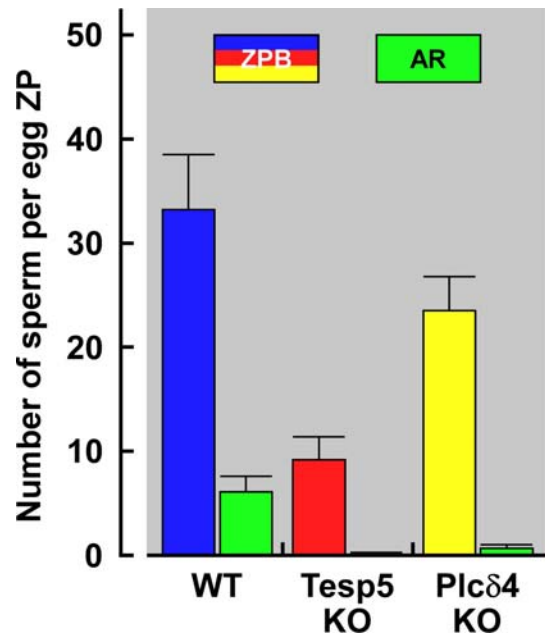


図3. PRSS21欠損マウス精子は卵子透明帯上でアクロソーム反応（AR）をほとんど起こさない。

(1)受精促進因子の精製と活性測定

人為的に性成熟させたマウスの子宮内分泌液を調製し、ゲルろ過クロマトグラフィーなどで分画した。得られた各画分は、PRSS21欠損マウス精子を用いた体外受精試験によってその活性を調べた。高純度で精製されたサンプルは、質量分析などによって化学構造の探索を行った。

(2)受精促進因子の機能解析

高度に精製されたサンプルを用いて体外受精試験を行い、その因子の熱や酸・アルカリ耐性などへの耐性をはじめとした因子の物性、さらにほかの受精関連タンパク質との相互作用を調べた。

(3)異種動物の子宮分泌液の解析

ラットやウサギの子宮分泌液を用いて、受精能促進因子の存在を調べた。

4. 研究成果

精巢特異的 GPI アンカー型精子セリンプロテアーゼ PRSS21 欠損マウス精子の体外受精能低下が子宮分泌液の添加によって回復することから、受精能回復に関わる新規因子の存在が予測された。そこで、本研究では、この受精能回復（促進）因子の同定および機能解析を試みた。

PRSS21欠損精子は、体外受精時に卵子細胞膜との融合が低下する。まず、この点に着目して研究を行い、PRSS21欠損精子を高度に精製した子宮因子で処理することによって卵

子細胞膜との融合率が有意に増加することが見いだされた。また、セリンプロテアーゼ阻害剤のひとつであるパラミノベンザミジンで精子を処理すると、野生型の精子でも卵子融合率の低下を引き起こしたが、精製因子の添加により融合能が回復した。さらに、その受精能促進因子は化学的に非常に安定であった。このような活性はマウスだけでなく、ウサギやラットの子宮分泌液にも確認された（図4-7参照）。

以上の結果から、受精能促進因子は PRSS21 欠損精子だけでなく、野生型精子でも機能することが明確になった。また、パラミノベンザミジンの酵素阻害活性を補償し、マウスやラットといったげっ歯類だけでなく、ウサギでも同様の因子が存在することも明らかになった。本研究課題期間内では、この因子の化学構造の決定までは至らなかったが、今後、哺乳類における生体内での受精現象の解明へ貢献すると考えられる。

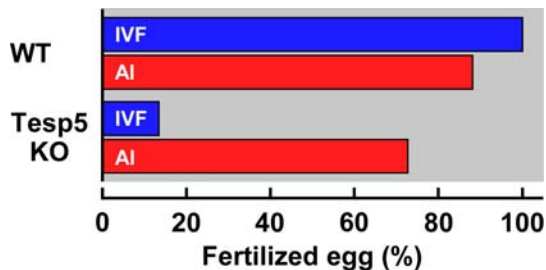


図4. 精巣上体の PRSS21/TESP5 欠損マウス精子を子宮へ注入すると (A I) 体外受精 (I V F) 率が回復する。

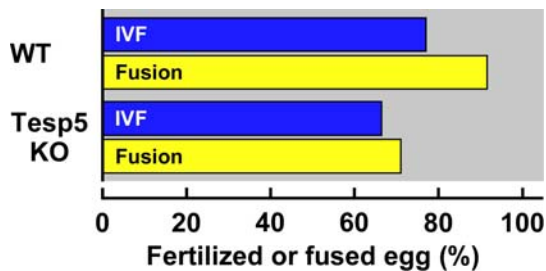


図5. 子宮から射出された PRSS21/TESP5 欠損マウス精子を回収して体外受精と卵子との融合実験を行うと野生型と同じ能力が見いだされる。

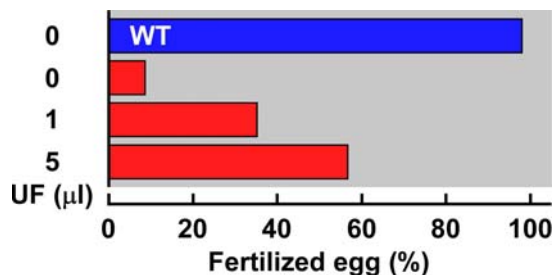


図6. 子宮分泌液を添加すると PRSS21/TESP5 欠損マウス精子の受精率が回復した。

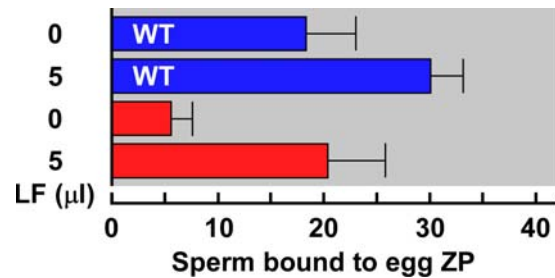


図7. 子宮分泌液を添加すると PRSS21/TESP5 欠損マウス精子の卵子透明帯結合能力が回復した。

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)

①Kawano, N., Kang, W., Yamashita, M., Koga, Y., Yamazaki, T., Hata, T., Miyado, M., and Baba, T.

Mice lacking two sperm serine proteases, ACR and PRSS21, are subfertile, but the mutant sperm are infertile *in vitro*.

Biol. Reprod. 83: 359-369, 2010. 査読有

②Kimura, M., Kim, E., Kang W. T., 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. 査読有

[学会発表] (計4件)

①山下美鈴, 馬場忠

経産マウスにおける着床位置決定機構の解析
第33回日本分子生物学会年会 (BMB2010)、
2010年12月9日神戸ポートアイランド

②Yamashita, M. and Baba, T.

Effects of placental scars on implantation sites in multiparous mice.

Gordon Research Conference Reproductive Tract Biology, 2010年8月17日 New Hampshire, Holderness School, USA.

③山下美鈴, 馬場忠

子宮内因子による受精能回復機構の解析
第82回日本生化学学会大会、2009年10月23日、
神戸ポートアイランド

④Yamashita, M., Kang, W., Kashiwabara, S., and Baba, T.

Functional effects of uterine fluids on PRSS21-deficient sperm.

Gordon Research Conference on Fertilization & Activation of Development. 2009年7月20日
New Hampshire, Holderness School, USA.

[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

山下 美鈴 (YAMASHITA MISUZU)
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・研究員
研究者番号：90451690