

Title	遺伝子組換えマウスを用いた配偶子間相互作用に関連する分子の機能解析
Author(s)	山口, 亮
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47226">https://hdl.handle.net/11094/47226</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	山 口 亮
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 1 0 7 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 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学 位 論 文 名	遺伝子組換えマウスを用いた配偶子間相互作用に関連する分子の機能解析
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡 部 勝 (副査) 教 授 山 元 弘 教 授 馬 場 明 道 教 授 中 川 晋 作

#### 論 文 内 容 の 要 旨

受精は多くの哺乳動物にとってその『生命のはじまり』であり、生物がその種を存続させるために必要不可欠なステップである。しかしながら同時に、その存続を“精子”と“卵子”という非常に脆弱な1個の細胞に託すという危険に満ちたステップでもあることから、精子と卵子の相互作用は受精の各段階において、分子レベルで厳密にコントロールされていることが容易に想像される。いくつかの遺伝子ノックアウトマウスで共通して精子の透明帯結合能に異常が現れることが報告されており、受精の各段階のうち精子-透明帯結合は非常に重要なステップであると想像されるが、その分子メカニズムに関してはほとんど不明であった。

遺伝子ノックアウトマウスの精子が卵透明帯に結合できなくなる分子として、精巣特異的な分子シャペロンである calmegin (*Clgn*) や精細胞に発現する細胞接着因子である ADAM1a、ADAM2、ADAM3、そして血圧調節に関わる ACE が報告されている。これらに共通の表現型をもたらす原因因子を同定するため *Clgn*<sup>-/-</sup> と *Ace*<sup>-/-</sup> マウスの精巣、精子タンパク質を解析したところ、*Clgn*<sup>-/-</sup> 精巣では ADAM1a/ADAM2 のヘテロダイマーが形成されないことで精子上から ADAM3 が消失することが明らかになった。一方、*Ace*<sup>-/-</sup> 精子では野生型と同程度に ADAM 分子が存在していたが、Triton X-114 を用いて二層分離を行なうと、生体膜やラフトのタンパク質を多く含む油層画分 (detergent-enriched fraction) に存在する ADAM3 が特異的に減少しており、ADAM3 の局在に異常が起きていることが示唆された。*Clgn*<sup>-/-</sup> 精子と *Ace*<sup>-/-</sup> 精子の透明帯結合能を比較すると、両精子とも野生型精子より有意に透明帯結合が低下していたが、*Clgn*<sup>-/-</sup> 精子の方がより透明帯結合数が少なかったことから、精子の油層画分における ADAM3 が精子-透明帯結合に重要である可能性が示唆された。

*Adam3*<sup>-/-</sup> を除いた *Clgn*<sup>-/-</sup>、*Adam1a*<sup>-/-</sup>、*Adam2*<sup>-/-</sup>、*Ace*<sup>-/-</sup> マウスでは精子の透明帯結合不全に加えて、子宮卵管接合部 (UTJ) を精子が移行できない表現型も報告されているが、この UTJ 移行不全は ADAM3 の異常では説明できない。精子の UTJ 移行さらには透明帯結合に関わる新たな分子を同定するために、精子に透明帯結合不全や UTJ 移行不全が見られる雄性不妊マウス (*Clgn*<sup>-/-</sup>、*Csp*<sup>-/-</sup>) の精子を二次元電気泳動により分離したところ、両精子で共通して消失しているタンパク質を検出した。このタンパク質を LC-MS/MS 解析したところ、精巣特異的な発現を示す新規遺伝子であることが明らかとなり、これを Putative Zona Interacting Protein (PZIP) と命名した。生体内での PZIP の機能を明らかにするため、相同組換え法によりノックアウトマウスを作製したところ、雄の *Pzip*

$^{-/-}$  マウスは不妊であり、その原因は精子の UTJ 移行不全であることが明らかとなった。また体外受精を行なうと *Pzip* $^{-/-}$  精子は透明帯結合能にも欠陥が見られたが、驚くべきことに野生型と同程度の受精率を示した。受精に関わる精巣、精子のタンパク質を調べたところ、*Pzip* $^{-/-}$  精子でも ADAM3 が特異的に消失していることが明らかとなった。ところが一方、*Adam3* $^{-/-}$  精子では PZIP タンパク質が消失しており、両者は相互に密接な関係にあることが明らかになった。

筆者が解析したマウスおよび論文で精子の透明帯結合に欠陥が見られると報告されているマウスでは、ADAM3 を除く全ての遺伝子ノックアウトマウスで精子が子宮から輸卵管へと移行できないと報告されており、透明帯結合能と UTJ 移行能には明確な相関関係が見られる。そこで精子の透明帯結合能に欠損が見られる *Adam3* $^{-/-}$  マウスの表現型について再度、詳細に解析すると、*Adam3* $^{-/-}$  精子も輸卵管へと移行することができないことが明らかとなった。

*Pzip* $^{-/-}$  精子の実験より、同じ透明帯に結合できない表現型を示す遺伝子ノックアウト精子であっても、体外受精を行なうと受精可能な精子と不可能な精子があることが分かった。そこでこれまでに見てきた雄性不妊マウスの精子を同時に体外受精し、それぞれの遺伝子ノックアウト精子の受精能を比較したところ、*Clgn* $^{-/-}$  精子はまったく受精できないのに対して、*Pzip* $^{-/-}$  精子や *Adam3* $^{-/-}$  精子は野生型と同程度の受精能を示すことが明らかとなった。これらのノックアウト精子で共通して PZIP や ADAM3 が減少あるいは消失していることが明らかとなっているが、*Clgn* $^{-/-}$  精子では PZIP や ADAM3 に加えて、受精に関わる他のファクターが欠損していることが示唆された。また *Pzip* $^{-/-}$  精子と透明帯との相互作用を詳細に観察すると、精子が透明帯に接触して一旦その場でしばらく留まった後、乖離していくという現象が見られる。一方 *Clgn* $^{-/-}$  精子ではこのような接触した後の一時的な保持はほとんど見られない。*Pzip* $^{-/-}$  精子が体外受精可能だったのは、この接触した後の弱い付着状態時にタイミング良く先体反応が起きて透明帯を通過できたためではないかと考えられる。恐らく受精を達成する精子と透明帯との真の相互作用はこのように短時間に起こるのではないかと予想された。

ノックアウト精子上から ADAM3 が消失することでその精子は野生型のように強力で透明帯に結合できなくなるが、この強力な結合は受精を達成するためにはそれほど重要なことではないと結論付けられた。むしろ PZIP や ADAM3 が消失することで精子の UTJ 移行能に欠陥が生じ、これが不妊の主たる原因と考えられる。*Clgn* $^{-/-}$  精子と野生型精子を同時に射出するキメラマウスを用いた実験では、野生型のみが輸卵管へと移行できたことから精子が子宮から輸卵管へと移行する際には精子 1 匹ごとに輸卵管と分子レベルでの相互作用を起こしていることが推測される。本研究より PZIP や ADAM3 は子宮-卵管接合部での精子と輸卵管との認識において重要な機能を果たしている可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本論文では雄性不妊となる複数の遺伝子ノックアウトマウスを用いて、配偶子間相互作用に関わる分子の同定、解析を行なったものである。ACE や calmegin ノックアウトマウスの精子の透明帯結合能が低下するのは ADAM3 の局所的な消失を介したものであることを示唆した他、新規の精子タンパク質 PZIP を同定した。PZIP 遺伝子をノックアウトしたマウスを作製することにより PZIP が受精に必須であることを明らかにしている。ついで透明帯に結合する力がなく不妊となる PZIP と ADAM3 ノックアウトマウス由来の精子であっても、体外受精を行なうと野生型精子と同等の受精率を示し、これまで重要と思われていた透明帯への結合能が受精の成立にそれほど重要ではないことを明らかにした。このことから ADAM3 や PZIP ノックアウトマウスが不妊になるのは子宮から輸卵管への移行能の欠陥によるものではないかと疑われ、受精過程における輸卵管内への精子の移行がきわめて重要なステップである可能性が示された。

これらの発見はいずれも哺乳類の受精機構を理解する上で重要な知見であり、本研究が博士（薬学）の学位授与に値するものと認める。