



Title	Sperm equatorial segment protein 1, SPESP1, is required for fully fertile sperm in mouse
Author(s)	藤原, 祥高
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58212">https://hdl.handle.net/11094/58212</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">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 【3】

氏名	藤原祥高
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第24098号
学位授与年月日	平成22年4月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学位論文名	Sperm equatorial segment protein 1, SPESP1, is required for fully fertile sperm in mouse (マウス精子頭部に存在するSPESP1の機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 岡部 勝 (副査) 教授 木村 正 教授 奥山 明彦

## 論文内容の要旨

## 〔目的〕

哺乳類の受精において、精子と卵子の融合における分子メカニズムはほとんど分かっていない。現在、精子側の融合関連因子は我々の研究室で同定されたIZUM01のみである。IZUM01の存在部位は先体反応後の精子頭部全体であり、卵子との融合に重要な部位といわれている精子頭部のequatorial segment (EQS)と完全に一致しない。このことからIZUM01以外にもEQSに特異的に局在して融合に関わっている分子の存在が示唆される。

そこで本研究では、ヒト精子のEQSに特異的に存在することが確認されているSPESP1 (*sperm equatorial segment protein 1*)に着目し、Spesplノックアウト(KO)マウスを作製してSPESP1の受精における役割について解析を行った。

## 〔方法〕

SPESP1を特異的に認識するペプチド抗体を作製し、ウエスタンプロット法によりマウス精子においてもSPESP1が存在することを確認した。その後、精子での局在部位を間接免疫蛍光染色法により検討した。次に、相同組換え法によりSpespl KOマウスを作製し、目的遺伝子の欠損をPCR、サザン、ノザン、ウエスタンプロット法により確認した。交配により得られたホモ欠損マウスを用いて表現型解析を行った。

## 〔成績〕

免疫染色によりマウスにおいてもSPESP1は精子頭部のEQSに局在することが確認された。KOマウスはメンデルの法則に従って得られ、正常に発育することが確認された。次に、交配実験から*in vivo*における受精能を調べたところ、Spespl KO雄マウスは不妊ではなかったが、野生型に比べ有意に産子数が減少することが分かった。そして、雌性生殖路でのKO精子の様子を観察した結果、KO精子は野生型に比べて子宫から輸卵管へと昇っている精子の数が明らかに少ないことが分かった。また、KO精子の受精能の低下は、*in vitro*の系を用いた解析でも同様に受精率の低下が見られ、その原因が融合能の低下であることが明らかとなった。

さらに、Triton X-114を用いてKO精子タンパク質を二層分離し、いくつかの受精関連膜タ

ンパク質の挙動を調べた。その結果、IZUM01に大きな変化は見られなかつたが、MN9抗原の挙動が大きく変化していることが分かつた。これらの結果は、MN9抗原を用いたKO精子の免疫染色からも確認することができた。また、IZUM01についても免疫染色を行つたところ、先体反応後のKO精子においてIZUM01の局在異常が観察された。そこで、KO精子の電子顕微鏡観察を行つたところ、先体反応前のKO精子には野生型との違いは見られなかつたが、先体反応後のKO精子においてEQSが消失している精子が多く観察された。

## 〔総括〕

SPESP1は、マウス精子においてもヒト精子と同様にEQSに局在するタンパク質であった。SPESP1の受精における役割を明らかにするために、Spespl KOマウスを作製し表現型解析を行つたところ、KO雄マウスは生殖能力が低下していることが明らかとなつた。その原因是、KO精子が雌の輸卵管へと昇つていく能力の低下および卵細胞膜への融合能の低下により引き起こされていることが明らかとなつた。さらに、Triton X-114を用いたKO精子の二層分離より、いくつかの受精関連膜タンパク質の局在に異常が見られ、先体反応後のKO精子においてEQSが消失していることが電顕観察より明らかとなつた。以上のことから、SPESP1はマウス精子において膜タンパク質を正しい部位に局在化させることにより、受精能を維持するためのEQS膜の安定化に寄与していることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

ヒト精子に存在するSPESP1というたんぱく質の機能を探るために、マウスの胚性幹細胞(ES細胞)を用いて相同組換え法によりSpespl遺伝子を欠損させた遺伝子操作マウスを作製した。SPESP1を発現しない雌においては何の変化も認められなかつたが、本来存在すべきSPESP1を欠損した精子を持つ雄マウスでは生殖能力が低下していることが認められた。そして受精能の低下は、精子においてSPESP1が存在する精子赤道部の膜が脆弱化することによることが示唆された。精子の受精能に影響を及ぼすたんぱく質を分子生物学的な手法により同定し、遺伝子欠損マウスを作製することで、受精能低下の作用機序についても明らかにしたことから、申請者は博士(医学)の学位授与に値する。