

Title	遺伝子操作動物を用いた受精のメカニズムの解明
Author(s)	室, 悠子
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59414
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	むら 悠 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬学)
学位記番号	第 25173 号
学位授与年月日	平成24年3月22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	遺伝子操作動物を用いた受精のメカニズムの解明
論文審査委員	(主査) 教 授 岡部 勝 (副査) 教 授 中川 晋作 教 授 土井 健史 教 授 辻川 和丈

論 文 内 容 の 要 旨

受精は生命を連続させるために不可欠なプロセスであり、60兆の細胞からなる個体が次世代をたった1つの細胞に託すという重要なポイントを担っている。マウスの場合、雌の子宮内に射出された精子は子宮-卵管接合部を通過し輸卵管へ移行する。このあと、さらに輸卵管内をのぼり、卵管膨大部で排卵された卵と出会う。卵は卵丘細胞層とその内側にある卵透明帯により取り囲まれている。精子はこれらの層を通過した後、卵と融合する。このように受精が成立するまでにはたくさんのステップがあり、受精は多数の因子によって複雑かつ厳密にコントロールされていると考えられている。

1つ目のテーマとして、卵と精子の結合がどのような機構によって成り立っているかという点について研究を進めた。卵は透明帯という、糖タンパク質から構成される細胞外マトリックスの層に取り囲まれている。マウス精子は透明帯の構成成分である ZP3 を認識して結合し、このステップが受精の種の特異性を担っているといわれている。ZP3 と結合する精子側の因子として、これまで複数の因子が挙げられているが、未だその結合のメカニズムは解明されていない。1995年に Bleil らは透明帯結合因子候補として ZP3R(zona pellucida 3 receptor)を報告したが、リガンドや抗体を用いた阻害実験のレベルにとどまっていたため、ZP3R をノックアウトしたマウスを作製し、生体内において実際に ZP3R が機能しているか否かの解析を行った。

Zp3r ノックアウトマウスは雄・雌ともに健康であり、外見上の異常も見当たらなかった。過去に他の研究室から ZP3R のペプチドを *in vitro* の受精系に添加すると精子の卵への結合阻害が起こることが報告されており、精子から ZP3R を欠

損させることにより雄が不妊になることが予想されたが、ノックアウトマウスの受精能は野生型と同程度であった。また精子の卵透明帯への結合能そのものを測定したが、やはり差は見いだせなかった。受精能も *in vitro*、*in vivo* ともに野生型との差が認められず、産仔数にも差は見られなかった。これらのことから、ZP3R はマウスの受精には必須な分子ではなく、透明帯との結合に関与しているにしてもその重要性は低いことが明らかになった。

これまで ZP3R の他にも、マウスの卵透明帯との結合に重要であると考えられてきた複数の精子側の因子のノックアウトマウスが作製されたが、受精能に影響が出なかったことが報告されている。

1 つめのテーマの研究で、ふたたび免疫組織化学的解析や抗体による阻害実験などにより受精に重要であると考えられてきた因子が必ずしも重要ではないことが明らかになった。従来の生化学的解析方法が受精の分野では必ずしもあてにならないことを示しており、卵と精子の *interaction* は遺伝子改変マウスなど、別のアプローチで解明しなければ真の機構には迫れないのではないかと考えられた。

また筆者は、これまでノックアウトマウスを用いた解析によって結果的に重要性が否定された数々の因子は、主として *in vitro* の系で研究が行われてきたものであり、*in vivo* における受精をもう一度基礎から見直すべきであると考えた。そこで 2 つ目のテーマとして、子宮や輸卵管の壁越しに観察できる蛍光標識された精子をもつトランスジェニックマウスを作製し、これまで誰も試みていなかった *in vivo* における受精のバイオイメージングを試みた。

マウスでは雌の子宮内に射出された精子は輸卵管へ移行する段階で精子数が 1/1000 程度と、極めて限定されることがわかった。また、生体内における受精の進行を調べると、交尾後一挙に完了するのではなく、交尾してから全ての卵が受精するまでには約 8 時間かかっており、生体内におけるマウスの受精は複数の卵子が大きな時間枠のなかで進行してゆく反応であることが確かめられた。実際の受精の *in vivo* イメージングには、先体内に GFP、ミトコンドリアに RFP を発現する蛍光精子をもつトランスジェニックマウスを用いた。この精子は蛍光顕微鏡を用いると子宮や卵管壁を通して観察を行うことができた。このトランスジェニックマウスの雄と交配した雌性生殖器を交尾後 15 分で観察したところ、精子が子宮-卵管接合部(UTJ)から卵管狭窄部(isthmus)にかけて局在することが確かめられた。しかしながら UTJ 部分における精子に通常の鞭毛運動は確認で

きなかった。そこで、30 秒毎のタイムラプスを撮影したところ、精子が UTJ から isthmus の方向へ列を成して上っていく様子が観察できた。

UTJ を通過する精子について検討を行ったところ、*Adam3*^{-/-}の精子と野生型の精子が同時に子宮に存在しても、野生型の精子のみが輸卵管へ移行すること、また先体反応の前後の精子が同時に存在する場合でも、isthmus で観察される精子はほとんどが先体反応前であった。これらの結果から、UTJ では明らかに精子の選択が行われることがわかった。

また、交尾後 2 時間で輸卵管内を観察したが、やはり実時間では精子の移動の様子はわからなかったため、再びタイムラプス撮影を行ったところ、精子は輸卵管の蠕動運動によって運ばれていることが明らかとなった。交尾後 4 時間では膨大部の直近で精子が観察され、ここで初めて先体反応精子が見られることがわかった。

膨大部における精子の局在を観察したところ、受精の進行中には精子は各 1 匹ずつに別れ、卵-卵丘細胞複合体内に認められた。これまでに 18 例でのべ 73 匹の精子を確認したが、どれひとつとして、同じ卵子に向かっているものはなかった。以上の結果から精子はランダムに卵に接近しているのではなく、未受精卵を選んで近づいている可能性が示唆された。

2 つめのテーマでは、筆者は 2 種の蛍光蛋白質を発現する精子をもつトランスジェニックマウス RBGS を用いた受精の *in vivo* イメージングの系を立ち上げ、精子が雌性生殖路内をどのようにのぼり、卵と出会うのか、*in vivo* における受精のメカニズムの一端を明らかにすることに成功した。また、精子の輸卵管内の移行に関しては、精子の運動のみではなく、輸卵管のはたらきの重要性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文では卵子の透明帯を構成する成分である ZP3 と結合すると言われる ZP3R (zona pellucida 3 receptor) をコードする遺伝子を欠損させた遺伝子改変動物を作製してその受精能が検討されている。その結果 ZP3R を持たない雄マウスは正常な受精能を示すことが明らかになり、これまで透明帯との結合に重要だと考えられてきた ZP3R は、マウスの受精に必須な分子ではないことが明らかになった。

また、2 種類の蛍光蛋白質が精子で発現されるようなトランスジェニックマウスを用い、精子を子宮や輸卵管の壁越しに観察することで、精子が生きた雌の生殖路内をどのようにのぼり、卵と出会うのかが検討されている。その結果、精子の輸卵管内の移行には、従来考えられてきた精子の運動のみではなく、輸卵管の蠕動運動が大きく寄

与していることが初めて明らかにされた。

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。