

融合に機能することが明らかにされた¹⁶⁾。

このように、精子と卵子の融合メカニズムは、未知の部分が多く役者が揃い始めたばかりである。今後、CD9、CD81やGPIアンカー型蛋白質およびIzumoの相互関係の解析から研究の進展が期待される。

おわりに

これまでに受精のメカニズムにかかわるさまざまな因子が同定されてきた。しかし、ノックアウトの審判により受精に必須ではないと判定されたものも少なくない。言い換えれば、厳しいノックアウトの審判をクリアしたわずかな因子は受精にとって非常に重要な因子である。しかし、ノックアウトマウス解析も万能なツールではない。たとえば本稿で紹介した透明帯への結合のように、このステップに関与する分子が複数存在する場合、単一遺伝子のノックアウトの解析だけではその説明が不可能である。また、ノックアウトマウスを用いた解析は、表現型によりそのステップに必須分子かどうかを明確にすることができるが、ほとんどの場合、その先にあるメカニズム解析に至ることは難しい。これがノックアウト技術の限界である。

これからの受精研究は、個々の分子の性質を解析すると同時にノックアウトマウスから得られる個体レベルでのデータと見比べてゆくことが必要である。また、その分子がなくなったことによる直接的な影響なのか、あるいは二次的な影響を見ているのかを精査することも重要である。いずれにせよ、まずノックアウトマウスの結果をもとに個々の因子の機能を推定し、生化学的解析により個々の相互関係を理解していくことが最良の手段であると筆者らは考えている。

ノックアウトの解析を中心に受精の各ステップに重要な因子が解明されたとき、受精の分子

メカニズムにとって、次世代の新展開が現れるものと考えられる。そこに到達したときには、すばらしい受精の分子メカニズム解明へのステージが待っていると信じている。

- 1) Baba D, et al.: Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg. *J Biol Chem* 277:30310-30314, 2002.
- 2) Kim E, et al.: Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:18028-18033, 2005.
- 3) Rankin TL, et al.: Human ZP3 restores fertility in Zp3 null mice without affecting order-specific sperm binding. *Development* 125:2415-2424, 1998.
- 4) Ikawa M, et al.: Calmegin is required for fertilin alpha/beta heterodimerization and sperm fertility. *Dev Biol* 240:254-261, 2001.
- 5) Kim E, et al.: Mouse sperm lacking ADAM1b/ADAM2 fertilin can fuse with the egg plasma membrane and effect fertilization. *J Biol Chem* 281:5634-5639, 2006.
- 6) Cho C, et al.: Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science* 281:1857-1859, 1998.
- 7) Nishimura H, et al.: Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Dev Biol* 233:204-213, 2001.
- 8) Nishimura H, et al.: Possible function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface. *J Biol Chem* 279:34957-34962, 2004.
- 9) Ikawa M, et al.: Calmegin is required for fertilin alpha/beta heterodimerization and sperm fertility. *Dev Biol* 240:254-261, 2001.
- 10) Hagaman JR, et al.: Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2552-2557, 1998.

- 11) Kondoh G, et al.: Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization. Nat Med 11:160-166, 2005.
- 12) Fukami K, et al.: Requirement of phospholipase Cdelta4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. Science 292:920-923, 2001.
- 13) Miyado K, et al.: Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. Science 287: 321-324, 2000.
- 14) Rubinstein E, et al.: Reduced fertility of female mice lacking CD81. Dev Biol 290:351-358, 2006.
- 15) Alfieri JA, et al.: Infertility in female mice with an oocyte-specific knockout of GPI-anchored proteins. J Cell Sci 116:2149-2155, 2003.
- 16) Inoue N, et al.: The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. Nature 434:234-238, 2005.

著者連絡先

(〒565-0871)
 大阪府吹田市山田丘 3-1
 大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センター
 井上直和

■ 産科と婦人科バックナンバー特集一覧 ■ (価格は税5%込)

第65巻(平成10年)	第8号	女性ホルモン補充療法(HRT)の再評価	2520
〈増刊号〉鑑別診断のための画像の読み方	第9号	がんと性を科学する	2520
第66巻(平成11年)	第10号	着床不全の改善をめざして	2520
〈増刊号〉子宮体部悪性腫瘍の診断と治療	第11号〈特大号〉産婦人科診療 症候から診断・治療へ	6195	
第11号〈特大号〉産婦人科がん化学療法	第12号	早産・切迫早産を考える	2520
第67巻(平成12年)	第71巻(平成16年)		
〈増刊号〉避妊—女性のwell-beingをめざして	第1号	内視鏡下手術の適応と限界	2520
第11号〈特大号〉産婦人科感染症のすべて	第2号	子宮体癌治療のCONTROVERSY	2520
第68巻(平成13年)	第3号	GnRHアンタゴニストの臨床応用	2520
〈増刊号〉産婦人科ホルモン療法マニュアル	第4号	妊産婦死亡を防ぐ	2520
第11号〈特大号〉産婦人科オフィス診療	〈増刊号〉検査値をどう読むか	6825	
第69巻(平成14年)	第5号	婦人科がんのリスクファクター	2520
第1号	第6号	多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)を考える	2520
第2号	第7号	妊娠中に行う手術の適応と問題点	2520
第3号	第8号	産科医療におけるパラダイムシフト	2520
第4号	第9号	卵巣がん治療のCONTROVERSY	2520
〈増刊号〉妊婦・新生児スクリーニング検査	第10号	生殖免疫を考える	2520
第5号	第11号〈特大号〉女性内科疾患 外来プライマリ・ケア	7245	
第6号	第12号	胎児well-beingの評価	2520
第7号	第72巻(平成17年)		
第8号	第1号	乳がんの診断と治療	2625
血液製剤の使用法	第2号	抗悪性腫瘍薬の臨床薬理学	2625
2520	第3号	子宮内膜症をどう扱うか	2625
第9号	第4号	骨盤位妊娠を考える	2625
婦人科癌の予防と検診	第5号	卵巣明細胞癌を考える	2625
2520	第6号	生殖補助医療と双胎妊娠	2625
第10号	第7号	性感染症の診断・治療と予防	2625
受精のメカニズムをさぐる	第8号	周産期のウイルス感染症	2625
2520	第9号	婦人科がん多施設共同研究の現状と将来像	2625
第11号〈特大号〉産婦人科診療における超音波診断のポイント	第10号	不妊治療と新しい多様な家族のすがた	2625
6195	第11号〈特大号〉産科診療マニュアル		
第12号	一産科異常への対応	5775	
妊娠中毒症	2520		
第70巻(平成15年)	第12号	周産期医療の倫理を考える	2625
第1号	第73巻(平成18年)		
血管新生と婦人科悪性腫瘍	第1号	卒後20年生のスーパーローテイト	2625
2520	第2号	子宮頸癌発生の予防に向けての戦略	2625
第2号	第3号	静脈血栓症	2625
生殖医療よりみた多胎妊娠	第4号	成育医療における胎児診療	2625
2520	第5号	卵巣薬物療法の新展開	2625
第3号			
内科疾患合併妊娠の管理			
2520			
第4号			
産婦人科医に必要な麻酔の知識			
2520			
〈増刊号〉産婦人科手術療法マニュアル			
7575			
第5号			
子宮頸癌治療のCONTROVERSY			
2520			
第6号			
難治性不妊症をどう扱うか			
2520			
第7号			
難産を考える			
2520			

☆お問い合わせ、ご注文は下記へ

〒100-0014 東京都千代田区永田町 2-14-2 山王グランドビル
 振替 00170-9-30203
 営業部 E-mail: eigyobu @ shindan.co.jp

TEL 03-3580-2770 (営業) FAX 03-3580-2776
 (株) 診断と治療社・営業部

受精の膜融合における 必須分子Izumoの同定

Identification of "Izumo" Which is Involved in Sperm-egg Fusion

井上 直和・岡部 勝

大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センター

Key Words

sperm, egg, fertilization,
membrane fusion,
knockout mice

■ Abstract ■

長い受精研究の歴史のなかで、膜融合のメカニズムとそこにかかわる因子の同定は多くの研究者の興味を集めてきたが、ほとんど分かっていなかった。しかし、最近の解析から卵子側の融合因子としてテトラスパニンのCD9が同定され、融合のメカニズム解明の最初の手がかりが得られた。一方、著者らは、融合を特異的に阻害するモノクローナル抗体を用いた遺伝子クローニングにより精子側の因子としてIzumoを同定し、遺伝子ノックアウトによりこの遺伝子が融合に必須な因子であることを見出した。

■ はじめに

受精は、射出された多くの精子（ヒトの場合1～3億匹）のなかで、最終的にたった1匹の精子が卵子と融合し、遺伝子情報を受け渡す過程である。射出された精子には受精能がないため生体内（雌性生殖路内）で、受精能を獲得（capacitation）し、様々な障害を乗り越えて卵子に辿り着かなければならない。このように厳しい生存競争を勝ち抜いた精子は卵子と確実に「融合」しなければならない。この過程は次世代へ種を保存するために非常に重要な現象であり、正確性や確実性を確保するために種を超えて精巧な仕組みが存在するのではないかと考えられる。しかし、「融合」のメカニズムについて分子生物学的な解析はほとんど進んでいないのが現状である。今回我々は、世界で初めてほ乳類の精子膜上で融合に深く関与するタンパク質を同定することができたので紹介したい。

Naokazu Inoue, Masaru Okabe
Genome Information Research Center, Reserch Institute
for Microbial Diseases, Osaka University

■ 1. 融合に関与する因子群

これまでノックアウトマウスを用いた受精研究から、4回膜貫通型のファミリー分子であるCD9をノックアウトするとその雌から作られる卵子は、精子と融合できないことが明らかになった（図A）。しかし顕微授精法により精子を細胞質内に直接注入することで融合のステップをバイパスすると正常に産仔が得られることから、CD9は融合のステップに特異的に関与していることが証明された¹⁾。

このほかに、GPIアンカー型タンパク質の生合成系に必須な酵素であるPig-aをZP3プロモーターで卵子特異的にCreを発現させることより卵子のみでノックアウトすると、GPIアンカー型タンパク質をもたない卵子ができ、それは精子と結合できるものの融合能がほとんど失われることも報告されている²⁾。しかし、この方法では卵子上のGPIアンカー型タンパク質が欠失することによる卵子の膜構造変化などの2次的な要因である可能性も否めない。今後、融合に寄与するGPIアンカー型タンパク質の同定が強く望まれる。

■ 2. Izumoの同定

このように、融合に関わる卵子側の因子はおぼろげながら姿を現し始めている。しかし精子側の因子は、長年探し求められてきたにもかかわらず決定的な証拠があるものは報告されていない。著者らは約20年前にすでに融合のステップを特異的に阻害する抗精子モノクローナル抗体（OBF13）を

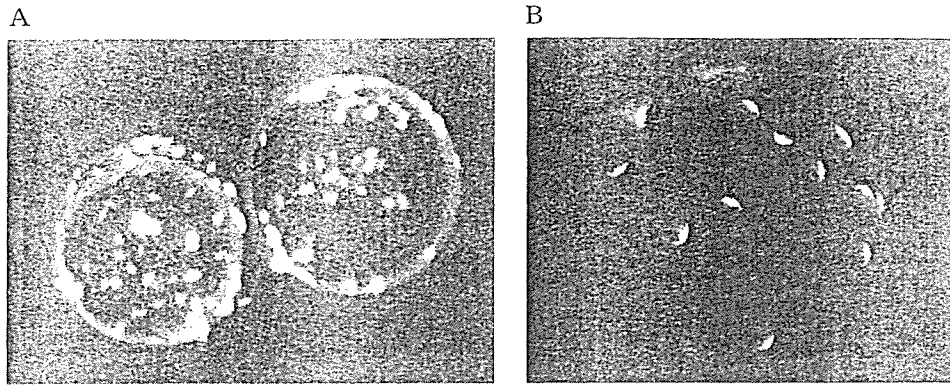


図 融合能欠損を示すCD9ノックアウト卵子とIzumoノックアウト精子

- A: CD9ノックアウト卵子に対して精子を加えヘキストで精子の核を染色すると、精子は正常に透明帯を通過するが、融合できないため囲卵腔に蓄積されている様子が観察される。
- B: Izumoノックアウト精子は先体反応を引き起こし、透明帯を通過することができるが、融合が全く起こらないため囲卵腔に精子が多数存在する。なお先体反応の有無は、先体反応後の精子に特異的に反応する抗体MN9（千葉大学の年森清隆教授より御供与頂いた）を用いて染色し、評価した。

見出していた³⁾。しかし、この抗体のサブクラスがIgMということもあって抗原の探索が困難で、長らくお蔵入りであったが抗原の抽出法や検出法の進歩もあり、最近になってやっとウエスタンブロット解析から2次元泳動後のゲル上で抗原のスポットを同定し、そのアミノ酸配列を解明することができた。我々はこの遺伝子を縁結びの神様のいる出雲大社に因んで「Izumo」と命名した。Izumoは細胞外に免疫グロブリン様ドメインを1つだけもつ、I型の膜貫通型糖タンパク質であった。

■ 3. Izumoノックアウトマウスの作製と解析

Izumoは精子に特異的に存在するタンパク質であったので、我々は迷うことなくストレートノックアウトマウスを定法にしたがって作製した。ノックアウトマウスは外見上健康であったが予想どおり雄マウスは不妊であり、ノックアウトマウスからの精子を用いた体外受精を行っても受精卵を得ることはできなかった。さらに詳細に調べると、この精子は正常に先体反応を引き起こし透明帯を通過していることが確認できた（図B）。つまり、このステップまでノックアウト精子に何ら問題はないことは明らかであった。次に精子の融合能力を検討したところ、ノックアウト精子は、卵子と

融合する能力を完全に欠失していることが分かった。この因子が融合の過程にのみ必要な分子であることは、ノックアウト精子が卵子細胞膜との結合能を有することや、融合のステップを顕微授精法でバイパスさせるとノックアウト精子からも産仔を得られることで示された。またヒト精子にもIzumoが存在し、特異的抗体を用いると体外受精が阻害されることから、ヒトにおいてもIzumoは卵子との結合または融合に機能するタンパク質であるということが明らかになった⁴⁾。

■ おわりに

今回の発見により、長年探し求められていた精子側の融合因子を同定することに成功した。またこの研究成果は、精子と卵子の融合メカニズムの解明に貢献することが期待されるほか、避妊ワクチンや不妊の診断などの社会的要求が大きい臨床分野においても応用できる可能性を秘めている。

文献

- 1) Miyado K, *et al.*: Science. 287: 321-324, 2000.
- 2) Alfieri J A, *et al.*: J Cell Sci. 116: 2149-2155, 2003.
- 3) Okabe M, *et al.*: J Reprod Immunol. 11: 91-100, 1987.
- 4) Inoue N, *et al.*: Nature. 434: 234-238, 2005.

遺伝子操作マウスを用いて見る卵子と精子の相互作用

岡 部 勝

わが国では約10組に1組のカップルが不妊に悩まされているといわれている。多くの人が不妊クリニックを訪れて、統計によると2004年にわが国で生まれた子供の65人に1人は体外受精児であったという。このような努力にもかかわらず、わが国では少子化に歯止めがかからず人口は減少に向かい始めている。「受精の生物学」は重要性を増しているが、少子化問題に資するどころか、これまでに蓄積されてきた受精のスキームがほぼ壊滅しようとしている。しかし遺伝子操作動物を用いた実験により、これまで知られていなかった受精の必須因子が次々と明らかになりつつあるので、本稿では、そのあたりをかいついで総説した。

生き物は音の存在を知るよしもないときに耳を発生させ、光の存在を知るよしもない状態であったにも関わらず、目を発生させ、物理学の知識を持たないにも関わらず、レンズを「発明」し網膜に像を結ばせることに成功した。さらにはレンズの厚みを変化させることで焦点を変更するなどの複雑なシステムを構築することにも成功してきた。これらは生命が成し遂げてきたすばらしい成功例のほんの一部にしか過ぎない。遺伝子を持ち寄り共有するという有性生殖システムの採用も生命にとって画期的な「発明」で、その発明以来、減数分裂と融合の過程は多くの進化を遂げてきたに違いない。現代の哺乳類において、このシステムは、雄が準備する小さいけれども活発に動き回る大量の精子と、雌が準備する大きい1個ないし数個しかない卵子との間で繰り広げられる「受精」現象として捕らえることができる。有性生殖はあまりにも根源的な発明であったために、受精のときには、目や耳などすべての獲得発明物をいったん放棄して、太古の世界に起こった細胞同士

の単純な融合を真似たかたちを再現しなければならない。すなわち、アフリカゾウのように何トンという体重を持つ強大な生き物であっても、受精のステップに至るには50-60マイクロメートルの鞭毛¹⁾を持つピコグラム単位²⁾の半数体単細胞である精子、もしくは、それよりは大きい透明帯と呼ばれる薄い糖タンパク質の膜に守られただけで脆弱な直径100マイクロメートル程度³⁾の20から40ナノグラム²⁾の卵子に変身しなければならない。成熟したアフリカゾウがいかに無敵といえども、受精の瞬間には、けしつぶ以下の脆弱な存在に戻らなければならない。これが有性生殖システムを採用した哺乳類の宿命である。

生命の大発明でもあり、宿命でもある受精のメカニズム(精子と卵子がどのようにお互いを見つけ、どのように接触し、融合に至るのか?)はどこまで明らかにされているのであろうか? この総説ではこれまでの受精研究の流れについて、マウスを中心に、いろいろと寄り道をしながら独断的な検証を試みてみた。

1. 卵 子

受精の立役者はなんといってもその存在感からいって卵子といえるであろう。最近、卵巣組織の辺縁部に卵子の幹細胞が存在するという驚くべき報告がNatureに掲載された⁴⁾。また、さらに追い討ちをかけるような衝撃的な報告としてこの幹細胞は骨髄細胞に由来し、血中をめぐり卵巣に達することが同じ著者らによりCellに掲載された⁵⁾。ハ

大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センター
(〒565-0871 吹田市山田丘3-1)
Observation of sperm-egg interaction through gene manipulated animals
Masaru Okabe (Genome Information Research Center, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Yamadaoka 3-1, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

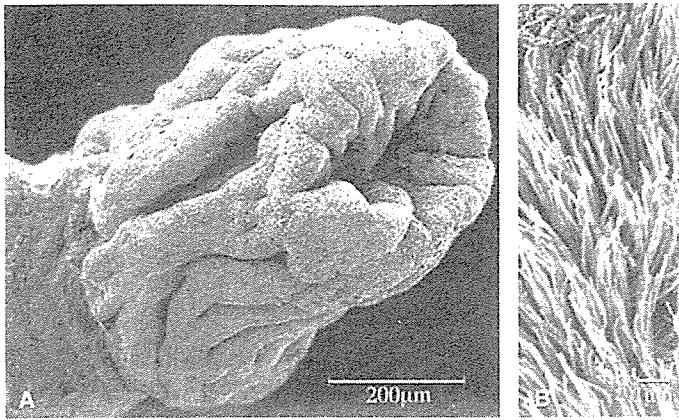


図1 卵管采の様子とその表面にある繊毛⁸⁾

論文のサイトから卵子が卵管内に吸い込まれてゆく動画がダウンロードできる。

ーバード大学医学部の研究室が一流の雑誌に掲載した報告であるが、後者の論文はサイエンスの領域からSF物語の領域に突入してしまった感がある。NatureやCellの論文の信憑性に疑念を呈している論文⁶⁾のほうに分があるように思える。しかし、ブタの胎児皮膚から卵子が分化してくるという報告⁷⁾もあり、どこになにの幹細胞が存在するのかについてはいましばらく混沌とした状態が続きそうである。

さて、以上は余談であるが卵巣から排卵された卵子は輸卵管内に吸引される。この様子はハムスターを使って見事な動画に収められている⁸⁾。この映像は必見で文字通り卵子が掃除機のホースの先に引っかかりながらもスポンと「吸引」されて入ってゆく様子が面白い。ただしこの吸引というのは液の流れによる吸引ではなく、卵子の周りに存在する卵丘細胞が卵管にある繊毛と次々と接着と離脱を繰り返しながら一定方向に運ばれてゆくことによる。ちょうど運動会でやる玉運びのような感じで、見ていて飽きないものがある。卵子は卵管采(図1)から吸い込まれた後に輸卵管の膨大部に移動し、ここで精子と出会い受精が起こる。卵子がどういう仕組みで膨大部にとどまるのかについての報告はないが、とどまっている間の卵子は卵丘細胞に包まれている。卵丘細胞は受精を終えると卵子から離脱する。透明帯がむき出しとなった卵子は再び輸卵管内を下降して子宮内へ移り、そこで着床することになる。LIFなどのノックアウトマウスでは着床が阻害されることが知られて久しい⁹⁾が、卵子と子宮壁の相互作用の生化学についてはあまり解明されていない。このあたりにも面白い仕組みがたくさんあるに違いない。

2. 精 子

卵子は排卵後、子宮に向かって輸卵管を下ってくるのに対し、精子は子宮を経て、輸卵管に上昇してくる必要がある。これにはもちろん精子の運動性が大いに関係しているのであるが、雌性生殖路内は試験管の中のような空洞には

なっておらず、むしろ精子にとっては入り組んだ迷路のように見えているはずである。眼や耳を持たない精子が迷路を潜り抜けて、どのように卵子を見出しているのであろうか。ホヤではステロイド性のケモアトラクタントが同定され精子の走化性に働いていることが明らかにされた¹⁰⁾。哺乳類の精子も走化性があることを示唆する報告が出ている。ヒト¹¹⁾やマウス¹²⁾の精子は進むべき方向を匂いで決めているのかもしれないが、雌性生殖路、あるいは卵子自身の発する何が精子に走化性をもたらすのかは不明である。

精子はマッチ箱の中に入っているマッチのようなものである。精巣内でたくさん産生されるが、それが精巣上体に移されてそこで不活性な状態のまま必要になるまで蓄えられている。射精されると雌性生殖路内に入ったという何らかの信号が伝わりマッチの頭の温度が発火点に近づくように精子も活性化される。これは昔から受精能獲得現象(capacitation)と呼ばれている反応であるが生化学的にも、精子膜表面からのコレステロールやその他の物質の放出やそれともなう呼吸・解糖能の上昇などいろいろな変化が精子に起こることが知られている。しかし何がcapacitationにとってもっとも重要な変化であるのかは解明されていない。capacitationの研究が難しい一因として、精子は必ずしも均一な集団ではないことが挙げられる。射精されるたくさんの精子の中で受精に関わるものは極めて限られており、大半はただ存在しているだけのようにも見える。一見同じに見える精子もそれぞれがかなり異なった生理機能を持っている。それでありながら、精子のバイオロジーを研究する時はほとんどの場合、精子全体をひとつの集団として扱わざるを得ない。これが精子を研究する上での大きなネックになっている。

受精能を獲得した精子は頭部の先端部に存在するリソソーム系の酵素が詰まっている先体(acrosome)と呼ばれる袋状組織の先体外膜とその外側にある細胞膜が融合して先体反応(acrosome reaction)と呼ばれる反応を起こす

精子の受精能獲得と先体反応

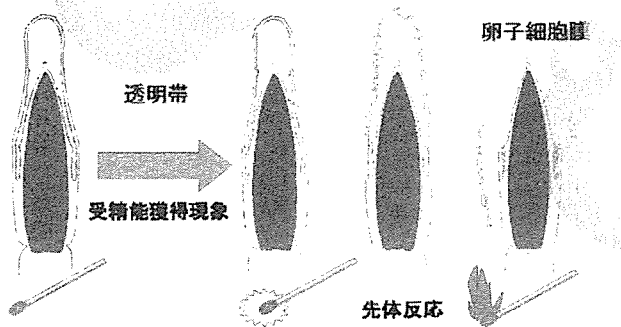


図2 精子の先体反応と卵子との相互作用

精巣上位に蓄えられている精子は代謝能は低く抑えられており頭部には先体と呼ばれる細胞小器官が存在する。雌性生殖路内に入ると活発に運動をはじめ先体部分を消失することによって受精可能となるが、活性化された状態は長くは続かないと考えられている。

(図2). この反応により、マッチが発火するように精子の先体部分から先体に含まれる酵素であるヒアルロニダーゼを放出しヒアルロン酸に囲まれた卵丘細胞の層を通過し、また先体からタンパク質分解酵素であるアクロシンを放出し、それが糖タンパク質からできている透明帯を溶かして進入し、精子が卵子と出会うというのが定説であった。しかし、後に述べるように現在の図式は異なってきた。

モルモットなどは非常に大きな先体部分を持っているので先体反応の様子を観察することができるがマウスやヒトの精子の先体部分は小さいために先体反応を起こしたのかどうかを光学顕微鏡で区別することは難しい。我々はオワンクラゲ由来の GFP 蛍光タンパク質を先体部分で発現させるようなトランスジーンを持つトランスジェニックマウスを作製している。この精子を使うと、先体反応を起こす前の精子では先体部分がきれいな蛍光を発するので精子の先体の様子を生きたままで観察することができる。このようなマウスは研究用動物資源として理化学研究所のバイオリソースセンターや熊本大学のCARDから B6; C3 Tg(acro3-EGFP)01Osb, または C57BL/6-Tg(CAG/Acr-EGFP)C3-N01-FJ002Osb という名前で頒布されている¹⁸⁾。このようなマウスからの精子はセルソーターで分析することで先体反応精子の割合を容易に算定することができ、先体反応が起こる様子をリアルタイムで観察することも可能である¹⁹⁾。先体反応が起こると GFP は3秒以内に拡散してなくなってしまうことが確認されたが、同じ先体内に存在する物質でも、時間がたたないと拡

散していかないものもあり、先体反応の仕組みは単純な all or none の状態ではなく、中間型のものが存在することが示唆されている。卵子との相互作用はこのような遷移型先体反応精子を考慮に入れなければならないのかもしれない¹⁴⁾。

3. 卵子と精子の相互作用—旧セオリーの破綻

精子が卵子とどのような相互作用をするのかについてはこれまでに多くの報告がなされている。たとえば、精子の持つガラクトシルトランスフェラーゼが酵素としてではなく、接着因子として卵子の透明帯や卵子の細胞膜への接着をつかさどっているという説が唱えられていた。この説は抗体の添加やリガンドあるいは酵素活性阻害剤の添加などによる状況証拠により積み上げられてきたものである。1997年に Shur らのグループにより、ガラクトシルトランスフェラーゼ (beta 1,4-galactosyltransferase) 欠損マウスが報告された¹⁵⁾。精子に若干の受精能の低下が認められるとはいうものの、ガラクトシルトランスフェラーゼを欠損した雄は不妊にはならなかった。しかし、Shur らは精子の膜上にはガラクトシルトランスフェラーゼ以外に SED1 というタンパク質も存在しており、これが透明帯との結合に働いていると報告し¹⁶⁾、ついで SED1 欠損マウスを報告した¹⁷⁾。しかしながら SED1 欠損マウスの雄も若干の受精能の低下が認められたものの、必須の因子であるとは言えなかった。

それを数年さかのぼった 1994 年に馬場らは、精子が透明帯を通過するのに必要であると考えられていた精子先体内の酵素、アクロシンを欠損させたマウスを作製したところ、若干の遅れは見られるものの、精子はアクロシンの助けを借りずに透明帯を通過できることが発見された¹⁸⁾。このことは Adham らによっても再確認されている¹⁹⁾。馬場らはアクロシンノックアウトマウスの精子にもなお残存するタンパク質分解酵素があることを見出し、マウス精子にはアクロシン以外にも精巣特異的なセリンプロテアーゼである TESP1 から TESP5²⁰⁾ を報告している。これらの酵素群が存在するのでアクロシンを欠損しても別の酵素がこれを補うのであろうと考えられているが、これらの酵素のうち、主役がいるのか?あるいはこれらを総合した酵素活性があればよいのかなどについては現在分かっていない。

一方、Myles らはモルモット精子の膜上に存在する PH-20 が受精の前後で精子上の存在部位を変化させたり、PH-20 と反応するモノクローン抗体 3 種のうちの 2 種が精子の透明帯への結合を阻害したりすることから PH-20 が透明帯結合因子であることを報告していた²¹⁾。1993 年には、ヘビ毒を研究していたグループが PH-20 はヒアルロニダーゼであることを発見した²²⁾。その後、サルではアクロシンではなく PH-20 が透明帯を通過する役割を担っ

^{脚注)} (<http://www.brc.riken.jp/lab/animal/en/>)

ている²³⁾との論文が発表された。そこで、馬場らはPH-20を欠損させたマウスを作製したが、雄の妊孕性にはほとんど影響が見られなかった²⁴⁾。

受精に必要な因子ではないかと思われた遺伝子をノックアウトしてもほとんど何も起こらないという物語はまだ存在する。たとえばファティリンはもともとPH-30と呼ばれるモルモット精子に対するモノクローン抗体と反応する抗原で、PH-30抗体は精子と卵子の融合を強く阻害する働きがある。その後、抗原の遺伝子がクローニングされ、配列中にはウイルスの融合ペプチドに似た配列や、インテグリン結合配列があることなどを状況証拠として精子の融合タンパク質ファティリンと命名されNatureに報告された²⁵⁾。1998年になり、同じグループはファティリンを形成するADAM1/ADAM2ヘテロダイマーのうちのAdam2遺伝子を欠損したマウスを作製したが、このマウスは不妊になるものの、その重要な作用点は融合の段階ではなく、それよりも前の精子が透明帯に結合する部分がうまく機能しないため、透明帯を通過できないことが明らかにされた²⁶⁾。

これまでの受精研究において大切な役割を持つと提唱されてきたさまざまな因子は、どれも抗体やリガンド、あるいは酵素阻害剤などの添加により受精阻害作用を示すという証拠により同定されてきたものばかりである。そのうちの代表選手のほとんどがノックアウトマウスの解析により存在しなくても受精にたいした影響がでないことや、予想されていたフェノタイプとは全く異なる役割を持っていることがわかったことになる。これまでの研究のいきさつを捨てて、この結果を冷静に受け止めると、まだノックアウトされていない他の因子の重要性についても、同様に赤信号がともされたことになる。受精のメカニズムの図式からノックアウトマウスを使用して受精への関与が明らかにな

ったものだけを残すことにすると、これまで報告されている因子群はほぼ全滅ということになり、かくして旧セオリーの崩壊が起こった。

4. 卵子と精子の相互作用—新セオリーの台頭

1) 精子と透明帯の相互作用

まともに見える精子がありながら、受精に問題がある精子ができるという例は、1997年に我々が発表したカルメジンノックアウトマウスが最初である。カルメジンをノックアウトしたマウスは正常な運動性を持つ精子を正常量産するが、雄は不妊である。なぜ不妊になるのかを知るために体外受精を行ったところ、カルメジンをノックアウトしたマウスからの精子は透明帯に結合できずに、透明帯に当たっても跳ね返されている様子が観察された(図3)。これでは体外受精がうまくいかないのは当然である。では、カルメジンが精子と透明帯との結合を直接担っているのでしょうか？ 答えは否である。カルメジンは全身の組織で発現している分子シャペロンであるカルネキシンとよく似た構造を持っており、精巣の中でのみ発現される精巣特異的シャペロンと考えられる。カルメジンはカルネキシンと同様に膜結合型の分子シャペロンであり、その存在部位はER膜上に限定される。精子が成熟してゆく過程でさまざまな遺伝子がシャットダウンされ、タンパク質合成能もなくなってゆき、ついには精子からERは消失してしまう。このときカルメジンも同時に消失する。従って、野生型の精子であろうともカルメジンは精子膜上には存在していない。従って、カルメジンが直接、透明帯との結合に関わっている可能性はない。カルメジンをノックアウトすることにより、精子から受精能力が消失するのは、精子の細胞膜上で透明帯との反応に関わるタンパク質が、うまく折り畳まれないことが原因となり、精子上に提示されないた

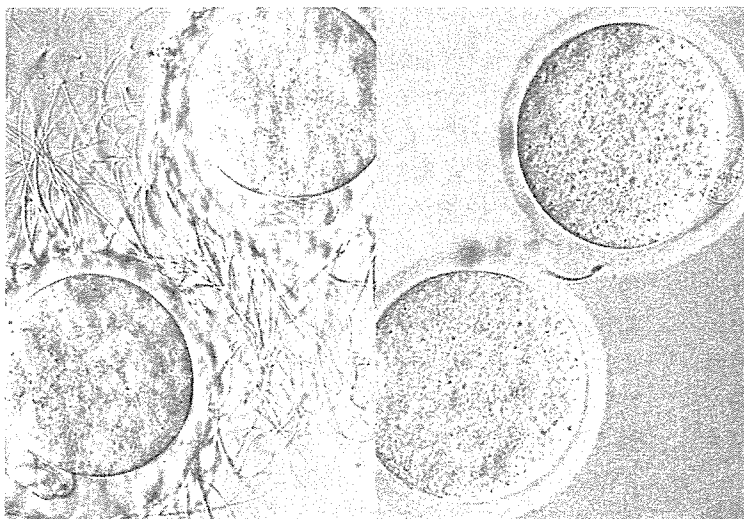


図3 カルメジンをノックアウトすると雄は不妊になる

左は野生型の精子で体外受精した様子である。透明帯にたくさんの精子が結合しているのがわかる。右はカルメジンをノックアウトしたマウスからの精子を媒精した場合である。このマウスからの精子は活発に運動しており、野生型と同数を加えたにもかかわらず透明帯に結合する精子はほとんど見当たらない。

めではないかと思われた。

カルメジンのノックアウトマウスが報告された後、先述の ADAM2 ノックアウトマウスが報告されたが、なんとこの二つの遺伝子のノックアウトは同じフェノタイプを示していた。このことを強引に結びつけて考えると、カルメジンが ADAM2 をシャペロンしている可能性が浮かび上がる。そこで精巣の抽出液をカルメジン抗体で免疫沈降したものを SDS 電気泳動し ADAM2 抗体を用いてウエスタンブロットしてみると、確かに ADAM2 がカルメジンと共沈していた。精巣内にはカルメジンと相同性を有するユビキタスな分子シャペロンであるカルネキシンも発現している。カルネキシンを免疫沈降すると多くのタンパク質が共沈するが、その中に ADAM2 は含まれておらず、明らかにカルメジンは ADAM2 と特異的に結合していることが確認された。さらに検討すると、通常 ADAM1 と ADAM2 はヘテロダイマーを形成しているので抽出液を ADAM2 で免疫沈降したときには ADAM1 も同時に落ちてくる。ところが、カルメジンをノックアウトすると ADAM2 で免疫沈降しても ADAM1 が落ちてこなくなることが分かった。これはカルメジンが ADAM2 の折り畳みに関与しており、その折り畳みがなければ ADM1/ADAM2 のヘテロダイマー（ファーターリン）の形成がうまくいかないことを示すものである。これでカルメジンと ADAM2 の両ノックアウトマウスが同じフェノタイプを有する理由が説明できた。

ところが驚いたことに、その後発表された ADAM1a や ADAM3 のノックアウトマウスがまたしてもカルメジンと同じフェノタイプを示したのである。ADAM ファミリーはお互いに連携した発現様式をとっているようで、ADAM1a ノックアウトマウスの場合には ADAM2 の発現に影響はないが、ADAM3 は精子からなくなるらしい²⁷⁾。また、ADAM3 をノックアウトしたときには ADAM2 の値はそれほど減らない²⁸⁾ ので、これまでのノックアウトマウスの結果を総合すると、ADAM3 が透明帯への結合に関与している最下流の因子ということになる。

しかし残念ながら、ADAM3 をヒトゲノム上でコンピュータ検索しても偽遺伝子と思われるものしか検出されない。ヒト精子には ADAM3 が存在しないとすると ADAM3 を最終的な透明帯接着因子とするメカニズムはマウス特有のものであることになる。さらに別の可能性として、ADAM1b と並んで精巣内に存在する ADAM1a をノックアウトしたときに ADAM3 が精子から消えた²⁷⁾ ように、ADAM2 や ADAM3 が消えたときに実は別に存在する真の透明帯結合因子が精子から消失したことが考えられる。その場合にはヒトやマウスに共通の透明帯結合メカニズムが存在してもおかしくはなくなる。

さて、それでは ADAM3 以外に透明帯結合因子の候補

はないのであろうか？ ADAM3 以外にも sp56 や zonadhesin, などが結合因子として報告されているがその信憑性はノックアウトマウス作製の結果を待たねばならないと思われる。少なくとも sp56 はカルメジンノックアウトマウスの精子上に残っていることが示されている²⁹⁾。また、話は少しずれるがカルメジン, ADAM1a, ADAM2, ACE のノックアウトマウスの精子はみな透明帯に結合できないということ以外に精子が輸卵管内に登っていけないというフェノタイプも共有している^{26,27,30,31)}。透明帯への結合不全と輸卵管への移行不全がなぜパラレルに起こるのかは大きな謎であると同時に何か重要なことを示唆しているに違いない。

2) 細胞膜の融合

透明帯への結合や通過は受精の前段階であり、受精現象の中核部分は配偶子の細胞膜が融合する過程であろう。細胞膜は細胞の境界を決める構造であるが、水平方向に流動性を持っていたり、二重層の表側と裏側で脂質組成を局在化させる機構が存在したり、コレステロールに富んだラフトと呼ばれる構造があるほか、細胞が分裂する際には膜成分の増殖も起こるなど、かなり動的な存在である。細胞が分裂する時にはミオシンなどからできた収縮環ができて、細胞膜にくびれが入り、最終的には中央体とよばれる微細な構造でつながった形になる。しかし、真に細胞が二つに分離するためには、この部分が引きちぎられなければならない。そのときには細胞膜に破れ目ができるはずであるが、おそらく膜の持つ自然な修復機能によって、この穴はふさがる。

細胞膜に人工的に穴をあける操作（たとえば未受精卵の細胞質内にピペットで精子を注入する ICSI 操作）をしても膜は自動的に修復する。しかし、細胞膜の復元能力は常に一定ではなく、マウスの卵子はヒトの卵子に比べて修復されにくい。ICSI 操作によって膜を破ると卵子はよく死んでしまう。マウスの場合、大きな穴があくために修復しにくいのか、修復能が劣っているのかははっきりしない。また、同じマウスでも受精卵になると未受精卵のときよりも細胞膜は丈夫になり、凍結保存などの操作にもよく耐えるようになる。精子の細胞膜も射精されたときと、受精能を獲得した後では、かなり違うことが認められている。同じ細胞膜でありながら、状況によって多様な性質を取ることができるのは細胞膜の裏打ち構造や膜を構成する脂質の組成やラフトなどの構造などさまざまな因子の働きによっている。受精とは未受精卵の細胞膜と、受精能を獲得した後には先体反応を起こした精子の細胞膜が融合する過程である。受精が成立するための基本的な状況として、まずお互いの膜が融合に適した環境に適合していることが必要と思われる。その上で何らかの因子が働き融合が引き起

表 1 さまざまな膜融合の例

ひとつの細胞で完結する膜融合
細胞分裂
エキソソーム ⁵⁰⁾
ウイルスの出芽
神経顆粒からの伝達物質の分泌 (SNARE, クラスリン)
★精子の先体反応 ⁵¹⁾ (SNARE)
ファゴサイトーシス (SNARE, クラスリン)
ミトコンドリアの融合 (mitofusin) ⁵²⁾
同種細胞の融合
筋芽細胞から筋肉
胎盤絨毛からシンシチオトロフォブラスト
破骨細胞の形成 ³²⁾
(DC-STAMP)
異種細胞 (生物) の融合
★受精 (精子-卵子) ^{37,43)} (CD9, Izumo)
ウイルスの感染

こされるのであろう。

実は、受精以外にも生体には膜融合をとまなう重要な過程がたくさん存在している (表 1)。肝臓や白血球の中には多核の細胞が存在するが、これは核分裂後に細胞質が分裂しないためにできあがる。ところが同様に多核化した細胞である筋肉の場合は成り立ちが肝臓や多核白血球とは異なり、筋原細胞がお互いに融合することによってできあがっている。胎盤絨毛細胞 (trophoblast) は自身で融合を起こしシンシチオトロフォブラストを形成し、子宮壁に接触・結合のあと胎盤形成に関わることが知られている。しかしこれらの細胞における融合因子は明らかにされていない。

また、破骨細胞は単球/マクロファージ系に属する細胞であるが、時には 100 核を越える大型の多核細胞を形成する。この多核化も細胞融合によってもたらされることが知

られていたが、最近、この融合を媒介する因子は DC-STAMP と呼ばれるタンパク質であることが明らかにされた³²⁾。しかしながら、この因子は間接的な働きをするものであり、直接の融合因子が分かっているわけではない³³⁾。

このほか、細胞内小器官であるミトコンドリアは他の細胞オルガネラの膜と融合することはないが、ミトコンドリア同士は融合したり分裂したりすることが知られる。その融合には mitofusin1 や 2 が関与することが知られている³⁴⁾。膜の融合のメカニズムがもっともよく調べられているのは小胞体におけるタンパク質輸送やエキソサイトーシスである。クラスリンにより被覆された小胞体が出芽するとその根元でダイナミン (GTPase) が膜を融合させて小胞をくびりとる。できあがった小胞はターゲットに向かいそこで小胞上の SNARE (vSNARE) とターゲット上の SNARE (tSNARE) が対になり膜同士を融合に導くと報告されている。受精に先立って精子は先体部分の膜が融合する先体反応を起こす必要があるが先体部分はその中に入っているたくさんの酵素を放出する一種のエキソサイトーシスと考えられる。とすると SNARE の関与があってもいいと思われるが、それを裏付けるようなデータも報告されている (図 4)³⁵⁾。

ウイルスに限らず、病原性の細菌などいろいろなメカニズムを駆使して細胞膜を通過し、細胞質内に入り込む仕組みを持っている。ある種のウイルスが標的細胞に融合する過程では小胞体や精子の先体反応で使われる SNARE の仕組みを真似ているらしく、ウイルスの上に単独で vSNARE と tSNARE の複合体からなるような構造を持っており、融合の時にはあたかも SNARE と見まがうばかりのメカニズムで融合を起こしているらしい (図 5)。また感染病原体の場合は、細胞内で増殖後、細胞膜をすり

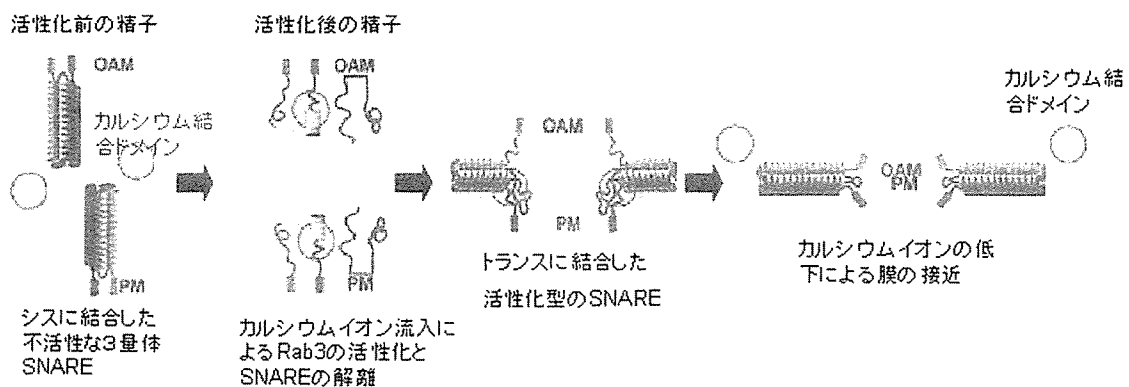


図 4 精子の先体部分の膜 (細胞膜と先体外膜) の融合のメカニズム³⁵⁾

先体反応時における SNARE の関与に関する仮説を示す。精子の細胞膜 (PM) と外先体膜 (OAM) にはともに Rab3, NSF, aSNAP が neurotoxin に抵抗性を示すシス結合したヘテロ 3 量体を形成しているが、先体内部にカルシウムが入ってくると Rab3 が活性化され 3 量体が解離する。その後トランスに結合する 3 量体が形成され、カルシウム濃度が再び減少することにより PM と OAM が引き寄せられて先体反応が起こる。

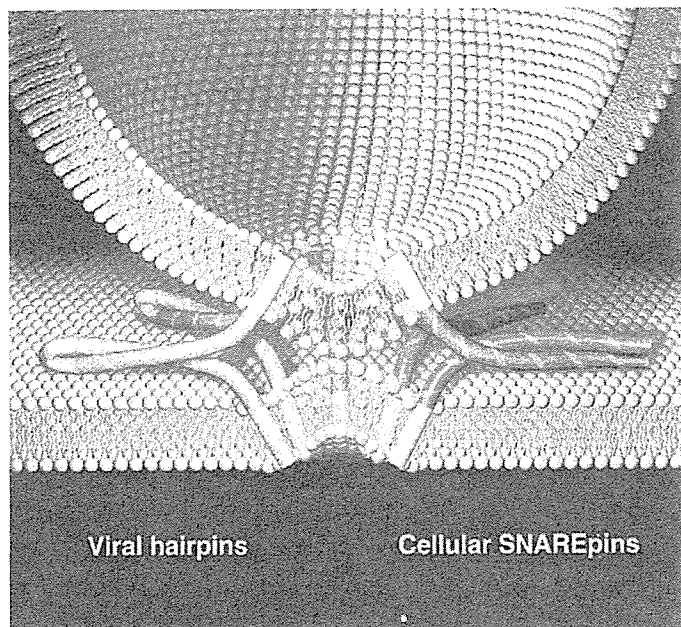


図5 SNAREによく似た構造を持つウイルスの融合タンパク³³⁾

左はウイルスのSNARE様一本鎖たんぱく質、右は細胞のもつSNARE構造

抜けて外に出なければ、再び他の細胞へと感染を広げることができない。というわけですべての膜融合を伴う反応は病原体にまで範囲を広げると非常に多くの仕組みが存在しているのが現状である。

さまざまな仕組みで膜融合が起こるにしても、そこになにか共通の機構は存在しないのであろうか？ 光学顕微鏡で観察できるような巨大人工脂質膜小胞(リポソーム)にインフルエンザウイルスの膜融合誘導タンパク質ヘムアグルチニンを含ませて、膜融合の過程を再現した実験によると、脂質二重膜が単純に近接しただけでは融合が起こらず、ペプチドが膜を激しく褶曲(折り畳み)して、初めて融合が起こると報告されている³⁶⁾。

図6に示すように膜が折れ曲がらないと融合が起こらない。このことを一般的なものとして考えると、膜を形成する脂質層の不安定化が融合が起こるための必須条件になるのかもしれない。それではいったい、受精現象ではどのような膜の変化が起こっているのでしょうか？

3) 精子と卵子の融合

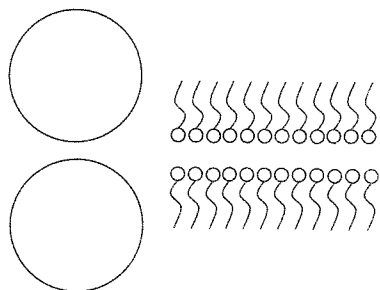
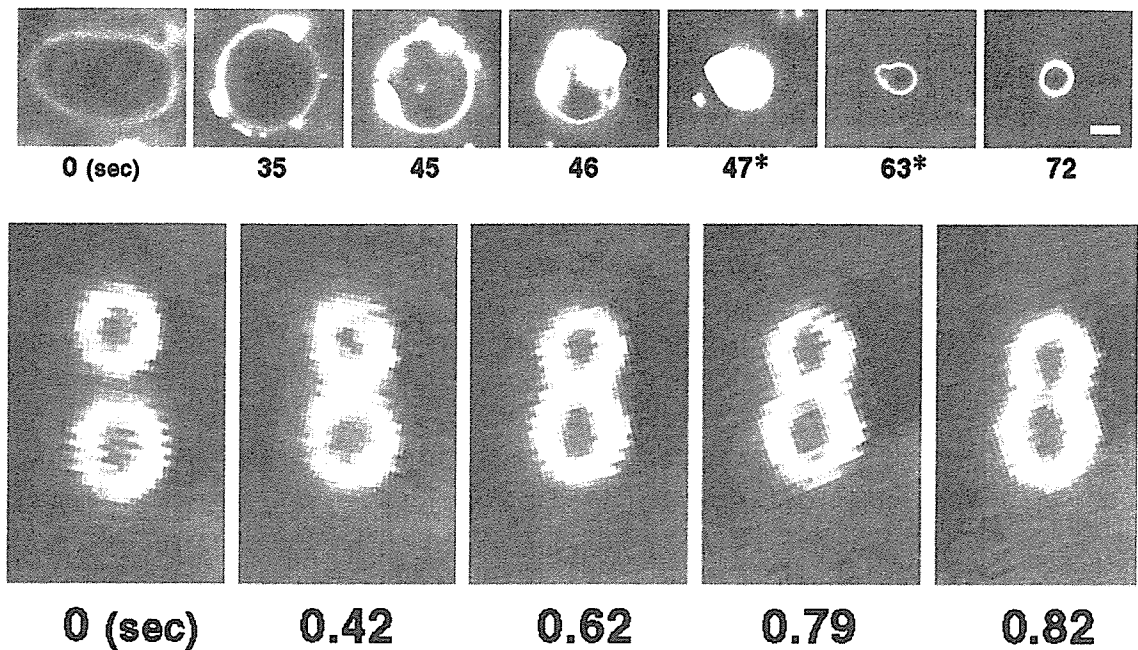
精子-卵子相互作用に関して旧来提唱されてきたメカニズムに対して遺伝子ノックアウトマウスの作製実験はどちらかといえば破壊的な役割を果たしてきたが、建設的な側面ももちろん存在する。いかなる遺伝子をノックアウトしてもその研究を行うためには必ずできあがったマウスは交配して増やさなければならぬ。というわけで、いまや受精の研究者は座っているだけで、他の研究者がノックアウトした遺伝子が精子や卵子の受精能に関わっているのかどうかを知ることができる。受精研究者にとっては極楽浄土

のような世界が展開されようとしている。たとえば、CD9ノックアウトの場合であるが、この遺伝子はそもそも多くの細胞で発現しており、欠損させると免疫担当細胞に影響が出るのではないかという予想のもとにノックアウトマウスが作製されたが、不妊という全く予期されていなかった部分に劇的な影響が現れた。すなわちCD9を欠失させたマウスの雄は正常な受精能を持つが、雌は不妊であった³⁷⁾。

なぜ、不妊になるのかを体外受精で調べたところ、卵子の透明帯内に多くの精子が蓄積しているが、これらの精子は卵子と融合できないことがわかった。卵子は普通、最初にやってきた精子と融合すると、多精子受精を防ぐため透明帯反応³⁸⁾と呼ばれる反応を起こし、それ以上の精子の侵入を阻止するが、どの精子も卵子と融合できなかったために、精子が次々と侵入し続け、図7に示すような結果になったものと考えられた。

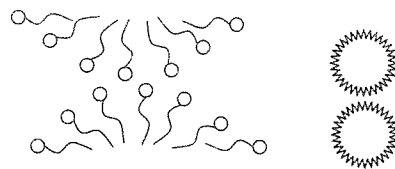
遺伝子ノックアウトにより、卵子が精子と融合するためにはCD9が必須であることが判明し、精子-卵子の融合のメカニズムにかかわる重要因子が受精を専門としない研究者により発見され、融合の分子生物学的研究の扉がはじめて開かれることになったわけである。CD9は四つの膜貫通領域を持つタンパク質で、テトラスパニンと呼ばれるファミリーに属しておりインテグリンなどと結合することが知られていた。卵子上ではインテグリン $\alpha 6$, $\beta 1$ が存在しており、インテグリンの合成ペプチドなどを加えると融合阻害が起こることから、インテグリンが精子との融合に必要であるという論文が報告された³⁹⁾。この手法は旧来の受精の図式を描くための手法と同じであった。だからとい

融合タンパク質を組みこんだ人工リポソームが褶曲する様子（上）と褶曲したリポソームが融合する様子（下）³⁶⁾



褶曲前の膜が向い合った様子

(右は拡大図)



褶曲後の膜が向い合った様子

膜が折れ曲がるために外系は小さくなる

(右は拡大図)

図 6 膜の褶曲は融合の前段階として必要か？

うわけではないが、「インテグリン重要説」は程なく、インテグリン $\alpha 6$ やインテグリン $\beta 1$ をノックアウトしたマウスの卵子の受精能が正常であった⁴⁰⁾ ことから、下火となった。

さて、精子は先体反応を起こさないと卵子と融合できない。これは融合因子が先体反応した精子にだけ表れてくることを示している。もし先体反応精子とだけ反応して、しかも卵子の融合を抑える作用を持つようなモノクローン抗

体を見つけることができれば受精の融合因子を明らかにできるかもしれない。こういう考えのもとに我々は抗ヒト先体反応精子特異抗体 MH61⁴¹⁾ 及び抗マウス先体反応精子特異抗体⁴²⁾ を作製した。ヒトの精子が MH61 抗体とどの程度反応するのかを調べることにより不妊の診断に応用することができた。その抗原はいったい何なのかを知るために、ウエスタンブロットでバンドを特定したあと、その部分のゲルからタンパク質を抽出して N 末端分析を行った

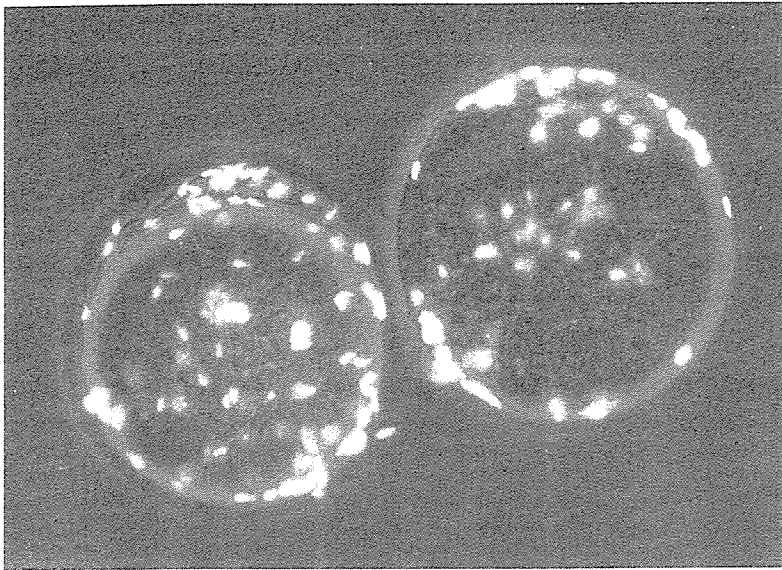


図7 CD9 ノックアウト卵子の透明帯の中に蓄積した多くの精子

光っているのはヘキストで染色された精子の核。卵子に融合能が無いために次々と精子が透明帯内へ進入を続けるが精子の核は卵子と融合・膨潤することなくそのままの形を保つ。

ところほとんど全身の細胞に発現している補体制御因子 CD46 であることがわかった。瀬谷らがマウスのオーソログのクローニングに成功したが、発現部位を調べたところ、マウスにおける CD46 は精巣だけ（正確には精子にだけ）に発現していた⁴³。このことから CD46 が受精に関わる重要な因子であるに違いないと考え、勇んで CD46 欠損マウスの作製を行った。ところが CD46 を欠損したマウスは予想を完全に裏切り、生殖能力にはなんの問題も生じなかった⁴⁴。旧セオリーの破壊に一役買ったわけである。再び「抗体による阻害実験」の限界を知るようになった。しかしこれはヒトで明らかになったことをマウスで確認しようとして失敗しただけかも知れない。そこで気を取り直してもともとマウスでとれていた OBF13 抗体が認識する抗原についても明らかにして遺伝子をノックアウトすることでその役割を検証することにした。OBF13 抗原のスポットを 2D ゲル上でウェスタンブロットにより同定し、そのスポットを LC/MS/MS で解析し、抗原を明らかにした。クローニングされた配列は、分子量 56 kDa で Ig ドメインをひとつだけ持つイムノグロブリンスーパーファミリーのタンパク質であった。RT-PCR を試みると、OBF13 抗原は CD46 の場合と同じく、精子にだけ発現していた⁴⁵。

しかしこれまでの例から分かるように OBF13 抗原が融合に関与する必須の因子であるかどうかは、ノックアウトマウスを作製してその妊孕性をみるまでは判断がつかない。そこでノックアウトマウスを作製し、野生型の雌と交配して、交尾してから数時間経過した雌の輸卵管から卵子を取り出し、受精しているかどうかをおそるおそる見てみたところ、期待通り、受精しておらず、卵子は未受精卵のみであった。体外受精をするとカルメジンの場合と異なり透明帯には鈴なりの精子が結合しており、たくさんの精子

が透明帯の中に侵入していた。しかし、卵子と融合している精子は 1 匹もなく、OBF13 抗原を持たない雄は不妊であった。OBF13 抗原を持たない精子を人工的に卵子の細胞質内にインジェクションする ICSI を行った場合は正常な受精卵が得られ、移植すると健康な産仔が得られたので、この抗原を持たない精子の欠陥は融合のステップに限局されていることが示された⁴⁵。

しかし、気をつけなければならないのは、ノックアウトマウスを作製して、フェノタイプが見えたからといって必ずしもその遺伝子がなくなったからとはいえない場合があることである。たとえば MRF4 遺伝子を三つの研究室で別々にノックアウトしたところ、胎生致死、一部死亡、影響なしと三つのフェノタイプが得られている。プリオン遺伝子も複数の研究室で別々にノックアウトされ、影響なし⁴⁶、神経症状あり⁴⁷の二通りのフェノタイプが報告された。MRF4 のフェノタイプの出た例は、ノックアウトベクターのせいで MRF4 遺伝子の隣にある Myf5 遺伝子が働かなくなったためである⁴⁸。プリオンのノックアウトでフェノタイプが出たほうは、ノックアウトベクターのせいで、プリオン遺伝子が途中から隣の遺伝子にスプライスされ、人工的な複合タンパク質が産生されたためである⁴⁹。

このような例を見ると、これ以外にも、ひとつのコンストラクトでしかノックアウトがなされていない遺伝子の中には、間違ったフェノタイプと結び付けられて報告されているものがあるに違いない。したがって、ノックアウトマウスでフェノタイプが見られても、実は間違っているかもしれないと疑ってかかるほうが賢明である。しかし、倍以上の労力を費やして複数のターゲティングベクターから 2 種のノックアウトマウスを作製したとしてもそれで絶対に

間違いないと断定することはできない。では、どうすれば遺伝子がフェノタイプの直接の原因であると断定できるのだろうか？ 実は、その遺伝子を同じように発現させるプロモーターがあれば、その遺伝子のトランスジェニックマウスを作り、ノックアウトマウスと交配して、フェノタイプが消えればそれがまちがいに原因遺伝子であったということが証明できる。

そこで我々は、OBF13 ノックアウトに見られた雄の不妊というフェノタイプが、本当に OBF13 抗原の欠損に由来するのかわかると確かめるために、精巣特異的に発現するカルメジンプロモーターに OBF13 抗原の cDNA を結合してトランスジェニックマウスを作製し、ノックアウトマウスと交配し、本来の遺伝子の欠損をトランスジーンで補ったところ、見事に不妊のフェノタイプが消失した。ここまでくれば OBF13 抗原が精子上に存在する卵子との融合に関わる因子であると断定しても間違いはないと考えられる。我々は融合に関わる真の精子側因子を理詰めで見つけ出したことがうれしくて、この遺伝子に和名をつけたくなり、縁結びの神様を祭る出雲大社にちなんで Izumo と命名し発表した⁴⁵⁾。

普通、受精は同種の精子と卵子の間に起こる反応であり、異種の配偶子が出会うことはないし、人工的に混合しても受精は起こらない。ところが、ハムスターの卵子は透明帯を取り除くと異種の精子とでも融合することが知られている。このようにハムスターの卵子はあたかもファゴサイトーシスを起こすように精子を取り込む。そこで Izumo をノックアウトしたマウス精子がハムスターの卵子に対して融合能を持つかどうかを検討したところ、さすがのハムスター卵子も Izumo がなければ精子と融合をできないことがわかった。我々はヒト精子にも存在する Izumo の受精への関与を検討したいと考えていた。そこで、ヒト Izumo に対する抗体を作製したところ、できあがった抗体はマウス Izumo 抗体の場合と同様に、新鮮なヒト精子とは反応しないが、先体反応を起こさせて内先体膜を露出させると精子と反応することが確かめられた。さらに、この抗体の存在下にヒト精子をハムスターの卵子に加えたところ、融合が阻害されることが認められ、ヒトでも Izumo は受精に関与していることが示唆された⁴⁶⁾。しかしながら、抗体による阻害はあてにならないというのが、この拙文で主張し続けている点である。残念ながらヒト Izumo 抗体だけを例外扱いして、ヒトでも機能していると断定するわけにはいかない。Izumo 遺伝子に欠陥を持つために不妊である男性が見つかるまでは、ヒトにおける役割の断定はお預けである。

終わりに

「生化学」誌に生化学的な手法の限界を説くのは気がひ

けたが、こと受精現象に関しては抗体を添加したり、リガンドを添加したり、あるいは酵素阻害剤を添加したりしながら、その影響を観察し、その結果に基づいて描かれた受精の図式は崩れ去ってしまった。これに対して、受精のようによくわづかな研究材料でミクロの出来事を追跡するには遺伝子操作動物の使用が非常に効果的であることが実証された。受精のメカニズムに登場する新因子はその半分以上が日本人研究者により発見されている。この事実は少子化に悩む我が国が不妊の診断や治療法を開発してゆく上でまことに喜ばしいことである。

文 献

- 1) Sa-Ardrit, M., Saikhun, J., Thongtip, N., Damyang, M., Mahasawangkul, S., Angkawanish, T., Jansittiwate, S., Faisaikarm, T., Kitiyanant, Y., Pavasuthipaisit, K., & Pinyopummin, A. (2006) *Int. J. Androl.*, **29**, 346-352.
- 2) Nagy, A. (2002) *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 3) Leibo, S.P. & Songsasen, N. (2002) *Theriogenology*, **57**, 303-326.
- 4) Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J.K., & Tilly, J. L. (2004) *Nature*, **428**, 145-150.
- 5) Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H.J., Adams, G.B., Niikura, Y., Tschudy, K.S., Tilly, J.C., Cortes, M.L., Forkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden, D.T., & Tilly, J.L. (2005) *Cell*, **122**, 303-315.
- 6) Byskov, A.G., Faddy, M.J., Lemmen, J.G., & Andersen, C.Y. (2005) *Differentiation*, **73**, 438-446.
- 7) Dyce, P.W., Wen, L., & Li, J. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **8**, 384-390.
- 8) Talbot, P., Geiske, C., & Knoll, M. (1999) *Mol. Biol. Cell*, **10**, 5-8.
- 9) Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F., & Abbondanzo, S.J. (1992) *Nature*, **359**, 76-79.
- 10) Yoshida, M., Ishikawa, M., Izumi, H., De Santis, R., & Morisawa, M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 149-154.
- 11) Spehr, M., Gisselmann, G., Poplawski, A., Riffell, J.A., Wetzel, C.H., Zimmer, R.K., & Hatt, H. (2003) *Science*, **299**, 2054-2058.
- 12) Fukuda, N., Yomogida, K., Okabe, M., & Touhara, K. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 5835-5845.
- 13) Nakanishi, T., Ikawa, M., Yamada, S., Parvinen, M., Baba, T., Nishimune, Y., & Okabe, M. (1999) *FEBS Lett.*, **449**, 277-283.
- 14) Kim, K.S. & Gerton, G.L. (2003) *Dev. Biol.*, **264**, 141-152.
- 15) Lu, Q. & Shur, B.D. (1997) *Development*, **124**, 4121-4131.
- 16) Ensslin, M.A. & Shur, B.D. (2003) *Cell*, **114**, 405-417.
- 17) Shur, B.D., Rodeheffer, C., Ensslin, M.A., Lyng, R., & Raymond, A. (2006) *Mol. Cell. Endocrinol.*, **250**, 137-148.
- 18) Baba, T., Azuma, S., Kashiwabara, S., & Toyoda, Y. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 31845-31849.
- 19) Adham, I.M., Nayernia, K., & Engel, W. (1997) *Mol. Reprod. Dev.*, **46**, 370-376.
- 20) Honda, A., Yamagata, K., Sugiura, S., Watanabe, K., & Baba, T. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 16976-16984.
- 21) Primakoff, P., Lathrop, W., Woolman, L., Cowan, A., &

- Myles, D. (1988) *Nature*, **335**, 543-546.
- 22) Gmachl, M. & Kreil, G. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3569-3573.
- 23) Yudin, A.I., Vandevoort, C.A., Li, M.W., & Overstreet, J. W. (1999) *Mol. Reprod. Dev.*, **53**, 350-362.
- 24) Baba, D., Kashiwabara, S., Honda, A., Yamagata, K., Wu, Q., Ikawa, M., Okabe, M., & Baba, T. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 30310-30314.
- 25) Blobel, C., Wolfsberg, T., Turck, C., Myles, D., Primakoff, P., & White, J. (1992) *Nature*, **356**, 248-252.
- 26) Cho, C., Bunch, D.O., Faure, J.E., Goulding, E.H., Eddy, E.M., Primakoff, P., & Myles, D.G. (1998) *Science*, **281**, 1857-1859.
- 27) Nishimura, H., Kim, E., Nakanishi, T., & Baba, T. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 34957-34962.
- 28) Nishimura, H., Cho, C., Branciforte, D.R., Myles, D.G., & Primakoff, P. (2001) *Dev. Biol.*, **233**, 204-213.
- 29) Ikawa, M., Wada, I., Kominami, K., Watanabe, D., Toshimori, K., Nishimune, Y., & Okabe, M. (1997) *Nature*, **387**, 607-611.
- 30) Hagaman, J.R., Moyer, J.S., Bachman, E.S., Sibony, M., Magyar, P.L., Welch, J.E., Smithies, O., Kregel, J.H., & O'Brien, D.A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2552-2557.
- 31) Ikawa, M., Nakanishi, T., Yamada, S., Wada, I., Kominami, K., Tanaka, H., Nozaki, M., Nishimune, Y., & Okabe, M. (2001) *Dev. Biol.*, **240**, 254-261.
- 32) Yagi, M., Miyamoto, T., Sawatani, Y., Iwamoto, K., Hosogane, N., Fujita, N., Morita, K., Ninomiya, K., Suzuki, T., Miyamoto, K., Oike, Y., Takeya, M., Toyama, Y., & Suda, T. (2005) *J. Exp. Med.*, **202**, 345-351.
- 33) Vignery, A. (2005) *J. Exp. Med.* **202**, 337-340.
- 34) Chen, H. & Chan, D.C. (2005) *Hum. Mol. Genet.*, **14** Spec No. 2, R283-289.
- 35) De Blas, G.A., Roggero, C.M., Tomes, C.N., & Mayorga, L.S. (2005) *PLoS Biol.*, **3**, e323.
- 36) Nomura, F., Inaba, T., Ishikawa, S., Nagata, M., Takahashi, S., Hotani, H., & Takiguchi, K. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3420-3425.
- 37) Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., Suzuki, K., Kosai, K., Inoue, K., Ogura, A., Okabe, M., & Mekada, E. (2000) *Science*, **287**, 321-324.
- 38) Barros, C. & Yanagimachi, R. (1971) *Nature*, **233**, 268-269.
- 39) Chen, M.S., Tung, K.S., Coonrod, S.A., Takahashi, Y., Bigler, D., Chang, A., Yamashita, Y., Kincade, P.W., Herr, J.C., & White, J.M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 11830-11835.
- 40) Miller, B.J., Georges-Labouesse, E., Primakoff, P., & Myles, D.G. (2000) *J. Cell Biol.*, **149**, 1289-1296.
- 41) Okabe, M., Nagira, M., Kawai, Y., Matzno, S., Mimura, T., & Mayumi, T. (1990) *Fertil. Steril.*, **54**, 1121-1126.
- 42) Okabe, M., Adachi, T., Takada, K., Oda, H., Yagasaki, M., Kohama, Y., & Mimura, T. (1987) *J. Reprod. Immunol.*, **11**, 91-100.
- 43) Tsujimura, A., Shida, K., Kitamura, M., Nomura, M., Takeda, J., Tanaka, H., Matsumoto, M., Matsumiya, K., Okuyama, A., Nishimune, Y., Okabe, M., & Seya, T. (1998) *Biochem. J.*, **330** (Pt 1), 163-168.
- 44) Inoue, N., Ikawa, M., Nakanishi, T., Matsumoto, M., Nomura, M., Seya, T., & Okabe, M. (2003) *Mol. Cell Biol.*, **23**, 2614-2622.
- 45) Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., & Okabe, M. (2005) *Nature*, **434**, 234-238.
- 46) Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., & Weissmann, C. (1992) *Nature*, **356**, 577-582.
- 47) Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., Nakatani, A., Kataoka, Y., Houtani, T., Shirabe, S., Okada, H., Hasegawa, S., Miyamoto, T., & Noda, T. (1996) *Nature*, **380**, 528-531.
- 48) Olson, E.N., Arnold, H.H., Rigby, P.W., & Wold, B.J. (1996) *Cell*, **85**, 1-4.
- 49) Flechsig, E., Hegyi, I., Leimeroth, R., Zuniga, A., Rossi, D., Cozzio, A., Schwarz, P., Rulicke, T., Gotz, J., Aguzzi, A., & Weissmann, C. (2003) *EMBO J.*, **22**, 3095-3101.
- 50) Couzin, J. (2005) *Science* **308**, 1862-1863.
- 51) Hutt, D.M., Baltz, J.M., & Ngsee, J.K. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 20197-20203.
- 52) Meeusen, S.L. & Nunnari, J. (2005) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 389-394.
- 53) Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlanti, F., Sollner, T.H., & Rothman, J. E. (1998) *Cell*, **92**, 759-772.

Azoospermia in mice with targeted disruption of the *Brek/Lmtk2* (brain-enriched kinase/lemur tyrosine kinase 2) gene

Seiji Kawa*, Chizuru Ito†, Yoshiro Toyama†, Mamiko Maekawa†, Tohru Tezuka*, Takahisa Nakamura*,
Takanobu Nakazawa*, Kazumasa Yokoyama*, Nobuaki Yoshida‡, Kiyotaka Toshimori†, and Tadashi Yamamoto*[§]

*Division of Oncology, and †Laboratory of Gene Expression and Regulation, Center for Experimental Medicine, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan; and ‡Department of Anatomy and Developmental Biology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670, Japan

Edited by Ryuzo Yanagimachi, University of Hawaii, Honolulu, HI, and approved October 13, 2006 (received for review May 5, 2006)

Brek/Lmtk2 (brain-enriched kinase/lemur tyrosine kinase 2) is a member of the Aatyk family of kinases that comprises Aatyk1, *Brek/Lmtk2/Aatyk2*, and Aatyk3. Although several potential roles have been proposed for *Brek* and other Aatyk family members, the physiological functions of these kinases remain unclear. Here, we report that *Brek*^{-/-} male mice are infertile, with azoospermia. Detailed histological analysis revealed that *Brek*^{-/-} germ cells differentiated normally until the round-spermatid stage, but failed to undergo the normal change in morphology to become elongated spermatids. Testicular somatic cells appeared normal in these mice. Expression of *Brek* in testis was restricted to the germ cells, suggesting that the maturation of germ cells in *Brek*^{-/-} mice are affected in a cell-autonomous manner. On the basis of these findings, we concluded that *Brek* is essential for a late stage of spermatogenesis. Further clarification of the mechanism by which *Brek* regulates spermatogenesis may help identify new targets for reproductive contraceptives and treatments against infertility.

AATYK | BREK | infertility | LMTK2 | spermatogenesis

Spermatogenesis, the process by which primordial germ cells generate sperm, is a complex process that includes mitotic division of spermatogonia, meiotic division of spermatocytes to generate haploid cells called spermatids, and differentiation of the spermatids into sperm cells. The last maturation step in which haploid spermatids undergo a complex restructuring program is called spermiogenesis. Spermiogenesis begins with formation of the acrosome from Golgi-derived vesicles, followed by formation of a flagellum, condensation of the nucleus with DNA compaction, and jettison of the cytoplasm. The resulting mature sperm consists of a head with a nucleus and a tail and enters the lumen of the seminiferous tubules. Spermatozoa that differentiate in the testis mature further during the passage through the epididymal duct to acquire functions essential for fertilization.

Protein-phosphorylation events play pivotal roles in regulating intracellular signals in response to a wide variety of stimuli. There is accumulating evidence that protein kinases, such as c-Kit, play critical and distinct roles in spermatogenesis (1). *Brek* (brain-enriched kinase) is a member of the protein kinase subfamily that comprises Aatyk1, *Brek/Lmtk2/Aatyk2*, and Aatyk3. This kinase subfamily was recently identified through a genome database search for human tyrosine kinases and was tentatively named the Aatyk (apoptosis-associated tyrosine kinase) subfamily (2). Generation of a phyletic tree of known tyrosine and Ser/Thr kinases revealed that Aatyk family kinases represent a previously uncharacterized category of kinases that reside between tyrosine kinases and Ser/Thr kinases. The primary structures of Aatyk kinases show slightly higher homology to tyrosine kinases than to Ser/Thr kinases, but we previously showed that the Aatyk kinases are Ser/Thr kinases and not tyrosine kinases (3). Although *Brek* is also called Aatyk2 and

Lmtk2 (lemur tyrosine kinase 2), these names are apparently after the putative tyrosine kinase activity and do not accurately reflect its genuine property. We also showed that *Brek* is expressed at high levels in early postnatal brain and that *Brek* plays a part in nerve growth factor (NGF) signaling in PC12 cells (3). Other groups reported that Kpi-2 (kinase/phosphatase/inhibitor-2) and Cprk (CDK5/p35-regulated kinase), which are identical to *Brek*, interact with protein phosphatase 1 catalytic subunit (PP1C) and p35 *in vitro* (4, 5); however, their *in vivo* association and biological significance are not characterized.

In this study, we elucidated the physiological function of *Brek* by generating mice with a targeted disruption of the *Brek* gene. We found that *Brek*^{-/-} male mice are infertile, with azoospermia. Because mice lacking members of the Aatyk family have not been analyzed, our current study provides a clue to investigate the physiological roles of this unique and little characterized family of kinases and to the molecular mechanism of spermatogenesis.

Results

Generation of *Brek*-Knockout Mice. To investigate the physiological role of mammalian *Brek*, we generated mice with targeted disruption of *Brek*. A *Brek*-targeting construct was designed to replace the genomic region of *Brek* containing exons 4–6 with a neomycin-resistance cassette (Neo) (Fig. 6A, which is published as supporting information on the PNAS web site). The exons 4–6 encode amino acid residues essential for kinase activity. ES cell clones bearing the targeted allele were selected by Southern blot analysis (Fig. 6B). To generate homozygous mutant mice, F₁ heterozygotes were interbred, and the F₂ offspring were genotyped by PCR analysis (Fig. 6C). Absence of *Brek* protein in *Brek*^{-/-} mice was confirmed by immunoblot analysis of brain lysates (Fig. 6D).

Azoospermia in *Brek*-Knockout Mice. *Brek*^{-/-} mice were born at a slightly lower frequency (18%, $n = 268$) than the predicted Mendelian frequency. We have not yet examined when and how the missing 7% of *Brek*^{-/-} pups die before birth. Null pups that survived the gestation period showed no phenotypic abnormality at birth and had apparently normal growth. Histological examination of immature *Brek*^{-/-} mice (postnatal weeks 3 and 4)

Author contributions: S.K., T. Nakamura, T. Nakazawa, K.T., and T.Y. designed research; S.K., C.I., Y.T., and M.M. performed research; S.K., K.Y., and N.Y. contributed new reagents/analytic tools; S.K., C.I., Y.T., M.M., and K.T. analyzed data; and S.K., T.T., T. Nakamura, K.Y., K.T., and T.Y. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS direct submission.

Abbreviation: PP1C, protein phosphatase 1 catalytic subunit.

[§]To whom correspondence should be addressed at: Division of Oncology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Shirokanedai 4-6-1, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan. E-mail: tyamamoto@ims.u-tokyo.ac.jp.

© 2006 by The National Academy of Sciences of the USA

Table 1. Fertility assessment

Male	Female	Average number of litters
<i>Brek</i> ^{+/+}	<i>Brek</i> ^{-/-}	6.1 ± 3.8 (n = 4 plugs)
<i>Brek</i> ^{+/+}	<i>Brek</i> ^{+/+}	7.2 ± 1.4 (n = 10 plugs)
<i>Brek</i> ^{-/-}	<i>Brek</i> ^{+/+}	0 (n = 6 plugs)

showed that all tissues examined, including testis (both somatic and germ cells), epididymides, and prostate were normal (data not shown). Note that spermatozoa are not typically present during this period. Adult *Brek*^{-/-} mice were healthy, with normal size and behavior. However, in breeding experiments, male *Brek*^{-/-} mice were infertile, although male *Brek*^{+/+} and female *Brek*^{-/-} mice showed normal fertility (Table 1). To determine the cause of infertility in the *Brek*^{-/-} males, we first examined whether spermatozoa were produced normally at 8 weeks of age. Testes of *Brek*^{-/-} mice were smaller than those of *Brek*^{+/+} mice (Fig. 1A). There were no spermatozoa in the epididymides of *Brek*^{-/-} mice (Fig. 1B). Thus, infertility of *Brek*^{-/-} males appeared to be caused by impaired spermatogenesis. Testes weights and sperm counts of *Brek*^{+/+} mice were normal (data not shown). Because testicular size and germ cell morphology during immature periods appeared normal, the defects in *Brek*^{-/-} mice seemed to be in late spermatogenesis. By TUNEL assay against sections of adult seminiferous tubules, we found a markedly increased number of apoptotic cells in *Brek*^{-/-} testes (Fig. 2). This finding suggested that differentiation of *Brek*^{-/-} germ cells was perturbed during late spermatogenesis and that a subset of the perturbed germ cells in *Brek*^{-/-} testes underwent apoptosis.

Importance of *Brek* in Late Spermatogenesis. To clarify defects in spermatogenesis in *Brek*^{-/-} mice, we performed histological analyses of adult seminiferous tubules in detail (Fig. 3). Although spermatogenesis proceeded normally in *Brek*^{-/-} testes until approximately round-spermatid production, *Brek*^{-/-} spermatids showed abnormalities in further development (Fig. 3B, D-I, and K). The number of elongating spermatids was gradually reduced in *Brek*^{-/-} testes as spermiogenesis proceeded. Few elongated spermatid were observed in seminiferous epithelium of *Brek*^{-/-} testes at stages VII–VIII (Fig. 3B, D, E, and K), unlike

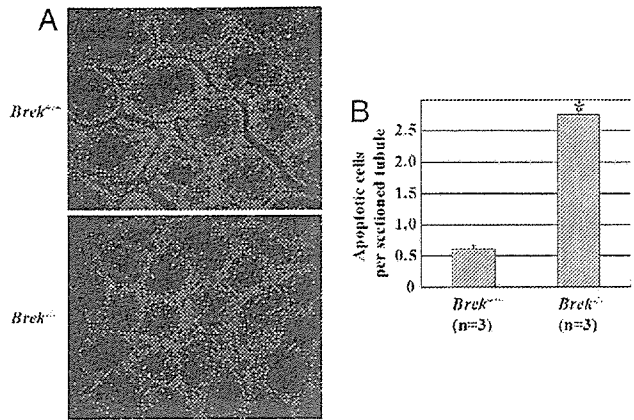


Fig. 2. Increased germ cell apoptosis in *Brek*^{-/-} mice. (A) Apoptotic cells were detected by *in situ* TUNEL assay of testis sections from 8-week-old *Brek*^{+/+} and *Brek*^{-/-} mice. Cells were visualized with DAPI (red). Merged images show TUNEL-positive cells in yellow. (B) Quantification of apoptotic germ cells in the seminiferous tubules of 8-week-old *Brek*^{+/+} and *Brek*^{-/-} mice. In each testis, TUNEL-positive cells in at least 100 tubule sections were counted and averaged. Error bars represent SD. Statistical significance (*, $P < 0.01$) was assessed by Student's *t* test. Analysis of 12-week-old mice yielded similar results.

in that of *Brek*^{+/+} testes (Fig. 3A, C, and J). In addition, vacuoles and degenerated symplast-like cells were frequently found in *Brek*^{-/-} seminiferous epithelium (Fig. 3B, E, and H). Electron micrographs suggested that elongating spermatids were readily phagocytized by Sertoli cells in *Brek*^{-/-} testes (Fig. 3E and H). As a result, engulfed spermatids and residual bodies of spermatids were frequently observed in the cytoplasm of Sertoli cells near the basement membrane (Fig. 3E). Many of elongating spermatids in *Brek*^{-/-} testes had variously deformed acrosomes. Typical acrosome deformation was indentation at the acrosome granule area (Fig. 3F). Many of *Brek*^{-/-} spermatids that differentiated into elongated spermatid stage (step S14) were being degenerated and showed various deformations on the heads and tails (Fig. 3G and H). Collapsed and separated acrosomes and tail degeneration with mitochondrial separation were often observed in *Brek*^{-/-} testes (Fig. 3H). Flagellum development in late spermatids was not impaired in *Brek*^{-/-} testes. The tail components such as outer dense fibers and fibrous sheath were apparently formed (Fig. 3I). We found few spermatids that differentiated to step S15 in seminiferous epithelium of *Brek*^{-/-} testes (Fig. 7, which is published as supporting information on the PNAS web site). The number and morphology of testicular somatic cells, including Sertoli cells (Fig. 3A and B) and Leydig cells (data not shown), in *Brek*^{-/-} mice were indistinguishable from those in *Brek*^{+/+} mice. Thus, the absence of *Brek* did not affect meiotic division of germ cells but abrogated the further maturation of round spermatids. *Brek* may control the activities of key proteins involved in late spermatogenesis.

Expression of *Brek* in Testis. Defects in testicular germ cells and somatic cells result in azoospermia. Abnormalities in hormone levels are also the cause of infertility. To characterize the expression profile of *Brek* in testis, we performed Western blot analysis (Fig. 4). *Brek* was highly expressed in mouse testis, suggesting that the impaired maturation of *Brek*^{-/-} germ cells was due directly to defects in the testicular cells and not to indirect effects of defects in other cell types, such as neural cells (Fig. 4A). Consistently, serum levels of testosterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone were not altered in *Brek*^{-/-} male mice (Table 2). We further evaluated *Brek* expression in testes from C57BL/6 mice (postnatal weeks 2–10) and

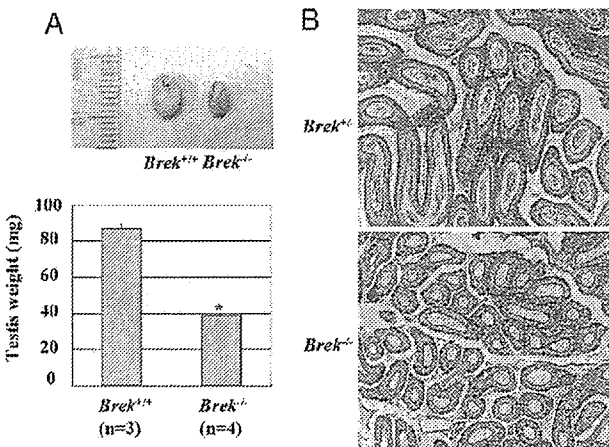


Fig. 1. Azoospermia in *Brek*^{-/-} mice. (A) Comparison of testis weights of 8-week-old *Brek*^{+/+} and *Brek*^{-/-} mice. (Upper) Photographs of testes from *Brek*^{+/+} and *Brek*^{-/-} mice. (Lower) One testis from each pair of testes was trimmed free of fat and weighed. (B) Sperms in epididymis. Micrographs of H&E-stained sections from 8-week-old *Brek*^{+/+} and *Brek*^{-/-} epididymides. Arrows indicate presence (*Brek*^{+/+}) or absence (*Brek*^{-/-}) of sperm cells. Analysis with 12-week-old mice yielded comparable results.

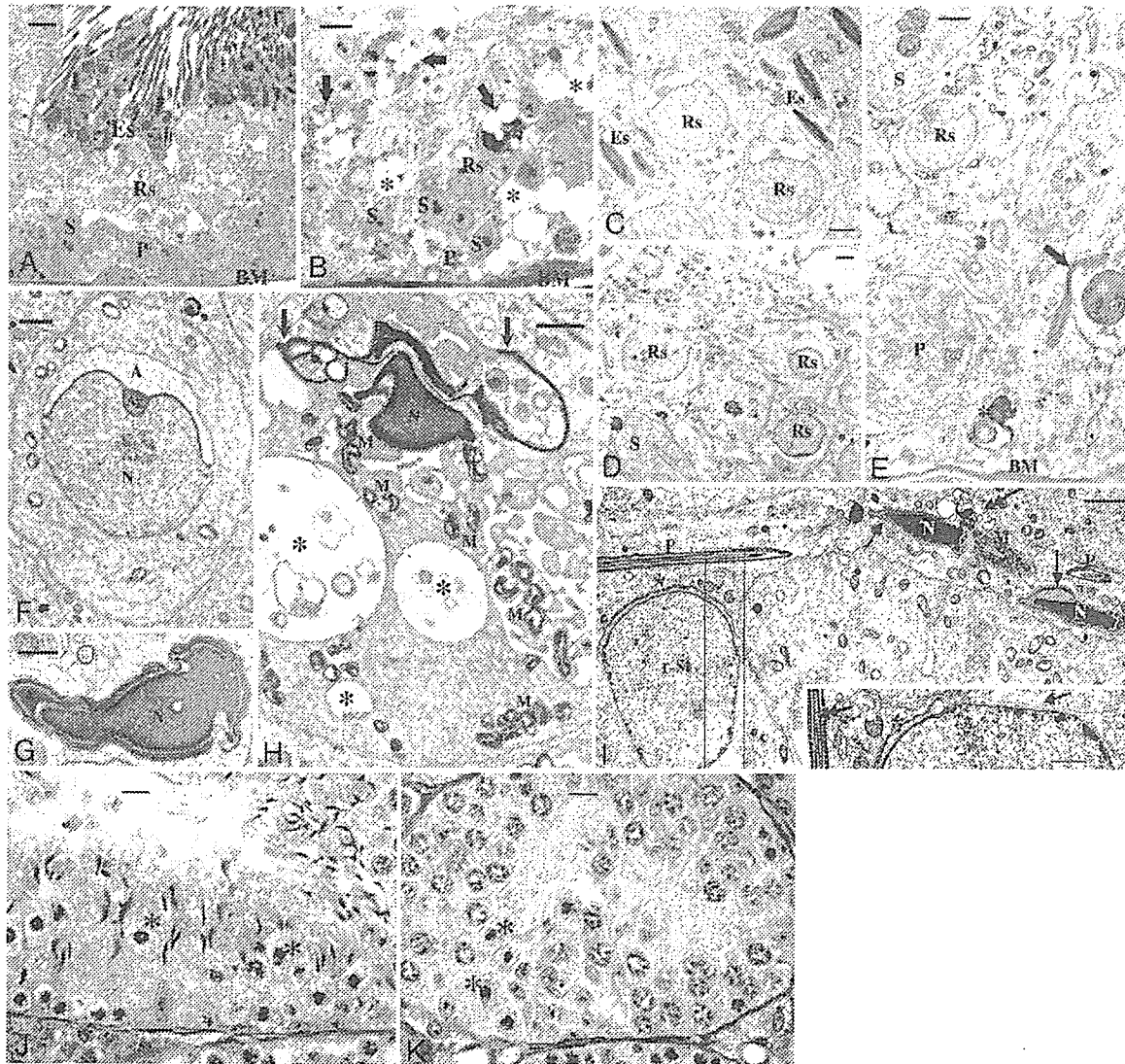


Fig. 3. Histological abnormality in *Brek*^{-/-} testes. (A and B) Light micrographs of testes (around stage VII–VIII). Sections were stained with toluidine blue. (A) Normal spermatogenesis in *Brek*^{+/+} testis. (B) Vacuoles (*) and degenerated symplast-like cells (arrows) were found in *Brek*^{-/-} testis. (C–I) Electron micrographs of *Brek*^{+/+} (C) and *Brek*^{-/-} (D–I) testes. Sections were stained with lead and uranyl acetate. (C) Normal spermiogenesis with healthy round and elongating spermatids in *Brek*^{+/+} testis. (D) In *Brek*^{-/-} testis, round spermatids appear to be produced normally but gradually show abnormal development in the acrosome (F). (E) Elongating spermatids develop abnormally and are eventually engulfed by Sertoli cells (arrows) with residual bodies (*). (G and H) Elongated spermatids at step 513–14 in *Brek*^{-/-} testes, showing varieties of deformations and collapsed components such as acrosome and nucleus in the head (G). Collapsed acrosomes (arrows) and vacuoles (*) found in Sertoli cells are indicated (H). (I) A few elongated spermatids survived until approximately step 15. Irregular acrosomes (arrows) and condensed nuclei (N) are indicated. The spermatids show electron-dense material with many vesicular structures at the border between the head and tail (double arrow). Middle piece shows relatively well arranged mitochondrial sheath (M) and principal piece region with fibrous sheath (P). A developed round spermatid (r-St) has an irregular acrosome (*), a part of which is shown in *Inset*. (*Inset*) A higher-magnification image of the rectangular area. Shown are manchette (arrow), irregular acrosome (*), and tail components such as fibrous sheath and outer dense fibers (double arrow); the axoneme is not clearly recognized at this magnification). (J and K) Stage matched images of *Brek*^{+/+} (J) versus *Brek*^{-/-} testes (K). Periodic acid/Schiff (PAS) staining shows stage XII that can be identified with secondary spermatocytes dividing at meiosis II (*). There are many elongating spermatids with PAS-positive acrosomes in the tubule of *Brek*^{+/+} testis (J). Few or no elongating spermatids are survived in the tubule of *Brek*^{-/-} testis (K). A, acrosome; Ag, acrosome granule; BM, basement membrane; Es, elongating or elongated spermatid; M, mitochondria; N, nucleus; P, pachytene spermatocyte; Rs, round spermatid; S, Sertoli cell. [Scale bar: 10 μ m [A and B]; 2 μ m [C–E and I (*Inset*), 1 μ m]; 1 μ m [F and H]; 0.5 μ m [G]; and 10 μ m [J, K]]

kit mutant (*kit*^{W/W^{-v}}) mice (postnatal week 10) (Fig. 4B). At postnatal week 10, the expression level of *Brek* was significantly low in *kit*^{W/W^{-v}} males compared with that in control wild-type males. Because *Kit*^{W/W^{-v}} males have greatly reduced numbers of germ cells but approximately normal number of somatic cells (6), the result suggested that *Brek* is expressed primarily in germ cells. Expression levels of *Brek* in testes of C57BL/6 mice were

markedly increased between postnatal weeks 2 and 3 (Fig. 4B). This finding is consistent with our hypothesis that *Brek* is required for a late phase of spermatogenesis after meiosis, because the first wave of cells undergoing spermatogenesis reaches spermatid production stage during the periods analyzed (7). We further examined the expression of *Brek* using fractionated mouse testicular cells (i.e., the germ cells, Leydig cells, and

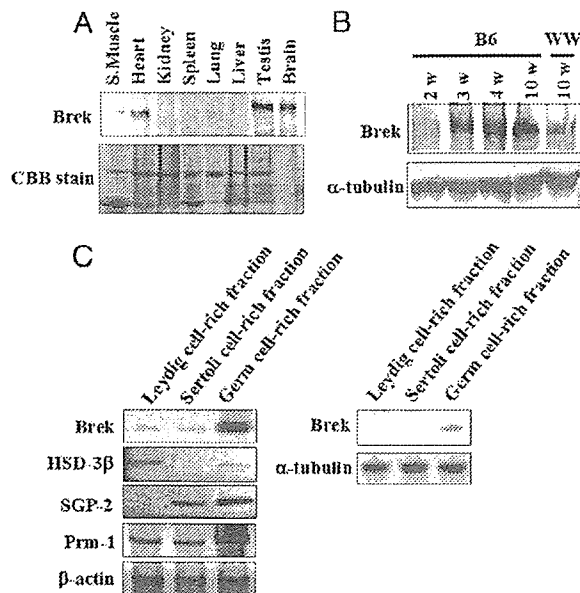


Fig. 4. Expression profile of Brek protein. (A) Mouse tissue lysates from 8-week-old males were probed with antibodies against Brek. Total protein levels were evaluated by Coomassie brilliant blue staining. (B) Testis lysates from *kit^{M/M-v}* mice (WW; Postnatal week 10) and C57BL/6 mice (B6; Ages are indicated) were probed with antibodies against Brek. α -Tubulin was examined as a loading control. (C) Germ cell-, Sertoli cell-, and Leydig cell-rich fractions were prepared for RT-PCR analysis (Left) and Western blot analysis (Right) as described in *Materials and Methods*. The quality of fractionated cells was verified by RT-PCR of β -HSD, *protamine-1*, and *SGP-2* genes, which are known to be specifically expressed in Leydig, germ, and Sertoli cells, respectively (Left). β -Actin and α -tubulin were examined as controls.

Sertoli cells) (Fig. 4C). Western blotting and RT-PCR using the fractionated cells revealed that *Brek* was exclusively expressed in a germ cell-rich fraction (Fig. 4C). Furthermore, immunohistochemical analysis of seminiferous tubules revealed that Brek was expressed at the elongating spermatid zone near the center of the seminiferous tubule. These findings are consistent with the phenotype in *Brek^{-/-}* testes, in which germ cells failed to undergo the normal change in morphology to become elongated spermatids (Fig. 5). Therefore, we have concluded that impaired maturation of *Brek^{-/-}* spermatids is a consequence of the cell-autonomous defects in *Brek^{-/-}* germ cells.

Discussion

Our present study on *Brek^{-/-}* mice revealed that Brek plays an essential role during spermatogenesis. Aatyk family kinases, including Brek, are evolutionarily distinct within the kinase subfamilies. The characteristics of Aatyk kinases in terms of amino acid sequences are intermediate between those of the tyrosine kinases and Ser/Thr kinases, which may explain why these kinases had escaped identification with classic homology-based screenings. *Aatyk1* was originally identified as a gene with expression up-regulated during apoptosis of myeloid cells (8). *Aatyk1* is preferentially expressed in brain (9, 10), and several potential roles have been proposed in the nervous system, including regulation of neural differentiation (10) and apoptosis (11, 12). However, these potential roles were evaluated with *in vitro* experiments only, and definitive evidence for the role of *Aatyk1* has not yet been reported. *Brek* and *Aatyk3* were originally identified in a human genome database as genes with kinase domain sequences that show high homology ($\sim 50\%$) to that of *Aatyk1* (2). We previously reported that Brek is involved

Table 2. Hormonal levels

	Testosterone, ng/dl	LH, ng/ml	FSH, ng/ml
<i>Brek^{+/-}</i>	24 \pm 7 (n = 12)	4.1 \pm 2.1 (n = 3)	93 \pm 12 (n = 3)
<i>Brek^{-/-}</i>	31 \pm 14 (n = 10)	3.3 \pm 1.7 (n = 3)	85 \pm 19 (n = 3)

LH, luteinizing hormone; FSH, follicle-stimulating hormone

in NGF signaling in PC12 cells (3). In PC12 cells, Brek was phosphorylated rapidly upon stimulation with NGF in a TrkA- and protein kinase C-dependent pathway. Introduction of a kinase-defective mutant of Brek into PC12 cells enhanced both Erk phosphorylation and neurite outgrowth in response to NGF, suggesting that Brek is a negative regulator of NGF-induced neuronal differentiation. Other groups reported that Brek interacts with p35/Cdk5 (4) and Inhibitor-2/PP1 (5). However, the specific functions of Brek in physiological processes are not known, as is the case with *Aatyk1*. No functional or biochemical analyses of *Aatyk3* have been reported. Thus, this study reports a previously uncharacterized physiological role of the Aatyk family members.

Brek^{-/-} mice had apparently normal health, with the exception of azoospermia. Despite the high expression of Brek in brain, no histological abnormalities in the nervous system have been yet found in *Brek^{-/-}* mice. Because our previous results suggested that Brek is a negative regulator of NGF signaling in PC12 cells (3), we carried out histological analysis of the nervous system, especially forebrain cholinergic neurons and peripheral trigeminal neurons, whose development was significantly impaired in TrkA- or NGF-knockout mice (13, 14). However, no abnormality in the nervous system has been found in *Brek^{-/-}* mice (data not shown). Because *Aatyk1* and *Aatyk3*, as well as Brek, are expressed at high levels in brain (3), it is possible that Brek function in the nervous system is compensated for by other Aatyk family kinase(s) in *Brek^{-/-}* mice. Therefore, generation of double- or triple-knockout mice that lack *Aatyk1* and/or *Aatyk3* in addition to Brek will further reveal physiological roles of Aatyk family kinases.

In this study, we found that male infertility in *Brek^{-/-}* mice was due to impaired maturation of germ cells. We proposed that the impaired spermatogenesis in *Brek^{-/-}* testis was directly caused by a defect in the germ cells and was not a secondary effect due to an abnormality in other cell types. In some strains of genetically modified mice, impaired spermatogenesis is a consequence of defects in testicular somatic cells (most frequently in Sertoli cells) or abnormalities in hormone levels (15–17). However, the number and morphology of testicular somatic cells were normal, and hormonal levels were not altered in *Brek^{-/-}* mice. Importantly, testicular expression of Brek is restricted to germ cells, suggesting that the maturation of germ cells in *Brek^{-/-}* mice is affected in a cell-autonomous manner.

Although differentiation of spermatogonia until step S1 (round spermatid) occurred normally in *Brek^{-/-}* testes, further differentiation of spermatids was largely suppressed (Fig. 7). Accordingly, we found few spermatids that differentiated to step S15 in *Brek^{-/-}* testes. Thus, Brek appears to be necessary for the morphological progression of postmeiotic germ cells, a process that includes mitochondrial compaction and expulsion of the cytoplasm, but not to be essential for the early phase of spermatogenesis. In wild-type mice, the first wave of spermatogenesis begins shortly after birth, and spermiogenesis is first observed around postnatal day 20 (7). The first spermatozoa are produced at approximately day 35. Our finding that the level of Brek protein in testis was increased between 2 and 3 weeks after birth was consistent with the idea that Brek expression is associated with a late phase of spermatogenesis, possibly after the generation of round spermatids. Importantly, immunohis-

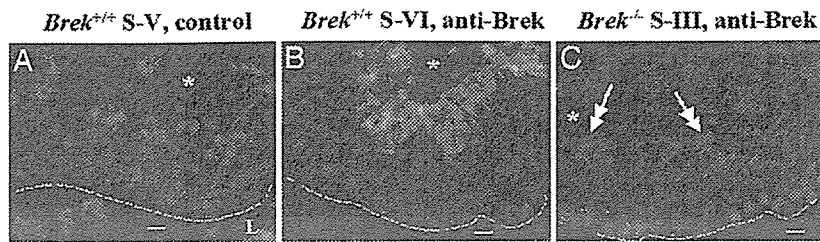


Fig. 5. Indirect immunofluorescence images of the seminiferous tubule. (A) Control image for *Brek*^{+/+} testis at approximately stage V. Primary antibody (anti-Brek antibody) was omitted. Nonspecific staining (red) is found in the abluminal side of the tubule and in the interstitial Leydig cell (L). (B) Immunostaining with anti-Brek antibody for *Brek*^{+/+} testis at approximately stage VI. Note strong staining (red) at the elongating spermatid zone near the center of the tubule. (C) Staining with anti-Brek antibody for *Brek*^{-/-} testis at approximately stage III. No immunostaining in the region of developing spermatids (double arrows). Asterisk (*) shows the center of the tubule. Red, Alexa Fluor 546; blue, Hoechst 33258. Dotted line shows the basement membrane region, i.e., the border of the seminiferous tubule. (Scale bar: 10 μ m.)

tochemical analysis revealed that Brek was expressed mainly in elongating and elongated spermatids in wild-type seminiferous tubules. We also found that mRNAs for genes expressed in postmeiotic germ cells, such as *Prm1*, *Prm2*, *TP1*, *TP2*, *CREM*, and *CaMK4* mRNAs, were also expressed in *Brek*^{-/-} testis (data not shown), further supporting the hypothesis that *Brek*^{-/-} germ cells differentiate normally into round spermatids. In addition, histological analysis of testes from immature *Brek*^{-/-} mice (postnatal weeks 3 and 4) showed no abnormalities in the number and morphology of round spermatids (data not shown; note that the first wave of spermatogenesis has not reached the step of elongation of spermatids during this period).

The mechanism by which Brek contributes to the late phase of spermatogenesis is presently unknown. Brek was reported to bind to and phosphorylate the catalytic subunit of PP1 *in vitro* (5), suggesting that Brek may play a part in spermatogenesis through the regulation of PP1 activity. One of PP1 isoforms, PP1 γ 2, is predominantly expressed in testis (18). Male mice with a targeted disruption of the *PP1 γ 2* gene showed comparable phenotype with *Brek*^{-/-} mice, severe impairment of spermiogenesis beginning at the round spermatid stage (18). It is possible that Brek regulates cytoskeletal structures needed for normal morphological development of round spermatids. Brek activity was rapidly increased upon lysophosphatidic acid (LPA) stimulation in PC12 cells, and overexpression of Brek promoted LPA-induced neurite retraction in differentiated PC12 cells (our unpublished data). Because LPA regulates actin cytoskeleton through RhoA, Brek might enhance the activity of RhoA. PP1 could also play a role in this scenario, because PP1 acts as a myosin phosphatase that is a key regulator of the actin cytoskeleton in skeletal muscle (19). In addition, NGF-PKC signaling might be also involved in the mechanism by which Brek play a role in spermatogenesis, such as in neurite elongation of PC12 cells. NGF and TrkA mRNAs were found principally in spermatocytes and round spermatids of the adult mouse testis, suggesting that NGF signaling might be involved in an early phase of spermiogenesis (20, 21). Multiple isozymes of PKC including α , β , δ , and ϵ isozymes are also expressed in testicular germ cells (22). In particular, like that of Brek, expression of PKC- δ in testis was increased between 2 and 3 weeks after birth (22). Further studies will define the precise mechanism by which Brek participates in spermatogenesis.

Fertility depends on the coordinated and combined functions of both the male and female reproductive systems. Anatomical defects, endocrinopathies, immunological problems, and environmental exposures are significant causes of infertility. Although several infertility disorders are associated with defined genetic syndromes, including cystic fibrosis and Turner syndrome (23, 24), nearly 25% of clinical infertility cases are idiopathic. Genetic etiologies are thought to underlie many of

these unrecognized pathologies. Reproductive defects as a major phenotype in mutant mice such as the *Brek*^{-/-} mice are being identified rapidly and may be helpful in refining our understanding of mechanisms underlying reproductive function, in identifying potential new contraceptive targets, and identifying the causative genes for specific reproductive disorders.

Materials and Methods

Targeting Construct and Generation of Mice. Homologous recombination was used to replace the genomic region of *Brek* that contains 3 exons encoding a part of the kinase domain with the neomycin-resistance (neo) cassette. The DT-A fragment was ligated to the 3' end of the targeting vector for negative selection. We identified the *Brek*-targeted 129Ola ES cell clones by Southern blot hybridization with the probe shown in Fig. 1A, and then injected these cells into C57BL/6 blastocysts. Male chimeras were mated with C57BL/6 females to obtain heterozygous (*Brek*^{+/-}) F1 offspring. We intercrossed the F1 progeny to produce homozygous *Brek*^{-/-} mice. Genotyping was performed by PCR with specific primers to amplify either the mutant or wild-type allele. All experiments with animals were carried out according to guidelines for animal use issued by the Committee of Animal Experiments, Institute of Medical Science, University of Tokyo.

Histological and TUNEL Analysis. We fixed testes in Bouin's solution or 10% formalin neutral buffer solution. Fixed tissues were embedded in paraffin. Sections (7- μ m thick) were cut, dewaxed, and then stained with toluidine blue or by PAS reaction with standard procedures. Apoptotic cells in sections were detected by TUNEL assay with an In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan).

Conventional Transmission Electron Microscopy. We fixed adult testes with 2% glutaraldehyde in 10 mM Hepes buffer. After washing the testes in the same buffer, we cut the tissues into small pieces and immersed them in the same fixative for 2 h at 4°C. Tissues were rinsed with PBS and then fixed again with 2% OsO₄. The samples were dehydrated through graded ethanol series and then embedded in Epon 812. We cut ultrathin sections on an ultramicrotome (Ultracut E; Reichert-Jung, Vienna, Austria) and stained them with uranyl acetate and lead citrate. Staining was observed with a 1200 EX transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan).

Immunohistochemical Localization of BREK in the Mouse Testis. Wild type and *Brek*^{-/-} mice were perfused through the left ventricle with 4% paraformaldehyde in PBS. Testes were removed and immersed in the fixative at 4°C for 4 h. The testis samples were passed through a sucrose gradient (10-, 15-, and 20% in PBS),