

受精の分子生物学を築く遺伝子改変動物

室 悠子, 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

はじめに

子どもは授かりもので受精は神秘的な現象というのが一般的な考え方であるが, その神秘のベールをはがすために遺伝子改変マウスを使った研究がたくさん行われるようになった。ヒトとマウスでは受精の細かいメカニズムに差があるかもしれないが, 哺乳類の精子は一般的に射精された状態では受精能を有しておらず, 雌性生殖路内に入ってから生理化学的な変化である *capacitation* と呼ばれる変化を起こすことは共通の仕組みである。また受精直前には *acrosome reaction* (先体反応) と呼ばれる先体部分の膜構造に大きな変化を起こす必要があることなどは, ウニなど哺乳類以外の精子にも共通する現象である。この総説では, 遺伝子改変マウスを用いてはじめて見えてきた受精の分子生物学的メカニズムについて述べる。

精子と卵丘細胞の相互作用

卵巣から放出される成熟卵は, 卵丘細胞の層に包まれており, 精子は卵子に出会う前に卵丘細胞層を通過する必要がある。卵丘細胞層がないほうが精子は卵子に近づくやすくなるが, 体外受精の系に入れると卵丘細胞に包まれた卵子のほうが受精しやすくなっている。これは, 卵丘細胞から放出される因子などが精子の機能を活性化している可能性を示している。最近, 卵丘細胞には自然免疫に重要な Toll Like Receptor:TLR が発現しており, 精子が卵丘細胞層の細胞外マトリクス (ECM) に存在するヒアルロン酸を分解すると, TLR に認識されて卵丘細胞から Il6, Ccl4, Ccl5 などのケモカインが放出され, これを受けた精子は自身の蛋白質のリン酸化を起こし受精能を獲得する [3] と報告されている。また卵丘細胞には *prostaglandinE2* (PGE2) のレセプター (Ptger2)

も発現しており, このレセプターを欠損させると雌に不妊傾向が現れることがわかっている。卵丘細胞からは先述のケモカイン以外にも CCL2, CCL7, や CCL9 などのサイトカインが分泌されているが, Ptger2 は PGE2 を介してサイトカインの分泌を調整しているようである。卵丘細胞に包まれた卵子 (cumulus oocyte complex: COC) には精子を誘引する働きがあるが, この走化性は CCL7 だけでも再現することが示されている。PGE2 は卵丘細胞からのケモカイン量を抑制するように働いているために, Ptger2 を欠損させるとノックアウトマウスの卵丘細胞から大量のケモカインがでるようになり, それがインテグリンを介しながら卵丘細胞の ECM を固くして精子の侵入が阻害される結果, メスの妊孕性が低下することがわかった [4]。この他に卵丘細胞から分泌される因子としてはプロゲステロンが知られており, 精子は核移行型のものとは異なるプロゲステロンレセプターを介して先体反応 (*acrosome reaction*) を誘発することなどが報告されている [5]。

透明帯の糖鎖と精子結合

精子は卵丘細胞層を通過したのちに, 卵子の透明帯に到達する。精子と透明帯との結合には種特異性があるが, 精子は透明帯の糖鎖を認識して結合するといわれている。たとえば α ガラクトース, GlcNAc, フコース, マンノースあるいは Lewis-X 型フコース残基などの糖を加えると, 精子の透明帯への結合は阻害を受けることが報告されている。ところが α ガラクトシル残基の存在部位を免疫電顕で見ると, α ガラクトシル残基は透明帯の内側部にしか存在しないことが示された。すなわち精子は透明帯に結合するとき, α ガラクトシル残基を認識することができないことが示された。さらに α ガラクトシルトランスフェラーゼを欠損させ透明帯に α ガラクトシル基をもたないはずの卵子にも精子は結合し受精することから, α ガラクトースを介した相互認識はないことがわかった。また Lewis-X 型フコース残基は透明帯上にみつからなかったため, 添加による阻害は認められるものの実際の相互作用に働いていないと考えら

連絡先: 室 悠子, 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

TEL: 06-6879-8374

FAX: 06-6879-8376

E-mail: okabe@gen-info.osaka-u.ac.jp

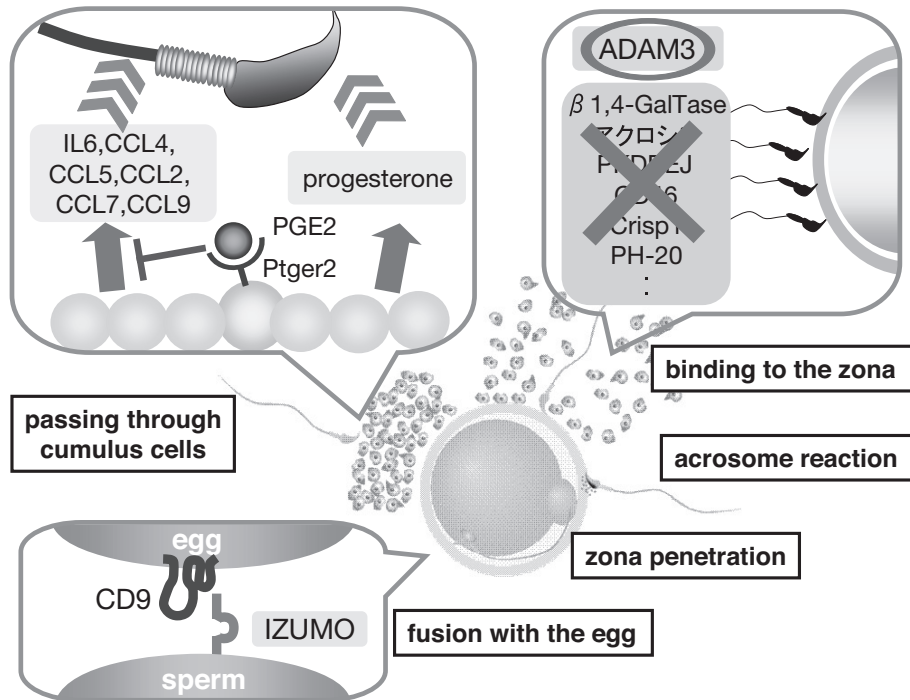


図1 精子の挙動に影響するさまざまな因子。精子は卵子に出会うまでに多くの関門を通過する必要がある。マウスの場合には輸卵管に入るときに選別が起こっている可能性がある [1]。そして膨大部に移行して卵丘細胞層や透明帯とさまざまな因子を介しながら相互認識をし (本文参照) 卵子と出会い、融合が起こる [2]。本総説では主に透明帯との結合部分に焦点をあててこれまでの流れを紹介する。

れた [6]。精子と卵子の相互作用を検討するとき、*in vitro* の系に何かを加えて影響をみるという手法は、必ずしも真のファクターを探索する方法としては適していないことを示している。

精子上の透明帯結合因子

精子は未受精卵の透明帯に結合するが、受精すると卵子の表面顆粒から酵素が放出されて透明帯成分の ZP2 が分解されるために透明帯に結合できなくなる [7]。この事実は、透明帯に対する精子の結合能力が受精に大切であることを暗示するものである。

精子上に存在する透明帯結合因子としては、アクロシンや PH-20 などたくさんの蛋白質が報告されている [8-19] が、ここではごく一部のみを紹介する。

β 1, 4-GalTase は、そのなかでもよく研究されてきた因子である。 β 1, 4-GalTase は精子の頭部に存在しているが局在部位は精子が成熟するにつれて変化し、精巣内で赤道部にまで広がっていたものが精巣上部では先体部分に限局するようになる。 β 1, 4-GalTase は膜貫通ドメインをもたないが膜蛋白質のように膜表面に存在すると考えられている [20]。 β 1, 4-GalTase の活性部位は精

巣上部から分泌される糖蛋白質により覆い隠されているが、精子が受精能を獲得 (capacitation) する間にこの分子が精子から遊離して β 1, 4-GalTase が活性型となり卵子と結合可能な状態になる [21]。 β 1, 4-GalTase は透明帯の成分である ZP3 上にある O-link 型の糖鎖に結合して galactose を転移させるというデータも報告されている [22]。この他にも β 1, 4-GalTase は、ZP3 に結合すると凝集して pertussis toxin 感受性のヘテロ 3 量体の G 蛋白 [23] やボルテージ非依存性のカチオンチャンネル [24] にシグナルを伝え細胞内 Ca や pH の上昇を引き起こしそれが先体反応の引き金を引くものと報告されていた。

遺伝子改変動物の導入

β 1, 4-GalTase が真の透明帯結合因子であれば ES 細胞を用いて相同遺伝子組換えを用い、 β 1, 4-GalTase 遺伝子を欠損させたマウスを作製すると、その精子は透明帯に結合できなくなるはずである。しかしながら、1997 年に 2 つの研究室から β 1, 4-GalTase を欠損したマウスが報告されたが、いずれの精子も受精可能であった [25, 26]。これは、それまでに生化学的な研究で積み上げら

れてきた GalTase の働きに関する知見が生体内の実際の受精時にはほとんど働いていないことを示している。Shur らは、精子には透明帯と結合する別の蛋白質 SED1 があるために GalTase をノックアウトした雄が不妊にならなかったと考え、さらに SED1 のノックアウトマウスも作製されたが、再び不妊にはならなかった [18]。Shur らは別の遺伝子による代償作用が働いたためであると推論しているが、GalTase と SED1 の両遺伝子を欠損したマウスによる検証は行われていない。β1, 4-GalTase 以外にも透明帯への結合に関与していることが示唆されている候補蛋白質 (アクロシン [27], PKDREJ, CD46, Crisp1 [28], PH-20 など) がノックアウトされたが、いずれも目立ったフェノタイプは現れておらず、生化学的手法により発見された透明帯結合因子候補は総くずれになった。

透明帯の糖鎖は重要か？

透明帯は主に ZP1 から ZP4 の 4 種類の糖蛋白質で構成されており (ZP4 は微量でありその生理的意義については不明な点が残されている [29, 30]), ZP2 と ZP3 がヘテロダイマーを形成し、そのところどころで、ZP1 がこれらを架橋するような形で透明帯の基本的な構造は形成されていると考えられている。しかし ZP1 のノックアウトマウスが作製されたものの ZP1 がなくても透明帯ができあがったので、ZP1 による架橋だけで透明帯が構成されているとは考えにくい。また、ZP1 がなくても受精は起こることから、ZP1 は受精に必須の因子ではないことが証明された。これとは別に、透明帯を可溶化したあと分画し、ZP1 や ZP2 可溶化成分を加えたときには精子と透明帯の結合は阻害されないが ZP3 の可溶化物は結合阻害活性があることが示されたので、精子が透明帯へ結合するときはおもに ZP3 を認識しているのではないかと報告された [31]。その後 ZP3 を pronase で分解しても阻害活性が残ることから、精子と卵子の結合に関与する本体は蛋白質ではなく糖鎖であると推察されてきた [32]。一方、ZP3 のノックアウトマウスも作製されているが、この場合は透明帯そのものができなくなるため ZP3 が精子の結合に必要なものかどうかを判定することはできなかった [33]。そこで ZP3 をもたないマウスに対して 67% のアミノ酸配列が相同であると判明しているヒトの ZP3 を発現させたところ、マウス ZP1 と ZP2 とヒトの ZP3 からなるハイブリッド透明帯が形成された。この卵子に対してヒトの精子を添加してもヒト精子はまったく結合できず、マウス精子だけが

結合・通過できることがわかった [34]。またハムスターの ZP3 をトランスジーンとして発現させたマウスの卵子からハムスターの ZP3 を精製してマウス精子に加えたところ、先体反応も引き起こす効果がある他、透明帯への結合がブロックされた [35] と報告されている。これらの結果を考え合わせても、やはり透明帯への結合には糖鎖が重要な役割を果たしているものと考えられた。

糖鎖の重要性に関する分子生物学的解釈

先述のように α ガラクトース, GlcNAc, フコース, マンノースあるいは Lewis-X 型フコース残基など単純な糖についてはその関与は否定されているが、骨格としての糖鎖は必要な可能性は残る。透明帯に存在するどのような糖鎖が受精に必要なのであろうか。Stanley らは N-glycan に Gal や GlcNAc を付加して基本骨格を作りだす mannoside acetylglucosaminyltransferase (Mgat1) を卵子特異的に欠損させても受精は正常に起こることから N-glycan は精子との相互認識に必須ではないことを示した [36]。しかしこれまでの研究では O-グリカンが大切であるといわれている。O-グリカンにはコア 1 から 4 までのタイプがあるが、コア 2 を作るのに必要な N-acetylglucosaminyltransferase L (C2GnT-L) という酵素がある。そこでこの酵素を欠損させて、コア 2 の O-グリカンが結合していない透明帯をもつマウスが作製されたが、このマウスでは普通に受精が起こることが確認された [37]。コア 3 とコア 4 型のものは ZP1 とか ZP3 の上にはみつかっていない。ということで最後に残された可能性は唯一、コア 1 グリカンということになる。ところがコア 1 グリカンを作るもとなる GalNAcTase は遺伝子が重複しているため、ノックアウトの対象としては不適であった。そこでコアグリカン 1 合成の次段階に働く T-syn という酵素を欠損させたマウスが作製された。その結果、コア 1 グリカンをもたない卵子でも十分受精できることが示された [36]。T-syn をノックアウトしたときに別の酵素が代償的に働いて糖鎖ができたわけではないことは、この透明帯に対して、さまざまなレクチンが結合しなくなることから明らかであった。さらに N グリカンが O グリカンの代わりに代償的に働いたのではないことは、N グリカン合成を阻害する Mgat1 との交配によりダブル欠損マウスを作製することで確かめられている。これだけの証拠が積み上がったので、これまでの多数の論文の示すところとは異なり、ZP3 の糖鎖は精子との結合に関与していないと考えるのが妥当で、透明帯糖鎖認識説はほぼ崩壊したと考えられる。し

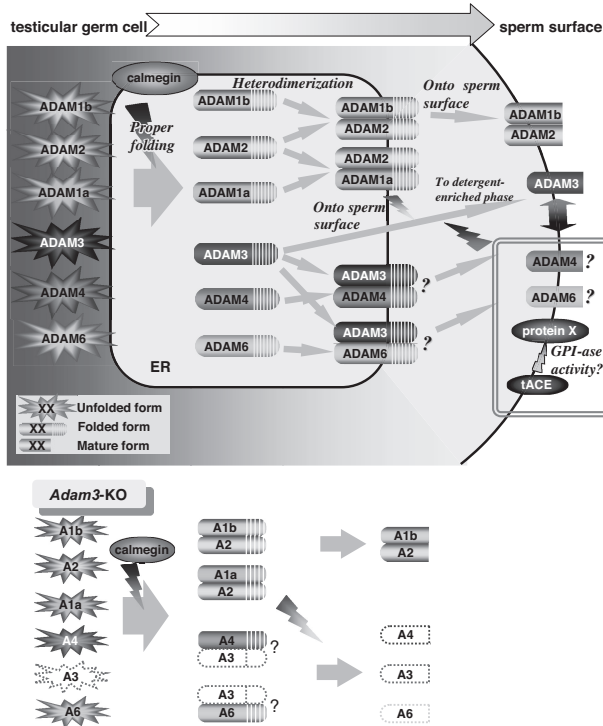


図2 透明帯との結合に関与する遺伝子群とそれらの関係。お互いの相互作用が明らかになっており、ADAM3がもっとも透明帯との結合に近い因子であると推定されている。しかし、本文では触れなかったが最近ADAM3を欠損させるとADAM4やADAM6も精子から消失することが報告された [45] ため、透明帯との結合および輸卵管内への移行に最終的に関わっている因子が何であるのかはさらに検討を要することになった。

かしながら最近になっても昆虫の細胞にバキュロウイルスベクターで蛋白質を発現させて作製したZP3には先体反応を誘発する活性があるが、糖鎖をつけることができない大腸菌に作らせたZP3にはこういう作用はなく、さらにバキュロウイルスの系で作る、先体反応を引き起こすことがわかっている試料から科学的に脱糖鎖させたものでは活性がなくなるということが報告されている [38]。これらは互いに相反する結果であるが、筆者らはこれまでの例から類推して透明帯における糖鎖の重要性についての真相はすでに明白であると考えている。

何が結合を担うのか？

糖鎖の必須性には大きな疑問符が付けられた。それではZP1~ZP3以外の因子が精子との結合に関与している可能性は示されているのであろうか？ 残念ながら現在のところ透明帯構成因子は主にZP1~3とみなされているだけで、新規の因子が存在する直接的な証拠は何も報告されていない。

遺伝子改変動物を用いて精子・卵子の相互認識がうま

くいかなくなったために不妊になる例は、われわれの作製したカルメジンノックアウトの系がはじめてである。カルメジンは精巣内特異的シャペロンであり精子から受精能力が失われるのは、カルメジンにより折りたたみを受ける透明帯結合因子の機能が損なわれたためと考えられる。

その因子の候補として、ADAM1とADAM2のヘテロダイマーであるファティリンが考えられた。Adam1にはaとbの2種類があり [39]、精巣内でのみ存在する精巣型ファティリン (ADAM1a/2) と精子型ファティリン (ADAM1b/2) である [40]。Adam2遺伝子を欠損させると精巣型、精子型のいずれのファティリンも消失し精子が透明帯に結合できなくなる [41]。Adam1bをノックアウトすると精子型ファティリンだけが欠損するが、このときには不妊の表現型が現れない [42] がAdam1aをノックアウトして精巣型ファティリンを欠損させると、精子型ファティリンが存在するにもかかわらず、雄は不妊になる [14]。すなわち、もともと精子にみつかった精子型ファティリンは受精に必須ではなく、精巣にしか存在しない、精巣型ファティリンが精子の透明帯結合能の付与に必要であることがわかったが透明帯結合因子候補からファティリンが脱落した。Adam1aをノックアウトしたマウスの精子を調べたところ、精子からADAM3が消失していることがみつけられた [14]。さらにアンギオテンシン変換酵素 (ACE) を欠損させたマウスも透明帯に結合できなくなる [15] が、この精子を調べるとADAM3が膜の一定の部分で大幅に減少していることがわかった [43]。もちろん、ADAM3を欠損させたマウスでも同様に透明帯への結合は阻害されて不妊になる。これらの因子の関係をまとめると、シャペロンであるカルメジンを消失させるとAdam1aのフォールディングがおかしくなり [44]、その結果精巣型ファティリンが消失し、それが精子からADAM3を消失させるという図式が得られた [43]。

おわりに

calmegin, ACE, Adam1a, Adam2, Adam3などの遺伝子はいずれもノックアウトすると精子が透明帯に結合できなくなるが、驚いたことにこれらはすべて精子が輸卵管内に移行できないというフェノタイプも共有している [46]。すなわち透明帯への結合と輸卵管内への移行は、常に車の両輪のような関係になっている。輸卵管内へ精子が移行するときには、精子と子宮・輸卵管結合部 (uterotubal junction ; UTJ) の表層に対する結合性が必

要なのかもしれない。精子が認識する透明帯上の因子は卵子に特異的なものではなく、UTJ 部分にも存在するより普遍性の高い因子である可能性が高い。受精の分子生物学は遺伝子操作動物抜きには考えられず、今後もいろいろな遺伝子欠損マウスが作製され驚くようなフェノタイプが報告されると思われ、この分野はますます面白くなっていくものと予想される。

引用文献

1. Nakanishi T, Isotani A, Yamaguchi R, Ikawa M, Baba T, Suarez SS, Okabe M (2004) Selective passage through the uterotubal junction of sperm from a mixed population produced by chimeras of calmegin-knockout and wild-type male mice. *Biol Reprod* 71, 959-965.
2. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M (2005) The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434, 234-238.
3. Shimada M, Yanai Y, Okazaki T, Noma N, Kawashima I, Mori T, Richards JS (2008) Hyaluronan fragments generated by sperm-secreted hyaluronidase stimulate cytokine/chemokine production via the TLR2 and TLR4 pathway in cumulus cells of ovulated COCs, which may enhance fertilization. *Development* 135, 2001-2011.
4. Tamba S, Yodoi R, Segi-Nishida E, Ichikawa A, Narumiya S, Sugimoto Y (2008) Timely interaction between prostaglandin and chemokine signaling is a prerequisite for successful fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14539-14544.
5. Oren-Benaroya R, Orvieto R, Gakamsky A, Pinchasov M, Eisenbach M (2008) The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. *Hum Reprod* 23, 2339-2345.
6. Aviles M, Okinaga T, Shur BD, Ballesta J (2000) Differential expression of glycoside residues in the mammalian zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 57, 296-308.
7. Bleil JD, Beall CF, Wassarman PM (1981) Mammalian sperm-egg interaction: fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP 2. *Dev Biol* 86, 189-197.
8. Hardy DM, Garbers DL (1995) A sperm membrane protein that binds in a species-specific manner to the egg extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor. *J Biol Chem* 270, 26025-26028.
9. Busso D, Cohen DJ, Maldera JA, Dematteis A, Cuasnicu PS (2007) A novel function for CRISP1 in rodent fertilization: involvement in sperm-zona pellucida interaction. *Biol Reprod* 77, 848-854.
10. Mori E, Kashiwabara S, Baba T, Inagaki Y, Mori T (1995) Amino acid sequences of porcine Sp38 and proacrosin required for binding to the zona pellucida. *Dev Biol* 168, 575-583.
11. Howes E, Pascall JC, Engel W, Jones R (2001) Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *J Cell Sci* 114, 4127-4136.
12. Primakoff P, Hyatt H, Myles DG (1985) A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. *J Cell Biol* 101, 2239-2244.
13. Shamsadin R, Adham IM, Nayernia K, Heinlein UA, Oberwinkler H, Engel W (1999) Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile. *Biol Reprod* 61, 1445-1451.
14. Nishimura H, Kim E, Nakanishi T, Baba T (2004) Possible function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface. *J Biol Chem* 279, 34957-34962.
15. Hagaman JR, Moyer JS, Bachman ES, Sibony M, Magyar PL, Welch JE, Smithies O, Krege JH, O'Brien DA (1998) Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2552-2557.
16. Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW, Myles DG, Primakoff P, White JM (1992) A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 356, 248-252.
17. Ikawa M, Wada I, Kominami K, Watanabe D, Toshimori K, Nishimune Y, Okabe M (1997) The putative chaperone calmegin is required for sperm fertility. *Nature* 387, 607-611.
18. Ensslin MA, Shur BD (2003) Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. *Cell* 114, 405-417.
19. Bookbinder LH, Cheng A, Bleil JD (1995) Tissue- and species-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein. *Science* 269, 86-89.
20. Scully NF, Shaper JH, Shur BD (1987) Spatial and temporal expression of cell surface galactosyltransferase during mouse spermatogenesis and epididymal maturation. *Dev Biol* 124, 111-124.
21. Shur BD, Hall NG (1982) Sperm surface galactosyltransferase activities during in vitro capacitation. *J Cell Biol* 95, 567-573.
22. Miller DJ, Macek MB, Shur BD (1992) Complementarity between sperm surface beta-1, 4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature* 357, 589-593.
23. Gong X, Dubois DH, Miller DJ, Shur BD (1995) Activation of a G protein complex by aggregation of beta-1, 4-galactosyltransferase on the surface of sperm. *Science* 269, 1718-1721.
24. Florman HM, Arnoult C, Kazam IG, Li C, O'Toole CM (1998) A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol Reprod* 59, 12-16.
25. Asano M, Furukawa K, Kido M, Matsumoto S, Umesaki Y, Kochibe N, Iwakura Y (1997) Growth retardation and early death of beta-1, 4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal differentiation of epithelial cells. *EMBO J* 16, 1850-1857.
26. Lu Q, Hasty P, Shur BD (1997) Targeted mutation in beta1, 4-galactosyltransferase leads to pituitary insufficiency and neonatal lethality. *Dev Biol* 181, 257-267.
27. Baba D, Kashiwabara S, Honda A, Yamagata K, Wu Q, Ikawa M, Okabe M, Baba T (2002) 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.
28. Da Ros VG, Maldera JA, Willis WD, Cohen DJ, Goulding EH, Gelman DM, Rubinstein M, Eddy EM, Cuasnicu PS (2008) Impaired sperm fertilizing ability in mice lacking Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (CRISP1). *Dev Biol* 320, 12-18.
 29. Koyama K, Hasegawa A, Inoue M, Isojima S (1991) Blocking of human sperm-zona interaction by monoclonal antibodies to a glycoprotein family (ZP4) of porcine zona pellucida. *Biol Reprod* 45, 727-735.
 30. Izquierdo-Rico MJ, Jimenez-Movilla M, Llop E, Perez-Oliva AB, Ballesta J, Gutierrez-Gallego R, Jimenez-Cervantes C, Aviles M (2009) Hamster zona pellucida is formed by four glycoproteins: ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4. *J Proteome Res* 8, 926-941.
 31. Bleil JD, Wassarman PM (1980) Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 20, 873-882.
 32. Florman HM, Bechtol KB, Wassarman PM (1984) Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. *Dev Biol* 106, 243-255.
 33. Rankin T, Familiar M, Lee E, Ginsberg A, Dwyer N, Blanchette-Mackie J, Drago J, Westphal H, Dean J (1996) Mice homozygous for an insertional mutation in the Zp3 gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development* 122, 2903-2910.
 34. Rankin TL, Tong ZB, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Nelson LM, Dean J (1998) Human ZP3 restores fertility in Zp3 null mice without affecting order-specific sperm binding. *Development* 125, 2415-2424.
 35. Kinloch RA, Mortillo S, Wassarman PM (1992) Transgenic mouse eggs with functional hamster sperm receptors in their zona pellucida. *Development* 115, 937-946.
 36. Williams SA, Xia L, Cummings RD, McEver RP, Stanley P (2007) Fertilization in mouse does not require terminal galactose or N-acetylglucosamine on the zona pellucida glycans. *J Cell Sci* 120, 1341-1349.
 37. Ellies LG, Tsuboi S, Petryniak B, Lowe JB, Fukuda M, Marth JD (1998) Core 2 oligosaccharide biosynthesis distinguishes between selectin ligands essential for leukocyte homing and inflammation. *Immunity* 9, 881-890.
 38. Bansal P, Chakrabarti K, Gupta SK (2009) Functional Activity of Human ZP3-Primary Sperm Receptor Resides Towards Its C-Terminus. *Biol Reprod* 81, 7-15.
 39. Nishimura H, Kim E, Fujimori T, Kashiwabara S, Kuroiwa A, Matsuda Y, Baba T (2002) The ADAM1a and ADAM1b genes, instead of the ADAM1 (fertilin alpha) gene, are localized on mouse chromosome 5. *Gene* 291, 67-76.
 40. Kim E, Nishimura H, Baba T (2003) Differential localization of ADAM1a and ADAM1b in the endoplasmic reticulum of testicular germ cells and on the surface of epididymal sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 313-319.
 41. Cho C, Bunch DO, Faure JE, Goulding EH, Eddy EM, Primakoff P, Myles DG (1998) Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science* 281, 1857-1859.
 42. Kim E, Yamashita M, Nakanishi T, Park KE, Kimura M, Kashiwabara S, Baba T (2006) Mouse sperm lacking ADAM1b/ADAM2 fertilin can fuse with the egg plasma membrane and effect fertilization. *J Biol Chem* 281, 5634-5639.
 43. Yamaguchi R, Yamagata K, Ikawa M, Moss SB, Okabe M (2006) Aberrant distribution of ADAM3 in sperm from both angiotensin-converting enzyme (Ace) - and calmegin (Clgn) - deficient mice. *Biol Reprod* 75, 760-766.
 44. Ikawa M, Nakanishi T, Yamada S, Wada I, Kominami K, Tanaka H, Nozaki M, Nishimune Y, Okabe M (2001) Calmegin is required for fertilin alpha/beta heterodimerization and sperm fertility. *Dev Biol* 240, 254-261.
 45. Han C, Choi E, Park I, Lee B, Jin S, Kim do H, Nishimura H, Cho C (2009) Comprehensive Analysis of Reproductive ADAMs: Relationship of ADAM4 and ADAM6 with an ADAM Complex Required for Fertilization in Mice. *Biol Reprod* 80, 1001-1008.
 46. Yamaguchi R, Muro Y, Isotani A, Tokuhiro K, Takumi K, Adham I, Ikawa M, Okabe M (2009) Disruption of ADAM3 Impairs the Migration of Sperm into Oviduct in Mouse. *Biol Reprod* 81, 142-146.