精子鞭毛運動に関わる糖代謝

誌名	Journal of mammalian ova research = 日本哺乳動物卵子学会誌
ISSN	13417738
著者名	向井,千夏 奥野,誠
発行元	日本哺乳動物卵子学会
巻/号	27巻4号
掲載ページ	p. 176-182
発行年月	2010年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

J. Mamm. Ova Res. Vol.27, 176–182, 2010

—総説—

特集：精子側からみた受精現象—capacitation・hyperactivationと細胞膜融合を中心に

精子鞭毛運動に関わる糖代謝

Function of Glycolysis in Sperm Motility

向井 千夏*・奥野 誠

Chinatsu Mukai* and Makoto Okuno

東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系 〒153-8902 目黒区

Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8902, Japan

要旨：体内受精を行う哺乳類では，精子鞭毛は射精にともない運動を活性化し，雌生殖器官内での受精能獲得時には超活性化と呼ばれる運動を示す．精子は卵に出会うまで，鞭毛運動を維持するためにATPが必須であるとともに，活性化や超活性化の運動変化を引き起こす細胞内シグナル伝達においても，cAMPの生成やタンパク質リン酸化にATPが必要となる．ATPの供給経路としては解糖系と呼吸系の2つがあげられるが，従来，精子の形態やその生産効率からミトコンドリアによる呼吸系が主であると考えられてきた．しかし，近年の研究成果により，鞭毛主部における解糖系によるATP供給が主要な働きをしていることが明らかとなってきた．本稿では，マウスでの知見を中心に，精子の鞭毛運動とシグナル伝達に関わるATP供給について解説する．

キーワード：精子，鞭毛運動，解糖系，ATP，受精能獲得

Abstract: Mammalian sperm are highly polarized in order to accomplish their physiological function, fertilization. Sperm flagellar movement is activated on ejaculation into the extracellular environment. Sperm motility becomes hyperactivated during "capacitation", which is required for fertilization. For mammalian sperm, ATP supplementation is essential for not only maintaining flagellar motility but also for regulating the phosphorylation events relating motility and fertilization. It was believed that oxidative phosphorylation worked mainly to provide ATP because of sperm morphological characteristics and the efficiency of ATP production. However, recent studies revealed that glycolysis in the principal piece works as the major process for supplying ATP, since glycolysis enzymes are localized to the principal piece, some of them are tightly associated with the cytoskeletal structure in it. We observed that extracellular glucose was highly utilized for the entire flagellar bending motion with a high beat frequency compared with pyruvate, a substrate for respiration. In this review, we discuss how glycolysis regulates sperm motility and function in the mouse.

Key words: Sperm, Flagellum, Glycolysis, ATP, Capacitation

はじめに

精子の究極の目的はオスの遺伝子を運び，卵（若しくは卵母細胞）に融合させることであり，そのために特化した細胞小器官を備えている．一般に，鞭毛を持つ精子ではその運動にATPを用いるが，ATPはその他にもタンパク質リン酸化などを介した運動調節などの生理作用に必須であり，これを産生するための代謝機構は，精子の機能を議論するうえで避けては通れない問題である．

哺乳類精子は精巣で減数分裂を終えたあと，精子変態過程を経て，球形の精細胞から非常に特殊な形状の精子へと変化する．精子の構造は，頭部（head），中片部（mid piece），主部（principal piece），終末部（end piece）の4つから成り，それぞれの部位が精子の生理的機能を果たすため，必要不可欠であると考えられている[1]．

（受付 2010年7月10日／受理 2010年8月6日）

別刷請求先：〒153-8902 目黒区駒場3-8-1
東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: cmukai@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

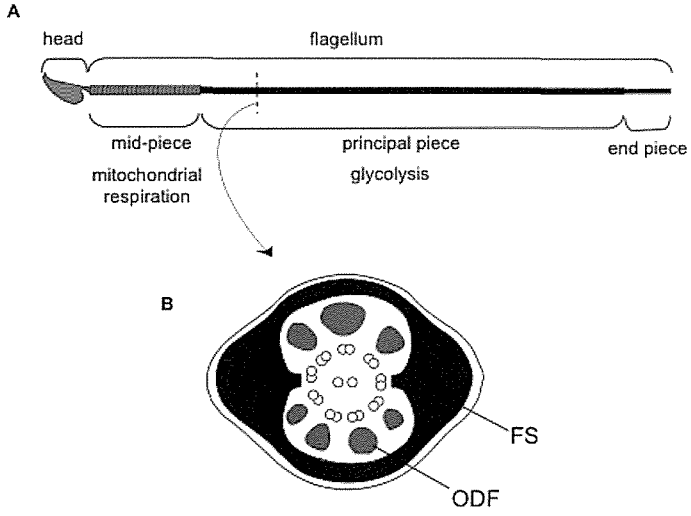

図1　マウス精子の簡略図
A）マウス精子は頭部（head），中片部（mid-piece），主部（principal piece），終末部からなる．中片部はミトコンドリアによる呼吸系の場であり，主部は解糖系の場となっている．B）主部の断面図．軸糸の外側にODF（外側粗大繊維）とFS（繊維鞘）が位置している．

精子の遊泳運動を可能にする鞭毛軸糸（いわゆる“9＋2”の微小管構造）は，頭部の端に位置する中心小体を起点とし，中片部から終末部までの全体に渡って存在し，その周囲を，中片部では外側粗大繊維（ODF: outer dense fiber）とミトコンドリア鞘が，主部ではODFと繊維鞘（FS: fibrous sheath）が取り囲んでいる（図1）．一般に哺乳類精子を構成するタンパク質は300種以上といわれているが，完成後は新たなタンパク質合成を行わないため，精子変態が完了するまでに備わった細胞成分によって，受精に至るまでの生理的機能を全てまかなわなければならない．本稿では，特に哺乳類精子の運動活性化と超活性化，受精時における代謝制御について述べる．

哺乳類精子鞭毛の構造

一般に鞭毛軸糸は9本のダブレット微小管と中央に2本の中心小管からなる細胞骨格で，ダブレット微小管に沿って外腕，内腕と呼ばれる突起が周期的に配置されている．この腕はモータータンパク質であるダイニンと呼ばれるタンパク質で，ATPの加水分解を行い，それが生み出す力によって微小管が能動的に滑り運動を行い，鞭毛の屈曲を生み出している．また，ダブレット微小管を弾性的に結合しているネクシンや，ダブレット微小管から中心対微小管へ向かうスポークと呼ばれる構造があり，これらは鞭毛屈曲運動の制御に関係があると考えられている．

哺乳類精子の場合，ダブレット微小管はODFと対合している．ODFは鞭毛先端に行くに従って細くなっている．この機能については，鞭毛を太くすることによって粘性抵抗を増し遊泳効率を高めるためや，屈曲による弾性エネルギーを蓄えるためなどが考えられるが，はっきりしてはいない．中片部ではODFの外側にミトコンドリアが鞘状に位置しており，呼吸系によるATP合成を行う場となっている．一方，鞭毛主部においては，ODFの外側には繊維鞘（FS: fibrous sheath）とよばれる肋骨様の細胞骨格が軸糸を取り囲むように存在している[2]．近年のプロテオミクスの研究などから，このFSに解糖系酵素のいくつかが局在していることが明らかにされており，鞭毛主部全体が解糖系の場となっていると考えられている[3–6]．また，体内受精を行うマウスなどの哺乳類では，雌性生殖器官内におけるグルコースやフラクトースなどの六単糖や，ピルビン酸，乳酸などの三単糖を細胞内に取込み，細胞内で解糖系や呼吸系によって代謝し，ATP供給を行っている．これらの取込みには，精子細胞膜に存在しているグルコーストランスポーターや単糖トランスポーターが働いていることが知られている[7, 8]．

鞭毛運動とATP

精巣上体を経て成熟した哺乳類精子の鞭毛は，Ca^{2+}などの外部刺激によって運動が活性化される．運動活性化過程にはcAMPが関わるタンパク質リン酸化反応などが関与するが，一度運動装置が活性化した後はATP濃度が運動の質と量に影響すると推察される．ATP濃度と運動活性の関係はウニなどの細胞膜除去モデル精子の鞭毛によって調べられてきた[9, 10]．細胞膜を界面活性剤TritonX-100で除去したウニ精子鞭毛は，ATPを与えられると鞭毛全長にわたってほぼ均一な波形の振動運動を行う．ダブレット微小管の滑

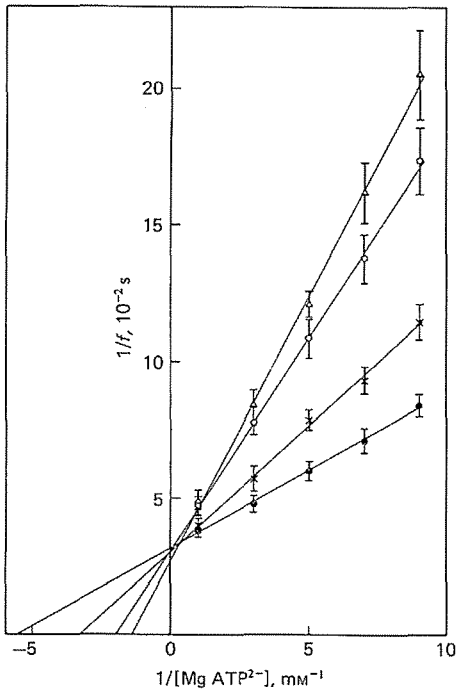

図2　細胞膜除去したウニ精子の鞭毛運動と基質の関係
基質であるATP濃度の逆数に対して，測定された鞭毛の振動数の逆数をプロットしてある．結果は直線関係を示しており（●），ミハエリス・メンテンタイプの反応であることがわかる．グラフから最高振動数がおよそ35 Hzであることが読み取れるが，これは生きている精子の振動数のおよそ80％である．リン酸（30 mM, ×）とADP（1 mM, ○）は競争阻害を示す．△はリン酸＋ADP．J. Cell Sci.（38, 105, 1979）を改変．

り量は鞭毛の屈曲角（鞭毛の一つの屈曲を挟む2本の接線のなす最大角）に比例するから，屈曲波形が不変であれば，鞭毛の振動数は微小管の滑り速度に比例するはずである．一方，微小管の滑り速度とはダイニンのATP加水分解反応の反応速度に対応しているから，鞭毛の振動数をダイニンの反応速度と見立てれば，酵素反応における基質濃度と反応速度の関係を示す反応式（ミハエリス・メンテンの式）が成り立つはずである．図2はまさにそのことが成り立っていることを示している．すなわち，基質濃度の逆数に対して測定された反応速度（この場合は鞭毛の振動数）の逆数をプロットすると直線関係が得られる．このグラフから得られる最大振動数は34 Hzで，生きているウニ精子の振動数のおよそ80％であり，鞭毛運動をよく再現しているといってよいであろう．

哺乳類精子鞭毛はウニ精子鞭毛に比べ複雑な構造をしているので単純ではないが，ATP濃度と振動数が関連することは細胞膜を除去した精子を用いた研究報告が古くからある[11]．

また，生きている精子と細胞膜を除去した精子の鞭毛では直接比較することはできないが，細胞内でのATP濃度や代謝活性が鞭毛運動の様々なパラメーター（鞭毛の屈曲角，波長，振動数など）に関連しているであろうことは想像に難くない[10]．

鞭毛運動の活性化・超活性化とATPの役割

マウス精子は，精巣上体中では運動しておらず，射精時に副生殖腺液と混合されることで鞭毛運動を開始する．この鞭毛運動活性化に関わる細胞外因子としては，カルシウムイオン，重炭酸イオンが知られており，濃度依存的に鞭毛運動活性化を引き起こすことが知られている[12]．これら細胞外の因子が細胞内での情報伝達の引き金となる．ハムスター精子ではカルシウムチャンネルを介して，流入したCa^{2+}によりアデニリルシクラーゼが活性化される[13]．アデニリルシクラーゼはATPをcAMPに変換し，このcAMPがA-キナーゼを活性化する．続いて，活性化したA-キナーゼによって，様々なタンパク質がリン酸化され，最終的に軸糸タンパク質のリン酸化を引き起こし，運動活性化につながることが明らかにされている[14]．

運動活性化した精子はそのままでは受精することはできない．雌生殖器官内で「受精能獲得（capacitation）」と呼ばれる機能変化を経ることで，鞭毛運動の超活性化と先体反応能の獲得が起こり，受精可能となる[1]．運動活性化精子は，前進性の運動であるが，超活性化精子は前進性が低下し，頭部の軌跡が8の字を描くような激しい運動を示す．雌体内では，卵管膨大部で超活性化が起こることが知られている[15]．この超活性化は，細胞外カルシウム，重炭酸イオンなどの細胞外因子や，アルブミンによるステロール流出などが引き金となり，細胞内でcAMPを介した様々なタンパク質のチロシンのリン酸化が起こることが知られている[16, 17]．これらの反応において，タンパク質リン酸化が重要な意味を持っているが，前述したように，運動活性化に関しては主にセリン，トレオニン残基のリン酸化が起こるのに対し，受精能獲得ではチロシン残基のリン酸化が重要であることが大きな違いである．

解糖系によるATP供給と鞭毛運動

これまで述べたように，精子は運動活性化，超活性化，受精能獲得を調節するために，細胞内シグナル伝達経路を備えているが，その働きにはATPを用いたタンパク質リン酸化があり，鞭毛運動維持にもATPの供給が不可欠である．射精から超活性化に至るには，動物種により異なるが，マウスなどでは生体内でおよそ1時間，生体外で再現すると3時間程度かかるといわれている[1, 18]．この間，これらの精子は鞭毛運動を継続しているので，常に細胞外の糖類をとりこみ，細胞内でATP産生を行っている．ATP供給経路として，主に解糖系と呼吸系が知られているが，近年の様々な研究成果により，マウス精子の場合，解糖系が主要なATP供給を行っていることが明らかとなった[19, 20]．

従来，生体外での精子培養には，グルコース，フルクトー

表1　代謝基質枯渇精子の運動再活性化

	枯渇前	枯渇後	グルコース添加	ピルビン酸添加
振動数（Hz）	20	1.5	18	10
ATP（pmol/million sperm）	400	80	300	300

ス，ピルビン酸，乳酸の4種の糖類が混合された培養液が用いられてきた[21]．これらエネルギー基質となりうる成分は，動物種により変動はあるものの共通して精漿に含まれていることが分かっている．我々は，精子培養液の代謝基質として，グルコースのみ含むもの（解糖系基質），ピルビン酸のみ含むもの（呼吸系基質），などを調製し，それぞれの代謝経路が精子の鞭毛運動にどのように関わるのか，精子鞭毛の運動性を指標として，代謝阻害剤を用いた実験を行った[19]．その結果，呼吸系阻害剤を用いて呼吸系を阻害しても，グルコースやフルクトースなどの解糖系基質が存在する場合，精子の運動性に阻害効果はみられず，精子のATP生産量も阻害されなかった．すなわち，ATP濃度は高く維持され，それに見合って鞭毛運動は高い振動数を示した．一方，ピルビン酸や乳酸などの呼吸系基質が存在しても，解糖系阻害剤を用いて解糖系を阻害すると，精子の運動性，ATP生産量ともに著しく阻害された．この結果は，マウス精子の鞭毛運動には解糖系によるATP供給が主要な働きをしていることを示している[19]．マウス精子は精巣内で形態形成を終えたあと，精巣上体中に貯蔵される．射精時に運動活性化が引き起こされるまで，鞭毛運動は活性化されていないが，生きている細胞としての代謝は行われている[1]．そのため，精巣上体から取り出した精子では，細胞内に代謝中間産物が存在しており，細胞外の代謝基質の純粋な効果を調べるには不十分といえる．そこで，我々は，代謝基質を含まない精子培養液に精子を希釈し，一定時間培養することで，細胞内の中間代謝産物を枯渇させた精子を調整し，そこへ細胞外代謝基質を加え，鞭毛運動とATP産生について調べる実験を行った（表1）．細胞内代謝基質を枯渇させた精子に，解糖系代謝基質であるグルコースと，呼吸系代謝基質であるピルビン酸を加えたところ，グルコースでは鞭毛運動の振動数が18 Hzに回復するが，ピルビン酸では振動数が10 Hzまでしか回復しなかった．さらに，細胞内ATP量についても調べたところ，基質添加10分後のATP量に有意差はみられなかった．このことは，解糖系，呼吸系それぞれによるATP生産量は同程度であるが，鞭毛運動に反映されるATP生産は解糖系が担っていることを示している（未発表）．

また後述するように，鞭毛の屈曲運動が鞭毛の先端部まで起こるためには，ATPが鞭毛先端まで供給される必要がある．マウス精子などの長大な鞭毛では，中片部のミトコンドリアで産生されたATPが拡散のみで鞭毛先端部まで供給されるのは困難である[22]．それ故に細胞質全体に存在する解糖系がATP供給を担うことは合理的であるといえるだろう．さらに，解糖系の反応速度は呼吸系に対して非常に早いので，基質あたりのATP生産性の低さを補っていると推察できる．

受精能獲得（capacitation）に関わるシグナル伝達経路に必要なATPについても，解糖系による供給が主要であることが示されている．Travisらは，様々な代謝基質存在下で精子を培養し，受精能獲得の指標となるタンパク質のチロシンリン酸化を調べた結果，グルコースなどの解糖系代謝基質存在下で起こることを報告している[20]．さらに，このチロシンリン酸化は，呼吸系阻害剤によっては阻害されず，呼吸系基質のみでは起こらないことから，受精能獲得を調節するシグナル伝達に必要なATP供給に関しても，解糖系が主要な働きをしていることを示している[20]．

代謝に関わる酵素の遺伝子改変マウスを用いた研究

1分子のグルコースを分解するとき，解糖系では2分子のATPが使われ，4分子のATPが作られ，結果として2分子のATPが作られることになる．呼吸系では36分子相当のATP（2分子は能動輸送などに使われる）が作られるため，効率よくATP合成を行う代謝経路としては呼吸系がよく知られている．しかし，精子は非常に特殊化された形状で，鞭毛全体を屈曲させるためのATP供給を，中片にあるミトコンドリア鞘から行うことは上述したように困難であり，何らかの輸送経路が必要となる．

ウニ精子では，ミトコンドリアで作られたATPがクレアチンリン酸の状態で鞭毛内へ拡散し，高エネルギーリン酸結合がクレアチンキナーゼによってATPに変換されることで，中片部ミトコンドリアで生産されたATPを鞭毛全体に輸送していることが知られている[23]．マウス精子鞭毛の場合，ウニ精子の3倍の長さであるため，単純拡散では鞭毛全体に中片部のATPを輸送することは非常に困難である．ミトコンドリアのクレアチンキナーゼをノックアウトしたマウスが正常に精子を形成し，受精能があることから，マウス精子ではクレアチンキナーゼを介した輸送は行っていないと考えられる[24]．さらに，ミトコンドリアのATP生産の要ともいえる，シトクロームc酵素をノックアウトしたマウスにおいても，精子は受精能を保持していた[25]ことから，マウスにおいてミトコンドリアの呼吸系は精子の受精能にあまり影響しないといえる．

一方，解糖系は10種類の酵素からなる一連の反応で，いくつかの酵素は精子特異型のアイソフォームを持っていることが知られている．なかでもATP合成に直接関わる，グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）とフォスフォグリセレートキナーゼ（PGK）に関しては，その精子

特異型アイソフォーム（GAPDHSおよびPGK2）のノックアウトマウスが作成され，受精能に著しい影響を及ぼすことが報告されている[4, 5, 26]．特に，GAPDHSはアミノ酸配列のN末にプロリンリッチドメインを持ち，この部位を介してFSに繋留されていると考えられている[27]．また，解糖系の第一反応を担う，ヘキソキナーゼ（HK）においても精子特異型アイソザイムが報告されており，GAPDH同様N末に精子特異的部位を持ち，この部位によってFSなどに局在していると報告されている[3, 28, 29]．

精子の解糖系酵素と鞭毛形成

一般に，解糖系は体細胞の細胞質に分散した一連の酵素群によって行われている反応である．しかし精子の鞭毛場合，細胞質は非常に少なく，これまでの研究から鞭毛主部の細胞骨格であるFSに解糖系酵素が繋留されていることが分かってきた．従って，鞭毛主部ではATP供給と消費が局所的に集中して非常に合理的に行われているであろうことが推測される．精子での解糖系酵素群の分子レベルでの局所的配置を調べることは，一般細胞におけるATP供給モデルを考える上でも重要であるといえる．また，繋留された酵素がその触媒機能をどのように保持し，連続した酵素反応をどのように可能にしているのかについても非常に興味深い．

Mukaiらは，精子鞭毛内の繋留されている解糖系酵素に着目し，生体外で一連の解糖系反応を模倣する人工酵素チップの作成を試みた．まずは，精子特異的部位をヒスチジンタグに置き換えた酵素を作成，方向性を保持した状態で基盤上へ固定化し．基盤上での酵素活性の測定を行った．その結果，解糖系の第1，第2反応を担う，ヘキソキナーゼとグルコース6リン酸イソメラーゼについて，それぞれ単独で基盤上で活性を示すことを明らかにした．さらに，これら2種の酵素による連続した酵素反応を示すデバイスの作成に成功した．また，このデバイスが，酵素をランダムに吸着させたデバイスよりもはるかに効率のよい酵素反応を行うことを示した[30]．このことは，精子鞭毛内に繋留された精子特異的解糖系酵素が，繋留されたまま非常に効率よくATP産生に働いていることを示唆している．では，これら解糖系の酵素は，精子形成過程において，いつどのようにして鞭毛へ繋留されるのだろうか？

精巣内の細胞を分離し，短期培養したのち，ATP量を定量すると，減数分裂直後の球形精細胞ではグルコースの代謝を行うが，鞭毛形成過程にある伸長精細胞 ではグルコースを代謝できず細胞内でATP量が減少することが報告されている[31, 32]．これは，生殖幹細胞である球状の精祖細胞が分化し精原細胞となり，減数分裂を経た後，核の凝集や鞭毛形成を経る，精子形成・精子変態過程の途中で，代謝に関わる酵素，特に解糖系酵素の発現調節と再配置が起こっていることを示唆している．我々は，異なる発育段階のマウス精巣RNAを用いて，体細胞型，精子特異型の解糖系酵素の発現を調べた．その結果，精祖細胞では体細胞型の解糖系酵素のみ発現が認められ，減数分裂開始後（3週齢）から精子特異型が発現することを確認し，現在，精子変態時におこる鞭毛形成とこれら解糖系酵素の再配置についての研究を進めている．

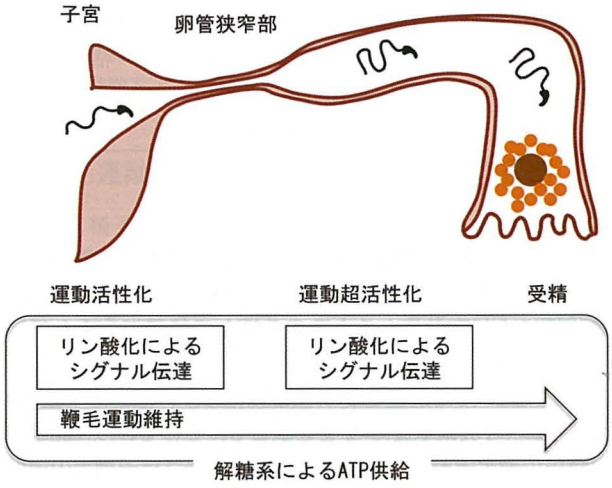

図3　マウス精子の鞭毛運動と代謝制御
運動活性化から受精にいたるまでATP供給が必須となる．リン酸化によるシグナル伝達と鞭毛運動，ともに解糖系によるATP供給が主要な働きをしている．

おわりに

以上のように，マウス精子の生理的機能は，絶え間ないATP供給によって完遂されるが，その供給は主に解糖系が担っていることがわかってきている（図3）．しかし精子は構造的にコンパートメント化されており，それぞれの部位における生理機能とそれらを支える代謝系の関連を明らかにする事によってのみ精子細胞全体としての機能を理解することになるのではないだろうか．そのための有力な一つの手段としては，精子全体若しくはコンパートメントごとのメタボローム解析が考えられる．それによって精子の様々な機能を支えるエネルギー供給系の全体像と制御機構が明らかになるであろう．例えば運動にあまり寄与していないように見えるミトコンドリアが，哺乳類精子では他の動物では例を見ないほど多い理由なども明らかにされるのではないかと期待される．

運動細胞として完成された精子の研究については比較的多くの知見が蓄積されてきたが，精子形成，特に鞭毛形成に関する知見はまだ充分とはいえない．とくに解糖系の酵素については，精子特異的なアイソザイムがどのように鞭毛形成と関わっているのか，未だ明らかとされていない．鞭毛形成と解糖系酵素の関連が明らかになれば，生殖幹細胞からの鞭毛形成分化機構の解明の一助となるであろう．また，細胞内の細胞骨格を足場として繋留された酵素群が，限られた空間で連続した酵素反応を行うといった，効率的な反応系構築という視点からの研究や応用が考えられる．代謝

の一つ一つの反応は，かなり解き明かされた過去の分野であるという認識が一般的であるが，生きている細胞内でどのように働いているかについては未知のことが多く残されている．この分野の今後の発展が期待される．

文　献

1) Yanagimachi, R. (1994): Mammalian fertilization. In: The Physiology of Reproduction, 2nd ed. (Knobil, E. and Neill, J.D., eds.), pp189–317, Raven Press, New York.
2) Oko, R. and Clermont, Y. (1989): Light microscopic immunocytochemical study of fibrous sheath and outer dense fiber formation in the rat spermatid. Anat. Rec., 225, 46–55.
3) Mori, C., Nakamura, N., Welch, J.E., Gotoh, H., Goulding, E.H., Fujioka, M. and Eddy, E.M. (1998): Mouse spermatogenic cell-specific type 1 hexokinase (mHk1-s) transcripts are expressed by alternative splicing from the mHk1 gene and the HK1-S protein is localized mainly in the sperm tail. Mol. Reprod. Dev., 49, 374–385.
4) Miki, K., Qu, W., Goulding, E.H., Willis, W.D., Bunch, D.O., Strader, L.F., Perreault, S.D., Eddy, E.M. and O'Brien, D.A. (2004): Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 16501–16506.
5) Krisfalusi, M., Miki, K., Magyar, P.L. and O'Brien, D.A. (2006): Multiple glycolytic enzymes are tightly bound to the fibrous sheath of mouse spermatozoa. Biol. Reprod., 75, 270–278.
6) Eddy, E.M., Toshimori, K. and O'Brien, D.A. (2003): Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. Microsc. Res. Tech., 61, 103–115.
7) Kim, S.T. and Moley, K.H. (2007): The expression of GLUT8, GLUT9a, and GLUT9b in the mouse testis and sperm. Reprod. Sci., 14, 445–455.
8) Brauchi, S., Rauch, M.C., Alfaro, I.E., Cea, C., Concha, I.I., Benos, D.J. and Reyes, J.G. (2005): Kinetics, molecular basis, and differentiation of L-lactate transport in spermatogenic cells. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 288, C523–534.
9) Brokaw, C.J. (1975): Effects of viscosity and ATP concentration on the movement of reactivated sea-urchin sperm flagella. J. Exp. Biol., 62, 701–719.
10) Okuno, M. and Brokaw, C.J. (1979): Inhibition of movement of trition-demembranated sea-urchin sperm flagella by Mg2+, ATP4-, ADP and P1. J. Cell Sci., 38, 105–123.
11) Ishijima, S. and Witman, G.B. (1987): Flagellar movement of intact and demembranated, reactivated ram spermatozoa. Cell Motil. Cytoskeleton., 8, 375–391.
12) Si, Y. and Okuno, M. (1993): Multiple activation of mouse sperm motility. Mol. Reprod. Dev., 36, 89–95.
13) Fujinoki, M., Kawamura, T., Toda, T., Ohtake, H., Ishimoda-Takagi, T., Shimizu, N., Yamaoka, S. and Okuno, M. (2003): Identification of 36-kDa flagellar phosphoproteins associated with hamster sperm motility. J. Biochem. (Tokyo), 133, 361–369.
14) Fujinoki, M., Kawamura, T., Toda, T., Ohtake, H., Shimizu, N., Yamamoto, S. and Okuno, M. (2003): Identification of the 58-kDa phosphoprotein associated with motility initiation of hamster spermatozoa. J. Biochem. (Tokyo), 134, 559–565.
15) Suarez, S.S. and Osman, R.A. (1987): Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. Biol. Reprod., 36, 1191–1198.
16) Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., Pan, D., Olds-Clarke, P. and Kopf, G.S. (1995): Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. Development, 121, 1129–1137.
17) Visconti, P.E., Moore, G.D., Bailey, J.L., Leclerc, P., Connors, S.A., Olds-Clarke, P. and Kopf, G.S. (1995): Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. Development, 121, 1139–1150.
18) Austin, C.R. (1952): The capacitation of the mammalian sperm. Nature, 170, 326.
19) Mukai, C. and Okuno, M. (2004): Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. Biol. Reprod., 71, 540–547.
20) Travis, A.J., Jorgez, C.J., Merdiushev, T., Jones, B.H., Dess, D.M., Diaz-Cueto, L., Storey, B.T., Kopf, G.S. and Moss, S.B. (2001): Functional relationships between capacitation-dependent cell signaling and compartmentalized metabolic pathways in murine spermatozoa. J. Biol. Chem., 276, 7630–7636.
21) Bavister, B.D. and Yanagimachi, R. (1977): The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. Biol. Reprod., 16, 228–237.
22) Tombes, R.M., Brokaw, C.J. and Shapiro, B.M. (1987): Creatine kinase-dependent energy transport in sea urchin spermatozoa. Flagellar wave attenuation and theoretical analysis of high energy phosphate diffusion. Biophys. J., 52, 75–86.
23) Tombes, R.M. and Shapiro, B.M. (1985): Metabolite channeling: a phosphorylcreatine shuttle to mediate high energy phosphate transport between sperm mitochondrion and tail. Cell, 41, 325–334.
24) Steeghs, K., Oerlemans, F. and Wieringa, B. (1995): Mice deficient in ubiquitous mitochondrial creatine kinase are viable and fertile. Biochim. Biophys. Acta., 1230, 130–138.
25) Narisawa, S., Hecht, N.B., Goldberg, E., Boatright, K.M., Reed, J.C. and Millán, J.L. (2002): Testis-specific cytochrome c-null mice produce functional sperm but undergo early testicular atrophy. Mol. Cell Biol., 22, 5554–5562.
26) Danshina, P.V., Geyer, C.B., Dai, Q., Goulding, E.H., Willis, W.D., Kitto, G.B., McCarrey, J.R., Eddy, E.M. and O'Brien, D.A. (2010): Phosphoglycerate kinase 2

(PGK2) is essential for sperm function and male fertility in mice. Biol. Reprod. 82, 136–145.

27) Welch, J.E., Schatte, E.C., O'Brien, D.A. and Eddy, E.M. (1992): Expression of a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene specific to mouse spermatogenic cells. Biol. Reprod., 46, 869–878.

28) Travis, A.J., Sui, D., Riedel, K.D., Hofmann, N.R., Moss, S.B., Wilson, J.E. and Kopf, G.S. (1999): A novel NH(2)-terminal, nonhydrophobic motif targets a male germ cell-specific hexokinase to the endoplasmic reticulum and plasma membrane. J. Biol, Chem., 274, 34467–34475.

29) Nakamura, N., Mori, C. and Eddy, E.M. (2010): Molecular complex of three testis-specific isozymes associated with the mouse sperm fibrous sheath: hexokinase 1, phosphofructokinase M, and glutathione S-transferase mu class 5. Biol. Reprod., 82, 504–515.

30) Mukai, C., Bergkvist, M., Nelson, J.L. and Travis, A.J. (2009): Sequential reactions of surface- tethered glycolytic enzymes. Chem. Biol., 16, 1013–1020.

31) Nakamura, M., Fujiwara, A., Yasumasu, I., Okinaga, S. and Arai, K. (1982): Regulation of glucose metabolism by adenine nucleotides in round spermatids from rat testes. J. Biol. Chem., 257, 13945–13950.

32) Nakamura, M., Okinaga, S. and Arai, K. (1986): Studies of metabolism of round spermatids: glucose as unfavorable substrate. Biol. Reprod., 35, 927–935.