

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21323

研究課題名(和文)細胞外Na⁺によるハムスター精子受精能獲得調節機構の解明研究課題名(英文)Elucidation of regulatory mechanism of capacitation by extracellular Na⁺ in hamster spermatozoa

研究代表者

竹井 元 (Takei, Gen)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：00708183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者の予備的研究より、受精の場である卵管内体液中に、体外受精培地と比べて高濃度のNa⁺が含まれることをハムスターを用いて明らかにした。この結果に基づき、本研究ではNa⁺が受精能獲得へ与える影響について解析した。本研究により、ハムスター精子が超活性化運動を発現するためには、Na-Ca ExchangerやNa/K ATPase等の細胞内外Na⁺恒常性を制御する分子群の働きが必須であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：In my previous study, I revealed oviductal fluid contains high concentration of Na⁺ compared to the medium for the in vitro fertilization in hamsters. Based on the previous study, present study was performed to elucidate the impact of extracellular Na⁺ on hamster sperm capacitation. The result showed that hyperactivation is regulated by extracellular Na⁺ in hamster spermatozoa, and the activity of molecules that regulate cellular Na⁺ homeostasis, such as Na-Ca exchanger or Na/K ATPase, are involved in hamster sperm hyperactivation.

研究分野：生殖細胞生理学

キーワード：哺乳類精子 受精能獲得 超活性化 Na⁺ Na/K ATPase Na-Ca Exchanger

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の精子は受精能獲得と呼ばれる種々の精子の“質的な変化”を経なければ卵と受精できない。受精能獲得をした精子は、超活性化運動と呼ばれる特殊な鞭毛運動を示す。申請者の予備的な研究より、受精が起こる場である卵管内の体液に含まれる Na イオン濃度が、体外受精用の培地より高いことが分かった。そこで、体外受精用の培地中の Na イオン濃度を上昇させることにより、卵管内の高濃度 Na イオンがハムスター精子の生理活性へ与える影響を調べた。すると、体外受精用培地の Na イオン濃度を卵管液程度まで上昇させると、超活性化運動の発現が遅延することを見出した(図 1)。これはすなわち、細胞外 Na によりハムスター精子超活性化が制御されていることを示唆している。さらに、この超活性化の制御には $\text{Na}^+ \text{Ca}^{2+}$ Exchanger (NCX) が関わることが分かってきた。

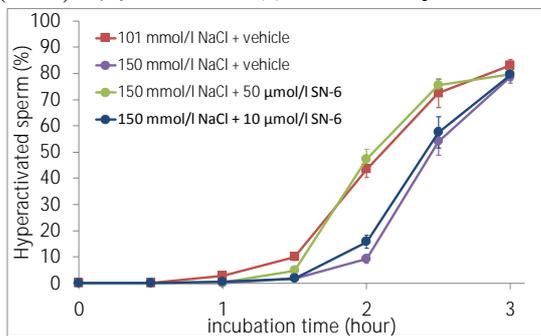


図 1: 細胞外 Na⁺による超活性化発現の遅延

2. 研究の目的

細胞外 Na イオンによりハムスター精子超活性化が制御されるという予備的結果から、申請者は精子細胞内外の Na イオン恒常性の制御がハムスター精子超活性化の制御と密接にかかわっているのではないかと考えた。そこで、Na イオン恒常性制御による超活性化調節機構を解明することで、生体内での受精能獲得制御機構の一端を解明できるのではないかと考え、研究を行った。具体的には、(1) 細胞外 Na イオンが超活性化以外の受精能獲得に伴う現象(先体反応、繊維鞘タンパク質のチロシンリン酸化)に与える影響を明らかにする。(2) NCX がどのように超活性化を制御しているのかを明らかにするため、ハムスター精子内での NCX の局在及び活性変化を調べる。(3) 細胞内外 Na イオン恒常性を制御する分子をハムスター精巣から探索し、その分子の受精能獲得に対する機能を明らかにする。以上の3点を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

実験動物として、超活性化を安定的に高い割合で起こす方法が確立されており、さらに超活性化に伴う鞭毛運動変化の観察が容易であるハムスター精子を用いた。

繊維鞘タンパク質のチロシンリン酸化は

抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロッティングにより調べた。先体反応は、CBB 溶液を用いて先体胞の染色の有無を評価することにより調べた。

NCX の活性が細胞外 Na イオンによってどのように変化するのかを明らかにするため、蛍光 Ca インジケーターである Fluo-4 を用いて、細胞外 Na イオン濃度変化に応じてハムスター精子細胞内 Ca イオン濃度がどのように変化するのか、蛍光分光光度計による細胞内 Ca イオン濃度の定量および蛍光イメージングを行った。

並行して Na イオン恒常性を制御する分子の探索、及び NCX のどのサブタイプが精子に存在するかを明らかにするために、ハムスター精巣を用いた RNA-seq 解析を行った。また得られた分子が本当にハムスター精子に存在するかどうかを確かめるために、RT-PCR 及び特異的な抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、mRNA レベル・タンパク質レベルの両面から解析を行った。さらにハムスター精子で Na^+/K^+ ATPase (NKA) $\alpha 4$ の発現が認められたことから、その特異的な阻害剤である ouabain を作用させたときのハムスター精子受精能獲得への影響を調べた。

なお将来的に遺伝子改変動物を用いた実験を検討するために、マウスでも同様の現象が見られるかどうかについて予備的な検討を行った。しかし、マウス精子においては同様の現象が観察されなかったため、本研究報告書ではハムスター精子を用いた結果のみを示すこととする。

4. 研究成果

(1) 細胞外 Na イオンが超活性化以外の受精能獲得に伴う現象に与える影響について

細胞外 Na イオンが超活性化以外の受精能獲得に伴う現象に与える影響について、繊維鞘タンパク質のチロシンリン酸化への影響、及び先体反応への影響について解析した。その結果、細胞外 Na イオン濃度を増加させても繊維鞘タンパク質のチロシンリン酸化及び先体反応へは影響がなかった。すなわちこれらの現象は全て受精能獲得に伴う現象であるにもかかわらず、超活性化のみが細胞外 Na イオンにより制御を受けていることが分かった。

(2) NCX がどのように超活性化を制御しているのかの解析

NCX が超活性化の制御に関わっているかどうかを調べるために、ハムスター精子細胞内 Ca イオン濃度の定量及び Ca イメージングを行った。その結果、細胞外 Na イオン濃度上昇に伴い運動開始直後の精子細胞内 Ca イオン濃度が減少すること、及びその減少は主に精子鞭毛(主部)で起こっていることが分かった。この結果は、運動開始直後のハムスター精子では、NCX が細胞外 Na イオンに応じて細胞(鞭毛)内 Ca イオンをくみ出していることを示唆している。超活性化運動発現時の

細胞内 Ca イオン濃度を測定することによって、NCX の活性の経時変化を間接的に評価することを試みた。しかし、Fluo-4 をロードした精子を長時間培養しても超活性化運動を示す精子を得られなかったため、本研究計画期間内ではハムスター精子細胞内 Ca イオン濃度の経時変化を評価できなかった。今後詳細に条件を検討することで、細胞内 Ca イオン濃度変化を明らかにし、NCX 活性の経時変化を見積もる予定である。

予備的研究により、NCX の阻害剤である SN-6 を精子に作用させると 150 mM NaCl によって抑制された超活性化が、101 mM NaCl 存在下での超活性化率と同程度まで上昇することが分かっている。さらに NCX 阻害剤を作用させたハムスター精子の細胞内 Ca レベルが上昇することが分かった。超活性化運動を示すためには細胞内 Ca イオン濃度の上昇が必要であることが知られているので (Suarez et al., 1993)。これらの結果は、NCX が細胞外 Na イオンに応じて細胞(鞭毛)内 Ca イオンをくみ出すことにより、細胞内 Ca イオン濃度の上昇を抑え、超活性化を抑制していることを示唆している。以上の内容をまとめて、Reproduction 誌に 2016 年に報告した (Takei and Fujinoki, 2016)。

またハムスター精子に NCX が発現していることを確認するため、RNA-seq 解析から得られたハムスター精巣発現 mRNA のリストから NCX アイソフォームを探索した。見つかった NCX アイソフォームについて RT-PCR を行い、実際に精巣で発現しているかどうかを確認した。その結果、ハムスター精巣において NCX1 及び NCX2 の発現が認められた。NCX1 および NCX2 がタンパク質レベルでハムスター精子に発現しているかどうかを確かめるため、市販の抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。しかし 4 種類の抗体を購入しても、ハムスターの NCX と反応する抗体が得られなかったため、ハムスター精子におけるタンパク質レベルでの NCX1,2 の発現を確認するには至らなかった。今後はハムスター NCX の抗体を作成することも視野に入れて、研究を進めていく予定である。

(3) Na イオン恒常性制御分子の探索およびその機能解析

さらに、NCX 以外の細胞内 Na イオン恒常性制御分子を探索し、それらの分子がハムスター精子受精能獲得へ果たす機能について解析した。ハムスター精巣において Na イオン恒常性に関わる分子を探索したところ、細胞内外の Na イオン恒常性制御において中心的な機能を果たす分子である NKA α サブユニットのうち、普遍的なアイソフォームである $\alpha 1$ と精巣特異的なアイソフォームである $\alpha 4$ の二つの配列を発見した。そこで NKA $\alpha 1$ および $\alpha 4$ がハムスター精巣で発現していることを RT-PCR により確認したところ、これら

二つの mRNA レベルでの存在が確認された。さらにウェスタンブロッティングによりタンパク質レベルでの解析を行ったところ、ハムスター精子に NKA $\alpha 1$ および $\alpha 4$ タンパク質が存在することが確認された。

NKA $\alpha 1$ および $\alpha 4$ のハムスター精子における機能を解析するために、NKA の特異的な阻害剤である ouabain を作用させた際の受精能獲得への影響を調べた (図 2)。その結果、 10^{-6} M ouabain により超活性化が抑制され、 10^{-5} M 以上の ouabain により鞭毛運動が完全に阻害されることが分かった。先行研究より、 10^{-6} M の ouabain は NKA $\alpha 4$ を特異的に阻害し、 10^{-5} M の ouabain は NKA $\alpha 1$ と $\alpha 4$ の両方を阻害することが知られている。すなわち、これらの結果は NKA $\alpha 4$ の活性が超活性化運動の発現に必須であり、NKA $\alpha 1$ は精子の運動性の維持に必須であることを示唆している。

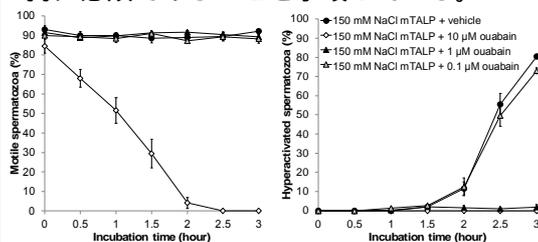


図 2 NKA 阻害剤 ouabain の運動率、超活性化への効果

NKA $\alpha 4$ が超活性化に必須であることが分かったので、次に超活性化運動と強い相関があることが知られている繊維鞘タンパク質のチロシンリン酸化が、NKA $\alpha 4$ の阻害によりどのような影響を受けるのか調べた。すると ouabain を作用させても繊維鞘タンパク質のチロシンリン酸化は阻害されないことが分かった。さらに、繊維鞘タンパク質のチロシンリン酸化および超活性化を増強することが知られているジブチリル cAMP やイソブチルメチルキサンチン (IBMX)、calyculin A などの薬剤を投与しても、ouabain による超活性化の阻害からの回復は見られなかった。これらの結果は、NKA $\alpha 4$ が細胞内外の Na イオン恒常性を制御することで、繊維鞘タンパク質のチロシンリン酸化を含むリン酸化シグナル伝達系とは別の側面から超活性化を制御していることを示唆している。以上の内容を現在投稿中である。

ところで 2016 年の我々の報告において、卵管内体液中に 20 mM もの高濃度の K イオンが含まれていることを明らかにした (Takei and Fujinoki, 2016)。一方受精能獲得した精子では膜電位の過分極が起こり、また膜電位の過分極が先体反応を起こすために必須であると報告されている。高濃度の細胞外 K イオンは膜電位を脱分極させるので、受精能獲得が起こる場所である卵管内に高濃度の K イオンが存在することは、膜電位の過分極が受精能獲得に必須であるとする研究と矛盾する (de la Vega-Beltrán et al., 2012)。そこで高濃度の K イオンがハムスターの超活性化や先体反応、

および受精能獲得に伴う膜電位の過分極へ与える影響について調べた。その結果、20 mM の K イオン存在下においても膜電位が過分極する傾向は見られたが、20 mM の K イオン存在下で過分極したハムスター精子の膜電位は、通常の体外受精用培地 (K イオン濃度は 2-6 mM) での受精能獲得前の精子に比べて有意に脱分極していることが分かった。その一方、20 mM の K イオン存在下でも超活性化や先体反応には影響が見られないことが分かった。この結果は、膜電位の制御が受精能獲得に対して重要でない可能性を示す。これらの結果に基づき NKA $\alpha 4$ の結果について考察すると、NKA $\alpha 4$ の阻害による超活性化の阻害は、膜電位の脱分極が原因ではないと示唆される。受精能獲得した精子では細胞内 Na イオン濃度が減少することがマウスで報告されている (Escoffier et al., 2012)。この報告に基づき考察すると、NKA $\alpha 4$ は細胞内 Na イオンを減少させることで、Na/H Exchanger の様な二次輸送体の活性を変化させ、受精能獲得を引き起こしている可能性が考えられた。

NKA $\alpha 4$ や NCX1, 2 の他に、Na/H Exchanger の様々なアイソフォームや K-dependent Na Ca Exchanger や Na-HCO₃⁻ cotransporter などの様々な二次輸送体がハムスター精巣 mRNA を用いた RNA-seq 解析により見つかっている。今後はこれらの輸送体がハムスター精子の受精能獲得にどのように貢献しているのかを解析していく予定である。さらに脳室内で Na センサーとして働くことが報告されている Na_x チャネルや、Na 漏出チャネルである Sodium leak channel non-selective protein などの様々な Na チャネルが RNA-seq 解析により見つかっている。今後の研究では、これらの Na チャネルがどのように上述の一次・二次輸送体共同してハムスター精子超活性化などの生理活性を制御しているのかを明らかにすることで、Na イオンの一次輸送体、二次輸送体やチャネルによる Na イオン恒常性制御と超活性化などの受精能獲得制御機構の関連を明らかにしていきたい。

<引用文献>

de la Vega-Beltrán et al., 2012 *J. Biol. Chem.* 287 44384-44393.

Escoffier et al., 2011 *J. Cell Sci.* 125 473-485

Suarez et al., 1993 *PNAS* 90, 4660-4664

Takei and Fujinoki, 2016 *Reproduction* 151 589-603.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

以下全て査読有

Takei GL, Fujinoki M, Yoshida K, Ishijima S: Regulatory Mechanisms of Sperm

Flagellar Motility by Metachronal and Synchronous Sliding of Doublet Microtubules. *Mol. Hum. Reprod.* 23: 817-826. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/molehr/gax055>

Fujinoki M, Takei GL: γ -Aminobutyric acid suppresses enhancement of hamster sperm hyperactivation by 5-hydroxytryptamine. *J. Reprod. Dev.* 63: 67-74, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1262/jrd.2016-091>

Takei GL, Fujinoki M: Regulation of hamster sperm hyperactivation by extracellular Na⁺. *Reproduction* 151: 589-603, 2016. DOI: 10.1530/REP-15-0367

Fujinoki M, Takei GL, Kon H: Non-genomic regulation and disruption of spermatozoal in vitro hyperactivation by oviductal hormones. *J. Physiol. Sci.* 66: 207-212, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12576-015-0419-y>

Fujinoki M, Takei GL: Estrogen suppresses melatonin-enhanced hyperactivation of hamster spermatozoa. *J. Reprod. Develop.* 61: 287-295, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1262/jrd.2014-116>

[学会発表](計 11 件)

Takei GL, Fujinoki M: Na⁺/K⁺ ATPase $\alpha 4$ subunit plays the important role in hyperactivation while $\alpha 1$ subunit is essential for the maintenance of motility in hamster sperm. 4th World Congress of Reproductive Biology, Okinawa, Japan, 2017, 9.

竹井元 今弘枝: ハムスター精子受精能獲得に膜電位の過分極は必要ない. 日本動物学会第 88 回富山大会, 富山, 2017, 9.

Takei GL: - closed meeting - Gordon Research Conference Fertilization & Activation of Development, Holderness, NH, USA, 2017, 7.

竹井元 藤ノ木政勝: Na⁺/K⁺ ATPase による超活性化調節. 日本アンドロロジー学会第 36 回学術大会および第 25 回精子形成・精巣毒性研究会共同開催学会、倉敷、2017, 6.

竹井元 藤ノ木政勝: ハムスター精子において Na⁺/K⁺ ATPase $\alpha 1$ は生存を、 $\alpha 4$ は超活性化をそれぞれ調節する. 第 94 回日本生理学会大会, 浜松, 2017, 3.

竹井元 藤ノ木政勝: 細胞外ナトリウムによるハムスター精子超活性化調節. 第 109 回日本繁殖生物学会大会, 相模原,

2016, 9.

Takei GL, Fujinoki M: Regulation of hamster sperm hyperactivation by Na⁺ via an action of Na⁺/Ca²⁺ exchanger. 12th International Congress of Cell Biology, Prague, Czech, 2016, 7.

竹井元 藤ノ木政勝：細胞外ナトリウムによるハムスター精子鞭毛運動調節．日本アンドロロジー学会第 35 回学術大会および第 23 回精子形成・精巣毒性研究会共同開催学会，前橋，2016, 6.

竹井元 藤ノ木政勝：細胞外ナトリウムによるチロシンリン酸化非依存的なハムスター精子超活性化調節．第 93 回日本生理学会大会，札幌，2016, 3.

竹井元 藤ノ木政勝：細胞外 Na⁺によるチロシンリン酸化を介さないハムスター精子超活性化調節．日本動物学会第 86 回新潟大会，新潟，2015, 9.

竹井元 藤ノ木政勝：細胞外ナトリウムによるハムスター精子超活性化調節機構の解明．日本アンドロロジー学会第 34 回学術大会および第 22 回精子形成・精巣毒性研究会共同開催学会．福岡，2015, 6.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし
6. 研究組織
(1)研究代表者

竹井元 (Gen Takei)
獨協医科大学・医学部・助教
研究者番号：00708183

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()