

令和元年5月27日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15558

研究課題名(和文) 精子の受精能獲得時に生じる生理動態の解明

研究課題名(英文) Dynamics in sperm physiology during capacitation

研究代表者

河合 喬文 (Kawai, Takafumi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70614915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類では、精子が正常に受精するためには受精能獲得という過程を経る必要がある。この過程では、細胞内でのカルシウム動態の変化、ならびにpH変化(アルカリ化)、膜電位の変化も並行して起きることが知られている。pHシグナル、膜電位変化については、カルシウム動態になんらかの重要な役割を示すことが示唆されている一方、詳細なメカニズムについては分かっていない。我々はマウスの精子を用い、この点を検証した。本研究ではマウスの精子を用いたカルシウムイメージング、pHイメージングの実験系を確立し、また精子からのパッチクランプ法を確立した。これにより精子の受精能獲得における生理的变化について、重要な知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりこれまで明らかにされてこなかった哺乳類の精子が受精時に示している生理動態について、より詳細な知見を得ることが出来ると期待される。これにより、将来的には不妊治療などにも適用できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Mammalian sperm undergo a physiological process, called capacitation during fertilization. During capacitation, calcium influx, hyperpolarization, alkalinization occur in the sperm. However the relationship among them is not well understood. Here we established experimental system to examine this.

We succeeded in detecting pH change during capacitation and also succeeded to detect alkalinization induced hyperpolarization by performing patch clamp from sperm. With these techniques we found some important knowledge of physiological change in mouse sperm during capacitation.

研究分野：電気生理学

キーワード：精子

1. 研究開始当初の背景

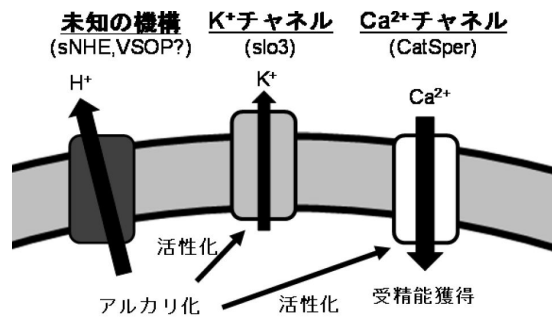


図1 精子受精能獲得の模式図

哺乳類の精子では、受精前に生じる細胞内のpH変化や、カルシウムシグナル、細胞膜電位といった生理状態の動的変化が、受精能獲得に極めて重要であるとされている。具体的には、受精能獲得時に細胞内はアルカリ化し、またK⁺チャネルを介して過分極、Ca²⁺チャネルを介してカルシウム応答を示すことが明らかになっている。しかしその機序には未だ不明な点も多く、また、これらの異なる

因子(pH, カルシウム, 膜電位)が如何に協調的に制御されるかについては、未解明な点が多い。たとえば受精能獲得に伴って生じるとされる精子のpH変化(アルカリ化)については、その作用機序などは詳しくは分かっておらず、また実際に受精能獲得時に生じるpH変化を哺乳類でリアルタイムに測った研究は哺乳類では存在しない。加えて、これまでpHの変化により細胞内のCa²⁺流入が誘起されることがわかっているが、実際にこれが受精能獲得時においてどの程度重要であるのかについては知見が殆ど存在していなかった。

2. 研究の目的

本研究では、哺乳類の精子において、pH, Ca²⁺, 膜電位がどのように協調的に作用して受精能獲得に寄与するのかを明らかにすることを目的とした。そのためには各生理的变化の現象がどのように起きるのかについて時系列を追って調べる必要がある。そこで本研究ではこれらをリアルタイムでのイメージングにより明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

野生型のマウスを用いて精巣上体尾部から成熟精子を摘出し、各プローブを使用して受精能獲得培地投与による影響を調べた。pH イメージングについては BCECF、Ca²⁺イメージングについては Fluo3、膜電位イメージングについては DiBAC を用いて行った。細胞は Cell Tak によってカバーガラスに貼り付け、37 度に温度制御した蛍光顕微鏡を測定に用いた。また必要に応じて精子からの電気生理学的測定を行い、主となる分子の特性を調べる。この時、成熟した精子は測定に向かなかったため、精巣上体体部から摘出した精子を測定に用いた。

4. 研究成果

精子からの pH イメージング、Ca²⁺イメージングを行うことにより、それぞれについて受精能獲得時に生じるそれぞれの変化を捉えることに初めて成功した。膜電位イメージングについては、残念ながらプローブと溶液が干渉作用を示してしまい、測定に不適であることが分かった。しかし pH イメージングと Ca²⁺イメージングにより、両者の時空間的な関係性を追うことに成功し、新しい知見をもたらすことが出来た。また、

K⁺イオノフォアや様々な薬剤を投与することによって膜電位による Ca²⁺シグナルへの影響を検証することに成功した。

また、精子のイオンチャネル活性を調べるうえで電気生理学的な検証が極めて有用であるが、これは細胞の小ささにより非常に困難であるという問題があった。これを克服するためにプロトコルを改良し、実験の成功率が格段に向上した。

この改良したプロトコルを用いた実験を行っていく過程で、細胞の膜電位を制御する K⁺チャネルのアルカリ化に伴う活性化の働きを抑制する薬剤を発見することが出来た。したがってこの薬剤は受精能獲得時の精子の過分極応答の重要性を検証するうえで有用な存在であると考えられる。この知見を基に薬剤存在下で Ca²⁺イメージングを行うという実験も行い、重要な知見を得ることが出来た。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Ratanayotha A, Kawai T, Okamura Y.

Real-time functional analysis of Hv1 channel in neutrophils: a new approach from zebrafish model. *Am J Physiol.*, in press (2019).(査読あり)

Okamura Y, Kawanabe A, Kawai T.

Voltage-Sensing Phosphatases: Biophysics, Physiology and Engineering. *Physiological Reviews*, 98(4):2097-2131 (2018) (査読あり)

Kawai T, Tatsumi S, Kihara S, Sakimura K, Okamura Y.

Mechanistic insight into the suppression of microglial ROS production by voltage-gated proton channels (VSOP/Hv1) Channels. 29:1-8 (2018) (査読あり)

Kawai T, Okochi Y, Ozaki T, Imura Y, Koizumi S, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Yamashita T, Okamura Y.

Unconventional role of voltage-gated proton channels (VSOP/Hv1) in regulation of microglial ROS production. *J Neurochem.* 142(5):686-699 (2017) (査読あり)

Ratanayotha A, Kawai T*, Higashijima S, Okamura Y (* corresponding author).

Molecular and Functional Characterization of the Voltage-Gated Proton Channel in Zebrafish Neutrophils. *Physiological Reports*. 5(15) no. e13345 (2017) (査読あり)

〔学会発表〕(計 5 件)

Kawai T, Miyata H, Nakanishi H, Sakata S, Okochi Y, Watanabe M, Sakimura K, Sasaki T, Ikawa M, Okamura Y. Functional analysis of voltage-sensing phosphatase in mouse sperm. *The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress*, Kobe, Japan, (2019)

Kawai T, Takao K, Sakimura K, Miyakawa T, Okamura Y

Age-dependent regulatory function of microglial voltage-gated proton channels, The 41st annual

meeting of the Japan neuroscience society, Kobe (2018)

Eguchi N, Hashimoto M, Jinno Y, Kawanabe A, Kawai T, Okamura Y
Sea squirt voltage-gated sodium channel : kinship with the origin of vertebrate neural sodium channels, The 41st annual meeting of the Japan neuroscience society, Kobe (2018)

河合喬文、宮田治彦、中西広樹、坂田宗平、大河内善史、渡辺雅彦、崎村建司、佐々木雄彦、伊川正人、岡村康司
精子における電位依存性ホスファターゼによるイノシトールリン脂質の制御, 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会、東京、(2018)

Kawai T, Takao K, Sakimura K, Miyakawa T, Okamura Y
Gene expression and behavior analysis of microglial voltage-gated proton channels in mouse, The 40st annual meeting of the Japan neuroscience society, Chiba (2017)

〔図書〕(計 2 件)

河合喬文、岡村康司「電位依存性プロトンチャンネル VSOP/Hv1」【編集】高橋良輔、山中宏二、樋口真人、漆谷真、脳内環境辞典、メディカルドゥ (2017) p70-p71

河合喬文、筒井秀和、岡村康司「電位センサードメインを用いた膜電位プローブの進歩」生体の科学、医学書院、 68(5):444-445 (2017)p444-p445

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。