

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：32717

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09721

研究課題名(和文) 精嚢分泌タンパク質による精子膜ステロールレベル調節を介した受精能獲得制御

研究課題名(英文) Regulation of sperm capacitation through control of sperm membrane sterol levels by seminal vesicle secretory proteins.

研究代表者

吉田 薫 (Yoshida, Kaoru)

桐蔭横浜大学・医用工学部・教授

研究者番号：70398973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：受精能獲得時に精子膜からのコレステロールの流出はその契機になるが、生理的な調節機構は不明である。我々はこれまでに、精嚢分泌タンパク質が積極的に精子膜のコレステロール量を保持することを明らかにしている。この作用が異所的な受精能獲得を抑制すると考えるが、その分子機構は明らかではない。本研究ではマウス子宮卵管接合部を短時間培養し、組織透明化により精子の卵管上皮への結合観察を可能にした。また、精子細胞膜抽出物のレクチンアレイを実施し、MbCDによるコレステロールの除去および精嚢分泌タンパク質SVS2の有無により受精能獲得過程が制御されると運動して、精子細胞膜糖鎖構造が変化することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々を含むほ乳類に共通の体内受精の仕組みを理解することは、拳児を希望するカップルに安全かつ有効な生殖補助医療を提供する基礎となる。特に、本研究のこれまで顧みられることの少なかった精漿成分の体内受精における生理的な役割を明らかにする試みは生殖補助医療への応用も期待できる重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：Although the efflux of cholesterol from the sperm membrane is triggered during the capacitation, the physiological regulatory mechanism is unknown. We have previously shown that seminal vesicle secretory proteins actively maintain cholesterol levels in the sperm membrane. We hypothesize that this action suppresses ectopic fertilization potential acquisition, but the molecular mechanism is not clear. In this study, mouse utero-tubal junction (UTJ) was cultured for a short time and tissue transparency enabled observation of sperm binding to the oviductal epithelium. In addition, lectin arrays of sperm cell membrane extracts were performed, and it was shown that the sperm cell membrane structure of glycan chains is altered in conjunction with the removal of cholesterol by MbCD and the regulation of the process of fertilization ability acquisition by the presence of sperm seminal vesicle secretory protein SVS2.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精子 糖衣 精嚢分泌タンパク質 卵管 受精能獲得

1. 研究開始当初の背景

精巣内で形成された精子は機能的には未熟である。精巣上で細胞外より膜の修飾を受け、運動能を獲得し、放精の際に運動を開始する。さらに、雌生殖道内において、卵や雌性生殖器分泌因子により精子の最終成熟が起こり、受精能を得る(受精能獲得)。そして卵周辺部において先体胞の開口分泌が起き(先体反応)、受精に至る。この受精過程において精漿に含まれる因子が精子の運動能や受精能に対して抑制的に働くことが示され、“受精能抑制因子”として種々の物質が研究されている。このように精子の外部環境因子による精子機能の制御は受精において必要不可欠な現象である。特に、近年は *in vivo* での受精過程を検討することにより“受精能獲得”という現象を根本的に理解しようとする研究が盛んである。そこで本研究では、何が *in vivo* でどのように精子膜ステロールレベル調節を行っているかを理解することを研究課題の核心をなす学術的「問い」として、精囊分泌タンパク質に着目し、その *in vivo* での作用を明らかにすることによってこの核心に迫る。研究代表者らが着目するヒト精囊分泌タンパク質セメノジェリン(SEMG)については、ヒト精子の運動および受精能獲得を抑制することが明らかとなっている。また、マウスにおける相同タンパク質 SVS2 に関しては受精能獲得を抑制すると共に子宮内での精子保護作用が確認されている。その作用機序研究においては、SEMG のターゲットとなる精子膜の受容分子として、EPPIN 複合体タンパク質が示されている。SVS2 はガングリオシド GM1 への結合が確認されているが、膜タンパク質については不明である。また、SEMG と SVS2 は相同タンパク質であるものの、その一次構造の相同性は低い。ただし、塩基性タンパク質であることは共通で、分子表面は正に帯電していると考えられる。一方、精子が負に帯電していることはよく知られているが、その分子構造については近年まで不明であった。現在ではヒトにおいて、精巣上部尾部で分泌、精子膜表面最外層に付加される構造は ディフェンシン 126(DEFB126)によるグリコカリックスであることが明らかになっており、シアル酸を含む O 結合型糖鎖が負電荷を与えていると考えられる。そして、このグリコカリックス構造が、負に帯電している頸管粘液の通過等に必須であると考えられている。しかしながら、ヒトにおける *in vivo* での検討は不可能であり、これらの作用機序は全てが確かめられたものではなく、マウスでの基礎研究が必須である。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに臨床側と協力して、男性不妊症、特に精子無力症の原因究明を目指し、SEMG をツールとして精子運動調節機構の解明に取り組んできた。しかしながら、ヒトを対象とした研究のみでは *in vivo* での受精過程を検討することは不可能であるため、マウスにおける精囊分泌タンパク質 SVS2 による受精能獲得調節機構の研究を進めることで、これまで不明であった受精能抑制因子の生理的作用を明らかにした。本研究ではこれらの研究で得られた知見を元に、*in vivo* で実際にはたらく精囊分泌タンパク質による精子膜ステロールレベル調節の制御を介した精子受精能獲得の調節機構解明を目的とする。

3. 研究の方法

DEFB126 のマウスにおける相同タンパク質は ディフェンシン-22(DEFB22)であり、同様に精子膜表面最外層にグリコカリックスを形成することが示されている。しかしながら、これらグリコカリックスと精囊分泌タンパク質の相互作用については明らかになっていない。そこで、本研究ではマウスを用い、(1)SVS2 と DEFB22 の相互作用と(2)SVS2 および DEFB22 の精子膜からの除去機構に着目した研究を行った。

(1)SVS2 と ディフェンシン-22 の相互作用の解明：未だ明らかになっていない DEFB22 の糖鎖構造を明らかにするため、マウス精巣上部精子膜画分からの免疫沈降による DEFB22 精製と O 型糖鎖切り出し、HPLC 解析を試みた。この方法では DEFB22 の回収が困難であることがわかったので、次に、マウス精巣上部精子膜画分を用いたレクチンアレイを実施した。この結果からグリコカリックスの糖鎖構造を予測し、候補糖鎖を決定した。一方、蛍光レクチンを用いて SVS2 との結合を精子染色による競合阻害実験にて確認した。

(2)SVS2 および ディフェンシン-22 の精子膜からの除去機構の解明：実はヒトとマウスでは子宮の構造に大きな違いがある。特に子宮頸部の構造は異なり、ヒトにある子宮頸管という精子にとっての関門は、マウスにはない。ヒトは腔内射精であり、精漿は子宮内に進入しないとされている。マウスは子宮内射精であり、SVS2 は精子と共に子宮内に進入する。従って子宮卵管結合部(UTJ)が精漿から分離する精子の関門になると考えられる。先行研究で、卵管内精子に SVS2 が結合していないことは明らかである。UTJ の卵管側上皮には一時的に精子が結合するリザーバー構造があり、ここから離脱する際に SVS2 と共に精子膜の結合分子が除去されると予想され、その際にコレステロールも流出して受精能獲得が起こると考えられている。そこで、本研究ではマウス子宮の器官培養あるいは IUI(子宮内精子注入法)を用いて精子の卵管上皮細胞

への結合と SVS2 の関与、および離脱精子からの SVS2、DEFB22 およびコレステロールの除去について、各分子の蛍光物質による直接ラベルあるいは間接蛍光抗体法により観察可能な系の確立を試みた。

4. 研究成果

(1) マウス精巣上体精子膜画分からの免疫沈降による DEFB22 精製：先行研究を参考に DEFB22 のペプチド抗原（成熟ポリペプチドの 18-31 アミノ酸）を作成し、ウサギポリクローナル抗体を得た。この抗体を用いたウエスタンブロット法により、精子の DEFB22 を検出できたが、その特異性は低かった(図 1 左、矢印は DEFB22 の予想分子量)。次に精子膜タンパク質の抽出を試み、その抽出物についてこの抗体を用いたウエスタンブロット法を行った。予想された分子量にバンドは検出できたが、高分子量側に凝集をおこしており、さらに細胞質画分にも検出されていることから、精製方法についてさらなる検討が必要となった(図 1 右)。

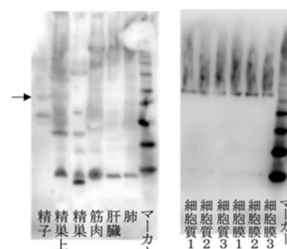


図 1

免疫沈降についても試みたが、DEFB22 を回収できなかった。DEFB22 の糖鎖修飾は C 末側で起こると考えられているため、抗原部位は N 末側に設定しているが、この領域は球状の立体構造をとるとも考えられており、未変性状態での結合は起こらない可能性がある。いずれにせよ、本方法による DEFB22 精製は中断とし、その後の O 型糖鎖切り出しと HPLC 解析についても今後の検討課題となった。

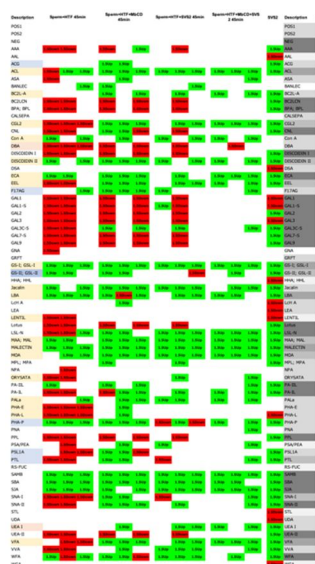


図 2

(2) マウス精巣上体精子膜画分のレクチンアレイ：先行研究を参考に精巣上体精子を HTF 培地中で *in vitro* 受精能獲得させる過程で、メチル シクロデキストリン(M-CD)もしくは SVS2 もしくはその両方を作用させた際のレクチンアレイによる網羅的な糖鎖動態を明らかにした。未処理精巣上体精子膜画分を基準とするヒートマップから、各処理による一定の傾向が見出され、特に SVS2 による受精能獲得抑制に連動して増減するのは GSL-II であることが示された(図 2、3)。また、SVS2 そのものもレクチンとの結合が多く観察され、糖鎖付加が起きていることが示唆された。SVS2 によってもたらされる糖鎖を考慮する必要はあるが、GSL-II の認識する N アセチルグルコサミンが SVS2 による可逆的な受精能獲得抑制に何らかの役割を担っている可能性がある。加えて、SVS2 の影響を比較的受けずに精子膜表面の糖鎖を安定して標識するには WGA が適当であることもわかった。

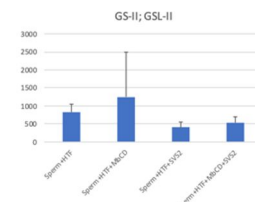


図 3

(3) マウス精巣上体精子の蛍光レクチン染色：精巣上体精子をアルブミン含有 TYH 培地中で *in vitro* 受精能獲得させる過程で、培地への SVS2 添加の有無で比較した。培養後の精子は洗浄回収し、各種蛍光レクチンを用いて蛍光顕微鏡観察にて評価した。その結果、検討した 7 種類のレクチンのうち、シグナルがみられたのが ConA, UEAI, WGA で、このうち SVS2 により蛍光強度に変化が見られたのは ConA と UEAI で、いずれも添加により蛍光量は増加していた(図 4)。WGA については SVS2 による影響は見られなかった(これは上記の結果と一致する)。

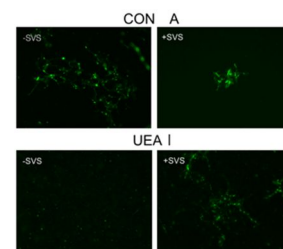


図 4

(4) マウス子宮の器官培養：子宮を採取し、HTF 培地中で短時間培養し、IUI を行うことによって、UTJ の精子結合の様子を直接観察した。子宮は腔結合部で左右に分けて使用することにより個体差の影響の排除も試みた。精子は前培養中にヘキストにより頭部の蛍光標識を行った。蛍光顕微鏡観察により精子が UTJ および卵管へ到達している様子は観察できたが、詳細な観察は困難であったため、組織透明化を試みた。透明化により UTJ の詳細を観察することができる可能性は確認できたが、精子頭部の検出まで至っていない(図 5)。今後はライトシート顕微鏡を用いた立体的な観察を試みる予定である。

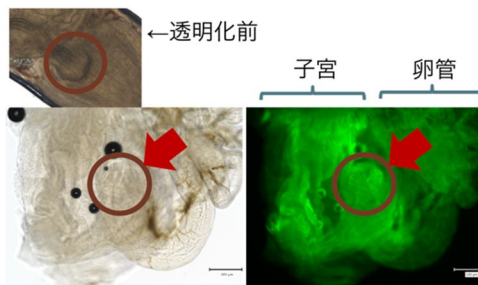


図 5

① Ashley I Yudin, Theodore L Tollner, Cathy A Treece, Robert Kays, Gary N Cherr, James W Overstreet,

and Charles L Bevins, β -Defensin 22 is a major component of the mouse sperm glycoalkyx Reproduction. 2008 December ; 136(6): 753–765.

②Araki N, Trencsényi G, Krasznai ZT, Nizsalóczki E, Sakamoto A, Kawano N, Miyado K, Yoshida K, Yoshida M. Seminal vesicle secretion 2 acts as a protectant of sperm sterols and prevents ectopic sperm capacitation in mice. Biol Reprod. 2015 Jan;92(1):8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakaguchi D, Miyado K, Iwamoto T, Okada H, Yoshida K, Kang W, Suzuki M, Yoshida M, Kawano N	4. 巻 11
2. 論文標題 Human Semenogelin 1 Promotes Sperm Survival in the Mouse Female Reproductive Tract.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3961
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms2111396	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shindo Miyuki, Inui Masafumi, Kang Woojin, Tamano Moe, Tingwei Cai, Takada Shuji, Hibino Taku, Yoshida Manabu, Yoshida Kaoru, Okada Hiroshi, Iwamoto Teruaki, Miyado Kenji, Kawano Natsuko	4. 巻 20
2. 論文標題 Deletion of a Seminal Gene Cluster Reinforces a Crucial Role of SVS2 in Male Fertility	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4557 ~ 4557
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20184557	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 吉田 薫, 吉田 学	4. 巻 51(5)
2. 論文標題 受精時に見られる精子運動調節	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 253-255
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	吉田 学 (Yoshida Manabu) (60301785)	東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関