

機関番号：32202

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791159

研究課題名 (和文) 精子受精能獲得におけるリン酸化・脱リン酸化メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Clarification of sperm protein phosphorylation/dephosphorylation mechanism in sperm capacitation

研究代表者

鈴木 達也 (SUZUKI TATSUYA)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：90348003

研究成果の概要 (和文)：

精子超活性化の調節には PPP (phosphoprotein phosphatase) と呼ばれる脱リン酸化酵素が関与すると考えられている。本研究では、PPP のどの型がハムスター精子超活性化の調節に関与するのかを調査した。その結果、PPP2 が精子超活性化の調節に密接に関与した。しかしながら、PPP2 は精子タンパク質のチロシンリン酸化の調節とは関与しなかった。

研究成果の概要 (英文)：

It has been widely accepted that phosphoprotein phosphatases (PPPs) are associated with the regulation of sperm hyperactivation. In the present study, we examined the types of PPPs associated with the regulation of hamster sperm hyperactivation. From the results, it is likely that PPP2 is closely associated with the regulation of sperm hyperactivation, although it is not associated with the regulation of tyrosine phosphorylation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：タンパク質、プロテオーム、シグナル伝達、生理学、発生・分化

1. 研究開始当初の背景

不妊症に占める原因のうち男性側の責任は約 50%近くに存在する。中でも造精機能障害が 90%以上を占め、そのうち約 60%は原因不明とされ、特発性男性不妊症と呼ばれる。特発性男性不妊症に対する治療として薬物療法が行われるが、一般的にその有効性は低く、生殖補助医療 (assisted reproductive technology: ART) に移行することが多い。ART の治療成績は良好であるが、一方では多胎妊娠、卵巣過剰刺激症候群等の合併症の問題を包含している。これら ART による合併症を予防するためにも、精子の受精現象への理解をさらに深め、ART に依存しない男性不妊治療法の開発が望まれている。

射出精子は卵子と受精する能力を有しておらず、雌性生殖路内で「受精能獲得」と呼ばれる複雑な生理学的、機能的な変化をとげ、はじめて受精することが可能となる。受精能獲得精子は頭部では先体反応を、鞭毛では超活性化と呼ばれる変化をとげる。超活性化は精子鞭毛の高振幅非対称の特殊な運動であり、卵子の外側にある透明帯を貫通し、受精するための推進力となる。これまで精子超活性化は、Ca²⁺や cAMP、PKA によるタンパク質リン酸化によって調節され、最終的に精子鞭毛の A kinase anchoring protein (AKAP) と呼ぶ 80kDa 前後のタンパク質チロシンリン酸化と強い関連があると理解されている。しかしながら、PKA から AKAP のリン酸化までのリン酸化カスケードは未だ十分に解明されていない。

2. 研究の目的

リン酸化カスケードの調節にはタンパク質リン酸化酵素であるキナーゼだけではなく、脱リン酸化酵素であるプロテインフォスファターゼも関与している。本研究ではプロテインフォスファターゼの中でもセリン/スレオニンフォスファターゼ (PPP) に焦点を当て、精子超活性化の調節に関与すると考えられる精子リン酸化タンパク質および PPP サブファミリーを検索した。

3. 研究の方法

- (1) 精巣上体より採取したハムスター精子を培養液中で超活性化させ、顕微鏡下に超活性化を観察し、精子超活性化率の変化を解析した。

精子運動率 (%) = 運動精子数 / 全精子数 × 100

精子超活性化率 (%) = 超活性化精子数 / 全精子数 × 100

- (2) 超活性化過程にある精子からタンパク質を抽出し (図 1)、抗リン酸化チロシン抗体を用いたウエスタンブロッティングを行い、超活性化の間にチロシンリン酸化する精子タンパク質を検出した。

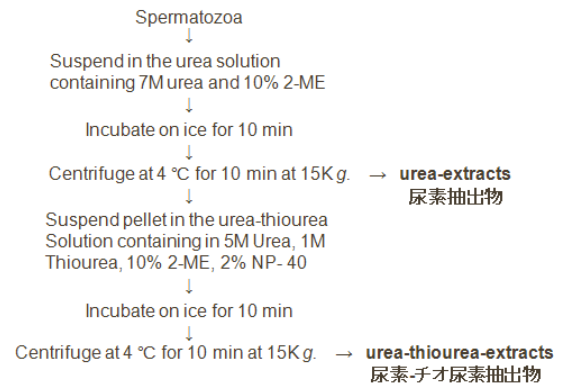


図 1 精子タンパク質プロトコール

- (3) 抗 PPP1CA, 1CB, 1CC 抗体、抗 PPP2 抗体、抗 PPP3 抗体を用いたウエスタンブロッティングで精子タンパク質中の PPP の存在を確認した。
- (4) PPP 阻害による精子超活性化への影響を見るために、PPP 阻害剤 (PPP1/2 阻害剤: オカダ酸、カリキュリン A、トートマイシン、PPP3 阻害剤: デルタメスリン、フェンバレレート) (表 1) の添加による精子の超活性化率の変化を解析した。

PPP阻害剤	PPP1	PPP2	PPP3
オカダ酸	10-15nM	0.1nM	-
カリキュリンA	2nM	0.5-1.0nM	-
トートマイシン	1nM	10nM	-
デルタメスリン	-	-	100pM
フェンバレレート	-	-	2-4nM

表 1 PPP 阻害剤の IC50 (50%阻害濃度)

- (5) PPP1CA および PPP2 の活性をそれ自身のリン酸化・脱リン酸化を見ることに

より評価した。尚、PPP1CAはThr-320のリン酸化、PPP2はTyr-307のリン酸化により不活性化することが解っている。

- (6) 最後に、精子タンパク質のチロシンリン酸化の変化をウエスタンブロッティングにより確認し、PPP1/2 阻害剤添加精子における変化と比較した。

4. 研究成果

- (1) ハムスター精子は3時間で概ね超活性化を完了した。

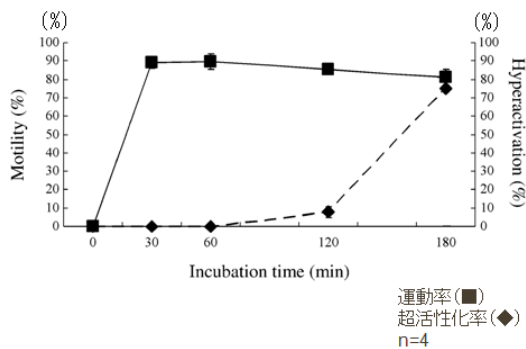


図2 精子運動率・超活性化率の変化

- (2) 精子が超活性化する間に時間依存性に増強する 12 種類のタンパク質チロシンリン酸化を検出した。
- (3) 精子中に PPP1CA、PPP1CC、PPP2 および PPP3 が存在することを確認した。
- (4) PPP1 および 2 の阻害により精子超活性化は有意に促進されたが、PPP3 を阻害しても不変であった (図 3-5)。

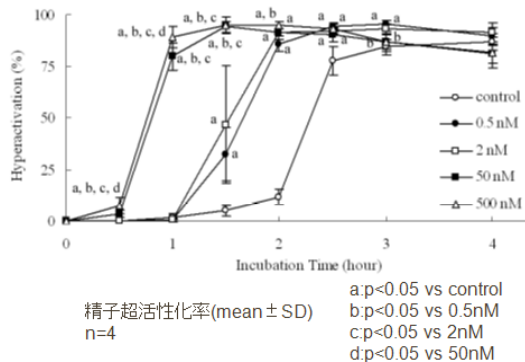
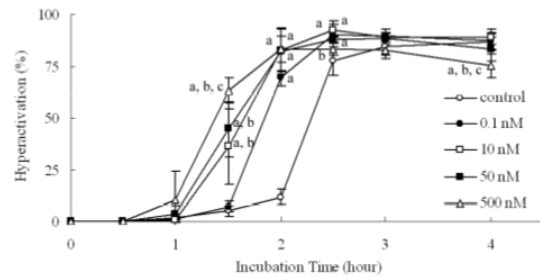
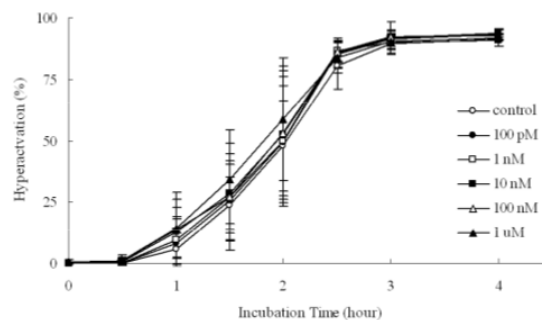


図3 オカダ酸の PPP1/2 阻害による精子超活性化の影響



精子超活性化率(mean ± SD) n=4
a:p<0.05 vs control
b:p<0.05 vs 0.1nM
c:p<0.05 vs 10nM

図4 カリキュリン A の PPP1/2 阻害による精子超活性化の影響



精子超活性化率(mean ± SD) n=4

図5 デルタメスリンの PPP3 阻害による精子超活性化の影響

- (5) 精子 PPP1CA は運動開始から2時間までリン酸化状態であり、3 時間以降で脱リン酸化した。一方、PPP2 は運動開始直後ではリン酸化しておらず、0.5 時間以後リン酸化した。PPP1CC のリン酸化は評価できなかった。
- (6) そして、PPP2 を阻害したにも関わらず AKAP の候補と考えられる 4 種類のタンパク質チロシンリン酸化はコントロールと不変であったが、一方 PPP1 を阻害すると増強した。

ハムスター精子中に PPP1CA、PPP1CC、PPP2 および PPP3 が存在したが、PPP3 は精子超活性化と関連性がなかった。また、PPP2 を阻害することにより精子超活性化が促進されたことにより、PPP2 は精子超活性化と関連性があることを初めて報告した。PPP1CA は精子超活性化が始まってから不活性化し、一方 PPP2 は始まる前に不活性化した。時間経過を考えると PPP1CA より PPP2 が作用していることが

想定される。一方 PPP1CC はリン酸化を確認することが出来ず、PPP1CC が超活性化に関わっているかどうかは不明であった (図 6)。

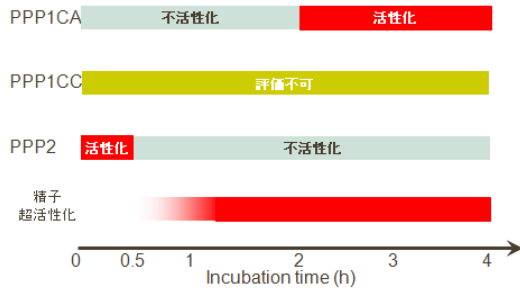


図 6 精子超活性化間の PPP 活性

また、AKAP の候補と考えられる 4 種類のタンパク質チロシンリン酸化は PPP2 阻害により調節された精子超活性化と関与しない傾向にあり、PPP2 の作用部位は今まで報告されている精子受精能獲得を調節するリン酸化カスケードとは異なる可能性があるとして評価した。

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 2 件)

- ① Suzuki T, Fujinoki M, Shibahara H, Suzuki M:
Regulation of hyperactivation by PPP2 in hamster spermatozoa.
Reproduction 139:847-856, 2010. 査読有
- ② 鈴木達也、柴原浩章、鈴木光明:
精子の capacitation.
日本哺乳動物卵子学会誌 27:166-175, 2010. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 鈴木達也、柴原浩章、鈴木光明:
精子超活性化に関与するプロテインフォスファターゼサブファミリーは 2A である。
第 62 回日本産科婦人科学会、2010 年 4 月 23 日、東京国際フォーラム
- ② 鈴木達也、藤ノ木政勝、柴原浩章、鈴木光明:
ハムスター精子において PPP2 は超活性化の調節に関与する。
第 55 回日本生殖医学会、2010 年 11 月 12 日、ホテルクレメント徳島

[その他]

ホームページ等

http://rseeds.jichi.ac.jp/research_seed/public/ResearchResultDetail.php?publicId=9GluMgt7Yu649v1J9CXbgWz44HDJ1f&resultCd=1§ionCd=236

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 達也 (SUZUKI TATSUYA)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：90348003

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：