

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07274

研究課題名（和文）精子における電位依存的酵素活性の時空間的検証

研究課題名（英文）Spatial and temporal analysis of voltage-sensing phosphatase activity in sperm

研究代表者

河合 喬文（Takafumi, Kawai）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70614915

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞の膜電位に応じて酵素活性を示すという特有の蛋白質VSPに着目した研究を行った。今回は、「VSPは精子の膜電位をいつ感知するのか」について研究を進め、未成熟精子の膜電位情報が重要であることを明らかにした。VSPはイノシトールリン脂質PIP2を基質としている。成熟状態の異なる精子を用いてPIP2のレベルを解析したところ、未成熟段階の精子で既にVSPの活性が生じていた。またVSPの膜電位感受性を変化させた変異体マウスを作製して検証を行ったところ、精子の運動性やイノシトールリン脂質量に変化が見られ、このことから未成熟精子の電位シグナルが精子の脂質環境の形成に重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで我々は、精子において「電気信号を化学信号に変換する」新規の機構が精子の運動性に重要であることを明らかにしていた。このことは、精子に起因する不妊治療などを考えるうえで非常に重要な問題であるが、一方でこれまでVSPがどのタイミングの電気信号を感知しているのかはまったくわかっていなかった。今回我々は、未成熟精子の電気信号がVSPの活性化に重要であることを初めて明らかにした。また、この点について、実際に精子のVSPの電位感受性を変化させることで確認した。このことは、精子の電気信号を人為的に制御することで、精子の機能調節も可能になることを示唆しており、重要な知見に繋がることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The study focused on the unique protein VSP, which exhibits enzymatic activity in response to the membrane potential of cells. In the present study, we investigated “when does VSP sense the membrane potential of sperm” and found that the membrane potential information of immature sperm is important. The PIP2 level was analyzed using spermatozoa in different states of maturity, and it was found that VSP activity already occurred in immature spermatozoa. Mutant mice with altered membrane potential sensitivity of VSP showed changes in sperm motility and inositol phospholipid levels, indicating that the potential signaling of immature sperm is important for the formation of the sperm lipid environment.

研究分野：生理学

キーワード：精子 膜電位 VSP

1. 研究開始当初の背景

神経細胞や筋細胞に代表されるように、全ての細胞は膜電位を有し、これを有効活用することで生命活動の維持に役立っている。一般的に、膜電位情報の感知は細胞膜に存在する「電位依存性イオンチャネル」により行われ、この蛋白質が細胞の膜電位変化に応じてイオン透過を行うことで機能することが知られている。電位依存性イオンチャネルには数十種類のバリエーションが存在するが、いずれの場合においても膜電位を感知する電位センサードメインと、イオン透過を行うポアドメインの二つより構成される。したがって、これらの分子は「電気信号」に応じて新たな「電気信号」を生成するという性質を持っており、このような性質から活動電位の生成などに貢献することが知られている。一方で我々が近年着目している電位依存性酵素 VSP(voltage sensing phosphatase)は、例外的に電位センサーにホスファターゼドメインが繋がった特有の構造を持ち、*in vitro* では膜の脱分極に伴ってイノシトールリン脂質(PIP2)を脱リン酸化するという興味深い機能を持つ(Murata et al. Nature, 2005)。すなわち VSP は「電気信号」を酵素反応という「化学信号」に変換するという稀有な機能を有している。これまでの研究から、VSP は種を通じて精巣に発現することが示されていたが、その生理機能は明らかにされてこなかった。

一方で我々はこれまでに、VSP 欠損マウスの精子を用いることで、(1) VSP が精子で機能して酵素活性を示していること(イノシトールリン脂質 PIP2 を脱リン酸化して減少させていること)、(2) VSP 欠損により精子の Ca²⁺シグナルに異常が見られること、(3)それにより精子の運動性に異常が生じ、(4)体外受精能が劇的に低下すること、等を明らかにしてきた(Kawai et al., PNAS, 2019)。以上の結果は、精子が VSP を介して膜電位依存的な酵素活性という独自の機構を有していることを示している。また興味深いことに凍結レプリカ法を用いた PIP2 標識実験により、マウス精子の鞭毛膜では PIP2 が軸方向に勾配をもって分布することを見出し、この勾配が VSP 欠損により消失することを明らかにしている(順天堂大・藤本教授との共同研究)。したがって VSP は精子の鞭毛において PIP2 の勾配を作り出していることが明らかとなった。このような精子特有の PIP2 勾配は、精子特異的イオンチャネルである Slo3 の制御に重要であることも見出した。

以上の結果は、精子における新たな膜電位感受機構という観点から大変興味深いだが、その一方で、未だ明らかにされていない問いが存在していた。すなわち「精子のどの成熟段階での膜電位シグナルが VSP の機能に寄与しているのか」である。我々は、このような時系列的な詳細を明らかにすることが、精子による新規の膜電位感知機構を理解するうえで極めて重要であると考えた。

2. 研究の目的

上記研究背景を踏まえ、本研究では、精子における VSP による膜電位の感知がどの段階で行っているのかを明らかにすることを目的とした。また、これまでの研究において *in vitro* での VSP の性質については非哺乳類を用いた実験のみが成功しており、哺乳類 VSP の発現実験に成功した報告は存在しないという問題も抱えていた。これは哺乳類 VSP が発現細胞系では細胞膜に効率よく輸送されないことに起因する。そこで本研究ではマウス VSP の配列に工夫を凝らすことで、哺乳類 VSP の具体的な電気生理学的性質を明らかにすることも目的とした。また、この実験が可能となった場合は、非哺乳類における VSP に関する知見を背景として種々の変異導入実験を行うことで、その動作原理の共通点・相違点を明らかにすることを第二の目的とした。さらにこれによって、VSP の電位感知メカニズムに関する考察が得られたら、実際にマウスを用いてその変異を導入したノックインマウスを作製し、VSP における電位感受能力の変化がどのようにその機能へと影響を及ぼすかを考察することを目的とした。

3. 研究の方法

精子の成熟段階に応じた VSP の活性を調べるため、様々な成熟状態にある精子を野生型および VSP 欠損型マウスより摘出し、そこに含まれるイノシトールリン脂質のプロファイルを特殊な質量分析法によって解析した(東京医科歯科大・佐々木雄彦教授との共同研究)。成熟精子および未成熟精子はそれぞれ精巣上体尾部および精巣上体頭部から摘出した。また精巣には未成熟精子とさらに未熟な精細胞が混在して存在している。これらを正確に分けるために、まずは遠心分離により未成熟な精巣精子を isolate する方法を過去の文献を基に確立した。さらに精細胞を純度よく摘出するため、過去の文献を参考にして FACS による細胞分離を行った。実際に高純度で精細胞が分離されていることを免疫細胞化学によって確認した。

また上記の通り、これまで哺乳類の VSP については、その電位依存性に関する知見が欠けているという弱点があった。この点を明らかにするため、マウス VSP の配列に工夫を凝らし、発現効

率の良いホヤ VSP の細胞内配列とのキメラ蛋白質を作製することで細胞膜への発現効率を上昇させることを試みた。この際、電位依存性酵素活性に重要な「電位センサードメイン」・「リンカードメイン」・「ホスファターゼドメイン」はマウス由来のものが維持されるように設計した。実際に作製したキメラ分子の機能検証にはアフリカツメガエル卵母細胞を用いた。VSP の作用については、そのリードアウトとして PIP2 感受性プローブである PLCdeltaPH-GFP、及び PIP2 依存性イオンチャネルである KCNQ2/3、そして GIRK チャネルを共発現させることによって行った。脱分極刺激によって VSP を活性化させ、PIP2 が減少することで蛍光強度や電流強度が変化するかを観察した。これにより、マウス VSP の電位依存性を詳細に解析した。また、マウス VSP について、電位センサードメイン、リンカードメイン、ホスファターゼドメインへと過去の非哺乳類 VSP に関する知見を基に変異導入を行い、その動作原理について考察を行った。

加えて未成熟精子の持つ膜電位情報を調べるため、精巣上体体部の精子を抽出し、グラミシジン穿孔パッチクランプによる膜電位測定を行った。

最後に、上記アフリカツメガエル卵母細胞を用いた実験から、マウス VSP の電位感知に重要な部分が同定されたため、実際にこの部分に変異を有する点変異マウスを作製した。そして、その精巣上体頭部および尾部から未成熟精子・成熟を抽出し、イノシトールリン脂質のプロファイルを検証した。加えて、成熟精子については運動能に変化があるか、体外受精能に変化が生じるかについて検証を行った。

4. 研究成果

精子の成熟段階に応じた VSP の活性を調べるため、様々な成熟状態にある精子について、VSP 欠損精子およびヘテロ精子を用いて、そのイノシトールリン脂質のプロファイルを検証した。今回は精巣の精細胞、精巣の未成熟精子、精巣上体の未成熟精子、成熟精子より質量分析による測定をおこなった(東京医科歯科大・佐々木雄彦教授との共同研究)。本手法では、イノシトールリン脂質のアシル基成分まで情報として得ることが可能である。まず、イノシトールリン脂質のアシル基について、精子の成熟に伴ってそのプロファイルが著しく変化することが明らかとなった。すなわち精子が成熟していくについてイノシトールリン脂質における多価不飽和脂肪酸の含有率が上昇していく様子がはじめて観察された。また、PIP2/PIP 比について VSP の欠損精子とヘテロ精子を比較すると、精巣精子の段階から既に VSP による活性の影響が見られていることが明らかとなった。すなわち精細胞の段階では両者間に有意傾向が見られたのに対し、精巣精子では有意な違いが観察された。また精子が精巣から精巣上体へと移動するにかけ、VSP の活性はさらに高くなっていることが分かり、精巣上体における成熟過程においても、引き続き VSP が重要な活性を持っていることが明らかとなった。この結果は、未成熟精子における膜電位情報が VSP の活性には必要であるという可能性を示唆している。

上述した通り、これまで哺乳類の VSP については、その電位依存性に関する知見が欠けているという弱点があった。そこで我々はこの点を克服するために、その配列に工夫をこらし、細胞膜への発現効率が上昇するマウス VSP を作製した。具体的には細胞膜発現効率の良いホヤ VSP を参考にし、N 端側の配列と細胞内ループの配列を導入・置換した。これにより、実際に細胞膜への発現効率が上昇することを生化学的に確認した。次に PIP2 プローブや PIP2 感受性イオンチャネルを用いてその電気生理学的な性質を調べたところマウス VSP は -30mV ほどから活性化を生じることが明らかとなった。またその応答はおおよそ 100mV ほどで saturation していた。上記研究結果から、マウス VSP が未成熟精子の膜電位を感知して機能していることが示唆されたため、実際に未成熟精子から電気生理学的計測を行い、その膜電位をグラミシジン穿孔パッチクランプ法により計測した。その結果、実際にこの測定値が -30mV から 0mV の範囲にあることを明らかにした。

また、上記発現細胞系でマウス VSP の電位センサードメイン・リンカードメイン・ホスファターゼドメインに対して点変異実験を行った。その結果、(1)電位感知能力を喪失する変異体、(2)電位感知能力が僅かに増加する変異体、(3)酵素活性を喪失する変異体などの同定に成功した。これらの結果は、既知の非哺乳類型 VSP の性質とも類似しており、マウス VSP は非哺乳類の VSP と類似した機構を用いることで機能していることが示唆された。

最後にこの発現実験系で同定された変異条件をもとに、それぞれ三種類のノックインマウスを作製し、精子の機能解析を行った。予想外のことに、電位感受性及び酵素活性を持たない変異体については VSP の発現自体が失われた。このことは、VSP の活性自体がその精子における発現維持に必要であることを示唆しており、過去の我々のノックインマウスを用いた研究結果(Kawai et al., PNAS, 2019)とも一致している。また電位感知能力を持たないマウスでも VSP の発現が失われたことは VSP による電位感知が精子においてもその機能発現に重要であることを示唆している。一方で電位感知能力が僅かに増加している変異体については、精子においても通常通りの発現が見られた。そこで、運動性や体外受精能、PIP2 の組成について検証を行った。その結果、運動性や PIP2 の組成についてはわずかながら、変化が確認された。以上の結果は、VSP が精子成熟時の膜電位を確かに感知していることを示すと共に、その活性自体が VSP を含めた膜蛋白質の発現に影響を及ぼし得ることを示唆している。

以上から、精子における VSP の電位感知機構の重要性をその時間軸と共に捉えることに成功

した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawai T*, Narita H, Konno K, Akter S, Andriani R, Iwasaki H, Nishikawa S, Yokoi N, Fukata Y, Fukata M, Wiriyasermkul P, Kongpracha P, Nagamori S, Takao K, Miyakawa T, Abe M, Sakimura K, Watanabe M, Nakagawa A, Okamura Y (* corresponding author)	4. 巻 479(11)
2. 論文標題 Insight into the function of a unique voltage-sensor protein (TMEM266) and its short form in mouse cerebellum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem J	6. 最初と最後の頁 1127-1145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20220033	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Ratanayotha A, Matsuda M, Kimura Y, Takenaga F, Mizuno T, Hossain MI, Higashijima SI, Kawai T*, Ogasawara M, Okamura Y* (* corresponding author)	4. 巻 5(1)
2. 論文標題 Voltage-sensing phosphatase (Vsp) regulates endocytosis-dependent nutrient absorption in chordate enterocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03916-6	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 該当する
1. 著者名 Paixao IC, Mizutani N, Matsuda M, Andriani RT, Kawai T, Nakagawa A, Okochi Y, Okamura Y	4. 巻 122(11)
2. 論文標題 Role of K364 next to the active site cysteine in voltage-dependent phosphatase activity of Ci-VSP	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophys J	6. 最初と最後の頁 2267-2284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2023.01.022	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Kawai Takafumi, Takao Keizo, Akter Sharmin, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Miyakawa Tsuyoshi, Okamura Yasushi	4. 巻 157
2. 論文標題 Heterogeneity of microglial proton channel in different brain regions and its relationship with aging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 624 ~ 641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15292	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kawai Takafumi, Hashimoto Masaki, Eguchi Natsuki, Nishino Junko M., Jinno Yuka, Mori-Kreiner Risa, Aspaker Mans, Chiba Daijiro, Ohtsuka Yukio, Kawanabe Akira, Nishino Atsuo S., Okamura Yasushi	4. 巻 296
2. 論文標題 Heterologous functional expression of ascidian Nav1 channels and close relationship with the evolutionary ancestor of vertebrate Nav channels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100783 ~ 100783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100783	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kawai Takafumi, Okamura Yasushi	4. 巻 13
2. 論文標題 Spotlight on the Binding Affinity of Ion Channels for Phosphoinositides: From the Study of Sperm Flagellum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 834180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2022.834180	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kawanabe Akira, Mizutani Natsuki, Polat Onur K., Yonezawa Tomoko, Kawai Takafumi, Mori Masayuki X., Okamura Yasushi	4. 巻 152
2. 論文標題 Engineering an enhanced voltage-sensing phosphatase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of General Physiology	6. 最初と最後の頁 e201912491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1085/jgp.201912491	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Sakaguchi Taiki, Okumura Ryu, Ono Chisato, Okuzaki Daisuke, Kawai Takafumi, Okochi Yoshifumi, Tanimura Natsuko, Murakami Mari, Kayama Hisako, Umemoto Eiji, Kioka Hidetaka, Ohtani Tomohito, Sakata Yasushi, Miyake Kensuke, Okamura Yasushi, Baba Yoshihiro, Takeda Kiyoshi	4. 巻 31
2. 論文標題 TRPM5 Negatively Regulates Calcium-Dependent Responses in Lipopolysaccharide-Stimulated B Lymphocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107755 ~ 107755
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107755	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kawai Takafumi, Okamura Yasushi	4. 巻 14
2. 論文標題 The Slo3/Lrrc52 complex is sensitive to phosphoinositides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Channels	6. 最初と最後の頁 190 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19336950.2020.1778393	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kawai Takafumi, Kayama Kento, Tatsumi Shoki, Akter Sharmin, Miyawaki Nana, Okochi Yoshifumi, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Yamamoto Hiroyasu, Kihara Shinji, Okamura Yasushi	4. 巻 34
2. 論文標題 Regulation of hepatic oxidative stress by voltage gated proton channels (Hv1/VSOP) in Kupffer cells and its potential relationship with glucose metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 15805 ~ 15821
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001056RRR	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kawai Takafumi, Takao Keizo, Akter Sharmin, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Miyakawa Tsuyoshi, Okamura Yasushi	4. 巻 157(3)
2. 論文標題 Heterogeneity of microglial proton channel in different brain regions and its relationship with aging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 624-641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15292	査読の有無 有
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2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Takafumi Kawai
2. 発表標題 Ion channel regulation by phosphoinositides phosphatase and its voltage-dependence in mice sperm flagellum
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河合喬文
2. 発表標題 電位依存性ホスファターゼによる精子鞭毛におけるイノシトールリン脂質極性形成とそのメカニズム
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔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

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