

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790084

研究課題名（和文）

プロテオミクスを利用した受精能獲得過程における精子放出タンパク質の機能解析

研究課題名（英文）

Proteomic analysis of sperm releasing proteins during capacitation

研究代表者

竹尾 透（TAKEO TORU）

熊本大学・生命資源研究・支援センター・助教

研究者番号：10517014

研究成果の概要（和文）：マウス精子の機能解析に有用な高感度プロテオミクスシステムを構築し、精子を構成するタンパク質の全体像および、受精能の獲得過程で生じるマウス精子から放出された微量タンパク質の同定に成功した。本研究により得られた知見は、新規分子を介した精子の受精能の制御機構の解明に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have developed a new technology of proteomics with high sensitivity for detecting trace of proteins released from mouse sperm during capacitation. Novel proteins derived from sperm were identified using the system. These findings suggested that identified proteins have potential to regulate the sperm functions which are useful to understand the mechanism of fertility control in sperm *via* the proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：受精、精子、シクロデキストリン、プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類精子は、雄性あるいは雌性生殖器内において、生化学あるいは生物学的な変化を経ることによって受精能を獲得する。我々は先に、環状マルトオリゴ糖である methyl- β -cyclodextrin (MBCD) が、マウス精子の体外培養条件下において、人工的に受精能獲得を誘起する作用を示すことを見出した。

(2) 本知見は、遺伝子改変マウスの凍結/融解精子の低受精能を劇的に改善することか

ら、マウス体外受精における有用な技術として実用化されている。さらに、我々は、MBCD の作用として、マウス凍結/融解精子の細胞膜からのコレステロールの流出を促進し、受精能獲得を効率的に誘起させていることを明らかにした。しかしながら、MBCD によるコレステロール流出が、精子の受精能獲得の分子機序において、どのように寄与しているかは明らかになっていない。

(3) MBCD の受精促進作用の分子メカニズムの解明を目的として、我々は、MBCD を処理した

精子について検討を進めてきた。その結果、MBCD がマウス精子における培養液中へのタンパク質放出を促進しているという興味深い現象を発見した。現在、哺乳類精子の受精能獲得は、雌性生殖器内で精子に付随する受精能阻害因子が遊離することにより、精子の活性化が起こり、受精能獲得が誘起されると考えられている。しかしながら、受精能獲得に関する分子メカニズムは、ほとんど解明されておらず、受精能阻害因子の同定されていないのが現状である。我々が発見した MBCD により促進される精子放出タンパク質は、受精能の制御に関与している可能性が高く、これらのタンパク質を同定することにより、哺乳類精子の受精能制御に関する新規分子メカニズムの解明が期待できる。

2. 研究の目的

我々は先に、MBCD が、体外受精におけるマウス凍結/融解精子の受精率を劇的に増加させることを明らかにした。さらに、MBCD 処理により、精子から培養液中へタンパク質の放出が顕著に増加するという興味深い知見を明らかにしている。

そこで本研究では、プロテオミクス手法を用いて精子放出タンパク質を同定し、精子の受精能に対する精子放出タンパク質の機能解析を行うことにより、精子の受精能を決定している因子及び制御機構の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) マウス精子の構成タンパク質を網羅的に同定できる高感度プロテオミクスシステムの構築を行った。

C57BL/6 系統の成熟雄マウスから、精巣上部尾部精子を回収し、精子からタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質を HPLC(逆相カラム)にて分画および精製を行った。回収したタンパク質を凍結乾燥した後に、BCA 法によりタンパク質を定量した。タンパク質をトリプシンで消化した後に、iTRAQ (Applied Biosystems) のプロトコルに従い同位体標識化処理を行った。凍結乾燥処理した後に、ペプチドを HPLC(強陽イオン交換カラム)にてさらに分画した。

分画したサンプルを Nano-LC/MALDI スポットティングシステムを利用して、サンプルプレートにスポットした。MALDI-TOF 型質量分析装置によりペプチドを測定し、マススペクトルを得た。得られたペプチドの情報をデータベースにより解析し、精子構成タンパク質を同定した。

本解析により得られたデータを基に、精子タンパク質リストの作成および、バイオインフォマティクス手法を利用して精子構成タンパク質の分類を行った。同定したタンパク質のアノテーションには、下記のデータベ

スを使用した。

- Gene ontology (<http://www.geneontology.org/>)
- Reactome skypainter (<http://www.reactome.org/cgi-bin/skypainter2>)
- Genecodis (<http://genecodis.dacya.ucm.es/>)

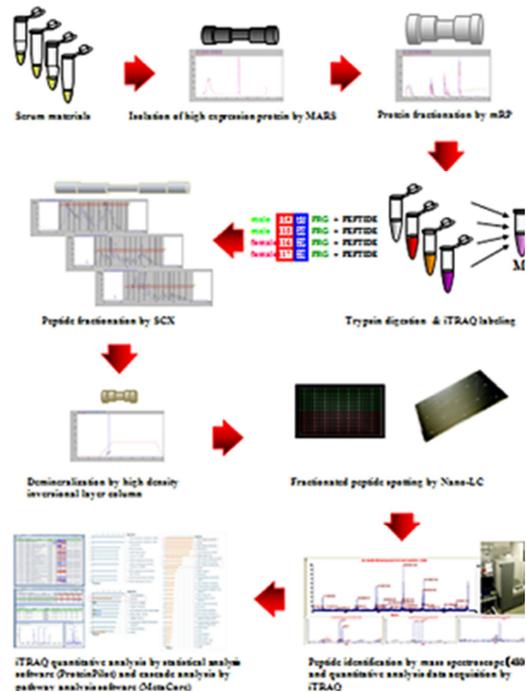


図 1 高感度プロテオミクスシステム

なお、本実験により、確立された技術を使用して、精子構成タンパク質のリスト化および精子放出タンパク質の同定および解析を行った(図 1)。

(2) マウス精子から放出されるタンパク質による受精能制御機構の解明を目的として、精子放出タンパク質の同定を行った。C57BL/6 系統の成熟雄マウスから、精巣上部尾部精子を回収し、MBCD 含有あるいは不含有培地中で培養した。培養後、精子と上清を分離し、それぞれのサンプルからタンパク質を抽出した。回収したタンパク質は、上記と同様の処理により、分画・精製、ペプチド化、iTRAQ 標識、分画を行った。各サンプルをスポットティングした後に、MALDI-TOF 型質量分析装置によりペプチドを測定し、マススペクトルを得た。得られたペプチドは、データベースにより解析し、iTRAQ 標識のデータより増減が認められたタンパク質を同定した。さらに、同定されたタンパク質について、バイオインフォマティクス手法を利用して解

析を行った。

4. 研究成果

(1) マウス構成タンパク質のリスト化

本研究により開発した高感度プロテオミクスシステムにより、マウス精子のプロテオーム解析を行い、4,457種類の精子構成タンパク質を同定することに成功した。現在までに、報告されているマウス精子の構成タンパク質は、858種類であったが、本技術により飛躍的にマウス精子を構成するタンパク質を明らかにすることができた。本知見により、約3,600種類の新規精子構成タンパク質が明らかになり、これまで未知であったマウス精子の全体像をタンパク質レベルで鮮明に示すことに成功した。得られたマウス構成タンパク質のリストを基に、バイオインフォマティクス手法を利用して、マウス精子構成タンパク質の分類を行った(図1)。

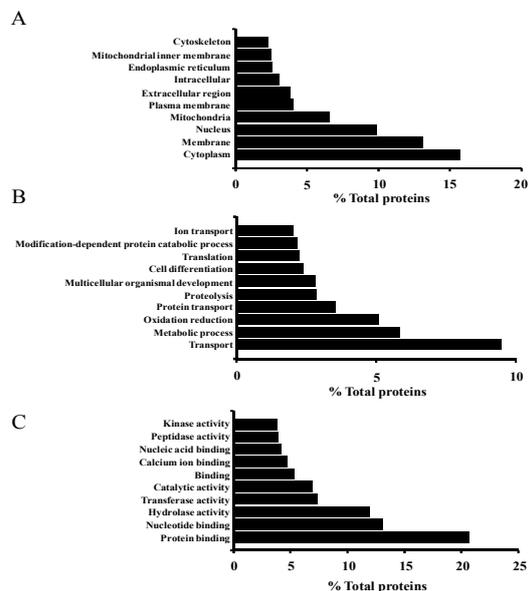


図2 マウス精子の構成タンパク質

同定されたタンパク質の分類 (A) cellular component、(B) biological process、(C) Molecular function.

(2) 受精能獲得過程における精子放出タンパク質の同定および機能解析

マウス精子を MBCD 含有培地中で培養し、上清中に放出される精子放出タンパク質の解同定および解析を行った。その結果、マウス精子が受精能を獲得する際に、精子から放出される微量タンパク質の同定にも成功した。同定された精子放出タンパク質の中には、精子の受精能制御に関与することが、既に知られているタンパク質も含まれていたが、その大部分は機能が解明されていないタンパク質であった。精子受精能の制御に関与する可

能性が高いタンパク質群の機能として、ペプチダーゼ、メンブレントラフィック、サイトカインを介したシグナル伝達に関与する分子の存在が明らかになった(図3)。今後、本知見を基に、これらタンパク質の詳細な機能解析が必要である。

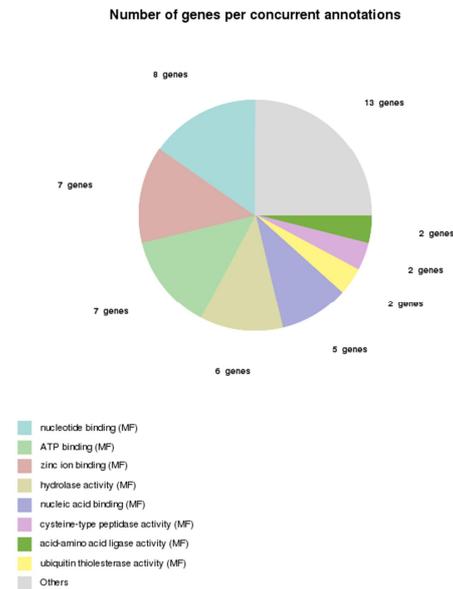


図3 受精能獲得過程に増加する精子放出タンパク質の機能

(3) 本知見により、マウス精子の受精機能の制御機構に関与する候補分子として、種々の精子放出タンパク質を同定することに成功した。以上、本研究は、マウスの精子構成タンパク質の全体像や受精能の変化に伴う精子の構成タンパク質の変動を明らかにし、マウス精子の受精機能制御に有用な基礎的知見として、今後の体外受精技術の改良に極めて有用な情報を提供するものである。

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)

[学会発表] (計3件)

1. 竹尾 透、三池 浩一郎、今中 応亘、三池 輝久、山村 研一、中瀬 直己

プロテオミクスにより明らかになったマウス精子の系統特異的なタンパク質発現パターン

日本薬学会 131 年会、静岡、ツインメッセ静岡、2011 年 3 月 31 日

2. 竹尾 透、三池浩一郎、今中応亘、三池輝久、山村研一、中潟直己

プロテオミクス手法を利用したマウス精子の系統間比較

第 57 回日本実験動物学会、京都、京都テルサ、2010 年 5 月 15 日

3. 竹尾 透、三池浩一郎、今中応亘、三池輝久、山村研一、中潟直己

マウス精子のプロテオミクス

第 23 回動物生殖工学研究会、東京、北里大学、2009 年 12 月 5 日

[その他]

ホームページ等

当研究室 HP :

<http://card.medic.kumamoto-u.ac.jp/card/japanese/kenkyu/sigen/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹尾 透 (TAKEO TORU)

熊本大学・生命資源・研究支援センター・助教

研究者番号 : 10517014