

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590170

研究課題名（和文） PACAP を介した精子-卵丘細胞の相互作用と受精における役割

研究課題名（英文） The role of PACAP-mediated sperm-cumulus cell interaction in fertilization

研究代表者

谷井 一郎（TANII ICHIRO）

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）：教授

研究者番号：40207171

研究成果の概要（和文）：哺乳類の卵を取り囲む卵丘細胞には受精を促進する役割もあることが示唆されているが、そのメカニズムは解明されていない。本研究は、精子先体には PACAP が含まれていること、PACAP を卵丘細胞に作用させると受精を促進する因子が分泌されることを示した。この因子は精子の透明帯貫通に必要な鞭毛運動と先体反応率を上昇させ、結果として体外受精率を促進した。PACAP に応答して卵丘細胞が分泌する受精促進因子としてニューロキニン A を同定した。

研究成果の概要（英文）：Cumulus cells have been suggested to promote fertilization although the precise mechanism remains unclear. We showed that PACAP was present in the mouse sperm acrosome and it stimulated cumulus cells to secrete fertilization-promoting factors which accelerate sperm penetration through the zona pellucida. We identified neurokinin A as a cumulus cell factor that enhanced both the sperm motility and acrosome reaction which are necessary for sperm to penetrate the zona pellucida.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：発生学・形態形成学・受精

1. 研究開始当初の背景

(1) 精子細胞内部の発達中の先体内部には PACAP が存在することは報告されていた。しかし、形態的に完成した精子先体内部に PACAP の存在が確認されていないために、その役割については不明であった。

(2) 卵丘細胞の受精における役割は、一般的

に精子通過の障壁になることが知られているが、受精を促進する役割についてはまだ十分な研究が行われていない。

(3) 近年、精子と卵丘細胞の相互作用が受精に何らかの役割を果たしているいくつかの証拠が挙げられてきた。

2. 研究の目的

- (1) 成熟精子先体に PACAP が存在することを確かめる。
- (2) 卵丘細胞には PACAP 受容体が存在するので、PACAP の卵丘細胞への作用を調べる。
- (3) PACAP を介した精子と卵丘細胞の相互作用を解析する。

3. 研究の方法

- (1) 精子における PACAP の局在は、マイルドな固定条件下で固定した精子を用い、PACAP 特異抗体による蛍光抗体法により調べた。
- (2) 排卵された卵丘細胞-卵複合体を PACAP で前処理してから媒精して受精率を調べた。また、透明帯を通過する精子の数をカウントして PACAP 処理の影響を調べた。
- (3) 卵丘細胞-卵複合体を PACAP 添加培地でインキュベートしたときに培地に放出される因子が精子の運動に及ぼす影響を精子運動能解析装置で調べた。
- (4) 透明帯に誘導されて起こる先体反応に対して上記(3)の因子がどのような影響を与えるかを調べた。
- (5) PACAP 処理により卵丘細胞から放出される因子を同定するために、PACAP 処理液を PACAP 処理液に含まれる成分を質量分析にかけた。
- (6) 上と同様な目的で、PACAP 処理により卵有細胞で発現上昇する遺伝子を DNA マイクロアレイによって網羅的に検索した。
- (7) (6)の結果からニューロキニン A が卵丘細胞分泌因子の最有力候補と推測されたので、ニューロキニン A 受容体に対するアンタゴニストを精子に作用させてみて、PACAP 処理液による精子運動能と先体反応率上昇を抑制するかどうかを調べた。

4. 研究成果

本研究により以下の結果が得られた。

- (1) 下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド (PACAP) が精子先体内部に存在した。
- (2) 排卵後の卵周囲を取り囲む放線冠卵丘細胞に PACAP 特異的受容体 PAC1R が存在した。
- (3) 卵丘細胞-卵複合体に PACAP をさせると精子の透明帯通過率が上昇し、結果的に受精が促進された。
- (4) 卵丘細胞-卵複合体を PACAP 処理したときに放出される因子を含む培地を精子に作用させると、精子鞭毛運動の振幅が大きくなると同時に、透明帯に誘導されて起こる先体反応率が上昇し、その結果として、精子の透明帯貫通能力を高めた。
- (5) 卵丘細胞-卵複合体を PACAP 処理した

ときに放出される成分を質量分析により解析したところ、PACAP 処理によりプロゲステロン濃度が上昇していた。

(6) 卵丘細胞に PACAP が結合することにより発現上昇が起こる遺伝子を DNA マイクロアレイによって網羅的に検索したところ、サブスタンス P, ニューロキニン A などをコードする TAC1 遺伝子の発現率が 6 倍以上上昇した。

(7) マウス精子にはニューロキニン A と強く結合する受容体 NK-2R が存在しているので、NK-2R のアンタゴニストを精子に作用させたところ、PACAP により引き起こされる受精促進、精子運動能亢進、先体反応率上昇を抑制した。

以上の結果は、精子先体の PACAP は卵丘細胞に作用して受精を促進する因子を分泌させること、ニューロキニン A はその分泌因子の 1 つであることが示す。これより精子先体に含まれている PACAP は精子-卵丘細胞相互作用の中心的な役割をもつと考えられる。

哺乳類精子の受精に関する国内外の研究において、卵丘細胞の役割を分子レベルで明確に証明した研究は少ない。本研究は、卵丘細胞が受精に重要な役割をもつことを当該分野の研究者に認識させるものとなったと考えている。

ここで得られた成果は、不妊治療の 1 つとして行われている体外受精に応用可能である。現在体外受精の成功率は 3 割程度であるが、体外受精培地に PACAP を添加することによっての成功率を高めることが期待される。PACAP は精子に含まれ、受精時に作用しているので、PACAP を用いることは安全性の面でも問題がないと考えられる。さらに、家畜増産および希少哺乳動物の保護の目的で行う体外受精にも応用可能である。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Tanii, I., Aradate, T., Matsuda, K., Komiya, A. and Fuse, H.:
PACAP-mediated sperm-cumulus cell interaction promotes fertilization.
Reproduction, 査読有り, 141 (2011)

[学会発表] (計 9 件)

1. 谷井一郎, 荒籠忠, 高崎一朗, 小宮顕, 松田恒平: 哺乳類精子-卵丘細胞相互作用におけるニューロキニンAの役割。

- 第 118 回日本解剖学会総会・学術集会, 2013, 3, 28-30, 高松
2. 荒舘忠, 谷井一郎, 小宮顕: フラバン二量体とその関連化合物によるマウス精子の超活性化様運動の誘導効果. 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013, 3, 24-28, 仙台
 3. 荒舘忠, 谷井一郎, 小宮顕: マウス精子のハイパーアクチベーション様運動を誘導する植物成分フラバン二量体の効果. 第 31 回日本アンドロロジー学会, 2012, 6, 29-30, 神戸
 4. 谷井一郎, 荒舘忠, 高崎一朗, 小宮顕, 松田恒平: 神経ペプチドを介する精子と卵丘細胞のクロストークとその受精における役割. 第 31 回日本アンドロロジー学会, 2012, 6, 29-30, 神戸
 5. 谷井一郎, 荒舘忠, 高崎一朗, 小宮顕, 松田恒平: 精子先体PACAPによる卵丘細胞のTAC1 遺伝子の発現上昇とその役割. 第 117 回日本解剖学会総会・学術集会, 2012, 3, 26-28, 甲府
 6. 荒舘忠, 谷井一郎, 小宮顕: マウス精子のハイパーアクチベーション様運動を誘導する植物成分の探索. 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012, 3, 23-26, 京都
 7. 谷井一郎, 荒舘忠, 松田恒平: 精子先体の下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド (PACAP) の受精における役割. 第 52 回日本組織細胞化学会, 2011, 9, 24-25, 金沢
 8. Tanii, I., Matsuda, K., Aradate, T., Komiya, A.: PACAP-mediated sperm-cumulus cell interaction promotes fertilization. 第 25 回日本生殖免疫学会学術集会・国際生殖免疫学シンポジウム, 2010, 8, 28-29, Osaka
 9. 谷井一郎, 松田恒平, 荒舘忠: 下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) を介した精子-卵丘細胞相互作用と受精における役割. 第 115 回日本解剖学会総会・学術集会, 2010, 3, 28-30, 盛岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷井 一郎 (TANII ICHIRO)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号: 4 0 2 0 7 1 7 1

(2) 研究分担者

荒舘 忠 (ARADATE TADASHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号: 3 0 3 0 3 2 3 3

(3) 連携研究者

松田 恒平 (MATSUDA KOUHEI)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・教授

研究者番号: 6 0 2 2 2 3 0 3