

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32717

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22791502

研究課題名(和文) 精嚢分泌タンパク質による精子膜構造の制御を介した受精能抑制機構の解明

研究課題名(英文) Study of the mechanism for controlling of sperm function via membrane structure with proteins secreted by seminal vesicle

研究代表者

吉田 薫 (Yoshida, Kaoru)

桐蔭横浜大学・先端医用工学センター・講師

研究者番号：70398973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：精嚢分泌タンパク質Semenogelinは精子運動超活性化の抑制因子であり、これまでの先体胞反応およびタンパク質チロシンリン酸化抑制因子であるという報告と合わせて精子受精能抑制因子であることが示された。その作用機序について、精子細胞膜のコレステロールに直接結合する可能性があり、細胞膜脂質ラフト構造との直接の関与は未だ不明だが、精子細胞膜の流動性制御により受精能を抑制していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Seminal vesicle secreted protein, semenogelins(SEMGs) are one of inhibitory factor for hyperactivation of sperm motility. Our previous study has revealed that SEMGs were also inhibitory factors for acrosome reaction and protein tyrosin phosphorylation. Collectively, SEMGs may be inhibitory factors for sperm capacitation. However, it is still unclear that the direct interaction between lipid raft and SEMGs. Our study suggests that SEMGs can bind to cholesterol and effect on sperm membrane fluidity and on function for capacitation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：精子 受精能 膜ラフト 糖脂質 膜タンパク質 コレステロール アンドロロジ

1. 研究開始当初の背景

精巣内で形成された精子は、運動能・受精能は持たず、機能的には未熟である。この未熟な精子は精巣上体で運動能を獲得し、放精の際に運動を開始する(精子運動開始)。この過程において、卵や雌性生殖器官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。また哺乳類をはじめとした一部の動物では、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判っている。これまでに精漿中の精子受精能獲得を抑制する因子(受精能抑制因子)として種々の物質が研究されて来た。前立腺から分泌される prostasome はコレステロールを多量に含む顆粒状の物質であり、ヒト精子においては精子細胞膜の流動性を低下させ(E Carlini, *et al.* (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* 343, 6-12.)、先体反応を抑制する(NL Cross & P Mahasreshti (1997) *Arch. Androl.* 39, 39-44.)。また、最近マウスの受精能抑制因子の受容体が GPI アンカータンパク質であるという報告があり(R Gibbons, *et al.* (2005) *Reproduction* 130, 497-508.)、さらに精巣上体由来の受精能抑制因子の幾つかの候補が示されている(B Nixon, *et al.* (2006) *Biol. Reprod.* 74, 275-287.)。一方、副生殖腺の一つである精囊からも精子運動抑制因子が同定されている(H Lilja, *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 1894-1900.; T Iwamoto, *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 368, 420-424.)。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り、注目されている研究分野である。しかし、未だに受精能抑制因子の生理的作用における分子メカニズムは明らかになっていない。研究代表者である吉田薫は研究協力者である岩本晃明との共同研究で精囊由来のヒト精子運動抑制物質である semenogelin 1&2(SEMG1&2)の研究を行い、SEMG の PSA (前立腺特異抗原) による分解産物が運動抑制すること、SEMG が活性酸素産生経路経由で受精能獲得を抑制することを示した(E de Lamirande, K Yoshida, *et al.* (2001) *J Androl.* 22(4), 672-9)。また研究協力者の吉田学等は、SEMG のマウスにおける相同タンパク質である SVS2 が *in vivo* において受精能抑制因子として働くことをごく最近明らかにしている(N Kawano & M Yoshida, (2007) *Biol. Reprod.* 76, 353-61)。さらに最近、研究代表者も参加して、その分子の作用機構の研究を行い、精子細胞膜のガングリオシド GM1 が SVS2 の標的分子であることを明らかにした(N Kawano, K Yoshida, *et al.* (2008) *Biol. Reprod.* 79(6), 1153-9)。以上のように研究代表者はこの分野において、特に精子運動調節機構の研究では多くの成果を挙げている。さらに近年、特にヒト精子の運動調節につい

ては運動活性化における亜鉛イオンの働きが SEMG を介したものであること(K Yoshida, N Kawano, *et al.* *Mol Hum Reprod.* (2008) 14(3), 151-6.) また SEMG は精子膜電位の過分極を引き起こし、膜構造を変化させるものであること(Yoshida K, *et al.* *Cell Motil Cytoskeleton.* (2009) 66(2), 99-108.) を明らかにした。しかし、哺乳類精子は受精能獲得により精子の運動様式が大幅に変化するため、受精能獲得機構の理解なしには運動調節機構の研究もあり得ないと感じるに至った。そのため、マウスにおける受精能獲得の研究を進めることで、これまで不明だった受精能抑制因子の生理的作用を明らかにしつつある。しかしながら、ヒトのモデルとしてマウスを研究対象とするのはやはり限界があり、臨床応用を見据えた基礎研究をヒトを対象として行う必要がある。ここ数年この分野の論文が増える傾向にあり、先進性を保つためにも、これまでのマウスでの研究成果を土台としたヒト精子での研究が必要であると考へ、本研究課題の申請に至った。

2. 研究の目的

本研究では受精の過程において精子の運動能・受精能が精囊分泌タンパク質によって調節されるメカニズムについてその全貌を解明することを最終目的とする。本申請課題の研究期間においては精囊分泌タンパク質による精子膜構造の制御を介した精子運動・受精能獲得の抑制機構について研究を行う。申請者はこれまでに SEMG が精子の運動及び受精能獲得過程を抑制する作用を持つことを明らかにしてきている。しかしながらその受容分子機構についてはガングリオシド GM1 の関与の他はほとんど明らかになっていない。これには特異的な受容体が存在する場合、その受容体が精子膜ラフト構造に関連して存在することが考えられるので受容体と相互作用する構成タンパク質を同定しシグナル伝達経路を明らかにする。一方、ヒト精子において受精能獲得前後で SEMG が精子膜ラフト構造の変化に影響を及ぼすことをこれまでの研究で確認しているため SEMG の結合タンパク質と精子膜ラフト構造の関連について検討する。これらの研究は研究協力者らと先行して行っているマウスにおける相同タンパク質である SVS2 の作用機序を動物モデルとして行う。これらの研究からヒトにおいても精囊分泌タンパク質による精子運動及び受精能獲得の抑制は、受容体を介してあるいは膜ラフト構造の変化を直接抑制することにより起こっている現象であることが説明できる。また、SEMG は ATPase 阻害作用があると考えられており、実際精子中片ミトコンドリアに結合することも観察されているため、精子ミトコンドリア機能と運動性の関連についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 膜ラフト構造への影響の検討: ヒト精子における SEMG による膜ラフト構造への影響はこれまでの研究である程度明らかになってきているが、精子の洗浄法および固定法等に大きく影響を受けるので慎重に検討する必要がある。従って、本研究では改めて精子洗浄法による膜ラフト構造変化を検討する。具体的には、精子を採取し各種洗浄の後、受精能獲得のための培地中で培養する際に培地に Sg を添加して先体反応及び精子運動超活性化と膜ラフト構造の変化を検出する。また、膜ラフト画分を定法に従って精製し、その構成タンパク質についてウエスタンブロットによる解析を行う。

(2) 精子ミトコンドリアと運動性の関連検討: SEMG が精子中片部に結合している可能性は電子顕微鏡観察で明らかになってきているがミトコンドリア機能との関連については未だ検討されていない。ヒトでは特に精子集団がヘテロであり、集団として解析するとその差異が検出できない可能性が大きい。そこで本研究では新しい試みとしてシングルセル PCR 用のスライドチャンバーを用い、運動性を観察した上で SEMG との結合性を確認し、さらに PCR によりミトコンドリア DNA 量および欠失の有無を検出することで精子一細胞ごとにミトコンドリア機能と運動性の関連を検討する。

4. 研究成果

(1) 膜ラフト構造への影響の検討: 精子洗浄法による膜ラフト構造変化を検討した。具体的には、精子を採取し各種洗浄の後、受精能獲得のための培地中で培養する際に培地に Sg を添加して先体反応及び精子運動超活性化と膜ラフト構造の変化を観察した。その結果、溶液の pH が SEMG の精子膜への結合に影響することを見いだした。これは精子が遭遇する環境の pH 変化と照らし合わせると非常に興味深い現象である。また、PFA による固定が SEMG の精子膜への結合に影響することを見いだした。架橋を行わない方法も検討した。SEMG 抗体による精子膜画分の免疫沈降で EPC 複合体構成成分の検出を試みた。膜ラフト画分を定法に従って精製を試みたが、その後の他の研究の展開によりラフトマーカの分布について異論があり、さらなる検討が必要となった。

(2) 精子ミトコンドリアと運動性の関連検討: 研究計画では新しい試みとしてシングルセル PCR 用のスライドチャンバーを用い、運動性を観察した上で SEMG との結合性を確認し、さらに PCR によりミトコンドリア DNA 量および欠失の有無を検出することで精子一細胞ごとにミトコンドリア機能と運動性の関連を検討することになっていたが、交付予定額が機材の購入必要額に満たないため購入は断念せざるを得なかった。そこで、96 穴プレートにてシングルセル PCR を行う検討を

行ったが、直接のミトコンドリア遺伝子増幅は困難であり、解決策としてあらかじめ全ゲノムを非特異に増幅する方法を検討し、増幅が可能であることは確認できたが、研究期間内に目的遺伝子の増幅には至らなかった。

本研究期間後半に連携研究者である吉田らによって SVSK0 マウスの解析が終了した。SEMG のマウス相同タンパク質である SVS2 の役割は子宮における殺精子作用からの精子の保護であり、SVS2K0 マウスでは精子が子宮内で死滅するために輸卵管には侵入できないことが明らかとなった。また、同連携研究者らによる最近の研究ではその保護作用が精子膜コレステロールの直接制御であることが示唆されている。そこで、上記研究方法に加えて、最終年度はヒト精子においても SEMG による精子膜コレステロール制御について検討を行った。その結果、SEMG の作用によりコレステロールの増減が観察された。個体差が大きいため、結論には至らず、今後のさらなる検討が必要ではあるが、ヒトにおいてもその受精能獲得抑制作用は精子膜コレステロールの直接制御であることが示唆された。

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3件)

- Terai K, Yoshida K, Yoshiike M, Fujime M, Iwamoto T. Association of seminal plasma motility inhibitors/semenogelins with sperm in asthenozoospermia-infertile men ***Urologia Internationalis*** 査読有 85, 2010, 209-215
- Kawano N, Yoshida K, Miyado K, and Yoshida M. Lipid Rafts: Keys to Sperm Maturation, Fertilization, and Early Embryogenesis ***Journal of Lipids*** 査読有 2011 Article ID 264706
- Kawano N, Araki N, Yoshida K, Hibino T, Ohnami N, Makino M, Kanai S, Hasuwa H, Yoshida M, Miyado K, Umezawa A. Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 査読有 2014, 111(11):4145-50. doi:10.1073/pnas.1320715111.

[学会発表](計6件)

- Terai K, Yoshida K, Yoshiike M, Iwamoto T, Matsuura R, Yoshida A. Evaluation of sperm quality based on SPMIs binding on ICSI outcome.

11th International Symposium on SPERMATOLOGY Okinawa 2010
2010.6.2 Okinawa Convention Center,
Japan

- ・ 河野菜摘子、荒木直也、吉田薫、吉田学、宮戸健二 精囊分泌タンパク SVS2 のマウス体内受精における役割について **日本動物学会第82回大会** 2011年9月21-23日、旭川
- ・ 荒木直也 吉田薫 河野菜摘子 宮戸健二 吉田学 マウス精子受精能獲得における精囊分泌タンパク質 SVSs の機能解析 **第34回日本分子生物学会年会** 2011年12月13-16日、横浜
- ・ 荒木直也、河野菜摘子、吉田薫、宮戸健二、吉田学 マウス受精能獲得抑制因子 SVS2 の精子膜コレステロール維持作用 **日本動物学会第83回大会** 2012年09月13-15日、大阪大学
- ・ Araki N, Yoshida K, Kawano N, Miyado K, and Yoshida M. SVS2 inhibits sperm capacitation by regulating the efflux of cholesterol from sperm plasma membrane. **The International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants** 2012.11.12-16 Nagoya, Japan
- ・ 吉田薫、山崎一恭、吉池美紀、岩本晃明 精漿タンパク質 SEMG の精子の受精能評価マーカーとしての検討 **第58回日本生殖医学会学術総会** 2013年11月15-16日、神戸国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 薫 (YOSHIDA KAORU)
桐蔭横浜大学・先端医用工学センター・講師
研究者番号：70398973

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

岩本 晃明 (IWAMOTO TERUAKI)
国際医療福祉大学・大学病院・教授
研究者番号：60046117

吉田 学 (YOSHIDA MANABU)
東京大学大学院・理学系研究科・准教授