

## 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 6月 10日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23800038

研究課題名（和文）遺伝子改変動物を用いた精子機能調節におけるカルシウムシグナル伝達機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of calcium-signaling cascade in the regulation of sperm function using gene-modified animals

研究代表者

宮田 治彦 (MIYATA HARUHIKO)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：50604732

研究成果の概要（和文）：精子機能の調節におけるカルシニューリンの役割を理解するために、精巣特異的に発現しているカルシニューリンのノックアウト(KO)マウスを作製し解析を行った。その結果、カルシニューリンは精子運動性の維持に重要であり、受精に必要不可欠であることが分かった。KO精子の形態には特に問題は見つからなかった。また、同じくカルシウム依存性の酵素であるカルパインに着目し、精巣で特異的に発現しているカルパインのノックアウトマウスを作製した。

研究成果の概要（英文）：I made a knockout (KO) mouse that lacks testis-specific calcineurin to understand its role in the regulation of sperm fertilizing ability. As a result, I found that calcineurin is important to maintain sperm motility and is necessary for fertilization. There were no problems found in the morphology of KO sperm. I also made a knockout mouse that lacks testis-specific calpain that is a calcium-dependent enzyme like calcineurin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：受精、精子、カルシウム

## 1. 研究開始当初の背景

10組に1組のカップルは不妊に悩んでいると言われている。一方で男性(雄)用避妊薬の必要性がヒトを含む様々な動物で言われている。これらの問題の原因を解明または解決するためには受精の分子メカニズムを理解することが重要である。哺乳類の受精において、射出されたばかりの精子は受精能を保持しておらず、カルシウムを介したシグナル伝

達機構によって活性化されることが知られている(Darszon et al, 2001, Reproduction)。しかし、その詳しいシグナル伝達機構は分かっていない。

## 2. 研究の目的

カルシウムによって活性化される酵素、カルシニューリンとカルパインに着目した。カルシニューリンはカルシウムによって活性化

される脱リン酸化酵素である。阻害剤を使用した実験からカルシニューリンが精子の超活性化や先体反応に関わっている可能性が示唆されている (Ahmad et al, Arch Andol, 1995; Castillo Bennett et al, J Biol Chem, 2010)。カルシニューリンの触媒サブユニットには3種類のアイソフォームが存在するが、そのうちの1つである Ppp3cc は精巣で発現しているアイソフォームとして発見された (Muramatsu et al, Proc Natl Acad Sci USA, 1992)。一方、カルパインはカルシウムによって活性化されるタンパク質分解酵素であり、成熟精子においては先体に局在している (Ben-Aharon et al, Mol Reprod Dev, 2006)。また阻害剤を使った実験によりカルパインが先体反応に関わっている事が示唆されている (Ben-Aharon et al, Reproduction, 2005)。本研究では、これらの遺伝子のノックアウト (KO) マウスを作製し、受精におけるこれらの酵素の役割を個体レベルで解析する。

### 3. 研究の方法

カルシニューリンとカルパインの KO マウスを作製し、雄の妊孕性を調べる。また、体外受精の系を用いて KO 精子の受精能を詳細に解析する。さらに、KO マウスを精子先体が緑色、ミトコンドリアが赤色の蛍光を示す TG マウス (RBGS/Red Body Green Sperm) と交配させて RBGS・KO マウスを得ることにより、雌性生殖器官内における KO 精子の挙動を解析する。

### 4. 研究成果

(1) 精巣で特異的に発現しているカルシニューリン (Ppp3cc) の KO マウスを作製した。KO 雄マウスを野生型の雌マウスと交配させたところ、KO マウスは雄性不妊を示すことが分かった (図 1)。

(2) 精子を頭部と鞭毛に分画しウェスタンブロッティングを行うと、カルシニューリンの触媒サブユニット (PPP3CC) と調節サブユニット (PPP3R2) のどちらも鞭毛画分に観察された。また、抗 PPP3R2 抗体を用いて免疫沈降を行うと PPP3CC が共沈物として観察された。これらのことから PPP3CC と PPP3R2 が複合体を形成して精子鞭毛に局在していると考えられる。さらに、Ppp3cc・KO 精子において、PPP3R2 の発現量が低くなっていた。同じ調節サブユニットである PPP3R1 は、ヘテロ型の精子でもほとんど発現が見られなかった (図 2)。このことから、PPP3CC は PPP3R2 の精子局在に必要なことが示唆された。

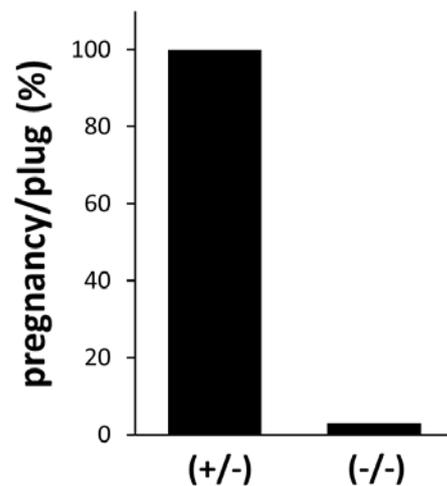


図 1 Ppp3cc・KO マウスは雄性不妊を示す

野生型の雌マウスを Ppp3cc ヘテロ (+/-) ・ホモ (-/-) 雄マウスと交配させた。ヘテロ: n = 16, ホモ: n = 34.

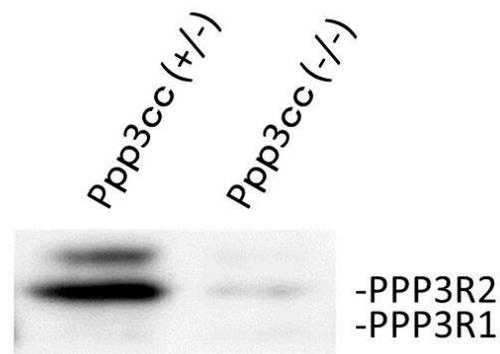


図 2 Ppp3cc・KO 精子では PPP3R2 の発現量低下が見られた

PPP3R1 はコントロールのヘテロでも発現が見られなかった。

(3) 透過型電子顕微鏡を用いて KO 精子の形態を調べてみると、野生型との違いは特に見つからなかった。一方、カルシウム依存性の脱リン酸化酵素活性を調べてみると、野生型に比べて KO 精子では有意に活性の低下が見られた。次に精子運動解析装置を用いて KO 精子集団の運動性を解析してみると、Ppp3cc・ヘテロ型の精子集団に比べて、Ppp3cc・KO 精子集団の遊泳速度は有意に低下していた(図3)。このことから、PPP3CCは精子運動性の維持に必要なと考えられる。

(4) 前述のように Ppp3cc・KO/RBGS マウスを得た。このマウスを用いて、雌性生殖内における Ppp3cc・KO 精子の挙動を調べてみると、コントロールに比べて数は少ないものの、卵子が排卵される卵管膨大部に精子が到達できることが分かった(図4)。

(5) 精巢で特異的に発現しているカルパインの KO マウス作製を行った。今後、この KO マウスの表現型を解析していく予定である。

#### 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 Miyata, H., Thaler, CD., Haimo, LT., Cardullo RA. “Protease activation and the signal transduction pathway regulating motility in sperm from the water strider *Aquarius remigis*.” , Cytoskeleton, 査読あり, 69(4)巻, (2012), 207-220.

[学会発表] (計 2 件)

① 宮田治彦, 雌性生殖路を移行する精子の in vivo ライブイメージング、第3回 vivid workshop、2013.02.22、石川県加賀市

② Miyata, H., Thaler, CD., Haimo, LT., Cardullo RA. アメンボ精子の運動様式と運動開始調節機構、日本動物学会第82回大会、2011.09.21、神楽公民館(旭川市)

[その他]

ホームページ等

大阪大学微生物病研究所遺伝子機能解析分野ホームページ

<http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/>

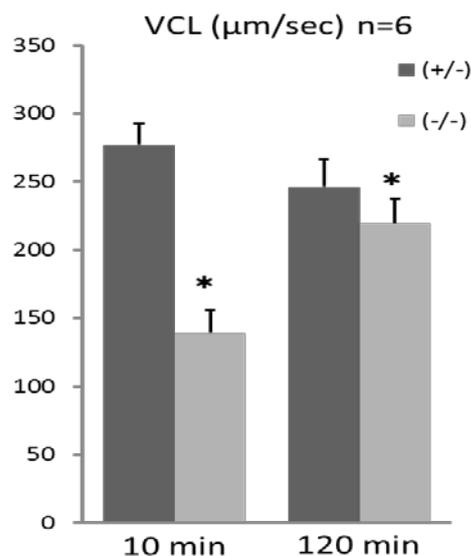


図3 Ppp3cc・KO 精子では運動能の低下が見られた

精子培養後 10 分と 2 時間での VCL (Curvilinear velocity) を測定した。

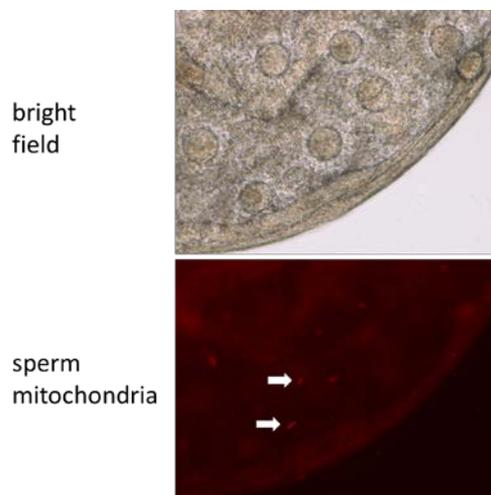


図4 卵管膨大部内の Ppp3cc・KO 精子

交尾後 8 時間後の卵管膨大部を観察した。Ppp3cc・KO 精子(白矢印)が卵管膨大部に到達していることが分かった。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 治彦 (MIYATA HARUHIKO)  
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教  
研究者番号：50604732

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし