

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：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780327

研究課題名(和文)哺乳動物の精子先体形成を制御する分子ネットワークの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular network controlling sperm acrosome formation in mammals

研究代表者

兼森 芳紀(Kanemori, Yoshinori)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：40529088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物の精子先体に含まれるACRBP/sp32は、セリンプロテアーゼACRの前駆体proACRへ特異的に結合するタンパク質である。マウスACRBPには選択的スプライシングによって生じた2種類のmRNA(Acrbp-WとAcrbp-V5)が精巣特異的に発現している。本研究では精子形成過程や受精過程でのACRBPの生理機能を明らかにするため、ACRBP欠損マウスと2種類のトランスジェニックマウスを作製し、解析した。その結果、ACRBP-V5は精子先体形成に関与することが明らかになった。一方、ACRBP-Wは受精過程でproACRの自発的活性化を制御することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mammalian sperm possess a cap-shaped, exocytotic vesicle, acrosome that is located at the anterior part of the nucleus. ACRBP/sp32, is an acrosomal protein, initially identified as a binding protein for the precursor (proACR) of sperm serine protease ACR. Unlike other mammalian ACRBPs, two forms of Acrbp mRNA, wild-type ACRBP-W and variant Acrbp-V5 mRNAs, were generated by alternative splicing of Acrbp in the mouse. In this study, we produced knockout mice lacking ACRBP to uncover the role of ACRBP in spermatogenesis and fertilization. These results demonstrate that ACRBP-V5 plays key role in condensation and subsequent spread of acrosomal proteins in the acrosome during spermiogenesis. It is also suggested that ACRBP-W may function in the retention of proACR in the acrosome until after sperm undergo acrosomal exocytosis.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：マウス 精子形成 受精

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物での精子形成不全は、不妊症のおもな原因となりうる。そのため、精子形成過程の分子メカニズムの解明は、学術的な基礎知見の集積にとどまらず、人工授精や不妊治療などの生殖補助技術の改善にもつながる。精子形成過程は、生殖幹細胞である精原細胞の自己増殖と精子への分化開始、精母細胞の減数分裂と遺伝子の相同組換え、半数体精子細胞から精子への形態変化の3段階に分けられる。これらの一連の分化過程が厳密な周期性を維持しながら進行するためには、精子形成細胞特異的タンパク質の発現・機能が不可欠である。このような精子形成の制御機構は、長年、発生工学的技術を用いた遺伝子改変マウスが作製されることで解析されてきた。

精子の頭部には、先体(アクロソーム)とよばれる細胞小器官がある。先体には、受精過程で重要な機能をもつ多くの加水分解酵素プロテアーゼやヒアルロニダーゼが存在する。なかでも、セリンプロテアーゼ Acrosin は、受精過程で先体反応により精子先体から放出され、卵子透明帯通過に関与することが示唆されている。われわれは、最近、受精過程での Acrosin のさらなる機能を調べるため、Acrosin 前駆体結合タンパク質 ACRBP/sp32 の欠損マウスを作製した。ACRBP は、ブタ射出精子から精製され、生体外で Acrosin 前駆体の活性化・成熟過程に関与することが示唆されている。そのため、ACRBP 欠損マウスは、Acrosin 前駆体の活性化がおこらず、卵子透明帯通過が遅れること、すなわち、ACRBP 欠損マウスは Acrosin 欠損マウスと同様の表現型になることが予想された。しかしながら、ACRBP 欠損マウスの雄は、Acrosin 欠損マウスと比較すると、妊孕性が著しく低下し、その精子は異常な形態であることが明らかになった。このことから、ACRBP は Acrosin 前駆体の活性化・成熟以外に、精子先体形成を制御する役割をもつことがはじめて示唆された。したがって、本研究では、これら意外かつ新規性に富む実験結果をもとに、ACRBP と中心とした先体形成の分子メカニズムの解析を行った。

2. 研究の目的

本研究では、精子形成過程での先体形成の分子メカニズムを明らかにするため、われわれが最近作製した ACRBP 欠損マウスを利用し、さまざまな実験を行う。そして、最終的に ACRBP トランスジェニック(TG)マウスを作製し、新規実験系(ライブイメージングや精巣組織の体外培養)への応用にも取り組み、研究成果を多角的に発展させていく。具体的な研究項目は、以下の3つである。

ACRBP の発現解析と局在解析

ACRBP 欠損マウスの表現型解析

ACRBP トランスジェニックマウスを用いた発展的研究

3. 研究の方法

ACRBP の発現解析と局在解析

マウス ACRBP には、2種類の選択的スプライシングバリエーション(それぞれを *Acrbp-W* と *Acrbp-V5* と命名)が存在することが示唆されている。それぞれに特異的なプローブや抗体を作製し、ノーザンブロット分析やウエスタンブロット分析を行い、精子形成過程での発現や存在の確認を行う。免疫染色法により精巣組織の切片や精巣上体精子での ACRBP の局在を蛍光顕微鏡で観察する。

ACRBP 欠損マウスの表現型解析

ACRBP 欠損雄マウスの妊孕性は、著しく低下することが判明しているため、その原因を解明する。精巣上体精子を用いた体外受精実験やその運動性を精子画像解析装置(CASA)で測定する。精巣切片や精巣上体精子を用いて、明視野観察ならびに先体形成マーカーのレクチン PNA での染色を行う。同時に、Acrosin 以外の先体タンパク質(ZPBP1, ZPBP2, ZP3R など)の抗体を用い、免疫染色も行い、先体の形態を調べる。

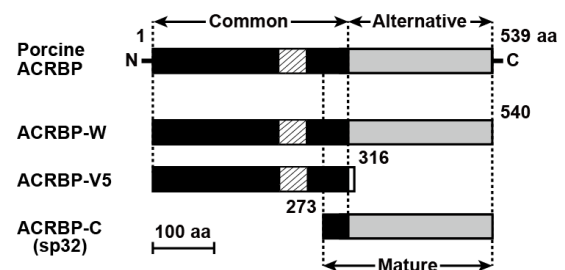
ACRBP トランスジェニック(TG)マウスを用いた発展的研究

外来性の ACRBP-W と ACRBP-V5 をそれぞれ発現する TG マウスを作製する。得られた2種の TG マウスと ACRBP 欠損マウスを交配させレスキュー実験を行い、ACRBP-W と ACRBP-V5 のどちらが先体形成や受精に重要な役割をもつかを調べる。

4. 研究成果

ACRBP の発現解析と局在解析

ACRBP は、ブタの射出精子抽出物からトリプシン様セリンプロテアーゼ ACR/Acrosin と共精製された先体内タンパク質である。ブタやヒトとは異なりマウスでは選択的スプライシングが起こるため、2種類の mRNA *Acrbp-W* と *Acrbp-V5* が精巣で発現している。*Acrbp* 遺伝子には10個のエキソンとイントロンがあり、*Acrbp* の選択的スプライシングはイントロン5で起こる。したがって、*Acrbp-V5* はエキソン5にイントロン5の一部が続く配列となる。それぞれの mRNA は翻訳されると540残基の ACRBP-W および316残基の ACRBP-V5 となる(下図)。ACRBP-V5 のC末端

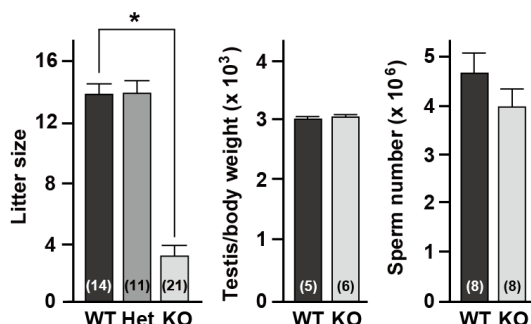


5残基はイントロン5由来のため、その部分のみ ACRBP-W とアミノ酸配列が異なる。また、

ブタ射出精子での ACRBP は 32 kDa のタンパク質であり、これは ACRBP-W の N 末端が切断され、残った C 末端領域に相当する。マウスでも同様のプロセシングが起きており、切断された ACRBP-W の C 末端側 267 残基を ACRBP-C/sp32 とした。Acrbp-W と Acrbp-V5 の mRNA は、ともに球状精細胞で発現のピークを迎え、伸長精細胞ではほとんど発現がみられなかった。タンパク質レベルではともにパキテ期精母細胞から存在していた。球状精細胞、伸長精細胞と精子形成が進むにつれ 55 kDa および 60 kDa の ACRBP-W が減少し、30 kDa の ACRBP-C が増加していた。これはマウスでもブタと同様に ACRBP-W がプロセシングを受け、成熟型の ACRBP-C に変換していることを示唆している。また伸長精細胞では ACRBP-V5 が消失していた。免疫染色の結果より、球状精細胞での ACRBP-W および ACRBP-V5 の局在はともに先体顆粒であったが、ACRBP-V5 の局在は伸長精細胞で消失していた。一方、ACRBP-C は精巢上体精子の先体内に観察された。以上の結果から、ACRBP-W および ACRBP-V5 は先体内に局在し、何らかの機能を持つことが示唆された。(Kanemori, Y., Biol. Reprod, 2013)

ACRBP 欠損マウスの表現型解析

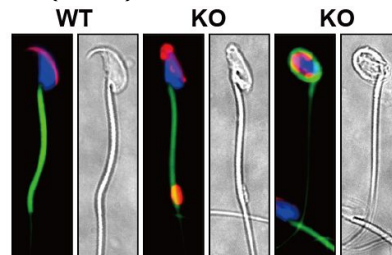
ACRBP の精子形成過程や受精過程での機能を調べるため、ES 細胞由来の相同組換え法を利用した ACRBP 欠損マウスの作製を試みた。完成した欠損マウスの遺伝子型は、サザンブロット解析で確認した。ウエスタンブロット解析では、欠損マウスの精巢抽出液で ACRBP-W, ACRBP-V5 および ACRBP-C のバンドの消失を確認した。ACRBP 欠損マウスには行動、体長、その他健康上の目立った異常はみられなかった。野生型雄マウスと掛け合わせた ACRBP 欠損雌マウスの妊娠率にも変化はなかった。しかしながら、精巢の大きさおよび精子数に顕著な差がないにもかかわらず、ACRBP 欠損雄マウスの妊孕率は著しく低下していた(下図)。



ACRBP 欠損雄マウスの妊孕率に有意差がみられたため、体外受精試験により精子の受精能について検証を行った。ACRBP 欠損マウス精子の受精数、透明帯結合数および卵子融合数はすべて有意に減少していた。以上のことから、ACRBP 欠損マウス精子は体外での受精能が低下していることが示唆された。CASA により ACRBP 欠損精子運動能の比較を行った。

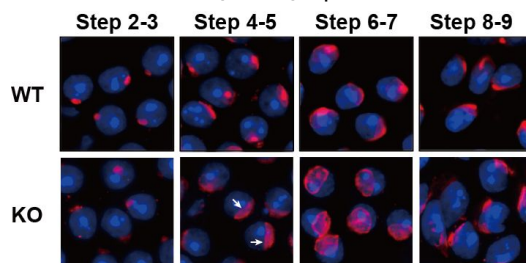
ACRBP 欠損精子には運動能を失ったものが多数あり、進行性運動や速度平均と同様に全運動能も大きく低下していた。また、超活性化精子の割合も減少していた。

野生型と ACRBP 欠損マウスそれぞれの精巢上体精子について、PNA レクチンで先体を、MitoTracker で中片ミトコンドリアを染色し観察を行った。野生型と比較して欠損マウス精子の中片、尾部には有意な差が認められなかった。しかし、頭部の先体突端が消失し球状になっていた。さらに突端が消失するだけでなく、頭部に中片が巻きついているものもみられた(下図)。ACRBP 欠損マウス精子の先



体に異常がみられたため、先体内のタンパク質について、精子抽出液を用いたウエスタンブロット解析を行った。先体内タンパク質の ACR は通常精子の先体反応まで 53 kDa の前駆体 proACR として存在している。しかし、ACRBP 欠損マウスでは ACR は 33 kDa のバンドとして検出された。ZBP1 と ZBP2 は先体タンパク質であり、先体形成に関与することが知られているが、ACRBP 欠損マウスではともに存在量の有意な差はなかった。SPACA1 は先体内膜に局在するタンパク質であり、精子と卵子の融合に機能していると報告されている。野生型でみられた SPACA1 の 40 kDa と 42 kDa のバンドは、ACRBP 欠損マウスでは消失していた。このことから、少なくとも ACRBP は proACR と SPACA1 に影響を与えていることが示唆された。

ACRBP 欠損マウス精子の先体形態に異常がみられたため、精子形成過程での精細胞をより詳細に観察した。Step 別に分けた精細胞を蛍光染色し、顕微鏡で観察した。ACRBP 欠損マウスでの前体顆粒は野生型と同様であったが、Step 4-5 精細胞での先体顆粒凝集とその融合は維持されていなかった。Step 4-5 以降、欠損マウス精細胞の先体胞はすべて異常な形を示した(下図)。proACR, ZBP2 およ



び ZBP1 は、通常精子形成過程後期まで先体顆粒に凝集しているが、ACRBP 欠損マウスでは先体顆粒への凝集がみられず、先体胞全体に拡散していた。また先体胞の赤道部に局在する SPACA1 が欠損マウスでは分散して局在

していた。以上の結果から、ACRBP は精子形成過程で先体顆粒の凝集に関与することが示唆された。

ACRBP トランスジェニック(TG)マウスを用いた発展的研究

マウス ACRBP には、選択的スプライシングにより生じる 2 種のタンパク質 ACRBP-W と ACRBP-V5 が存在する。ACRBP 欠損マウスの精子先体形態の異常にどちらの ACRBP が関与しているのかは不明である。したがって、それぞれの機能について解析するため、TG マウスを用いた ACRBP 欠損マウスのレスキュー実験を行った。

作製した ACRBP レスキューマウス (KO(W-TG)と KO(V5-TG)と命名)の精巣抽出液では、どちらも内在性の ACRBP-W と ACRBP-V5 を欠失していた。一方で外来性の ACRBP-W と ACRBP-V5 の発現は確認された。また、KO(W-TG)の精巣上体精子のみで外来性 ACRBP-C もみられた。proACR の存在を調べたところ、KO(W-TG)は野生型と同じ 53 kDa のバンドであったが、KO(V5-TG)では ACRBP 欠損マウスと同じ 33 kDa のバンドとして検出された。このことから、ACRBP-W は proACR の自発的プロセッシングを阻害していることが示唆された。先体の形態は、KO(V5-TG)だけで野生型と同程度まで還元していた。さらに、ACRBP 欠損雄マウスの妊孕性や体外受精率の低下は、KO(W-TG)と KO(V5-TG)ともに大きく回復していた。以上の結果から、ACRBP-V5 は精子先体形成に関与することが明らかになった。また、ACRBP-W は受精過程で proACR の自発的活性化を制御することが示唆された。今後は、これらの ACRBP トランスジェニックマウスを利用して新規実験系(ライブイメージングや精巣組織の体外培養)への応用にも取り組み、研究成果を多角的に発展させていきたい。

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)

*Kanemori, Y., *Ryu, J. H., *Sudo, M., Niida-Araida, Y., Kodaira, K., Takenaka, M., Kohno, N., Sugiura, S., Kashiwabara, S., and Baba, T. (*These authors contributed equally.) Two functional forms of ACRBP/sp32 are produced by pre-mRNA alternative splicing in the mouse. Biol. Reprod. 88: 1-8, 2013. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

精子アクロソームタンパク質 ACRBP と ACR のダブル欠損マウスの解析 高嶋 明日登、兼森 芳紀、首藤 舞、康 宇鎮、馬場 忠 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 4 日、神戸国際会議場 (ポスター)

Proacrosin-binding protein ACRBP/sp32 regulates acrosome formation during mouse spermiogenesis. Kanemori, Y., Sudo, M., Koga, Y., Okabe, M., and Baba, T. 2013 年 7 月 15 日、Gordon Research Conference Program on Fertilization & Activation of Development, Holderness School Holderness, NH, USA (ポスター発表)

Two functional forms of ACRBP/sp32 are produced by pre-mRNA alternative splicing in mouse spermatogenesis. Sudo, M., Kanemori, Y., Ryu, JH., Niida-Araida, Y., Kodaira, K., Takenaka, M., Kohno, N., Sugiura, S., Kashiwabara, S., and Baba, T. 2013 年 7 月 15 日、Gordon Research Conference Program on Fertilization & Activation of Development, Holderness School Holderness, NH, USA (ポスター発表)

Functional role of mouse ACRBP/sp32 in spermatogenesis and fertilization. 柳辰協、首藤 舞、兼森 芳紀、柏原 真一、馬場 忠 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場 (ポスター発表)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.acroman.org/>

Facebook ページ: Baba lab.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼森 芳紀 (KANEMORI, YOSHINORI)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号: 40529088