

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03163

研究課題名（和文）新規GPIアンカー型タンパク質からわかる精子の機能分化

研究課題名（英文）Functional difference of sperm revealed by novel GPI-anchored proteins

研究代表者

近藤 玄（Kondo, Gen）

京都大学・医生物学研究所・教授

研究者番号：40243258

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、マウス精子集団はSpGPI-APの発現量の違いをもって2群（high精子とlow精子）にわかれることを示し、特にhigh精子がCa²⁺イオン依存的に出現し、体内での受精を負に制御することを示した。このhigh精子は、精子活性化の過程でSpGPI-APと連動する5種類の表面分子が存在するユニークな集団であった。また、同様な精子集団はサルにも存在することを示した。この現象は、従来のキャパシテーションや先体反応とは独立した事象と考えられ、哺乳動物には新たな受精制御機構が存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不妊症の約30%は原因不明の男性不妊によるものと考えられている。本研究について現在特許出願を考えており、その予備調査において複数の男性不妊専門医からこの研究成果の早期の開示が要請された。本研究では、ヒトに近縁のサルにおいてマウスと同様の現象が認められたことから、将来不妊症診断や治療法開発につながる可能性が高いと考えられ、社会的意義も大きいと思われる。

研究成果の概要（英文）：This study showed that mouse sperm populations were divided into two groups (high sperm and low sperm) based on differences in SpGPI-AP expression levels. The high spermatozoa appeared in a Ca ion-dependent manner and negatively regulated fertilization in vivo. It was a unique population with five different surface molecules that co-expressed with SpGPI-AP during sperm activation. We also showed that a similar sperm population exists in monkeys. This phenomenon is considered to be independent of conventional capacitation and acrosomal reaction, suggesting the existence of a new fertilization control mechanism in mammals.

研究分野：実験動物学

キーワード：受精 精子 精子表面タンパク質 人工授精 体外受精 マウス サル GPIアンカー型タンパク質

様式 C-19, F-19-1, Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

不妊症全体の約 30%は原因不明の男性不妊によるものと推定されているが、不妊の原因遺伝子や分子機構については不明な点が多い。我々はこれまで、グリコシルフォスファチジルイノシトールアンカー型タンパク質(GPI-AP)の受精における役割に焦点をあてて研究を進めてきた。GPI-AP はまた、酵母や原虫などの単細胞生物からヒトにわたるすべての真核生物に保存されており、単細胞生物では遺伝学的な研究の結果、GPI-AP が欠損すると致死となることが知られている。一方、哺乳動物では、150種類をこえる GPI-AP が知られており、加水分解酵素、接着因子、リガンド、レセプターなどタンパク質部分の機能は様々である。ところが、マウス ES 細胞で GPI-AP を欠損させても致死的不是である。また、様々な組織で GPI-AP をコンディショナルに欠損させると、恒常性維持や高次機能の発揮が損なわれることが知られており、高等生物でも重要な役割を担っている。マウス精子では、CD59, Prss21, Hyal5, Prnd, Tex101 等の GPI-AP が発現しており、なかでも Tex101 を欠損させると精子の子宮卵管通過障害による雄性妊娠異常となる。また卵子で GPI-AP のひとつである folate receptor4(FR4) を欠損させると、精子卵融合障害による雌性不妊となり、哺乳動物の受精を成立させるためには、GPI アンカーシステムが不可欠であることがわかっている。そこで我々は、精子特異的かつ最も発現量の多い GPI-AP は精子の機能発揮に重要であると着想し、先行研究においてマウスの精巣上体精子から膜タンパク質分画を回収し、PI-PLC 処理により特異的に GPI-AP を分離・濃縮し SDS-PAGE したところ、主要な 2 つのバンド(分子量 30kDa, 35kDa)を見出した。そこで、これらのバンドをゲルから抽出し、マスマスペクトロメトリー解析したところ、35kDa のバンドは carbonic anhydrase4(CA4)であった。この GPI-AP は、全身的に発現し、精子にはエクソソームを介して精巣上体上皮から受け渡されることが予備実験でわかった。またこの分子は、精子の活性化に必要な重炭酸イオンの生成に関与していることもすでに知られている。

一方、30kDa のバンドは機能の報告されていない新規分子(SpGPI-AP と仮称)であった。次にこの分子の mRNA 発現を全身の臓器で調べたところ、精巣特異的な発現を示した。そこで我々は、SpGPI-AP に対するモノクローナル抗体を作製し、蛍光ラベルしたのちマウス精子を FACS 解析することとした。通常のセルソーターでは、精子は細胞質がないため変形・破壊されてしまい正常状態で解析することが困難である。そこで、精子の物理的破壊防止・機能温存が可能なマイクロ流路型セルソーターを用いた。その結果、精子は、SpGPI-AP の発現量により 2 群(high, low)に大別された。

2. 研究の目的

本研究では、SpGPI-AP high/low 精子の発生分化、機能発揮の分子メカニズムを詳細に解析することを目的とした。さらに、マウスの解析から得られた基礎的知見をもとに、ヒトに近縁のマカク属サルに研究対象を拡張することで、男性不妊の新たな診断法や治療法開発への橋渡し研究も展開することを目的とした。

3 . 研究の方法

本研究では、マウス精子を研究対象として独自に開発した抗 SpGPI-AP モノクローナル抗体や 300 種類におよぶ細胞表面分子に対するモノクローナル抗体を用いて種々の形態学的解析、細胞生物学的解析、分子生物学的解析を行った。

4 . 研究成果

本研究の重要な研究成果は、以下のとおりである。

1) 精子集団から high 精子を除去し、人工授精を行うと体内での受精率が向上した。このことから high 精子は、体内での受精に抑制的に機能していることが示唆された。

2) 300 種類のモノクローナル抗体を用いて high 精子の表面タンパク質の発現解析を行った。その結果、high 精子では 5 種類のタンパク質の発現が特異的に上昇していた。このことから high 精子の特異性が明らかになった。

3) サル精子についても同様の解析を行ったところマウス high 精子で発現上昇しているタンパク質のいくつかはサル精子でも上昇していた。

4) high 精子は、精子活性化の初期段階であるキャパシテーションを誘導する BSA や重炭酸イオンがなくても出現したが、Ca²⁺イオンが欠如すると出現しなかった。次に、従来から Ca²⁺イオン依存的で知られる、精子活性化最終段階である先体反応との関連性を調べた。その結果、low 精子では先体反応が誘導されたが、high 精子では有意な誘導はみられなかった。

5) SpGPI-AP 特異的モノクローナル抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察をおこなったところ、SpGPI-AP が精子膜表面に局在する精子が確認できた。さらに、このような精子では先体反応が誘導されていないことがわかった。これらのことから、high 精子の出現は、Ca²⁺イオン依存的ではあるが、キャパシテーションや先体反応とは独立した事象であることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹尾 透 (Takeo Toru) (10517014)	熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授 (17401)	
研究分担者	岡本 宗裕 (Okamoto Munehiro) (70177096)	京都大学・ヒト行動進化研究センター・教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関