

令和元年6月19日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07036

研究課題名(和文) 卵細胞と精子のATPライブイメージングから生殖細胞のエネルギー代謝の総理解へ

研究課題名(英文) Analysis of energy metabolism in germ cells using real-time imaging of ATP in oocyte/egg and sperm

研究代表者

井尻 貴之 (IJIRI, Takashi)

摂南大学・理工学部・講師

研究者番号：20629620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アデノシン三リン酸(ATP)は生体内の様々な反応にエネルギーを供給する分子である。

蛍光ATPプローブを利用したライブイメージング等により、ツメガエルの卵成熟過程におけるATPの振る舞いの一端を理解することができた。ツメガエルの卵母細胞内ではATP産生のためにミトコンドリアにおける反応だけでなく細胞質における反応も働いており、また卵核胞崩壊後にATPが減少するのはATPがタンパク質のリン酸化に使われるからであることがわかった。

精子が卵と受精するためには受精能を獲得する必要があるが、生物発光を利用したATPアッセイにより、受精能を獲得したマウス精子ではATP量が約3割減少することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、日本を含む先進国の夫婦の6組に1組が不妊といわれており、不妊症の割合は増加している。本研究では、卵成熟や精子の受精能獲得の過程でのATPの変化に関する知見が得られ、将来ATPに着目した不妊症の診断や治療への応用が期待される基礎データを提供することができた。

両生類は水棲動物と陸棲動物の境界、さらには体外受精と体内受精の境界に位置する動物である。本研究でツメガエルの卵成熟には細胞質での解糖系の反応も働いていることがわかり、ツメガエルは進化的関係を理解する上で重要なだけでなく、生殖細胞の性質をエネルギー代謝の観点から理解する上でも貴重なモデルとなり得ることが示された。

研究成果の概要(英文)：Adenosine 5'-triphosphate (ATP) is essential for many physiological reactions in living cells.

Real-time imaging of ATP, using fluorescent ATP probe, and other analyses made it possible to understand a part in behavior of ATP during oocyte maturation in *Xenopus*. The results indicated that glycolysis in cytoplasm as well as oxidative phosphorylation in mitochondria are critical for ATP production in *Xenopus* oocyte and that ATP is used as a phosphate donor for protein phosphorylation after germinal vesicle breakdown.

Mammalian sperm must undergo the step, called capacitation, to acquire the ability to fertilize an egg. ATP assay, which is based on bioluminescence, suggested that the amount of ATP decreased by about 30% in capacitated mouse sperm.

研究分野：生殖生物学

キーワード：卵細胞 精子 ATP ライブイメージング エネルギー代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アデノシン三リン酸 (ATP) は生体のエネルギー通貨として、細胞の機能維持のために必須の分子であり、その ATP 産生の反応には細胞質基質での解糖系とミトコンドリアでの酸化的リン酸化がある。卵細胞における ATP の代謝機構の研究は主に哺乳類を対象として行われ、哺乳類の卵では解糖系の活性が低いことが報告されていた。一方で、哺乳類の精子においては運動のエネルギー源は精子中片部のミトコンドリアでの酸化的リン酸化ではなく精子尾部の解糖系の反応により作られた ATP であることが示されていた。

ツメガエルは、卵成熟時の細胞周期が哺乳類と類似しており、古くから卵成熟機構の研究に活用されてきたが、卵細胞におけるエネルギー代謝の研究は十分になされていなかった。また、マウスでは「なぜ精子の運動のためにエネルギー産生の効率が良い酸化的リン酸化が使われないのか？」などの未解決の問題があり、精子の機能に対するミトコンドリアの役割はほとんどわかっていなかった。

このような疑問に答えるためには生殖細胞内における ATP の挙動を知る必要があるが、従来の ATP 測定といえば細胞全体の平均を見るルシフェラーゼアッセイしかなかった。しかし 2009 年に蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用した ATP プローブ (ATeam) が開発され、ATP の空間的な情報が得られるようになったため、本研究では ATeam を用いて卵細胞と精子における ATP のライブイメージングを行うことにした。

2. 研究の目的

本研究では、動物の卵細胞と精子におけるエネルギー代謝機構を ATP ライブイメージングから総合的に理解することを目的とした。そのために、卵成熟と受精を対象とした実験ではアフリカツメガエルを用い、精子の機能を対象とした実験ではマウスを用いた。また、本研究では、ATP を指標とした新しい不妊症の診断や治療へつながるような、脊椎動物の卵細胞と精子における ATP 代謝に関する基礎データの蓄積も目指した。

3. 研究の方法

(1) 本研究で扱ったツメガエルの未成熟卵母細胞は卵巣から摘出後にコラゲナーゼ処理を行い卵細胞のまわりの濾胞細胞等を取り除いたものである。この状態の未成熟卵母細胞は、バッファーに移してプロゲステロンを加えるだけで *in vitro* での卵成熟を誘導することができる。卵成熟時には卵核崩壊に続く極体放出が起こり、その結果として動物極の表層に白いスポット (ホワイトスポット) が現れるため、それを指標として ATP 合成阻害剤が卵成熟に及ぼす影響を調べた。

(2) ATeam の 2 種類の蛍光から変換した FRET の値を測定することで ATP のイメージングが可能となる (FRET 値が大きいほど ATP 濃度が高い)。本研究では、申請者が以前に確立したツメガエルの卵母細胞における ATP イメージングの系を用い (引用文献)、アルビノの卵母細胞に ATeam タンパク質をインジェクションした後に顕微鏡下で蛍光を観察した。

(3) 精子 ATP イメージングを行う際の基礎データとして、様々な生理条件における 10^3 個オーダーの精子の ATP 量を調べた。具体的には、マウス精巣上体尾部から精子を採取し、熱処理と超音波破碎処理を行った上でルシフェラーゼ発光法を利用した測定を行った。特に、精子が卵と受精するために必須の受精能獲得を TYH 培地中で誘導し、その前後での ATP 量を比較した。

4. 研究成果

(1) ツメガエルの卵成熟にどの ATP 産生反応が重要であるかを明らかにした。実際の手順として、ツメガエル未成熟卵母細胞に ATP 合成阻害剤をインジェクションした後にプロゲステロンを加えてホワイトスポットの出現を観察した。その結果、ツメガエルの卵成熟時にはミトコンドリアの酸化的リン酸化だけでなく、細胞質の解糖系も働いていることが示唆された (図 1 上から 1 番目と 2 番目)。さらに、酸化的リン酸化と解糖系を同時に阻害しても阻害効果は倍にならなかったことから、それらはリンクしていることが示された (図 1 上から 3 番目)。これら ATP 合成阻害剤の影響によるホワイトスポットの出現の遅れは、ATP をインジェクションすることで回復

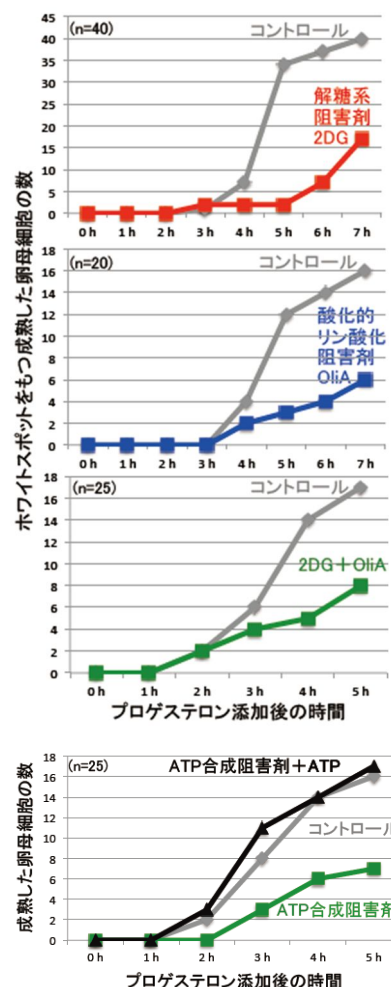


図 1 卵成熟反応に対する ATP 合成阻害剤の影響

した(図1上から4番目)。この結果はATPがツメガエルの卵成熟においてシグナル分子として働いている可能性も示唆している。ATPはシグナル伝達物質として、細胞内ではインスリンの分泌などに、細胞外では神経伝達などに関与しており、その生理的な役割も注目されている。そのため、今後ツメガエルの卵母細胞においてもATPをシグナル分子とみなすことで、エネルギー代謝の観点だけでは見えてこなかったATPの下流にあるシグナル分子との関係が明らかになり、卵母細胞の機能についての理解が深まるものと期待される。

(2) 研究の方法(2)のATPイメージングの実験系を用いて、卵細胞内のATPレベルに対するATP合成阻害剤の影響をリアルタイムで観察した。これまでに、プロゲステロンによりツメガエルの卵成熟を誘導すると卵表層において次第にATPレベルが増大し(図2上)、卵核胞崩壊を境に減少に転じるが、酸化的リン酸化の阻害剤によりATPの増加タイミングが遅延することが確認されていた(図2中)。本研究のATPイメージングから、ツメガエルの卵成熟時では解糖系も働いていることが新たに示された(図2下)。この手法は他の様々な生物への応用が期待され、ツメガエルでの結果は同様の手法で観察されたマウス卵母細胞におけるATP変化と類似していた(引用文献)。しかし、マウス卵母細胞ではATPレベルに解糖系は関係しないのに対し(引用文献)ツメガエル卵母細胞ではATP増加に解糖系も寄与する点が大きく異なっている。

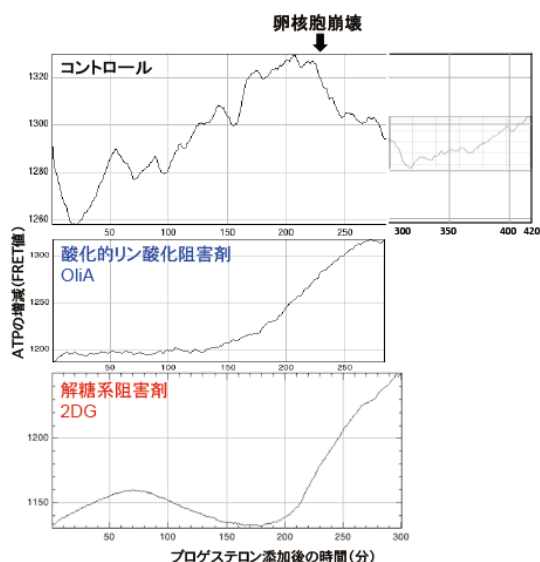


図2 卵母細胞におけるATPの変化とATP合成阻害剤の影響

(3) 以上のように、ツメガエルの卵成熟におけるATP産生の理解はある程度進んだが、一方で「ATPがどのように使われるのか」という新たな問いが生まれてきた。そこで本研究では、ATPイメージングで観察された卵核胞崩壊後のATP減少の理由は、ATPがタンパク質のリン酸化に利用されているからではないかと考えた。

この仮説を検証するため、卵母細胞にプロゲステロン(PG)を添加後1時間毎に回収し可溶性タンパク質を抽出し、抗PY99抗体を用いてウエスタンブロッティング解析を行った。そして、タンパク質のチロシンリン酸化を表すバンドを比較した結果、この時使用した卵母細胞の半数以上でホワイトスポットが出現していたPG処理後5時間以降で38kDa付近に特異的なバンドが検出され、しかも時間を経るとともに強くなっていた(図3矢印)。このことから、約38kDaに観察されたタンパク質のリン酸化がATPの利用先の一つであることが示唆された。今後の解析では、このリン酸化を受けるタンパク質が何であるのかを明らかにすることが重要となる。

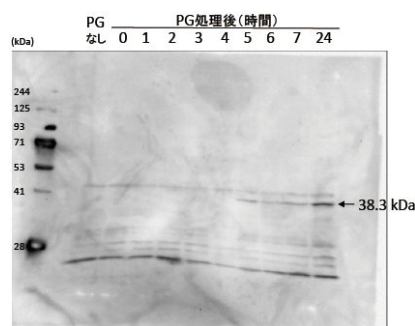


図3 卵成熟過程のタンパク質リン酸化の変化

(4) ツメガエルの卵は第二減数分裂中期で停止した状態で産卵され、精子と受精することによって減数分裂が完了する。その後の卵割も含めて、受精前後のプロセスには多くのエネルギーが必要であると考えられ、本研究ではツメガエルの受精時におけるATP産生についても調べた。方法としては、ツメガエル卵の*in vitro*受精系で体外受精を行う際に、バッファーにATP合成阻害剤を加えたものと加えないコントロールを比較した。ツメガエル卵では受精後に動物極側の表層収縮がみられ1時間頃までに動物極が上を向くので、これらを観察した上で、最終的に受精から3時間以上経過した時点で卵割が起こっていれば卵が受精したと判定した。その結果、解糖系と酸化的リン酸化の阻害剤を同時に使用した場合に受精が9割以上阻害されたことから、ツメガエル卵細胞では受精にもATPが必須であることが確認できた。今後は、解糖系と酸化的リン酸化それぞれによるATP産生が、どのように受精に関わっているのかを詳細に解析する必要がある。

(5) 形態形成や成熟の過程で細胞質をほとんど失っている精子においてはインジェクションによりATeamを導入することができない。そこで、イメージングにより精子のATPを観察するために、研究分担者が作製したゲノム中にATeam遺伝子を組み込んだマウス(ATeamノックインマウス)を利用することにした。精子ATPのイメージング実験は研究分担者の研究室で実施しているが、まずATeamノックインマウス精子でのFRETを検出するための条件設定を行った。そのためには、凍結保存した、細胞質で蛍光ATPプローブを発現するATeamノックインマウスの精子を用いた。精子が卵と受精するためには受精能を獲得するキャパシテーションと呼ばれる過程を経る必要があるが、この凍結精子を融解し*in vitro*でキャパシテーションを誘導し、その前後の精子を

顕微鏡で観察したところ、弱いながらも FRET を検出することに成功した。次に、この FRET が精子の実際の生理的な機能を反映しているのかどうかを評価するために、ルシフェラーゼ反応を利用して ATeam ノックインマウスの精子の ATP 量を測定した。その結果、受精能を獲得したマウス精子では ATP 量が約 3 割減少することがわかった。そのため、今後の ATP イメージングで観察する精子の FRET も同様に減少すれば、生理的な ATP の変化を検出していると判断できる。また、ミトコンドリアで ATeam を発現する精子の解析も計画しており、ミトコンドリアで発現する ATeam をもったノックインマウスと、精子細胞で DNA の部位特異的組換えを行う Stra8-Cre マウスを交配している。ようやく両方の遺伝子をもつ可能性のあるマウスが生まれてきており、これらの候補マウスが成長すれば遺伝子型を確認し、両方の遺伝子をもつ雄マウスが得られれば精子の ATP イメージングを行う。

さらに、ATeam ノックインマウスを使っての他の組織での ATP イメージングが実施されており、研究分担者により ATeam ノックインマウスを用いた解析の有用性が示された。

<引用文献>

Ijiri TW et al.: ATP imaging in *Xenopus laevis* oocytes. In *Sexual Reproduction in Animals and Plants* (Springer), 181-186, 2014

Dalton CM *et al.*: Measurement of ATP in single oocytes: impact of maturation and cumulus cells on levels and consumption. *J Cell Physiol.*, 229: 353-361, 2014

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Miyazawa H, Yamamoto M, Yamaguchi Y, Miura M: Mammalian embryos show metabolic plasticity toward the surrounding environment during neural tube closure. *Genes Cells.*, 23: 794-802, 2018

<https://doi.org/10.1111/gtc.12626>

[学会発表](計19件)

蓑田 龍也、岸川 淳一、岩尾 康宏、横山 謙、佐藤 賢一、井尻 貴之：アフリカツメガエル卵成熟における ATP の影響とタンパク質リン酸化の解析、日本動物学会第89回大会、札幌市、2018.9.13

Ijiri TW: ATP metabolism in *Xenopus* oocyte during maturation. Frontiers in Reproduction 21st Annual Symposium, Woods Hole, USA, 2018.6.8

井尻 貴之、岸川 淳一、今村 博臣、上野 秀一、岩尾 康宏、横山 謙、佐藤 賢一：ツメガエル卵胞における ATP の役割の検証、日本生体エネルギー研究会第 43 回討論会、京都市、2017.12.20

井尻 貴之、岸川 淳一、今村 博臣、上野 秀一、岩尾 康宏、横山 謙、佐藤 賢一：ツメガエル卵母細胞において ATP が卵成熟に与える影響、日本動物学会第 88 回大会、富山市、2017.9.22

Sato K, Tokmakov AA, Ijiri TW: Studies on signaling events associated with oocyte maturation, fertilization, and apoptosis in *Xenopus laevis*. Gordon Research Conference on Fertilization and Activation of Development, Plymouth, USA, 2017.7.19-20

Ijiri TW, Kishikawa J, Ueno S, Iwao Y, Yokoyama K, Sato K: Effect of ATP on oocyte maturation in the frog *Xenopus laevis*. Gordon Research Conference on Fertilization and Activation of Development, Plymouth, USA, 2017.7.17-18

Ishihara Y, Ohtsuki G, Miwa H, Aoki H, Tsuchida H, Ogasawara R, Sakamoto K, Yanagita M, Imamura H, Yamamoto M: Visualizing Spatiotemporal and quantitative dynamics of ATP levels in mouse. Cell Symposia: Exercise Metabolism, Gothenburg, Sweden, 2017.5.22

井尻 貴之、岸川 淳一、今村 博臣、崎家 真穂、上野 秀一、岩尾 康宏、横山 謙、佐藤 賢一：ATP metabolism in *Xenopus laevis* oocytes: Is ATP yielded by glycolysis during maturation? 第 38 回日本分子生物学会年会、神戸市、2015.12.2

井尻 貴之、嘉門 未紗、岩尾 康宏、横山 謙、佐藤 賢一：アフリカツメガエル卵成熟に対する ATP 産生阻害の影響、日本動物学会第 86 回大会、新潟市、2015.9.17

Ijiri TW, Kishikawa J, Imamura H, Sakiie M, Ueno S, Iwao Y, Yokoyama K, Sato K: Inhibition of ATP synthesis affects white spot occurrence and the increase of ATP during progesterone induced maturation in *Xenopus laevis* oocytes. Gordon Research Conference on Fertilization and Activation of Development, Plymouth, USA, 2015.7.20-21

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山本 正道

ローマ字氏名：(YAMAMOTO, Masamichi)

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：特定准教授

研究者番号(8桁): 70423150

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。