

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07691

研究課題名(和文) 豚精巢リラキシン様蛋白の生殖細胞の抗アポトーシスおよび成熟因子としての機構解明

研究課題名(英文) The role of relaxin-like factor (RLF)/insulin-like factor 3 (INSL3) as germ cell anti-apoptotic and maturation factor on boar sperm production

研究代表者

高坂 哲也 (Kohsaka, Tetsuya)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：10186611

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)：本研究では、ブタ精巢で発現するリラキシン様蛋白(RLF) (insulin-like factor 3、INSL3とも呼ぶ)の作用機構について、抗体により内因性RLFを不活性化(中和化)したブタを作製して究明した。不活性化モデルブタでは、生殖細胞のアポトーシスが4倍増加し、BAXの発現増加、BCL2の発現減少をもたらし、CASP3発現を活性化した。精子性状の変化に加え、精子運動能や濃度を低下させた。以上、RLF不活性化(中和)は生殖細胞のアポトーシス増加と精子性状の低下を導き、RLFが生殖細胞の抗アポトーシス・成熟因子として機能することを示唆する。

研究成果の概要(英文)：This study was to produce model pigs neutralized endogenous RLF by immunization with RLF/INSL3 antibody and to investigate the mechanism of its action as germ cell anti-apoptotic and maturation factor. First, RLF inactivation resulted in a 4-fold increase in the frequency of apoptotic germ cells. Second, inactivation led to upregulation of the pro-apoptotic BAX and downregulation of the anti-apoptotic BCL2, and in turn activated the mitochondrial apoptotic pathway with induction of CASP3. Third, neutralization affected the development of epididymal muscle layer. Finally, inactivation had no effect on semen volume; however, it caused a significant reduction in sperm motility, concentration and quality compared with control. These results revealed that the RLF/INSL3 inactivation (neutralization) increases germ cell apoptosis and decreases in semen quality and sperm output, suggesting that RLF/INSL3 acts as an germ cell anti-apoptotic and maturation factor of sperm production.

研究分野：動物生殖生理学

キーワード：リラキシン RLF INSL3 Passive immunization Active immunization Sperm production Germ cell apoptosis

1. 研究開始当初の背景

これまで研究代表者らは、ブタ精巣で発現する 12 kDa の RXN 様蛋白 (RLF) (最近では insulin-like factor 3、IN SL3 と呼ばれる) に焦点をあて、世界に先駆け、表 1 の成果を見出してきた。

産生源	精巣
産生細胞	ライディッヒ細胞
構造特性	12 kDaのA-B-C鎖モノマー
生物活性	受容体LGR8を発現させたHEK293細胞で高い活性
分泌様式	内分泌と傍分泌
受容体	LGR8 (RXFP2とも呼ばれる)
標的細胞 (組織)	精子形成を司る生殖細胞と精子成熟を司る精巣上体
受容体との結合特性	生殖細胞に対して、Kd = 5.44 nM/Bmax = 8.44 CPS
精子形成過程	アポトーシス抑制か?
アポトーシス抑制機序	?
精子成熟過程	精子成熟に関与か?
精子成熟因子としての機序	?

すなわち、ブタ精巣で発現する RLF/IN SL3 は、1) 単離・構造決定の結果、高い生物活性を持つ 12 kDa の A-B-C 鎖モノマーとして、アンドロゲンを産生するライディッヒ細胞から分泌され (Biochem. J. 2012)、2) 性成熟に伴って発現増加し (J. Endocrinol. 2014)、3) 血中のほか、精巣間隙や精細管内に分泌され (J. Endocrinol. 2014)、4) 生殖細胞で発現する受容体 LGR8 (RXFP2 と呼ばれる) と高い親和性 (k d 値 5.44 nM) で結合し (Ital. J. Anat. Embryol. 2013; J. Endocrinol. 2014)、5) 能動免疫による RLF のサイレンシング (中和化) を図ると、生殖細胞にアポトーシスが多発して精子濃度の著しい減少をきたし、精巣上体の機能が低下する (Endocrinology 2015)、などの知見を見出してきた。

これらの研究成果を踏まえ、図 1 に示す着想に至った。

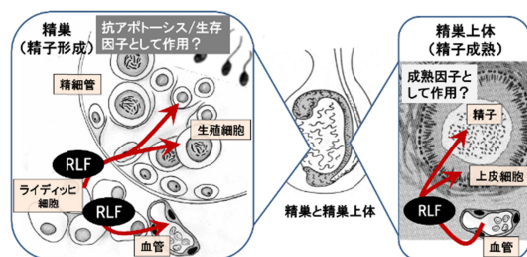


図1. 精子形成および精子成熟過程におけるRLFの生理機能(想定図)

すなわち、ブタ精巣ライディッヒ細胞から分泌された RLF は、傍分泌 (アポクリン分泌) 様式で精子形成の場である精細管内に運ばれ、生殖細胞で発現する受容体を介して、アポトーシスの抑制を促し生殖細胞の生存因子として機能するのではないが、一方、血中に放出された RLF は内分泌様式で精子成熟の場である精巣上体へ運ばれ、上皮細胞や管腔内の精子で発現する受容体を介して精子の成熟因子として作用するのではないかと考え、本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

リラキシンは分娩に備えた子宮頸部の軟化を始め、多岐に渡る組織で様々な作用を発現する 6 kDa の蛋白ホルモンである。研究代表者はリラキシンファミリー蛋白の一つ「リラキシン様蛋白 (RLF) (最近では insulin-like factor 3、IN SL3 と呼ばれる)」をブタ精巣で見出し、12 kDa のモノマーとして分泌され、精子形成の場である精巣において生殖細胞のアポトーシスの制御に、さらに精子成熟の場である精巣上体ではその機能に関与する可能性を示唆した。これらの知見を基に、本研究では、RLF を精子形成・成熟との関連性で捕らえ、RLF の精子形成過程における生殖細胞のアポトーシス抑制機構と精子成熟過程における RLF の成熟因子としての作用機構を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は、精巣ライディッヒ細胞で発現する RLF の精子形成過程における生殖細胞のアポトーシス抑制機構と精子成熟過程における RLF の作用機構を明らかにしようとするものである。これらの解明には、RLF の能動免疫による抗体産生および本抗体 IgG を投与した受動免疫により RLF をサイレンシング (不活性化) したモデルブタを用いる。生殖細胞のアポトーシス抑制機構については、TUNEL 法によるアポトーシス陽性生殖細胞の定量、定量 PCR によるアポトーシスカスケード解析、TR-FIA による血中 RLF およびテストステロン濃度の解析、レーザーマイクロディゼクションによる受容体発現細胞の増減解析、RNA 干渉法で明白にする。一方、精子成熟過程の機能解明については、定量形態解析による精巣上体の特性評価、精液性状の評価、CASA による精子運動特性解析、精子核クロマチンの構造安定性評価、CTC による精子受精能解析および cAMP/cGMP 測定による細胞内シグナリング解析を行った。

4. 研究成果

(1) RLF 不活性化モデルブタの作製

研究代表者らによりブタ精巣から単離した RLF (Biochem. J. 2014) をキャリアタンパク質である卵白アルブミン (OVA) と結合させた OVA-RLF を抗原として、7 週齢の未成熟雄豚に免疫を開始し、28 週齢まで能動免疫処理を施した。なお、対照区には、OVA のみを免疫処理した。RLF を不活性化できる力価の高い抗体が産生されたことを、受容体 LGR8 遺伝子を導入した HEK293 細胞 (Biochem. J. 2012; Biol. Chem. 2013) で確認し、受動免疫に用いる血清を採取した。

採取した血清は、硫酸沈殿の後、DEAE セファロースカラムクロマトにより IgG 画分を精製した。得られた抗 RLF IgG 画分を 21 週齢 (春機発動期) の雄豚に 2 週間隔で計 9 回、39 週齢まで受動免疫処理を施し、RLF の不活性化モデルブタを作製した。なお、対照区のブタには正常血清から得た Normal IgG を同様に処理した。抗体価は EIA 法でモニタリングし、免疫期間を通して RLF が不活性化されていることを示し、RLF 不活性化モデルを確立することができた。

## (2) RLF 不活性化モデルブタの生殖細胞のアポトーシス制御機構の解析

不活性化モデルにおいて、精巣のパラフィン切片を作製し、アポトーシスを示す生殖細胞を TUNEL 法で解析した。その結果、不活性化モデルでは、精細管当たりのアポトーシス陽性生殖細胞の割合は対照区の 4 倍にまで増加していることが判明した。この生殖細胞の細胞死を反映するかのようにより、精巣重量は著しく減少していることが分かった。さらに、アポトーシス制御因子、とくに促進因子として BAX と Caspase3 を、一方、抑制因子として BCL2 と XIAP を定量 PCR 法で解析し、RLF 不活性化モデルのアポトーシス制御機構が究明できた。

## (3) RNA 干渉モデル細胞の作製と RLF の抗アポトーシス/生存因子としての検証

RLF の受容体アンタゴニストの siRNA を直接精巣に導入した RNA 干渉モデルの作製を目指した。すなわち、候補となる 5 つの siRNA を合成し、HEK293 細胞に受容体遺伝子と共に siRNA を導入した。導入 4 時間後に核の周りに siRNA が取り込まれていることが確認でき、導入 1 日目にはシグナリングが阻止され、その効果が 3 日まで続くことが分かった。さらに、本モデル細胞系において RLF が抗アポトーシス/生存因子として機能することが検証できた。

## (4) 精子成熟過程における精子核クロマチンの構造安定性に及ぼす RLF 不活性化の影響

RLF 不活性化モデルブタの凍結保存精子を用い、精子核クロマチンの構造安定性を解析した。精子の塗抹標本を低 pH・界面活性剤に浸漬して DNA 変性負荷処理を施した後、

アクリジンオレンジ染色を行い、精子核クロマチンの構造安定性の程度を顕微蛍光測光解析で調べたところ、精子核クロマチンの構造安定性が低下し、さらに SS 結合の割合が低下していることがモノプロモビマンを用いた顕微蛍光測光解析で判明した。

## (5) 精子成熟過程における精子運動能の付与に及ぼす RLF 不活性化の影響

RLF (IN SL3) 抗体をブタに受動免疫した RLF 不活性化モデルで、精子運動能の付与に及ぼす影響を調べた。22 週齢 (春機発動) の雄豚を用いて 38 週 (成熟) まで RLF 抗体を 2 週毎に 9 回投与し、RLF 不活性化を図った。その結果、RLF 不活性化は精液量に影響を及ぼさなかったが、精子濃度や精子運動能の有意な低下をもたらした。さらに、精子性状にも違いがみられ、正常精子の割合が減少する一方で、死滅精子が増加していた。このことから、RLF は精子成熟段階の運動能付与に重要であることが明らかとなった。

## (6) ブタ精子の受精能に対する RLF の関与の検証

精子の受精能とは、精子の超活性化、受精能獲得、先体反応、卵との接着・融合、前核形成、胚発生に至るまでのプロセスを左右する精子の能力を指す。本研究では、体外受精系を用いて卵へ侵入するまでの精子の能力に及ぼす RLF の影響を CASA による運動能解析、CTC による受精能解析および cAMP/cGMP 測定による細胞内シグナリングの 3 方面から検証した。その結果、RLF はブタ精子の細胞内 cAMP の上昇を導くものの、受精能獲得にはあまり関与せず、卵との接触・融合に関与する可能性を示唆した。

## 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 5 件)

1) Minagawa I, Murata Y, Terada K, Shibata M, Park EY, Sasada H, Kohsaka T. Evidence for the role of IN SL3 on sperm production in boars by passive immunisation. *Andrologia*. 2018:e13010. doi: 10.1111/and.13010. 査読有

2) Miyazaki T, Ishizaki M, Dohra H, Park S, Terzic A, Kato T, Kohsaka T, Park EY. Insulin-like peptide 3 expressed in the silkworm possesses intrinsic disulfide bonds and full biological activity. *Sci Rep*. 2017; 7(1):17339. doi: 10.1038/s41598-017-17707-1. 査読有

3) Pitia AM, Uchiyama K, Sano H, Kinukawa M, Minato Y, Sasada H, Kohsaka T.

Functional insulin-like factor 3 (INSL3) hormone-receptor system in the testes and spermatozoa of domestic ruminants and its potential as a predictor of sire fertility. *Anim Sci J.* 2017; 88(4):678-690. doi: 10.1111/asj.12694. 査読有

4) Matsuzaki M, Mizushima S, Hiya G, Hirohashi N, Shiba K, Inaba K, Suzuki T, Dohra H, Ohnishi T, Sato Y, Kohsaka T, Ichikawa Y, Asumi Y, Yoshimura T, Sasanami T. Lactic acid is a sperm motility inactivation factor in the sperm storage tubules. *Sci Rep.* 2015; 5:17643. doi: 10.1038/srep17643. 査読有

5) Pitia AM, Minagawa I, Uera N, Hamano K, Sugawara Y, Nagura Y, Hasegawa Y, Oyama T, Sasada H, Kohsaka T. Expression of insulin-like factor 3 hormone-receptor system in the reproductive organs of male goats. *Cell Tissue Res.* 2015; 362(2):407-420. doi: 10.1007/s00441-015-2206-8. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

1) 飯塚真大・皆川至・山崎美悠・高橋綾乃・Ali M Pitia・佐々田比呂志・橋爪一善・高坂哲也. 受精におけるブタ卵胞液由来 INSL3 の精子側での作用. 日本畜産学会. 第 124 回大会. 2018 年.

2) 高坂哲也・高橋綾乃・山崎美悠・飯塚真大・村田陽子・皆川至・佐々田比呂志. 脂質過酸化を誘起させたブタ精子におけるリラキシンの影響. 日本畜産学会 第 123 回大会. 2017 年.

3) 皆川至・村田陽子・寺田圭・柴田昌利・佐々田比呂志・高坂哲也. 受動免疫法による INSL3 の中和化がブタ造精機能と精液性状に及ぼす影響. 日本畜産学会 第 122 回大会. 2017 年.

4) Murata Y, Minagawa I, Pitia AM, Shibata M, Sasada H, Hashizume K, Kohsaka T. Two relaxin family peptides, relaxin (RLN) and insulin-like factor 3 (INSL3) in porcine follicular fluid are involved in sperm fertility via their receptor signaling. The 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress. 2016 年.

5) Kohsaka T, Minagawa I, Sagata D, Pitia AM, Terada K, Shibata M, Hasegawa Y, Sasada H. Action of insulin-like factor 3 (INSL3) as a germ cell survival factor in

boars. The 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress. 2016 年.

6) Pitia AM, Minagawa I, Sasada H, Hashizume K, Kohsaka T. The corpus luteum is a source and target of insulin-like factor 3 (INSL3) in pregnant goats. The 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress. 2016 年.

7) Kohsaka T, Kohriki H, Uera N, Tazawa A, Katakura Y, Pitia AM, Minagawa I, Hasegawa Y, Sasada H. Identification, characterization, and possible function of a novel INSL3 receptor splice variant RXFP2.X6 in testes. 7th International Congress on Relaxin and Related peptides. 2015 年.

8) Katakura Y, Tazawa A, Minagawa I, Kohsaka T. siRNA knockdown of a novel INSL3 receptor splice variant RXFP2.X6 alters INSL3-induced cAMP signaling in RXFP2-expressing HEK293 cells. 7th International Congress on Relaxin and Related peptides. 2015 年.

〔図書〕(計 1 件)

Kohsaka T, Siqin, Minagawa I, Sasada H (編者: Sandor Kukovics). Recent advances in research on the hormone INSL3 in male goats (In: Goat Science). InTechOpen, 2018 年発行予定.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

<https://tdb.shizuoka.ac.jp/RDB/public/Default2.aspx?id=10880&l=0>

<https://scholar.google.com/citations?user=3oht-dUAAAAJ> (Google Scholar)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高坂 哲也 (KOHSAKA, Tetsuya)  
静岡大学・農学部・教授  
研究者番号：10186611

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者 無し

研究者番号：

(4) 研究協力者

佐々田 比呂志 (SASADA, Hiroshi)  
柴田 昌利 (SHIBATA, Masatoshi)  
寺田 圭 (TERADA, Kei)