

令和元年6月3日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11075

研究課題名(和文) IVFの受精率を上げるフラボノイドの作用機序の解明

研究課題名(英文) The analysis of function of the flavonoids which is active on the fertility rate of IVF.

研究代表者

田中 宏光 (Tanaka, Hiromitsu)

長崎国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：10263310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：人工授精培地に添加することにより受精率上昇が認められる甘草から抽出したイソリキリチゲインやホルモノネチンについて、作用機序について解析を進めた。その結果、これら分子は細胞膜を通過して精子に作用し、射出後の精子の運動性や成熟に影響を与え、受精率を向上させたものと考えられた。タンパク質アレーを用い、精子内のこれら分子が作用するタンパク質の同定のための条件を整えることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不妊症治療や優良な家畜の安定的な生産と希少動物の保護などのために、効率的な人工授精が望まれている。本研究では、甘草から抽出した受精率に効果的が認められるイソリキリチゲインやホルモノネチンの精子に対する作用機序について解析を進めた。植物成分が動物の体内に取り入れられ、生理活性物質として作用し、これら分子の食物としての安全性について解析を進め、人工授精の改良に貢献できた。

研究成果の概要(英文)：We have analyzed the mechanism of an increase in fertilization rate of Isoliquiritigenin and Formononetin extracted from licorice, when added to artificial insemination medium.

As a result, it was thought that these molecules passed through the cell membrane and reacted to sperm, affecting the motility and maturation of the sperm after ejection, and improving the fertilization rate. We have completed the conditions for identification of the proteins associated with Isoliquiritigenin and Formononetin in sperm by using protein arrays.

研究分野：アンドロロジー

キーワード：不妊症 精子 精子形成 生殖細胞 生薬 甘草 精巢

1. 研究開始当初の背景

日本では、5組に1組のカップルが不妊症と報告されている(日本生殖医学会)。先進国においては、同様に不妊症が増加していることが報告されている。最近になって、不妊症の原因が男性側にも半分以上存在していることが報告され、また、女性と同様に加齢とともに精子機能の不全が増加することが示唆された。一方で不妊症の治療技術は向上し、近年の晩婚化の進行で、年齢を考慮した迅速な治療として、顕微授精(ICSI)が第一選択とされる傾向にある。現在の日本では50人に1人が、また、デンマークでは10人に1人が人工授精で誕生し、人工授精で誕生した子たちが生殖年齢に達し、人工授精治療による遺伝の連鎖も相まって、半数以上の男性が不妊症予備軍といわれている。近年、人工的な化学物質、特に環境ホルモンが動物の性に影響を与えることが突き止められた。しかし、ヒトにおいての人工化学物質の性への影響は不明のままである。医療技術の進展とともに、ヒトの生活は豊かになるが、原因を突き止めることなく不妊症の増加を甘受し、技術で対処することは、本来のヒトの生活環に大きな影響を与え、環境問題も含めて、子孫に大きなつげを残すことになる。

私は、大阪大学微生物病研究所に在籍中(1993-2004)、(1)マウス精子細胞特異的に発現する遺伝子群のクローニングとその機能解析を行い、(2)これら遺伝子群のほとんどがヒトにも保存されていることから、それらをクローニングし、各タンパク質の発現と機能解析を行うと共にゲノム構造の解析を行ってきた。さらに、田中プロジェクトとして(2005-2007)、(3)男性不妊症患者、妊孕性確認男性からの血液及び精液DNAサンプルを収集し、それら特異的遺伝子の染色体上の一次構造解析を行い、男性不妊症原因遺伝子変異や single nucleotide polymorphisms (SNPs)を明らかにしてきた。(4)精液中にこれら遺伝子の転写物(mRNA)やタンパク質が存在することを明らかにし、mRNAやタンパク質を男性不妊症患者と妊孕性の確認された男性で比較検討できることを示した。その後、長崎国際大学に移り(2008~)、今までのプロジェクトに加え、甘草の水溶性成分が人工授精時に有効に作用することを明らかにし、その主要成分として、イソリクイリチゲニンとホルモノネチンを同定した。

また、これらの成果をもとに遺伝子診断と最良の治療法の開発を進めてきた。この間、海外の研究者からも複数の共同研究が要請され、サンプルや情報の提供を行ってきた。

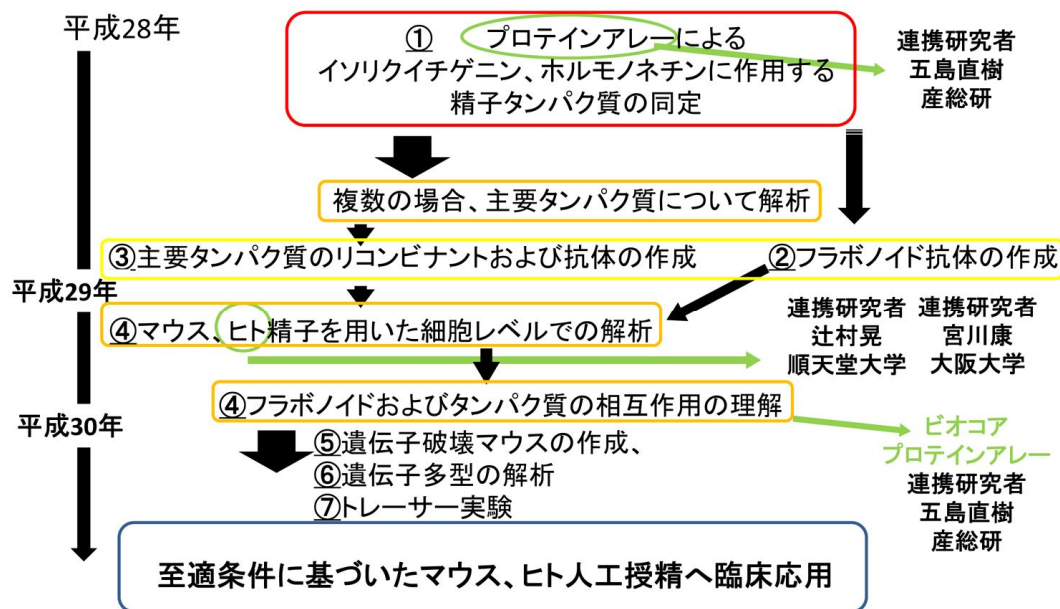
2. 研究の目的

生薬の甘草の水溶性成分を人工受精時の精子培養液に加えると、受精率が向上することを突き止めた。さらに成分を解析し、イソリクイリチゲニンやホルモノネチンは、単独で受精率を向上させ、胚は正常に分化し正常な子産を得ることができることを明らかになった。形態異常の精子に有効であったが、これらの作用機作については不明である。イソリクイリチゲニンやホルモノネチンがどのように人工受精率の向上に寄与するのかについて、分子メカニズムを明らかにし、精子の成熟についての理解を進め、男性不妊症の理解し適応患者を検査したい。**具体的には、すでに私たちの別の実験で実績のある、プロテインアレイにイソリクイリチゲニンやホルモノネチンを反応させ、これらフラボノイドが作用するタンパク質を同定する。**最近、これらフラボノイドは細胞内に取り込まれないことが報告されていることから、これらフラボノイドは細胞膜成分に作用すると考えている。幸いにして、イソリクイリチゲニンやホルモノネチンは、蛍光を発する物質である。イソリクイリチゲニンやホルモノネチンに対する特異抗体は存在しないが、紫外線を用い、プロテインアレイで解析することが可能である。得られた情報をもとに、イソリクイリチゲニンやホルモノネチンと反応するタンパク質をコードする遺伝子をクローニングし、レコンビナントタンパク質を作成し、特異抗体の作成、精子細胞での局在の観察、生化学的解析を進める。さらに、ピオコア等を用い、タンパク質の相互作用を解析し、タンパク質分子の詳細について解析を進めたい。これらによって得られる結果を糸口に精子の分化と射出精子の成熟について理解を深め、男性不妊症の原因の解明や治療法の開発に結び付ける。

3. 研究の方法

以前の研究において、甘草の水溶性成分から、人工受精の受精率を上昇させる物質としてイソリクイリチゲニンやホルモノネチンを同定した。そこで今回は、**これらフラボノイドが作用する精子タンパク質の同定をおこない、精子上の因子から、精子成熟の理解を進めたい。**

下図に研究方法の時系列を模式的に示した。



4. 研究成果

㉞イソリキリチゲニン、ホルモノネチンは蛍光物質でもある。精子や卵子などでこれら物質が細胞膜を通過するの否かについて、これら物質を含む培養液中での細胞の蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、ともにこれら物質は、細胞膜を透過することが明らかになった（論文、総説）

㉟最近になって、タンパク質がホールディングされた状態で用いることができるプロテインアレイが開発された。最近の共同研究によって、そのプロテインアレイを用いて、生殖細胞核特異的抗原を認識する抗体 TRA98 の抗原タンパク質を同定できた（投稿中）。同様のプロテインアレイを用いて、イソクイリチゲニンやホルモノネチンと結合するタンパク質を同定する。イソクイリチゲニンやホルモノネチンは、蛍光物質である。イソクイリチゲニンやホルモノネチンを認識する抗体は存在しないが、プロテインアレイで容易にシグナルを得られることが期待される。また、オーバーレイアッセイによって、タンパク質のシグナルを得ることができた。プロテインアレイにかかる条件は確立できたので、それを用いて、これら物質が直接作用する生体内タンパク質の同定を進行中である。

㊱中国大陸では、双子が多く生まれる村など、いくつかの風土症例が存在する。ある特別な食物の接種が生体に影響を与えることも考えられる。甘草は、昔から生薬として食されており、日本でも江戸時代から用いられてきた。アメリカではお菓子として昔から一般に食用にされており安全性は非常に高い。これらの物質を食する形で形成できた。今後、動かし、生体内での動向を調べ、至適量を処方し EBM を確立することは重要である。物実験、ヒトを対象とした臨床データを収集したい。

㊲イソリキリチゲニン、ホルモノネチンの生体への作用を解析する中で、IVF での受精率に効果がある生薬成分を同定することができた（論文 及び投稿中）。また、関連する精子に関する新しい知見も報告した（その他論文）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

以下の論文は、すべて査読有

Tanaka H, Miyagawa Y, Tsujimura A, Wada M. Genetic Polymorphisms Within the Intronless ACTL7A and ACTL7B Genes Encoding Spermatogenesis-specific Actin-like Proteins in Japanese Males. International Journal of Fertility and Sterility (In press).

Aoki Y, Tsujimura A, Nagashima Y, Hiramatsu I, Uesaka Y, Nozaki T, Ogishima T, Shirai M, Shoyama Y, **Tanaka H**, Horie S. Effect of *Lepidium meyenii* on in vitro fertilization via improvement in acrosome reaction and motility of mouse and human sperm. Rep Med Biol 18:57-64 (2019).

Tanaka H, Miyagawa Y, Tsujimura A, Nishimune Y. Male infertility and single-nucleotide polymorphisms in the testis-specific succinyl CoA: 3-oxoacid CoA transferase (SCOT-T/OXCT2) gene in a Japanese cohort. *Int J Reprod Fertil Sex Health* S1:02:001:1-6 (2018).

Tanaka H, Haraguchi T, Wada M, Shoyama S. Localization of herbal medicine substances in sperm that increase fertilization rate during mouse IVF. *Int J Reprod Fertil Sex Health* 4:113-115 (2017).

Hada M, Kim J, Inoue E, **Tanaka H**, Watanabe Y, Okada Y. TH2A is phosphorylated at meiotic centromere by Haspin. *Chromosoma* 126:769-780 (2017).

Nakasuji T, Ogonuki N, Chiba T, Kato T, Shiozawa K, Yamatoya K, **Tanaka H**, Kondo T, Miyado K, Miyasaka N, Kubota T, Ogura A, Asahara H. Complementary Critical Functions of Zfy1 and Zfy2 in Mouse Spermatogenesis and Reproduction. *PLoS Genet.* 13:e1006578. (2017).

Soda T, Miyagawa Y, Ueda N, Takezawa K, Okuda H, Fukuhara S, Fujita K, Kiuchi H, Uemura M, Okamoto Y, Tsujimura A, **Tanaka H**, Nonomura N. Systematic characterization of human testis-specific actin capping protein $\beta 3$ as a possible biomarker for male infertility. *Hum Reprod.* 32:514-522 (2017).

Shimada M, Goshima T, Matsuo H, Johmura Y, Haruta M, Murata K, **Tanaka H**, Ikawa M, Nakanishi K, Nakanishi M. Essential role of autoactivation circuitry on Aurora B-mediated H2AX-pS121 in mitosis. *Nat Commun* 7:12059 (2016).

Tanaka H, Tsujimura A, Miyagawa Y, Oh D, Choi D, Wada M, Nishimura H, Nishimune Y. Genetic variation in the testis-specific *HASPIN* gene encoding a serine/threonine protein kinase in infertile Japanese males. *Advances in Sexual Medicine* 6:19-25 (2016).

Tanaka H, Yoshimoto T, Nakamura N, Takeda T, Wada M, Miyagawa Y, Akira Tsujimura A. SNPs within the Intron-less *TAF7* Gene Encoding a General Transcription Factor in Japanese Males. *Nagasaki Int Univ Rev* 16:197-201 (2016).

〔主な学会発表〕(計 3 件)

2018年9月

衛生薬学・環境トキシコロジー フォーラム 2018/佐世保
フォーラム I:生殖毒性の最前線 座長

2017年9月

Fourth World Congress of Reproductive Biology (WCRB2017) / Okinawa.
Addition of licorice extract to culture media improves in vitro fertilization ability.

2016年9月

第34回 日本受精着床学会総会/軽井沢
シンポジウム3 (ARTの成績向上に資する精子の質改良法 / 招待)
「甘草抽出物を用いたARTの成績改善法の検討」

〔図書〕(計 4 件)

Shoyama Y, **Tanaka H**. Sperm activator, licorice. *薬用植物研究* 39, 1-6 (2017).

正山征洋、田中宏光 「甘草の神秘～人口減少時代の到来に向けての福音～」 自費出版(2017)

Tanaka H, Wada M, Tung HN, Fujii S, Uto T, Shoyama Y. In Vitro Fertilization Activators for Future (Chapter 7). In *Biological Activities and Action Mechanisms of Licorice Ingredients*. INTECH (2017).

Tung HN, **Tanaka H**, Tsujimura A, Miyagawa Y, Wada W, Fujii S, Uto T, Shoyama Y. In vitro Fertilization with Mouse Sperm Activated by Components of Licorice Root Extract. *Nat Prod Chem Res* 4:100217 (2016).

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等：<https://www1.niu.ac.jp/about/teacher/detail.html?tid=189>

6．研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：五島直樹

ローマ字氏名：Goshima Naoki

研究協力者氏名：辻村晃

ローマ字氏名：Tsujiura Akira

研究協力者

研究協力者氏名：宮川康

ローマ字氏名：Miygawa Yasushi