

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2022

課題番号：17KK0150

研究課題名（和文）鳥類精子における膜ラフトマイクロドメインを介した先体反応制御機構の解明

研究課題名（英文）Membrane raft-mediated mechanism of sperm acrosome reaction in avian sperm

研究代表者

浅野 敦之（Asano, Atsushi）

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：10630981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,200,000円

渡航期間： 7ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では、鳥類精子において膜ラフトによる先体反応のシグナル伝達機構を調べ、さらに動物生殖工学技術開発への応用を試み以下の知見を得た。

膜ラフトは受精関連遺伝子群を含み、先体反応の制御を担っている。先体反応には細胞外のエネルギー基質や細胞膜調節因子を起点とする膜横断型シグナル機構が関与している。少なくともSFK、PKA、AMPKなどのタンパク質キナーゼは先体反応の細胞膜調節に関与する。卵膜への精子の結合は、細胞内カルシウムの変化を生み、その結果卵膜侵入性、運動性を向上する、ことが分かった。さらに、SFKは精子の長期受精能力保存に関与する可能性があり、生殖工学的技術への応用が期待出来る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義は、本成果は雄生殖メカニズムに関する鳥類と哺乳類の類似性と特異性を明らかにし、生殖生物学のみならず進化生物学的に興味深い知見を示した。また精子における細胞膜による機能制御機構の重要性は、基盤データとして翻訳後修飾を含むポストゲノム研究に大きく貢献する点も意義に含まれる。

社会的意義は、ヒトや家畜で好発する生殖障害の検査・治療法の開発に有用である。さらに細胞機能を利用した次世代配偶子保存技術の開発に向けた研究シードとなり、様々な現社の問題の解析、解決にも応用できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the signal transduction home of the acrosomal reaction by membrane rafts in avian spermatozoa, and also worked on the development of animal reproductive engineering technology using the results, and obtained the following findings. Membrane rafts contain fertilization-related genes and control the acrosomal reaction. The acrosomal reaction involves transmembrane signaling mechanisms originating from extracellular energy substrates and cell membrane regulatory factors. At least protein kinases such as SFK, PKA and AMPK are involved in cell membrane regulation of the acrosomal reaction. Sperm binding to the egg membrane was found to produce changes in intracellular calcium, resulting in improved egg membrane penetration and motility. Furthermore, SFK may be involved in the long-term preservation of fertility in avian sperm, and is expected to be applied to reproductive technology.

研究分野：動物統合科学

キーワード：精子 細胞膜 鳥類 カルシウム 先体反応 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

家畜生産力の強化や希少種の保存には、効率的な人工繁殖技術の開発が不可欠である。しかし哺乳類に比べ、鳥類では精子の受精機能に不明な点が多く、その開発は遅れている。遺伝子の転写翻訳活性を持たない精子は、自己に予め組み込まれた様々な細胞機構を駆使し、細胞内シグナリング経路の活性、鞭毛における運動性および頭部における先体反応誘起を同時に制御しなければならない。しかし、どのようなメカニズムで特定の細胞内領域に必要な応じて機能発現を誘導するのか明らかではない。膜ラフトは、ステロールおよび機能性膜タンパクを豊富に含む微少な細胞膜マイクロドメインである。今までに申請者を含むいくつかの研究チームが、哺乳類や海洋生物の精子において膜ラフトが細胞機能の時空間制御に関わることを明らかにした。このことは動物界において膜ラフトは精子受精機能の制御に普遍的に関与していることを暗示するが、鳥類に関する研究は実施されていない。

2. 研究の目的

卵膜に結合した鳥類精子は、直ちに先体反応を誘起し卵へ侵入する。哺乳類において、精子は受精能獲得により細胞内 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を増加させ先体反応を誘起するが、鳥類精子では受精能獲得が存在せず、先体反応誘起のメカニズムは不明である。申請者は今までの研究で、膜ラフトは鳥類精子の卵膜結合および先体反応に関与すること、PMCA1 および 4 を特異的に含むことを明らかにした。鳥類精子の卵膜結合は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加のトリガーであることから、膜ラフトは鳥類精子の卵膜への結合から先体反応誘起までのプロセスを統括的に制御している可能性がある。 Ca^{2+} イメージング法は高空間分解能を有し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態の解析に有用であるが、精子では主に鞭毛運動解析にしか利用されていない。

本研究は、基課題で得られた知見を基盤とし、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態と先体反応のデュアルイメージング法を用いて膜ラフトの機能を解析することで、この可能性を検討する。

3. 研究の方法

実験 1: 精子膜ラフトに存在する卵膜結合性 60KDa タンパクの同定と機能

基課題の研究は、膜ラフトに存在する 60KDa の新規分子がニワトリ精子の卵結合に関与することを示唆した。そこでこの分子を同定するため、コーネル大学バイオテクノロジー研究所で精製した 60KDa 新規分子のプロテオミクスを実施する。卵膜は 5 つの糖タンパク (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4, ZPD) から構成され、アクロシンは ZP1 と相互作用があることが示唆されている。そこで次に、同定分子の組換えタンパクおよび特異的抗体を作製し、糖タンパクへの結合様式およびアクロシンとの関係性を調べる。また、特異的抗体を使って新規分子の細胞内局在と先体反応における役割を調べる。

実験 2: ニワトリ精子の先体反応誘起機構における膜ラフトの役割

本実験では、まず哺乳類精子で行った既報に従い、ニワトリ精子において Ca^{2+} イメージン

グと同時に、先体反応をリアルタイムで検出する手法を確立する。その後、膜ラフト破壊剤である 2OHCD を使って、卵膜への結合に伴う膜ラフトの役割を調べる。次にニワトリ精子へイオンチャンネル特異的阻害剤あるいは活性化剤を使って、 $[Ca^{2+}]_i$ 増加と先体反応との関連性とメカニズムを調べる。さらに卵膜への結合による細胞内 Ca^{2+} 増加がプロテインキナーゼ C(PKC)、カルモジュリンキナーゼ(CaMK)およびホスファチジルイノシトール 2 リン酸経路(PIP2)の活性におよぼす影響を調べる。以上の実験で、膜ラフトによる Ca^{2+} 動態制御と先体反応誘起機構の解明を試みる。

4. 研究成果

実験 1-1: 運動性鳥類膜ラフトに存在し、内卵黄膜との結合を仲介する 60KDa タンパク質(X)の分離同定に成功した。X 特異的抗体を作成し WB と IIF で精子発現特性を確認した (図 1)。さらにニワトリ精子の先体領域原形質膜に存在するタンパク質群の網羅的同定およびその内、膜関連タンパク質への特異的抗体を作成した。さらに先体反応の生理的トリガーである内卵黄膜への精子の結合は、細胞内カルシウムの増加を生むことが分かった(図 2)。さらに精子運動性分析デバイス(SMAS)を使って、先体反応の促進経路である AMP 活性化キナーゼと鞭毛運動の関係を調べると、影響は認められなかった。

実験 1-2: 前述のプロテオーム分析で同定したサークファミリーキナーゼ(SFK)の精子先体反応における機能的役割を検討した結果、SFK は精子先体領域に存在し、膜ラフトにより活性制御されていることが分かった。さらに SFK は膜電位調節により自発的先体反応を抑制することから、受精能力保存に関与している可能性が分かった(図 3)。

精子は IPVL 結合によりミトコンドリア活動や $[Ca^{2+}]_i$ に加え、特徴的な運動性を発揮することで、卵侵入性を獲得する可能性が示唆された。

実験 2-1: 前述の膜ラフトプロテオーム同定に基づき作成した抗体は、その多くが精子先体部分へ局在を示し、プロテオミクスデータの正当性が裏付けられた。A 膜ラフトプロテオームに基づき、cAMP/PKA 伝達経路の家禽精子先体反応における役割を調べた。その結果、膜ラフトは PKA を亢進することで IPVL による先体誘起性の維持に関わる事が分かった(図 4)。AMPK

をシグナリング経路上流で制御するグルコースと運動性の関係性を調べた結果、グルコース輸送体 1(GLUT1)が解糖系とミトコンドリア酸化的リン酸化を介し運動と ATP 生産に関与

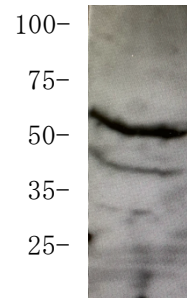


図 1. ニワトリ精子における X の発現

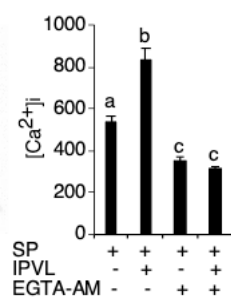


図 2. IPVL による $[Ca^{2+}]_i$ 変化

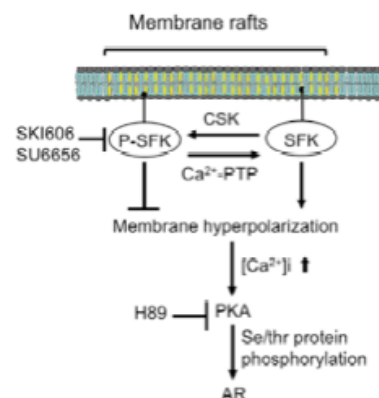


図 3. ニワトリ精子 SFK の作用モデル

する事も分かった(図 5)。

実験 2-2 : グルコース輸送体 3(GLUT3)に着目し、膜ラフトの精子における機能を調べた結果、GLUT3 は頭部先体膜と尾部に局在し、膜ラフトに機能制御されている事が分かった。また膜ラフトは AMPK を介して卵侵入を促進することで、受精能力の最大化に関わる事が分かった(図 6)。さらにグルコース代謝経路の解糖系および酸化的リン酸化の精子における役割は異なることも分かった。先体反応のシグナル伝達機構を調べるため、SFK サブタイプの同定を試みた。免疫沈降—プロテオミクス解析により SFK のなかでも c-YES1 はニワトリ精子先体反応に関与している可能性が分かった。

本課題に関わる研究成果をまとめると、国際学術誌 9 報(うち責任著者 7 報) 学会発表 4 報(国際学会 1 報)であった。

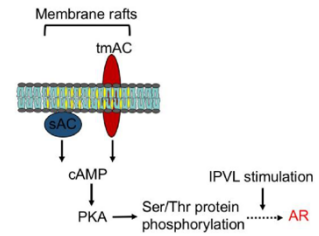


図 4. cAMP/PKA 経路による先体反応制御モデル

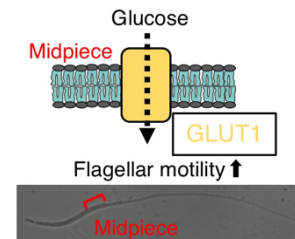


図 5. グルコースによる運動性制御モデル

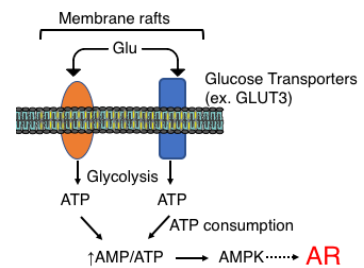


図 6. グルコースは GLUT3/膜ラフトを介して AMPK-先体反応機構を調節する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Asano Atsushi、Priyadarshana Chathura	4. 巻 59
2. 論文標題 Membrane-Mediated Regulation of Sperm Fertilization Potential in Poultry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 114 ~ 120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2141/jpsa.0210104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Obara Katsuya、Obara (Henmi) Chizuka、Naito Mitsuru、Mitsui Ikki、Une Yumi、Asano Atsushi、Tajima Atsushi	4. 巻 59
2. 論文標題 Effects of Calcium Lactate on the Development of Chicken Embryos in a Shell-less Culture System up to Day Seventeen of Incubation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 168 ~ 174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2141/jpsa.0210024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Setiawan Rangga、Priyadarshana Chathura、Miyazaki Hitoshi、Tajima Atsushi、Asano Atsushi	4. 巻 233
2. 論文標題 Functional difference of ATP-generating pathways in rooster sperm (Gallus gallus domesticus)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animal Reproduction Science	6. 最初と最後の頁 106843 ~ 106843
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anireprosci.2021.106843	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakajima Y.、Asano A.、Tajima A.	4. 巻 63
2. 論文標題 Developmental potential of cryopreserved gonadal germ cells from 7-day-old chick embryos recovered using the PBS(-) method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Poultry Science	6. 最初と最後の頁 46 ~ 53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00071668.2021.1960952	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 浅野敦之	4. 巻 Jan
2. 論文標題 精子機能の細胞膜制御：哺乳類と鳥類の違いと類似性から	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Science Digest 2022年1月号	6. 最初と最後の頁 36-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Priyadarshana C, Setiawan R, Tajima A, Asano A	4. 巻 15(11)
2. 論文標題 Src family kinases-mediated negative regulation of sperm acrosome reaction in chickens (Gallus gallus domesticus)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0241181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0241181	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Setiawan R, Priyadarshana C, Tajima A, Travis AJ, Asano A	4. 巻 32(7)
2. 論文標題 Localisation and function of glucose transporter GLUT1 in chicken (Gallus gallus domesticus) spermatozoa: relationship between ATP production pathways and flagellar motility.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reproduction, Fertility and Development	6. 最初と最後の頁 697-705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1071/RD19240.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Setiawan R, Priyadarshana C, Tajima A, Travis AJ, Asano A	4. 巻 32
2. 論文標題 Localization and function of GLUT1 glucose transporter in chicken sperm (Gallus gallus domesticus): relationship between ATP production pathways and flagellar motility.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reproduction, Fertility and Development	6. 最初と最後の頁 697-705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1071/RD19240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ushiyama A, Priyadarshana C, Setiawan R, Miyazaki H, Ishikawa N, Tajima A, Asano A.	4. 巻 -
2. 論文標題 Membrane raft-mediated regulation of glucose signaling pathway leading to acrosome reaction in chicken sperm	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biol Reprod. (accepted)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioz015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Setiawan R, Priyadarshana C, Tajima A, Travis AJ, Asano A
2. 発表標題 Function of GLUT1 glucose transporter in chicken sperm: relationship between ATP production pathways and motility
3. 学会等名 2019年度秋季家禽学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chathura Priyadarshana, Rangga Setiawan, Atsushi Tajima, Alexander Travis, Atsushi Asano
2. 発表標題 Membrane Raft-associated Src Family Kinases (SFK) Regulate Sperm Acrosome Reaction in Chickens.
3. 学会等名 SSR 52nd annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Src family tyrosine kinases (SFK) regulate acrosome reaction via membrane potential hyperpolarization in chicken sperm.
2. 発表標題 Chathura Priyadarshana, Rangga Setiawan, Atsushi Tajima, Alexander Travis, Atsushi Asano
3. 学会等名 関東畜産学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chathura Priyadarshana, Rangga Setiawan, Naoto Ishikawa, Atsushi Tajima, Alexander Travis, Atsushi Asano
2. 発表標題 Functional involvement of src family tyrosine kinases in regulation of acrosome reaction in chicken sperm
3. 学会等名 日本家禽学会2019年度春季大会
4. 発表年 2019年

〔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

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			
米国	コーネル大学			