

平成 22 年 6 月 12 日現在

研究種目：若手研究 B  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19791128  
 研究課題名（和文） 精囊分泌タンパク質による膜ラフトを介した精子機能制御機構の解明  
 研究課題名（英文） Study of the mechanism for controlling of sperm function via lipid rafts with proteins secreted by seminal vesicle  
 研究代表者  
 吉田 薫 (YOSHIDA KAORU)  
 桐蔭横浜大学・先端医用工学センター・講師  
 研究者番号：70398973

研究成果の概要（和文）：精囊分泌タンパク質 Semenogelin は精子運動超活性化の抑制因子であり、これまでの先体胞反応およびタンパク質チロシンリン酸化抑制因子であるという報告と合わせて精子受精能抑制因子であることが示された。また、細胞膜脂質ラフト構造との直接の関与は不明だが、精子細胞膜に結合してその流動性と機能に影響を与えていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Seminal vesicle secreted protein, semenogelins(SEMGs) are one of inhibitory factor for hyperactivation of sperm motility. Our previous study has revealed that SEMGs were also inhibitory factors for acrosome reaction and protein tyrosin phosphorylation. Collectively, SEMGs may be inhibitory factors for sperm capacitation. However, it is still unclear that the direct interaction between lipid rafts and SEMGs. Our study suggests that SEMGs can bind to sperm membrane and effect on its fluidity and on function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1000000	0	1000000
20年度	1100000	330000	1430000
21年度	1000000	300000	1300000
年度			
年度			
総計	3100000	630000	3730000

研究分野：細胞生理生化学、生殖生物学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：精子、受精能、膜ラフト、糖脂質、膜タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

精巣内で形成された精子は、運動能・受精能は持たず、機能的には未熟である。この未熟な精子は精巣上で運動能を獲得し、放精の際に運動を開始する（精子運動開始）。この過程において、卵や雌性生殖器分泌因子により精子の最終成熟が起こり、受精能を得る

（受精能獲得）。そして卵周辺部において先体胞の開口分泌が起き（先体反応）、受精に至る。また哺乳類をはじめとした一部の動物では、この受精過程において精漿に含まれる因子が精子の運動能や受精能に対して抑制的に働くことが判っている。精子の外部環境因子による精子機能の制御は、受精において

必要不可欠な現象であり、注目されている研究分野である。受精能獲得は主に哺乳類精子において見られ、さらに精漿には精子の受精能獲得を抑制する因子（受精能抑制因子）が存在することが知られている。そして、前立腺から分泌される prostasome が精子の耐凍能・受精能を低下させる因子として見いだされた(G Ronquist & I Brody (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **822**, 203-218.)。prostasome はコレステロールを多量に含む顆粒状の物質であり、ヒト精子においては精子細胞膜の流動性を低下させ(E Carlini, *et al.* (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* **343**, 6-12.)、先体反応が抑制される(NL Cross & P Mahasreshti (1997) *Arch. Androl.* **39**, 39-44.)。また、最近マウスの受精能抑制因子の受容体が GPI アンカータンパク質であるという報告があり(R Gibbons, *et al.* (2005) *Reproduction* **130**, 497-508.)、さらに精巣上体由来の受精能抑制因子の幾つかの候補が示されている(B Nixon, *et al.* (2006) *Biol. Reprod.* **74**, 275-287.)。一方、副生殖腺の一つである精嚢中からも精子運動抑制因子が同定されている(H Lilja, *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 1894-1900.; T Iwamoto, *et al.* (1995) *FEBS Lett.* **368**, 420-424.)。しかし、未だに受精能獲得とは何か、受精能抑制因子の生理的作用は何かはわかっていない。研究代表者である吉田薫は研究協力者である岩本晃明との共同研究で精嚢由来のヒト精子運動抑制物質である semenogelin (SEMG) の研究を行い、SEMG の PSA による分解産物が運動抑制すること、SEMG が活性酸素産生経路経由で受精能獲得を抑制することを示した(業績 5, 11)。また研究協力者の吉田学等は、マウス精嚢由来の腫瘍形成タンパク質 SVS2 が *in vivo* において受精能抑制因子として働くことをごく最近明らかにしており(N Kawano & M Yoshida, (2006) *Biol. Reprod.*, 2008 Dec;79(6):1153-9)、さらに現在その分子の作用機構の研究を行っている。

以上のように研究代表者はこの分野において、特に精子運動調節機構の研究では多くの成果を挙げている。しかし、哺乳類精子は受精能獲得により精子の運動様式が大幅に変化するため、受精能獲得機構の理解なしには運動調節機構の研究もあり得ないと感じるに至った。そのため、マウスにおける受精能獲得の研究も開始し、これまで不明だった受精能抑制因子の生理的作用を明らかにしつつある。しかしながら、ヒトのモデルとしてマウスを研究対象とするのはやはり限界があり、臨床応用を見据えた基礎研究をヒトを対象として行う必要がある。ここ数年この分野の論文が増える傾向にあり、先進性を保つためにも、これまでのマウスでの研究成果

を土台としたヒト精子での研究が必要であると考え、本研究課題の申請に至った。

## 2. 研究の目的

受精の過程において精子の運動能・受精能が精嚢分泌タンパク質によって調節されるメカニズムについて解明することを目的とする。本研究では、精嚢分泌タンパク質 SEMG によるヒト精子膜ラフト構造を介した運動及び受精能獲得調節機構の解明を行うことを目的とし、SEMG の精子側受容機構と精子膜ラフト構造の関連について検討し、SEMG による精子膜ラフト構造を介した運動及び受精能獲得調節機構の解明を行う。これまでに SEMG が精子の運動及び受精能獲得過程を抑制する作用を持つことは明らかになっているが、その受容機構については明らかになっていない。特異的な受容体が存在する場合、その受容体が精子膜ラフト構造に関連して存在することが考えられるので受容体と相互作用する構成タンパク質を同定しシグナル伝達経路を明らかにする。一方、ヒト精子において受精能獲得前後で SEMG が精子膜ラフト構造の変化に影響を及ぼすことを予備実験で確認しているのでこの機構に SEMG が関与している可能性について検討する。

## 3. 研究の方法

ヒト精子における SEMG による膜ラフト構造への影響を明らかにするために、精子を採取し Percoll 洗浄の後、受精能獲得のための培地中で培養する際に培地に SEMG を添加して先体反応及び精子運動超活性化と膜ラフト構造の変化を検出する。先体反応の検出にはイオノフォアまたはプロジェステロンによる先体反応の強制誘起と FITC-PSA (*Pisum sativum agglutinin*) による蛍光ラベルをもちいる。精子運動超活性化は CASA (Computer-Assisted Semen Analyzer) パラメーターの超活性化分類で超活性化率を算出する。膜ラフト構造の変化を観察するには FITC-CTB (*cholera toxin B subunit*) による GMI ガングリオシドの蛍光染色を用いる。SEMG と膜ラフト画分の結合の有無を FITC-CTB と抗 SEMG 抗体による蛍光染色との二重染色で確認する。また、膜ラフト画分を定法に従って精製し、その構成タンパク質についてウエスタンブロットによる解析を行う。実験に用いるヒト精子は健常ボランティアに提供を受ける。精液検査は WHO の推奨する方法を用い、検査結果が正常の範囲内にあるものだけを実験に用いる。又、当実験計画に使用する検体の収集については、既に研究協力先である聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会の承認を得ており、検体の提供を受ける際は、必要な事項について被験者に十分説明し、被験者の自由意思による同意を文書

で得る。検体を直接取り扱う実験に関しては研究協力先である聖マリアンナ医科大学に申請者が向いて行い、それ以外の実験及び結果の解析は桐蔭横浜大学で行う。平成19年度の研究で検出された精子膜ラフトタンパク質については必要に応じて SDS-PAGE あるいは二次元電気泳動にて分離後、トリプシン分解産物の LC/MS/MS によって同定を行う。また、近年精子の受精能獲得に膜ラフトタンパク質のチロシンリン酸化が重要な役割を果たしていると考えられているので SEMG による受精能獲得抑制にもこの経路が関与している可能性を考慮して膜ラフトタンパク質のチロシンリン酸化をウエスタンブロットにより検討する。SEMG が膜ラフト構造と結合しているかどうか、またその様式を明らかにするために水晶発振子マイクロバランス測定法による分子間結合測定を行う。さらに架橋試薬により SEMG とそれぞれの精子を架橋した後、上記と同様に膜ラフト画分を精製して結合の有無と結合タンパク質について抗 SEMG 抗体を用いたウエスタンブロットによる解析を行う。特異的な結合を起こす受容体の有無に関してはこれまでの検討により塩基性蛋白質である RNase をコントロールに用いることで検討可能であると考えられる。また、精子の受精能獲得には膜からのコレステロールの流出が必須であるため膜構成脂質の測定をアンプレックスレッド・コレステロールアッセイキットにより FACS を用いて行う。またこの際に SEMG がコレステロールの流出そのものに影響を与えている可能性についても検討する。

#### 4. 研究成果

ヒト精子における SEMG による膜ラフト構造への影響を明らかにするために、当初、精子の洗浄法として Percoll 密度勾配遠心法を予定していたが、SEMG の精子運動超活性化への影響を検討するにあたり洗浄方の影響が懸念されたためまず、Percoll 法と swim-up 法の比較を行った。その結果、Percoll 洗浄と swim-up 処理が精子の運動に及ぼす影響について明らかな差があり、swim-up 処理は精子の運動性を超活性化状態により近づけていることが示された。さらに、SEMG は高濃度でいずれの処理の場合も精子運動を完全に抑制するが、低濃度では swim-up 処理における直進性、平均運動半径の抑制を解除、すなわち超活性化状態に至る経路をより強く抑制していることが示された。従って、in vivo に於ける精子運動超活性化についても PSA により低分子化した SEMG がその調節の重要な役割を担っていると考えられ、SEMG は精子運動の生理的な超活性化抑制因子でもあることが示唆された。また、膜ラフトへの影響に関してはマウスで

の相同タンパク質 SVS2 とガングリオシド GM1 の結合が明らかになったのでヒト精子についても同様な方法で精子全膜脂質の抽出が可能であるかどうか検討を行い、同様に抽出されることを確認した。さらにガングリオシド GM1 に対する SEMG の結合について検討を行った。本検討には Far-western 法を用いたがバックグラウンドが高く、更なる条件検討が必要である。SEMG 結合タンパク質については免疫沈降法での検討を行い、一般的な膜タンパク質可溶化バッファーである RIPAbuffer にて抽出した膜タンパク質中に SEMG に結合するタンパク質をいくつか見いだすことができた。しかしながら、RIPAbuffer による抽出ではタンパク質の変性が起こっている可能性があり、正常な結合が検出されていないと考えられたので、さらなる検討の結果、膜タンパク質の抽出には、窒素キャビテーションと超遠心により精子の膜画分を調整し、NP-40 を用いて可溶化を行うことに決定した。免疫沈降の条件検討は行ったが、現在のところこれまでに報告のある低分子量のアダプタータンパク質は見られていないが、特異的な膜タンパク質は得られていない。しかしながら、SDS-PAGE での検討により免疫沈降された画分には泳動阻害を起こす物質が含まれており、恐らく脂質だと考えられる。従って、やはり SEMG と精子膜脂質の直接相互作用も視野に入れた検討が必要であると考えられる。これらの結果より、今後は SEMG の精子膜上での受容機構の候補として、糖脂質とタンパク質の両方を検討する予定である。一方、別の分子間結合測定法である水晶発振子マイクロバランス法を用いた検討も行った。水晶発振子上に固定された膜画分に対する SEMG の結合は観察されているが、CTB による結合阻害は見られていない。

また、膜構造への影響評価として膜電位に及ぼす影響についてフローサイトメーターと電位依存性蛍光色素を用いた検討も行った。SEMG は swim-up 処理したヒト精子膜を可逆的に過分極させた。このとき精子運動が抑制されていることも確認した。更に長時間の SEMG による処理や SEMG 高濃度での処理では精子の一部に脱分極がみられ、膜の透過性が変化して PI 陽性になることが観察され、これは不可逆的であった。これらの結果より swim-up 処理後の精子に対して SEMG は膜構造を変化させその透過性を上げる働きがあることが示唆された。今後はこの現象と膜ラフト構造との関連についても検討する予定である。

#### 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4件)

- ①. Yoshida K, Kawano N, Yoshiike M, Yoshida M, Iwamoto T, Morisawa M Physiological roles of semenogelin I and zinc in sperm motility and semen coagulation on ejaculation in humans. Mol Hum Reprod 査読有 14(3), 2008, 151-156
- ②. Yoshida M, Kawano N, Yoshida K. Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanisms Cell Mol Life Sci 査読有 65(21), 2008, 3446-3457
- ③. Kawano N, Yoshida K, Iwamoto T, Yoshida M. Ganglioside GM1 mediates decapacitation effects of SVS2 on murine spermatozoa. Biol Reprod. 査読有 79(6), 2008, 1153-1159
- ④. Yoshida K, Krasznai ZT, Krasznai Z, Yoshiike M, Kawano N, Yoshida M, Morisawa M, Tóth Z, Bazsáné ZK, Mária T, Iwamoto T. Functional implications of membrane modification with semenogelins for inhibition of sperm motility in humans. Cell Motil Cytoskeleton 査読有 66(2), 2009, 99-108

〔学会発表〕 (計5件)

- ①. 河野菜摘子、吉田 薫、吉田 学、マウス受精能破壊因子 SVS2 の受容体はガングリオシド GM1 である、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、2007年12月、横浜
- ②. 吉田 薫、吉池美紀、野澤資亜利、岩本晃明、ヒト精漿タンパク質Semenogelinが精子運動に及ぼす影響、日本動物学会第78回大会、2007年9月、弘前
- ③. 吉田 薫、吉池美紀、野澤資亜利、岩本晃明、ヒト精囊分泌タンパク質Semenogelinがs wim-up後の精子運動に及ぼす影響、日本アンドロロジー学会第26回学術大会、2007年7月、千葉
- ④. 吉田薫、吉池美紀、吉田学、森澤正昭、Zoltan Krasznai、Terez Marian、岩本晃明、精囊分泌タンパク質Semenogelinの精子膜電位および膜透過性への影響、日本アンドロロジー学会第27回学術大会、2008年7月、京都
- ⑤. 吉田 薫、ヒト精囊分泌タンパク質SEMG1 & 2による精子受精能獲得過程の制御、第8回受精シンポジウム(日本動物学会第80回大会)、2009年9月18日、静岡グランシップ

〔図書〕 (計1件)

Kaoru Yoshida, Teruaki Iwamoto, and Manabu Yoshida, Nova Science Publishers, **Human Spermatozoa: Maturation, Capacitation and Abnormalities** Effects of the Seminal Plasma

Proteins Semenogelin (SEMG)/Seminal Vesicle Secretion 2 (SVS2) on Sperm Fertility pp.205-220, 2010, pp545

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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◇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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 薫 (YOSHIDA KAORU)  
桐蔭横浜大学・先端医用工学センター・講師  
研究者番号：70398973

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

岩本 晃明 (IWAMOTO TERUAKI)  
国際医療福祉大学・大学病院・教授  
研究者番号：60046117

吉田 学 (YOSHIDA MANABU)  
東京大学大学院・理学系研究科・准教授  
研究者番号：60301785