

令和 6 年 9 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2021～2023

課題番号：20KK0376

研究課題名（和文）精子における膜電位シグナルによる脂質リモデリングの解明

研究課題名（英文）Lipid Remodeling by Membrane Potential Signaling in Sperm

研究代表者

河合 喬文（Kawai, Takafumi）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70614915

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では、精子において膜電位を感知してイノシトールリン脂質の量を制御する電位依存性ホスファターゼVSPに着目して、それが他の脂質分布に与える影響を検証した。スクランブラーゼの一種として知られるTMEM16Fに着目し、この活性がイノシトールリン脂質による制御を受けるのかどうかについて、VSPを人為的にHEK細胞に発現させることで検証した。その結果、確かにVSPを脱分極刺激によって活性化させることで、TMEM16Fに由来する陽イオン電流の量が減少していく様子が観察され、TMEM16Fのイノシトールリン脂質感受性の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで我々は、精子において新規の電位感知機構（VSPによる電位感知機構）が存在することを明らかにし、それが成熟精子の運動制御に関わることを報告していた。この際は、VSPによる成熟精子のイオンチャネル活性の制御に焦点を置いていたが、最近の我々の研究により、VSPの活性にはむしろ「未成熟精子」の電気信号が重要であることが分かりつつある。本研究ではさらに、この「未成熟精子の電気信号」が、膜蛋白質の発現や他の脂質分布の制御にも関わりうることを明らかにしている。このような知見は、将来的には精子を対象とした不妊治療などにおいても、重要な役割を果たすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the voltage-gated phosphatase VSP, which senses membrane potential and regulates the amount of inositol phospholipids in spermatozoa, and examined its effects on other lipid distributions. Focusing on TMEM16F, known as a type of scramblase, we tested whether this activity is regulated by inositol phospholipids by heterologously expressing VSP in HEK cells. As a result, we observed that the amount of cation current derived from TMEM16F decreased when VSP was activated by depolarizing stimuli, suggesting the existence of inositol phospholipid sensitivity of TMEM16F.

研究分野：生理学

キーワード：精子 膜電位 脂質

## 1. 研究開始当初の背景

一般に細胞の膜電位情報は「電位依存性イオンチャネル」によって感知され、それに伴うイオンの流入によって細胞生理機能が制御されることが広く知られていた。これら電位依存性イオンチャネルは、膜電位を感知するための電位センサードメイン、ならびにイオン透過を担うポアドメインより構成され、この構造によって電位依存的なイオンチャネル活性を示すことが可能となる。一方で我々が近年着目している電位依存性酵素 VSP(voltage sensing phosphatase) は、例外的に電位センサーにホスファターゼドメインが繋がった特有の構造を持ち、in vitro では膜の脱分極に伴ってイノシトールリン脂質(PIP2)を脱リン酸化するという興味深い機能を持つ(Murata et al. Nature. 2005)。すなわち VSP は「電気信号」を酵素反応という「化学信号」に変換するという稀有な機能を有している。これまでの研究から、VSP は種を通じて精巣に発現することが示されていたが、その生理機能は明らかにされてこなかった。

これまで我々は、VSP 欠損マウスを作製し、そこから摘出した精子を用いることで、(1) VSP が精子で機能してホスファターゼ活性を示していること(すなわちイノシトールリン脂質 PIP2 を脱リン酸化し、その量を減少させていること)、(2) VSP の欠損により精子が受精時に示すカルシウムシグナルに異常を生じること、そして(3)それにより精子の受精時の運動性に異常が生じ、(4)体外受精能の成績が劇的に低下すること、などを明らかにしてきた(Kawai et al., PNAS, 2019)。すなわち VSP は精子のイノシトールリン脂質のプロファイルを有意に変化させており、イノシトールリン脂質依存的なイオンチャネル活性を制御することで精子の運動性制御に寄与していた。

一方でこれまでもイノシトールリン脂質については、イオンチャネルの制御以外にも様々な役割を担っていることが知られている。例えば種々のシグナルカスケードの制御、膜蛋白質の発現制御にも関わることが報告されている。したがって VSP が上記で証明したイオンチャネルの機能修飾以外にも、なんらかの機能を精子において有しているという可能性も十分に考えられる。

興味深いことに、これまでに精子を用いた研究から、ホスファチジルセリンと呼ばれる脂質について、その成熟過程に応じて量や分布が変化することが知られていた(脂質リモデリング)。この点について、実際に我々も質量分析による検証を行ったところ、実際に精子の成熟に応じてホスファチジルセリンの量に変化が生じていることを観察した(東京医科歯科大学・佐々木雄彦教授との共同研究)。上記に加え、我々は、近年、VSP の活性が、成熟精子よりもむしろ、未成熟の状態にある精子から既に観察されていることを見出ししていた。すなわち、「未成熟精子の膜電位情報がイノシトールリン脂質の分布制御に重要である」ということが示唆されていた。これまでの研究から、ホスファチジルセリンについては、TMEM16F などのスクランブラーゼ活性によりその分布が変化することが知られている。その一方で、種々のイオンチャネルやトランスポーターの活性は、イノシトールリン脂質による制御を受けることがこれまでの研究から分かっている。以上を考えると、VSP が未成熟精子のイノシトールリン脂質分布を制御することで、ホスファチジルセリンの分布を制御するスクランブラーゼの活性をも制御しているという仮説も考えられる。そこでこの点を検証するため、TMEM16 ファミリー蛋白質について、生物物理から生物学を含む幅広い研究を行っている Duke 大学 Huanghe Yang 研究室と連携研究を行うこととした。

## 2. 研究の目的

TMEM16 ファミリーのなかでもホスファチジルセリンに対するスクランブラーゼ活性を持つことで有名な TMEM16F に着目し、その活性がイノシトールリン脂質による制御を受けるのか、を明らかにすることを目的とした。また、これまでの我々の研究から、イノシトールリン脂質による膜タンパク質の修飾に当たっては、その修飾が存在するかどうかだけでなく、実際にどの程度の親和性があるか、が重要であることが明らかになっている。とりわけ、我々は精子においては特殊なイノシトールリン脂質環境が形成されていることを見出ししているため、TMEM16F についてもこの点を検証することが重要であろうと考えた。さらに、上記の点が明らかになった場合は、イノシトールリン脂質のなかでも最も重要な種類である PIP2 と TMEM16F、そしてホスファチジルセリンの空間的關係を更に詳しく調べ、VSP によるイノシトールリン脂質以外の脂質分布の制御機構が実在するのかを検証することも目的とした。

## 3. 研究の方法

TMEM16F は  $Ca^{2+}$  によって活性制御を受けるスクランブラーゼであり、その活性を正確に測ろうとすると、細胞にホスファチジルセリンプローブを投与した状態で膜電位制御実験を行う必要がある。この実験自体は不可能ではないが、ハードルが高いため代替案が求められた。本研究で我々が連携した Duke 大学 Huanghe Yang 研究室では、TMEM16F 研究に関するノウハウが蓄積されており、TMEM16F 活性の指標として、その活性の際に生じるイオン電流を測定することができることが分かった。そこでこのイオン電流を指標に TMEM16F 活性を測り、

PIP2 による制御機構も調べようと考えた。まずは HEK 細胞に TMEM16F 分子を強制発現させ、これを VSP と共発現させたときの影響を電気生理学的に見ることとした。本手法を用いることで、細胞に脱分極刺激をあたえると共にイノシトールリン脂質 PIP2 の量が減少する様子を観察することが出来る。次に、このような刺激を与えてから、TMEM16F に由来する電流量がどのように変化するかを検証した。

また変化が検証されたため、その効率を他のイオンチャネルとも比較することで、TMEM16F の PIP2 に対する親和性を評価することとした。

また精子における PIP2 の分布を可視化するために、PIP2 プローブに GST タグを標識した蛋白質を合成した。これを蛍光標識した抗 GST 抗体により観察することで、精子全体像における PIP2 の分布の詳細にせまろうと考えた。

#### 4. 研究成果

上記の通り、HEK 細胞に TMEM16F と VSP を共発現させた。細胞内に高濃度のカルシウムイオンを含めることで TMEM16F を活性化させ、また脱分極刺激を与えて VSP を活性化させることでその影響を検証した。その結果、VSP が活性化されることで TMEM16F の電流値が減少していく様子が観察され、TMEM16F の活性に PIP2 が重要であることが示唆された。一方で、その効率を詳しく見てみると例えば他の PIP2 感受性チャネルとして知られている KCNQ2/3 などよりは遥かに電流減少の効率が低く、TMEM16F は PIP2 に対して比較的、高親和性であることが示唆された。この結果は、(1)精子特異的のチャネルである Slo3 が PIP2 に対して非常に高い親和性を持つこと、また(2)精子の鞭毛においては、その高い PIP2 親和性に合わせるように、PIP2 の密度が VSP によって低く保たれている、という我々の研究成果とも一致しており、興味深い。

また、上記研究を行い、その結果を精子に適用するうえでは PIP2 の分布、ホスファチジルセリンの分布、そして TMEM16F の分布を詳細に研究する実験系の確立が必要であると考えた。PIP2 の精子鞭毛における分布については既に我々が共同研究で行っており(凍結レプリカ法、順天堂大・藤本教授との共同研究)、局所の PIP2 を解像度良く捉えることが出来ていた。しかしこの方法では局所のシグナルは捉えられても、鞭毛全体での分布を俯瞰して観察することが困難であるという問題を抱えていた。この点を克服するため、PIP2 プローブに GST タグを標識した蛋白質を作製し、細胞内の PIP2 を染色するという方法が取れないか考えた。neuro2a 細胞を対象としてこの方法を試してみたところ、内葉の PIP2 を綺麗に標識できた。したがってこの方法を精子の鞭毛に適用したところ、精子鞭毛での PIP2 の分布を予備実験ながら観察することができた。したがって今後は、PIP2 とホスファチジルセリン、TMEM16 蛋白質との空間的相関関係を明らかにし、それを精子の成熟というコンテキストの中で捉えることで、精子における電気信号を介した脂質分布の制御、という誰も明らかにしていない現象を探求していきたい。

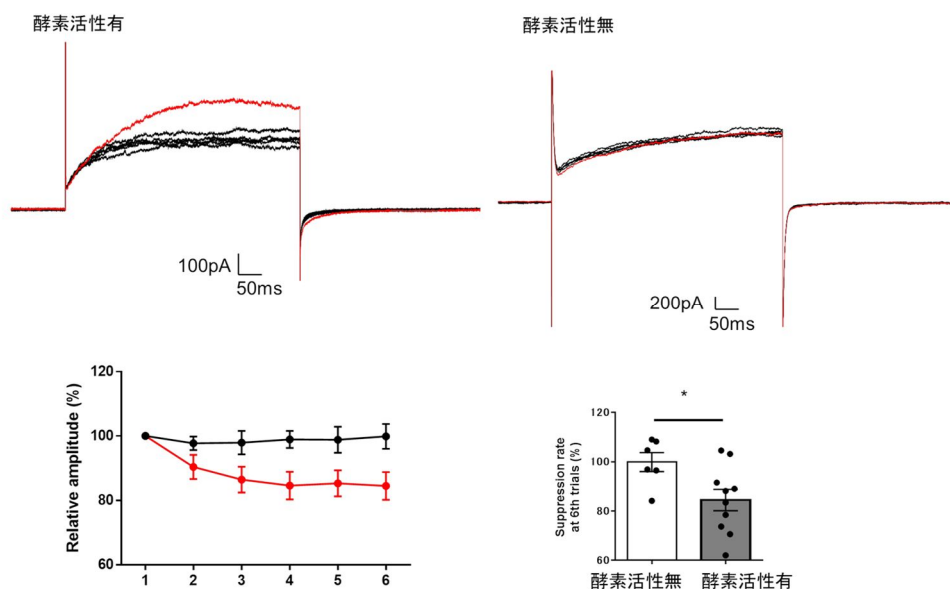


図1 VSP の活性化による、TMEM16F 電流の変化。  
 (上)酵母活性を持つ、或いは持たない VSP を準備し、TMEM16F と VSP の活性化を同時に行った。酵母活性のある実験においてのみ、TMEM16F 電流が減少していく様子が観察される。  
 (下)実際の時間経過と統計解析結果。左下のグラフについて、黒は酵母活性なし、赤は酵母活性ありの結果を示している。酵母活性ありのほうでは電流減少が見られることが分かる。右下には統計結果を示した。両者には有意な違いが存在する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawai T*, Narita H, Konno K, Akter S, Andriani R, Iwasaki H, Nishikawa S, Yokoi N, Fukata Y, Fukata M, Wiriyasermkul P, Kongpracha P, Nagamori S, Takao K, Miyakawa T, Abe M, Sakimura K, Watanabe M, Nakagawa A, Okamura Y (* corresponding author)	4. 巻 479(11)
2. 論文標題 Insight into the function of a unique voltage-sensor protein (TMEM266) and its short form in mouse cerebellum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem J	6. 最初と最後の頁 1127-1145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20220033	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 Ratanayotha A, Matsuda M, Kimura Y, Takenaga F, Mizuno T, Hossain MI, Higashijima SI, Kawai T*, Ogasawara M, Okamura Y* (* corresponding author)	4. 巻 5(1)
2. 論文標題 Voltage-sensing phosphatase (Vsp) regulates endocytosis-dependent nutrient absorption in chordate enterocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03916-6	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 該当する
1. 著者名 Paixao IC, Mizutani N, Matsuda M, Andriani RT, Kawai T, Nakagawa A, Okochi Y, Okamura Y	4. 巻 122(11)
2. 論文標題 Role of K364 next to the active site cysteine in voltage-dependent phosphatase activity of Ci-VSP	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophys J	6. 最初と最後の頁 2267-2284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2023.01.022	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 Kawai Takafumi, Okamura Yasushi	4. 巻 13
2. 論文標題 Spotlight on the Binding Affinity of Ion Channels for Phosphoinositides: From the Study of Sperm Flagellum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 834180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2022.834180	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 Kawai Takafumi, Hashimoto Masaki, Eguchi Natsuki, Nishino Junko M., Jinno Yuka, Mori-Kreiner Risa, Aspaker Mans, Chiba Daijiro, Ohtsuka Yukio, Kawanabe Akira, Nishino Atsuo S., Okamura Yasushi	4. 巻 296
2. 論文標題 Heterologous functional expression of ascidian Nav1 channels and close relationship with the evolutionary ancestor of vertebrate Nav channels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100783 ~ 100783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100783	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 Kawai Takafumi, Takao Keizo, Akter Sharmin, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Miyakawa Tsuyoshi, Okamura Yasushi	4. 巻 157
2. 論文標題 Heterogeneity of microglial proton channel in different brain regions and its relationship with aging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 624 ~ 641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15292	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Takafumi Kawai
2. 発表標題 Ion channel regulation by phosphoinositides phosphatase and its voltage-dependence in mice sperm flagellum
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会 (招待講演)
4. 発表年 2023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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	楊 黄河	デューク大学・Department of Biochemistry・Associate Professor	
	(Yang Huanghe)		

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	Duke University			