

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370030

研究課題名（和文） 受精時における精子受精能制御機構の解明

研究課題名（英文） Study on sperm motility and fertility

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

受精の過程において精子の運動能・受精能が調節されるメカニズムについて解明することを目的とし、本課題においては、主に精子走化性機構、及び精漿による精子の受精能調節機構の 2 点に研究内容を絞って研究を推進した。そして、精子走化性において重要な役割を果たしている精子鞭毛内  $Ca^{2+}$  濃度には細胞膜型  $Ca^{2+}$  ポンプが関与していること、マウス精嚢由来タンパク質 SVS2 が *in vivo* での精子の受精能獲得の調整に必須であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We are aiming to elucidate of control mechanisms of sperm movement and function during fertilization. In this study, we have studied on chemotaxis of ascidian spermatozoa and regulation of sperm capacitation by seminal plasma. Finally, we have found that a plasma membrane  $Ca^{2+}$ /ATPase is involved in ascidian sperm chemotaxis. In mouse, seminal vesicle secretion 2 (SVS2) is essential for regulating sperm capacitation in female genital tract.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野： 生殖生物学、動物生理化学

科研費の分科・細目： 生物系／生物学／基礎生物学／動物生理・行動

キーワード： 受精、精子活性化・誘引物質、精子受精能阻害物質、精子走化性、  
受精能獲得、カタユウレイボヤ、マウス

## 1. 研究開始当初の背景

精巣内で形成された精子は、機能的にはまだ未熟である。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。さらに多くの動物では、卵由来の物質によって活性化され、卵へ走化性運動を行う。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。そして卵周辺部において先体反応を起こし、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変化や受精能獲得

に対して抑制的に働くことが判っている。この卵由来物質や精漿といった、精子の外部環境因子による精子受精能の制御は、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。

卵由来物質による精子活性化は古くより数多くの報告があり、精子活性化物質もいくつかの種でとられている。一方、卵への精子走化性は現象としては多くの動物で知られているが、そのメカニズムはあまりわかっていないというのが現状であった。一方、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、前立腺や精巣上体から、受精能抑制因子の受精能抑制因子の幾つかの候補が示されている。一方、副生殖腺の一つである精囊中からも精子運動抑制因子が同定されている。しかし、未だに受精能抑制因子の生理的作用はわかっていなかった。

我々の研究グループはこの受精時における精子機能調節の研究にあたり、特に精子運動調節機構の分野で数多くの成果を挙げてきた。そこで、これまでの研究成果を土台として受精能獲得機構と精子運動調節機構の研究を有機的に結びつけ、精子の機能調節を統合的にとらえた研究を推し進めるべく、本研究課題を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究では、受精時における精子の運動能・受精能の調節メカニズムを解明することを目的とした。具体的には、受精能獲得機構と精子運動調節機構の研究を個々に進めつつ、両者を有機的に結びつけながら解析することを目指した。

## 3. 研究の方法

受精の過程において精子機能が外来因子によって調節されるメカニズムを統合的に理解することを目指し、本課題の実施期間においては精子走化性と受精能抑制機構に研究内容を絞り、精子活性化・誘引物質 SAAF によるカタユウレイボヤ精子運動調節機構、及び精囊由来の精漿成分 SVS2 によるマウス精子の受精能調節機構の 2 点に研究内容を絞り、研究をすすめることとした。具体的には以下の通りである。

### (1) 精漿由来物質による哺乳類精子の受精能調節機構の解明

我々の研究により、マウスにおいては精囊由来成分が精子の受精能獲得を抑制することが示され、その受精能抑制因子として、精囊分泌タンパク質 SVS2 が働くことを明らかにしていた。そこで、SVS2 と SVS2 受容体であるガングリオシド GM1 を足がかりに、SVS2

KO マウスを用いた解析や分子生物学的手法を用いて、主要なシグナル伝達機構を分子生物学的に探索した。また SVS2 類似タンパク質の機能を調べ、受精能抑制物質の生理作用の解明に努めた。

また、研究分担者である吉田薫を中心に、ヒト精囊由来精漿タンパク質 semenogelin (Sg) が精子受精能抑制因子として働きうるか、分子生物学的、生理学的に検討を行った。

### (2) 卵由来物質 SAAF によるカタユウレイボヤ精子運動調節機構の解明

我々は尾索動物カタユウレイボヤの精子誘引物質 SAAF を同定し、ある程度の精子活性化・走化性におけるシグナル伝達機構の解析を進めている。そこでこのカタユウレイボヤを主に用い、精子誘引物質 SAAF と結合するタンパク質をプロテオミクスの手法で探索し、さらにカルシウムイメージングや運動解析を通じて、運動能調節や受精能獲得機構における役割を調べた。また、カタユウレイボヤの近縁他種を用いて精子活性化・走化性機構の種特異性と共通性を探り、受精成立の効率化について検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 精漿由来物質による精子の受精能調節機構の解明：

我々は、マウスにおいて精囊から分泌されるタンパク質 SVS2 が精子の受精能獲得を抑制する働きがあることを示している。そこで本研究ではまず SVS2 が交尾後子宮内でどのように分布するかを調べた。交尾後数時間経った雌より雌性生殖器官を取りだし、抗 SVS2 抗体で染色したところ、SVS2 は子宮内膜に付着していたが、卵管では見られなかった。また、SVS2 と結合することが知られている GM1 の分布をコレラ毒素サブユニット B で染色したところ、やはり発情期に子宮内膜でのみ存在していた。このことは、交尾時に子宮内に侵入した SVS2 は子宮内膜にくっつき、卵管には侵入しないことを示している。

また、SVS2 遺伝子の KO マウスの作成を行った。そして、SVS2 が実際に *in vivo* において精子の自発的な受精能獲得を抑制し、正しい場所での受精能獲得を制御していることを明らかとした。

さらに、SVS2 以外の精囊分泌タンパク質が受精能獲得の抑制に働くかどうかを調べたところ、SVS4 も単独で受精能抑制に働くことがわかった。さらに SVS3 は単独では受精能抑制作用は無かったが、SVS2 と協調して受精能抑制を促進することも明らかとなった。

## (2)卵由来物質による精子運動調節機構の解明:

我々は、顕著に精子走化性を示す動物である尾索動物カタユレイボヤを用いて研究を行い、これまでにカタユレイボヤの精子誘引物質 (SAAF) を同定した。このSAAFによる精子誘引機構を明らかにするため、センサー分子であるSAAF受容体の同定を行った。

まず、光反応性官能基であるdiazirine基を導入した光架橋性biotin-SAAFによるSAAF結合タンパク質の検出をおこなった。カタユレイボヤ精子を人工海水に懸濁後、光架橋性biotin-SAAFを加えUV360nmを照射した。SDS-PAGEサンプルバッファーで直接可溶化したサンプルをSDS-PAGEにて分離、PVDF膜に転写した後、HRP-streptavidinによるoverlayで光架橋性biotin-SAAFラベルを検出したところ、SAAF特異的に標識される370kDa (p370) と150kDa (p150)のタンパク質が検出された。

次に、streptavidin-resin と biotin-SAAF を用いた SAAF 固相化レジンによる SAAF 結合タンパク質の pull down により受容体候補分子の精製を行った。カタユレイボヤ精子を窒素ガスキャビテーション処理後、超遠心分離により細胞膜画分を調整した。これを0.1%NP-40を含むPBS中に超音波処理により懸濁し、SAAF 固相化レジンによるアフィニティ精製を行った結果、p370を含むSAAF結合タンパク質を得た。これをSDS-PAGEにより分離し、p370のバンドをMALDI-TOF-MASSをもちいたPMF法により解析したところ、細胞膜型Ca<sup>2+</sup>/ATPase (PMCA/ATP2B3)と同定された。カタユレイボヤPMCAは予想分子量が133kDaであるが、PMCA抗体によるウェスタンブロッティングにより、約130kDaのタンパク質と共にp370が認識されることから、p370が実際にPMCAであることが明らかとなった。このPMCAについて、さらに詳細な解析を行ったところ、カタユレイボヤ精子膜上では、128kDaの新規バリエーションが主に発現していることを明らかにした。さらに、抗pan PMCA抗体5F10を用いたカタユレイボヤ精子の免疫染色を行ったところ、精子ではCiPMCAが鞭毛上に局在していることが明らかとなった。

このCiPMCAをSf9細胞にて発現させ、フローセル型のQCM (水晶発振子マイクロバランス) (NAPiCOS: 日本電波工業 (株)) による分子間相互作用測定を行ったところ、CiPMCA発現細胞にSAAFが結合することが示され、実際CiPMCAとSAAFが相互作用することが明らかとなった。

さらに、PMCAの阻害剤である

5-(and-6)-carboxyeosin diacetate を取り込ませたカタユレイボヤ精子は、運動速度等には変化は無いが、SAAF に対する走化性を全く示さなくなった。このことは、CiPMCA が実際に精子走化性に関与することを示す。

## 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7件)

- 1) Kambara Y., Shiba K., Yoshida M., Sato C., Kitajima K., & Shingyoji C. Mechanism regulating Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanosensory behaviour in sea urchin spermatozoa. *Cell Structure and Function* **36**, 69-82 (2011). doi: 10.1247/csf.10020 (査読有)
- 2) Kawano N., Yoshida K., Miyado K., & Yoshida M. Lipid Rafts: Keys to Sperm Maturation, Fertilization, and Early Embryogenesis. *J. Lipids*, Article ID 264706, 10 pages. (2011) doi:10.1155/2011/264706 (査読有)
- 3) Yoshida M., & Yoshida K. Sperm chemotaxis and regulation of flagellar movement by Ca<sup>2+</sup>. *Mol. Hum. Reprod.* **17**, 457-465 (2011). doi:10.1093/molehr/gar041 (査読有)
- 4) Yoshida K., Ochiai A., Matsuno H., Panayi G.S., & Corrigall V.M. Binding immunoglobulin protein (BiP) resolves rheumatoid synovitis: a xenogeneic study using rheumatoid arthritis synovial membrane transplants in SCID mice. *Arthritis Research & Therapy.* **13**:R149. (2011) doi:10.1186/ar3463 (査読有)
- 5) Kawano N., Ito J., Kashiwazaki N., & Yoshida M. Phosphorylation of the MAPK pathway has an essential role in the acrosome reaction in miniature pig sperm. *Reprod. Domestic Anim.*, **45**, 263-268 (2010) doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01279.x (査読有)
- 6) Terai K., Yoshida K., Yoshiike M., Fujime M., & Iwamoto T. Association of Seminal Plasma Motility Inhibitors/Semenogelins with Sperm in Asthenozoospermia-Infertile Men. *Urologia Internationalis*, **85**: 209-215 (2010) doi: 10.1159/000315976 (査読有)
- 7) Yoshida K., Krasznai Z.T., Krasznai Z., Yoshiike M., Kawano N., Yoshida M., Morisawa M., Tóth Z., Bazsáné Z.K., Marian T., & Iwamoto T. Functional implications of membrane modification with semenogelins for

inhibition of sperm motility in humans. *Cell Mot. Cytoskeleton*, 66, 99-108 (2009). doi: 10.1002/cm.20329 (査読有)

[学会発表] (計 37 件)

- 1) Yoshida, M. Sperm Chemotaxis in the Ascidian *Ciona intestinalis*. 3rd JAMBIO forum, Tokyo, Japan, January 14, 2012.
- 2) Yoshida, M. Role of  $Ca^{2+}$  in chemotactic behavior of ascidian sperm. 6th Asian-Pacific Organization for Cell Biology Congress, Manila, Philippines. February 25-28, 2011.
- 3) Yoshida, M. Sperm Chemotaxis in the Ascidian *Ciona intestinalis*. BIT's 1st Annual World Congress of Marine Biotechnology, Dailian, China, April 25-29, 2011.
- 4) 柴田 一, 土川博史, 松森信明, 村田道雄, 大石 徹, 平館裕希, 吉田 学, 森澤正昭. スジキレボヤ精子活性化誘引物質の構造決定を目指した合成研究 第 99 回有機合成シンポジウム 慶應大薬学部 (東京) 2011 年 6 月 15-16 日
- 5) Yoshida, K., Nakashima, A., Inaba, K., and Yoshida, M. Plasma membrane  $Ca^{2+}$ /ATPase acts as a SAAF receptor and regulates chemotactic response in the ascidian spermatozoa. Gordon Research Conference: Fertilization and the Activation of Development, Plymouth, NH, USA, July. 17-22, 2011.
- 6) 河野菜摘子, 荒木直也, 吉田 薫, 吉田 学, 宮戸健二. 精囊分泌タンパク SVS2 のマウス体内受精における役割について. 日本動物学会第 82 回大会 旭川 2011 年 9 月 21-23 日
- 7) 中島 章, 吉田 薫, 吉田 学. カタユウレイボヤ精子走化性における細胞膜型  $Ca^{2+}$ /ATPase の役割. 日本動物学会第 82 回大会 旭川 2011 年 9 月 21-23 日
- 8) 泉水 奏, 柴 小菊, 馬場昭次, 稲葉一男, 吉田 学. カタユウレイボヤ卵に於ける細胞外 pH 上昇による精子誘引物質の放出. 日本動物学会第 82 回大会 旭川 2011 年 9 月 21-23 日
- 9) 中島 章, 松永 茂, 吉田 薫, 吉田 学. カタユウレイボヤ精子走化性における細胞膜型  $Ca^{2+}$ /ATPase の役割. 第 6 回鞭毛・ダイニン機能研究会 東京 2011 年 10 月 1 日
- 10) 荒木直也, 吉田 薫, 河野菜摘子, 宮戸健二, 吉田 学. マウス精子受精能獲得における精囊分泌タンパク質 SVSs の機能解析. 第 34 回日本分子生物学会年会 横浜 2011 年 12 月 13-16 日
- 11) 吉田 薫, 稲葉一男, 吉田 学. カタユウレイボヤ精子誘引物質 SAAF の精子受容体同定の試み. 第 5 回鞭毛・ダイニン機能研究会 東京 2010 年 3 月 23 日
- 12) 荒木直也, 河野菜摘子, 宮戸健二, 吉田 薫, 吉田 学. 精囊分泌タンパク質 SVS による精子受精能抑制機構. 第 5 回鞭毛・ダイニン機能研究会 東京 2010 年 3 月 23 日
- 13) 吉田 薫, 稲葉一男, 大石 徹, 村田道雄, 吉田 学. カタユウレイボヤ精子誘引物質 SAAF 受容体の探索. 第 24 回海洋生物活性談話会 広島県竹原市 2010 年 6 月 5-6 日
- 14) Yoshida, M. Mechanism of ascidian sperm chemotaxis. 11th International Symposium on Spermatology, Okinawa, Japan. June 24-29, 2010.
- 15) Araki, N., Yoshida, K., and Yoshida, M. Function of seminal vesicle secretion proteins (SVSs) in capacitation of mouse sperm. 11th International Symposium on Spermatology, Okinawa, Japan. June 24-29, 2010.
- 16) Kawano, N., Araki, N., Yoshida, K., Yoshida, M., and Miyado, K. The essential role of seminal vesicle secretions on the sperm fertility in the female reproductive tract. 11th International Symposium on Spermatology, Okinawa, Japan. June 24-29, 2010.
- 17) Yoshida, K., Oishi, T., Murata, M., and Yoshida, M. A plasma membrane  $Ca^{2+}$  ATPase is a potential candidate for the SAAF receptor. 11th International Symposium on Spermatology, Okinawa, Japan. June 24-29, 2010.
- 18) Terai K, Yoshida K., Yoshiike M, Iwamoto T, Matsuura R, and Yoshida A. Evaluation of sperm quality based on SPMLs binding on ICSI outcome. 11th International Symposium on Spermatology, Okinawa, Japan. June 24-29, 2010.
- 19) 吉田 薫, 稲葉一男, 吉田 学. カタユウレイボヤ精子走化性における誘引物質の受容体探索. 日本プロテオーム学会 2010 年会 浦安 2010 年 7 月 26 日
- 20) 吉田 薫, 稲葉一男, 吉田 学. カタユウレイボヤ精子走化性における誘引物質受容機構. 日本動物学会第 81 回大会 東京 2010 年 9 月 23-25 日
- 21) Yoshida K. Sperm chemotaxis mediated by control of intracellular  $Ca^{2+}$  via plasma membrane

- Ca<sup>2+</sup> ATPase. Toin International Symposium on Biomedical Engineering 2010, Yokohama, Japan. November 6, 2010.
- 22) Hatano K, Yoshida K, Hagiwara K, Miura Y, and Hagiwara H. Biodistribution of PEG-Modified Gold Nanoparticles in Mice. Toin International Symposium on Biomedical Engineering 2010, Yokohama, Japan. November 6, 2010.
- 23) Sako N, Sasaki K, Kamakura S, Yamasaki K, Yoshida K, and Hagiwara H. Localization of Androgen Receptor Corepressor Testicular Zinc-finger Protein on Mouse Testis. Toin International Symposium on Biomedical Engineering 2010, Yokohama, Japan. November 6, 2010.
- 24) 荒木直也, 河野菜摘子, 吉田 薫, 宮戸健二, 吉田 学. マウス精子の受精能獲得抑制に対する精囊分泌タンパク質SVS2の作用. 第33回日本分子生物学会年会 神戸 2010年12月7-10日
- 25) 河野菜摘子, 金井誠也, 荒木直也, 吉田 薫, 吉田 学, 宮戸健二. 精囊腺タンパク質SVSの体内受精における役割. 第33回日本分子生物学会年会 神戸 2010年12月7-10日
- 26) 吉田 薫, 稲葉一男, 吉田 学. カタコウレイボヤ精子走化性における誘引物質受容機構. 第33回日本分子生物学会年会 神戸 2010年12月7-10日
- 27) 吉田 学, 近藤江里, 柴小菊, 大石 徹, 村田道雄. ホヤ精子誘引物質と精子運動制御機構. 第23回海洋生物活性談話会 三浦 2009年5月23-24日
- 28) Kondoh, E., Konno, A., Inaba, K., Ohishi, T., Murata, M., and Yoshida, M. How does the ascidian egg attract sperm? Releasing mechanisms of the sperm attractant SAAF from the egg. 5th International Tunicate Meeting, Okinawa, Japan, June 21-25, 2009.
- 29) Shiba, K., Baba, S.A, and Yoshida, M. Sperm chemotactic behavior and Ca<sup>2+</sup> dynamics of the ascidian, *Ciona intestinalis*. 5th International Tunicate Meeting, Okinawa, Japan, June 21-25, 2009.
- 30) Maruyama, K., Shiba, K., Baba, S.A., and Yoshida, M. Role of Ca<sup>2+</sup> in chemotactic behavior of ascidian sperm. Gordon Research Conference: Fertilization and the Activation of Development, Plymouth, NH, USA, July 12-17, 2009.
- 31) Shiba, K., Miyashiro, D., Kamimura, S., Baba, S.A, and Yoshida, M. When do spermatozoa detect the chemoattractant? – Experimental and simulation study. Gordon Research Conference: Fertilization and the Activation of Development, Plymouth, NH, USA, July 12-17, 2009.
- 32) 荒木直也, 吉田 学, 吉田 薫. マウス精子受精能獲得における精囊腺タンパク質 SVSの機能解析. 日本動物学会第80回大会 静岡 2009年9月17-20日
- 33) 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 静岡 2009年9月18日
- 34) Yoshida, M. Mechanism of sperm chemotaxis: How are spermatozoa guided to eggs? International Symposium on Cellular Signaling ~ principles and functions~, Tsukuba, Japan. November 18-19, 2009.
- 35) 吉田 学. 卵への精子走化性における精子運動制御のメカニズム. 日本発生物学会秋季シンポジウム 三島 2009年11月27-29日
- 36) 柴小菊, 馬場昭次, 吉田 学. 卵に対する精子走化性: 精子の誘引物質認識と応答のメカニズム. 第32回日本分子生物学会年会 横浜 2009年12月9-12日
- 37) 吉田 学. マウス精囊由来物質による精子受精能調節機構. 第41回精子研究会 駒場 2009年12月19日
- [図書] (計2件)
- 1) Yoshida M. Regulation of sperm chemotaxis in the ascidian, *Ciona intestinalis*. in **"Sperm Cell Research in the 21st Century: Historical Discoveries to New Horizons."** (Ed. by M Morisawa), Adthree Publishing Co., Tokyo, Japan (2012) *in press*. (査読有)
- 2) Yoshida K, Iwamoto T. & Yoshida M. Effects of the seminal plasma proteins semenogelin (SEMG)/seminal vesicle secretion 2 (SVS2) on sperm fertility. in **"Human Spermatozoa: Maturation, Capacitation and Abnormalities."** (Eds. by T. Lejeune and P. Delvaux), Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge NY, pp.205-220 (2010) ISBN: 978-1-60876-401-3 (査読無)
- [その他]
- (1) ホームページ  
<http://www.mmbs.s.u-tokyo.ac.jp/research/Yoshida/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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

### (3) 連携研究者

なし