

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2014

課題番号：24880010

研究課題名(和文) 精巣上体における精子の選択的分子獲得機構に関する研究

研究課題名(英文) Mechanism for selective acquisition of functional proteins in sperm during epididymal transit

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) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：精子は精巣上体通過中に、内腔液から機能性分子を選択的に取り込むことで受精能力を獲得する(精巣上体成熟)。最近、このプロセスが精巣上体で分泌されるエクソゾームにより仲介されることが報告されたが、選択的分子獲得に関わるメカニズムは明らかではない。本研究では、精巣上体成熟機構を細胞膜の機能解析を通して解明することを目的とした。

その結果、精子はエクソゾームからタンパクを選択的に獲得する可能性が示唆された。また、タンパクの獲得を制御する精巣上体管内腔液のpH調節には、上皮細胞群における細胞内シグナリング経路の関与が示唆された。さらに、エクソゾームは主に精巣上体頭部で分泌される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sperm undergo functional maturation by selectively taking up molecules during epididymal transit, in order to become competent to fertilize egg (so called epididymal maturation). Recent studies showed that this process is mediated by exosomes secreted from epididymal epithelia. However, the mechanism involved in selective acquirement of molecules is poorly understood. This led us to investigate the mechanism for epididymal maturation with particular focus on membrane function. Given results suggested that sperm selectively acquire protein from exosomes. Regulatory mechanism of pH that is known to affect protein acquirement was suggested to involve the cellular signaling pathway. In addition to this, results suggested the possibility that secretion of exosomes mainly occurs in caput epididymis.

研究分野：繁殖生物学

キーワード：精子 精巣上体成熟 細胞膜 受精

1. 研究開始当初の背景

最近のプロテオーム解析により雄の妊孕性は精巣上体を含む副生殖器分泌物の組成に影響されることが分かってきた。このことから精巣上体は受精能力の制御において重要な役割を果たしていることを顕示している。

精巣上体通過中の精子は、内腔液から様々な機能性タンパクや脂質を細胞膜へ選択的に取り込むことにより受精能力を獲得する(精巣上体成熟)。内腔液の組成は精巣上体上皮細胞群により協同的に調節されていることは知られていた。最近精子への外部タンパクの輸送はこの上皮細胞層が分泌する膜小胞であるエクソゾームにより仲介されることが分かってきた。さらに最近の体外実験の結果、この反応は酸性条件下で促進されることが報告された。しかし精子の選択的分子獲得に関わるメカニズムの全容には未だ多くの謎が残されている。

最近エクソゾームおよび精子の頭部先体原形質膜において膜ラフトマイクロドメインが存在していることが明らかにされた。膜ラフトはガングリオシド  $G_{M1}$  ( $G_{M1}$ )や機能性膜タンパクを豊富に含む生体膜マイクロドメインで、様々な細胞種において機能性分子の細胞間輸送時の選択的分子挿入に関わっている。最近、我々の行ったプロテオーム解析で、精子の膜ラフトは精巣上体成熟期間中に一部の機能性タンパクを選択的に獲得することが分かった。このことから膜ラフトは精子の選択的分子獲得において何らかの機能的役割を果たしていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は家畜を用いて精巣上体成熟機構を膜ラフトの機能解析を通して統括的に解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1)と蓄場由来ブタ精巣上体尾部にマイクロカニューラを挿入し、PBSを還流することで精巣上体内腔液を回収した。そのサンプルを超遠心分離(100,000xg, 1時間)に供し、エクソゾーム分画を得た。エクソゾームを再懸濁した後、1.0mg Sulfo-LC-Biotin reagentで30分間ビオチン標識し、使用するまで4°Cで保存した。精巣上体尾部から回収した精子をTCM199培養液で洗浄後、 $2 \times 10^7$ 精子/mlに調整し、エクソゾームと1時間38.5°Cで共培養した。遠心分離(1000xg, 10分間)で回収した精子をSDS-PAGEに供し、NeutrAvidin-HRPを使って精子におけるビオチン標識タンパク質の存在を解析した。

(2)エクソゾームを3mM 2-OHCDで15分間処理した後、1% TX100を添加し、さらに15分間4°Cで培養した。遠心分離(20,000xg, 2時間)で回収した溶性分画および不溶性分画をSDS-PAGEに供した。

(3)生後7日齢のブタ精巣上体頭部を、種々の

酵素を添加したRPMI1640で1時間処理することにより、精巣上体上皮細胞を分離した。遠心濃縮した上皮細胞( $1 \times 10^6$ 細胞)を、テストステロンおよびEGFを添加した後、コラーゲンコートディッシュに播種し、34°Cで7-10日間培養した。コンフルエントに達した精巣上体上皮細胞にアンジオテンシンIIあるいはフォルスコリンを添加し3時間培養後、培養液のpH変動を調べた。

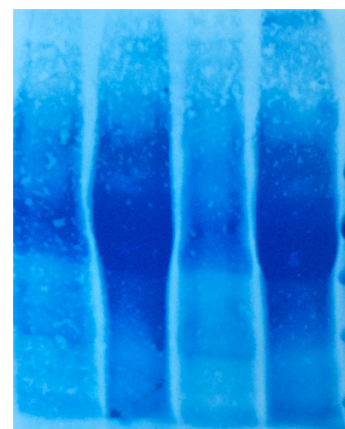
(4)還流固定したマウス精巣上体組織から凍結組織切片を作製した。PBS処理、メタノール処理、あるいは1%SDS処理で抗原不活化した組織切片を、膜ラフトマーカーである $G_{M1}$ に特異的に結合するコレラ毒素Bサブユニット(CTB)-Alexa488および/あるいはV-ATPaseサブユニットB1およびa4抗体を用いて免疫染色に供した。観察には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

(5)マウス精巣上体頭部、体部および尾部から回収した精子( $5 \times 10^7$ 細胞)から超音波破碎により膜分画を分離した。膜分画をCTB-HRPを使ったスロットブロットに供し、 $G_{M1}$ 含量の定量解析を行った。

4. 研究成果

(1)エクソゾーム由来精子タンパク質の解析

マイクロカニューラを使ってブタ精巣上体尾部を還流した結果、内容物からエクソゾームを得ることに成功した。ビオチン標識エクソゾームと精巣上体精子を共培養した結果、一部のエクソゾームタンパク質が精子に移行されることが分かった。2-OHCDでコレステロールを流出させたエクソゾームのタン



1 2 1 2  
+ -  
2-OHCD

(1)非ラフト, (2)ラフト  
図 1. エクソゾームのタンパク質構成

パク質解析の結果、様々なタンパク質がエクソゾームに会合していることが明らかになった(図 1)。以上の結果、精子はエクソゾームからタンパク

質を獲得すること、またこの機構には膜ラフトが関与している可能性が示唆さ

れた。

(2)ブタ精巣上体一次上皮細胞における  $H^+$ 分泌のメカニズム

ブタ精巣上体頭部の酵素処理により回収した上皮細胞を約一週間培養することにより、初代培養細胞を確立することに成功した。培

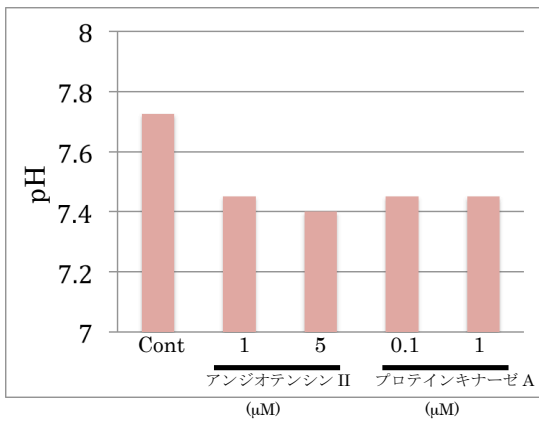


図2. 大鼠精巣上体初代培養細胞からのH<sup>+</sup>分泌

養細胞を1あるいは5μM アンジオテンシンIIで刺激した結果、H<sup>+</sup>の分泌が促進され、外部液の酸性化が起こった。さらにプロテインキナーゼA促進剤の0.1あるいは1μM フォルスコリンで刺激しても同様の効果が得られた(図2)。以上の結果から、精巣上体内腔液の酸性化には、アンジオテンシンIIレセプタ

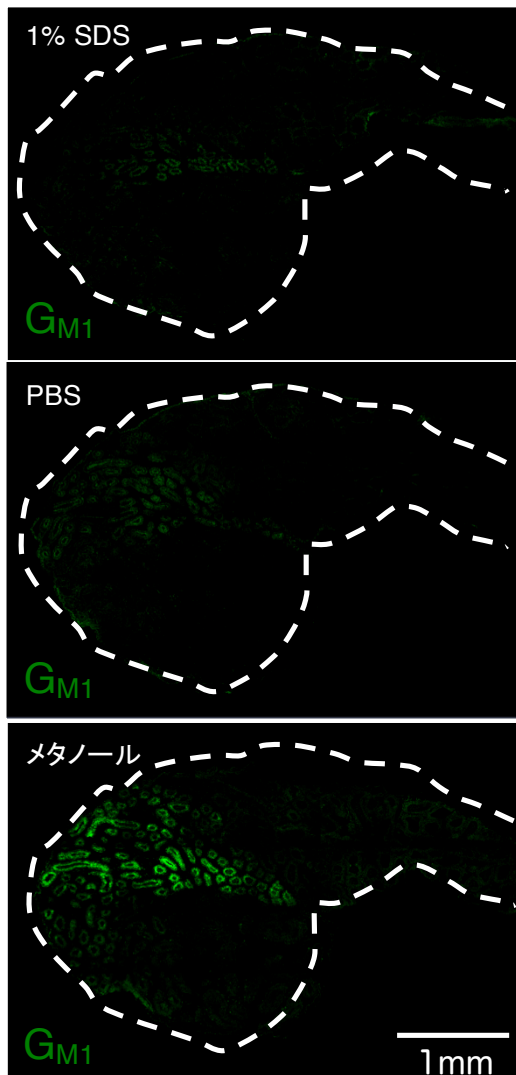


図3. 異なる抗原賦活化法によるG<sub>M1</sub>の局在

ーを起点とするプロテインキナーゼAのシグナル経路が関与していることが示唆された。

### (3)マウス精巣上体における膜ラフトの局在特性

マウス精巣上体組織切片の抗原賦活化法を比較した結果、1%SDSおよびPBS処理と比較してメタノール処理において最も強いG<sub>M1</sub>のシグナルが得られた(図3)。またG<sub>M1</sub>は精巣上体頭部の一区画およびその周辺の特異的細胞に著しく豊富に発現していることが分かった。G<sub>M1</sub>とクリアー細胞特異的膜タンパクであるV-ATPase B1あるいはα4サブユニットの共染色を行った結果、G<sub>M1</sub>を豊富に発現している特異的細胞がクリアー細胞であることが判明した(図4)。以上の結果から、膜ラフトは精巣上体東部の一区画およびクリアー細胞において豊富に存在していることが明らかになった。

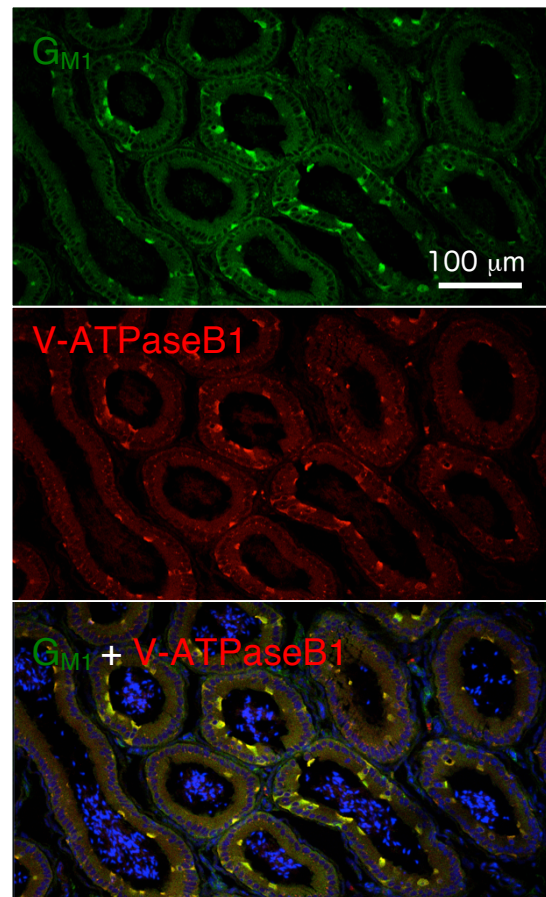


図4. 精巣上体頭部におけるG<sub>M1</sub>とV-ATPaseB1サブユニットの局在

### (4)精巣上体精子におけるG<sub>M1</sub>量の変化

スロットプロットを用いて、精巣上体頭部、体部、および尾部精子膜分画のG<sub>M1</sub>含有量を定量した結果、頭部精子細胞膜分画において最もG<sub>M1</sub>含有量が高く、体部および尾部にかけて減少することが分かった(図5)。以上の結果と(3)の結果をまとめると、精子は精巣上体頭部において膜ラフトを介してタンパク質

を獲得している可能性が示唆された。

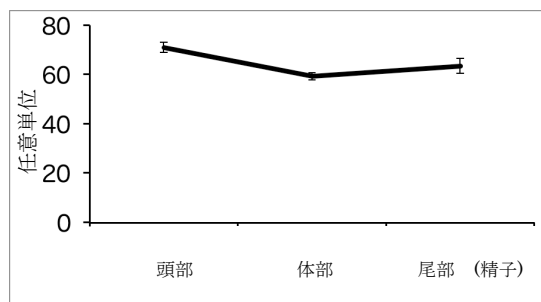


図 5. 異なる精巢上体精子における GM<sub>1</sub> 量の変化

## 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

① 浅野敦之、Alexander Travis.

マウス精巢上体における膜ラフトの局在特性. 日本畜産学会第 119 回大会、栃木県宇都宮市、宇都宮大学、2015 年 3 月 27 日.

## 6. 研究組織

(1) 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