

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450499

研究課題名(和文)精子先体形成におけるアクチン細胞骨格のダイナミクス

研究課題名(英文)Dynamics of actin cytoskeleton during mammalian spermatogenesis

研究代表者

兼森 芳紀(KANEMORI, Yoshinori)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：40529088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物の精子頭部には、先体とよばれるゴルジ体由来の細胞内小器官が存在する。我々は先体タンパク質のACRBP-Wとその選択的スプライシング変異体ACRBP-V5に着目し、遺伝子改変マウスの解析を行った。その結果、ACRBP-Wは精子セリンプロテアーゼAcrosinの自発的な活性化を制御すること、ACRBP-V5は精子形成過程での先体顆粒の形成に関与することが明らかになった。また、ACRBP-V5の欠損により、球状精細胞でのアクチン細胞骨格の異常形成が見い出された。アクチン構造を詳細に観察するため、アクチンを特異的に認識するプローブLifeactを発現するマウスの作製・解析を試みた。

研究成果の概要(英文)：Mammalian sperm possess a Golgi-derived exocytotic organelle, the acrosome, located on the apical region of head. We investigated genetically modified mice of acrosome protein ACRBP-W and its pre-mRNA alternative splicing variant ACRBP-V5. Consequently, the major function of ACRBP-W is to retain the inactive status of sperm serine-protease Acrosin until acrosomal exocytosis. ACRBP-V5 is involved in the formation and configuration of acrosomal granule during early spermiogenesis. Moreover, it was found that actin cytoskeleton of round spermatid was disrupted by the loss of ACRBP-V5. To observe in detail, we constructed transgenic mouse carrying the Lifeact probe which specifically recognized actin.

研究分野：農学

キーワード：マウス 精子形成 受精 選択的スプライシング 先体形成

1. 研究開始当初の背景

ほぼ全ての動物種の精子頭部には、先体(アクロソーム)とよばれるゴルジ体由来の特殊な細胞小器官がある。先体には、さまざまなタンパク質分解酵素が含まれており、受精での精子の卵子卵丘細胞層や透明帯の通過を助けるはたらきがある。精子形成過程において、先体の生合成は減数分裂後の球状精細胞から開始する。糖タンパク質が豊富な先体顆粒を含む複数の前先体小胞がゴルジ体から核膜表面に輸送され、各々が融合することで大きな先体胞を形成する。伸長精細胞になると、先体胞が伸長し半円形に成長、先体胞内部の先体顆粒が全体に広がり先体が完成する。この先体の劇的な形態変化には、アクチン細胞骨格を主成分とする3つの構造物: Ectoplasmic specialization, Acroplaxome, Manchetteが重要な役割を担っている。特にAcroplaxomeは、球状精細胞での先体と核との固着や核膜表面での前先体小胞同士の融合に必須な構造物である。

代表的な先体タンパク質の1つにACRBPが知られている。ACRBPは約20年前にブタの射出精子から同定され、トリプシン様セリンプロテアーゼAcrosinと結合することが示唆されている。その後の解析から、マウスACRBPには選択的pre-mRNAスプライシング制御によるバリエーションフォーム(野生型ACRBP-Wとイントロン5が保持した変異体ACRBP-V5)が存在すること、ACRBP-WとACRBP-V5は球状精細胞から先体胞内の先体顆粒に局在することが明らかになった(Kanemori et al. Biol. Reprod. 2013)。しかしながら、ACRBPは生体外でAcrosin/ACRの酵素的活性化を促進することが示唆されている一方で、生体内での生理機能は長年不明のままであった。我々は最近、ACRBP遺伝子を欠損したマウスを作製したところ、興味深いことに先体形成過程でAcroplaxomeが異常形成していることを見出した。この結果は、ACRBPが細胞骨格構造と何らかの相互作用をしていることを示唆している。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究では精子形成過程における先体タンパク質ACRBPの生理機能を明らかにするとともに、ACRBPとアクチン細胞骨格構造との関係性を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ACRBP欠損マウスの解析

既に作製済のACRBP欠損マウスを用いて、精子先体形成の異常が生じる原因を解明する。精細胞と精巣上体精子を用いた体外受精試験や運動機能を精子画像解析装置(CASA)で測定する。先体形成はPNAレクチンや先体タンパク質を認識する特異的抗体による免疫染色実験をおこなう。最終的には、ACRBP-WとACRBP-V5をそれぞれ発現するトランスジ

ェニック(TG)マウスを作製する。この2種のTGマウスとACRBP欠損マウスを交配させレスキュー実験を試みる。ACRBP-WとACRBP-V5のどちらが、もしくは両方が先体形成や受精に重要な役割をもつのかを検証する。

(2)Lifeact 精巣発現マウスの解析

Lifeactとは、最近開発された生きた細胞でアクチンフィラメントを可視化させる技術である。Lifeactプラスミドには、出芽酵母から得られたアクチンフィラメントを認識する17アミノ酸が含まれており、アクチンフィラメントの重合や機能を阻害しないため、生細胞での観察が可能である。蛍光タンパク質が付加したプラスミドを受精卵に導入し、TGマウスを作製する。

作製したLifeactマウスの精巣切片を用いて、精子先体形成でのアクチン細胞骨格を共焦点レーザー顕微鏡で観察する。得られたイメージ画像をもとに3次元構築や数値化させた後に立体シミュレーション解析も行う。先体形成で重要なアクチン構造物Ectoplasmic specialization, Acroplaxome, Manchetteにも着目する。アクチン結合タンパク質Arp2/3やケラチンの抗体を用いた免疫染色も行うことで、Lifeactマウスでアクチン細胞骨格が正常に形成されているか確認する。仮にLifeactマウスで詳細なアクチン動態が観察されない場合、アクチン結合試薬のファロイジンを用いるなど染色方法を変更する。また、精巣にあるセルトリ細胞やライデッヒ細胞のアクチン構造が物理的に先体形成の観察を困難にする可能性もある。その場合、Lifeactマウスのプロモーターを全身発現用から精細胞特異的ヒストンに変更したコンディショナルマウスを作製することで改善を図る。

4. 研究成果

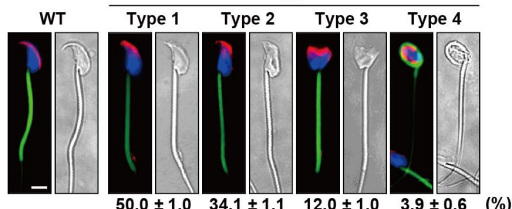
(1)ACRBP欠損マウスの解析

ACRBP欠損雄マウスは、野生型雄マウスと比較すると、自然交配で雌マウスを受精させる能力(妊孕率)が大幅に低下する。体外受精試験でACRBP欠損精子の受精能について検証すると、受精数、透明帯結合数、および卵子融合数はすべて有意に減少していた。このことから、ACRBPが欠損すると雄マウスは部分不妊になることが示唆された。

ACRBP欠損雄マウスの低妊孕性の原因を明らかにするため、精子形成過程での精細胞を詳細に調べた。先体形成のStepごとに分けた精細胞をPNAレクチンで染色し、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、ACRBP欠損マウスでStep 2-3の前先体顆粒は野生型と同様であったが、Step 4-5の精細胞では先体顆粒の凝集と融合が著しく阻害されていた。それに伴いStep 6以降のACRBP欠損精細胞では、先体胞の断片化が起きていた。透過型電子顕微鏡により、精細胞の詳細な構造変化を観察

したところ、ACRBP 欠損により Step 4-5 の先体胞が大きく変形していることが確認された。加えて核と先体をつなぐ構造物 Acroplaxome が波状に変形していることも判明した。Step 6 以降の ACRBP 欠損精細胞では、部分的な核構造の異常と先体の断片化がみられた。これらの結果から、ACRBP が先体顆粒の形成に関与することが示唆された。免疫染色法により代表的な先体タンパク質 proACR、ZBPB2、ZBPB1、および SPACA1 の局在を調べた。通常、精子形成過程後期まで proACR、ZBPB2、および ZBPB1 は先体顆粒に凝集しているが、ACRBP 欠損精細胞では先体顆粒への凝集がみられず、先体胞全体に拡散していた。先体胞の赤道部に局在する SPACA1 は ACRBP 欠損精細胞では、先体全体に分散していた。以上の結果から、ACRBP の欠損により先体タンパク質の局在が大きく変化することが明らかになった。

次いで、野生型マウスと ACRBP 欠損マウスそれぞれの精巣上体精子について調べた。免疫染色の結果から、核の形態変化をもとに、ACRBP 欠損精子の形態は、4つのタイプに分別された。タイプ1精子は形態学的に野生型と類似しているが、タイプ2とタイプ3精子はそれぞれ中程度と重程度の核の変形がみられた。タイプ4精子は、球状の精子頭部で核周辺部に精子鞭毛が巻き付いている表現型を示した。精巣上体でのタイプ1~4精子の割合は、それぞれ50%, 34%, 12%, 3.9%であった(下図)。ハイスピードカメラにより、そ



れぞれの精子の運動機能を比較すると、タイプ1とタイプ2精子は不規則な頭部の反転を繰り返し、尾部の屈曲により前方に進行していた。タイプ3精子では直線的な運動性は失われ、頭部と尾部が断続的に弱く動く程度であった。タイプ4精子は、ほぼ運動性が停止していた。一方で、ACRBP 欠損精子の中片部と尾部の形状は、野生型精子との有意な差は認められなかった。興味深いことに、タイプ1~4の精子を選別し、それぞれの核をICSI(顕微授精)すると、全ての精子には受精能があることが明らかになった(下図)。

Sperm	No. of oocyte injected with sperm	No. of egg developed after ICSI	No. of egg developed to 2-cell stage	No. of post-implantation embryo	No. of fetus
WT	40	40	38 (95%) ^a	28 (73%) ^b	14 (37%) ^b
Type 1	40	40	37 (93%)	28 (76%)	23 (62%)
Type 2	40	40	37 (93%)	28 (76%)	23 (62%)
Type 3	19	18	13 (72%)	11 (85%)	7 (54%)
Type 4	14	12	10 (83%)	7 (70%)	3 (30%)

2-Cell embryos obtained were all transferred to the oviducts.

^a Percentages are based on numbers of eggs survived after ICSI.

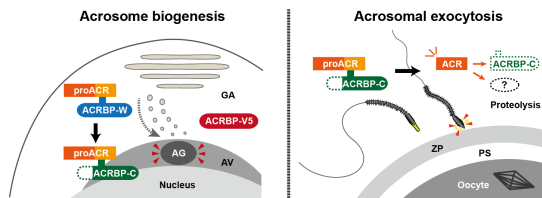
^b Percentages are based on numbers of 2-cell embryos.

すなわち、核や先体が変形した ACRBP 欠損精子は、受精後に起こる前核形成とそれに続く

卵子前核との融合において、大きな機能差が無いことが示唆された。

ACRBP 欠損マウス精子で先体の異常形成が生じたため、先体内タンパク質の存在について精子抽出液を用いたウエスタンブロット解析を行った。ACR は通常精子の先体反応まで 53 kDa の前駆体 proACR として存在している。しかし、ACRBP 欠損マウスでは ACR は 33 kDa のバンドとして検出された。ZBPB1 と ZBPB2 は先体形成に関与することが知られているが、ACRBP 欠損マウスでは共に存在量の有意な差はなかった。SPACA1 は先体内膜に局在するタンパク質であり、精子と卵子の融合に機能していると報告されている。野生型でみられた SPACA1 の 40 kDa と 42 kDa のバンドは、ACRBP 欠損マウスでは消失していた。このことから、少なくとも ACRBP は proACR と SPACA1 に影響を与えていることが示唆された。

マウス ACRBP には、選択的 pre-mRNA スプライシングにより生じる 2 種のタンパク質 ACRBP-W と ACRBP-V5 が存在する。ACRBP 欠損マウスの精子先体形態の異常にどちらの ACRBP が関与しているのかは不明である。それぞれの機能について解析するため、TG マウスを用いた ACRBP 欠損マウスのレスキュー実験を行った。作製した ACRBP レスキューマウス(KO(W-TG)と KO(V5-TG)と命名)の精巣抽出液では、どちらも内在性の ACRBP-W と ACRBP-V5 を欠失していた。一方で外来性の ACRBP-W と ACRBP-V5 の発現は確認された。proACR の存在を調べたところ、KO(W-TG)は野生型と同じ 53 kDa のバンドであったが、KO(V5-TG)では ACRBP 欠損マウスと同じ 33 kDa のバンドとして検出された。このことから、ACRBP-W は proACR の自発的プロセッシングを阻害していることが示唆された。先体の形態は、KO(V5-TG)のみで野生型と同程度まで還元していた。さらに、ACRBP 欠損雄マウスの妊孕性や体外受精率の低下は、KO(W-TG)と KO(V5-TG)ともに大きく回復していた。以上の結果から、ACRBP-V5 は精子先体形成に関与することが明らかになった。一方で、ACRBP-W は受精過程で proACR の自発的活性化を制御することが示唆された(下図)。これらの成

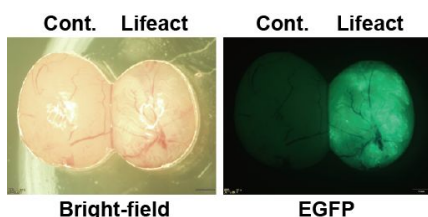


果は、国際的な学術誌 PNAS に掲載された。また、国内でも朝日新聞や日本経済新聞にも取り上げられた。

(2) Lifest 精巣発現マウスの解析

球状精細胞でのアクチンフィラメントを詳細に観察するため、Lifest-TG マウスの作製を試みた。Lifest を精細胞特異的に発現

させるため、ACRBP のプロモーター領域を Lifact の上流に挿入した発現ベクターを構築した。ACRBP の mRNA は、減数分裂パキテ期から発現することが知られている。蛍光タンパク質に EGFP と超解像顕微鏡観察用に EOSFP を発現するカセットをそれぞれベクターに組み込んだ。プロモーター領域と Lifact 配列の間には、ACRBP 遺伝子第 2 イントロン領域を挿入し、TG の発現効率を高めた。作製した Lifact ベクターの発現を確認するため、EGFP もしくは EOSFP が含まれるプラスミド DNA をマウス精巣にマイクロインジェクション後、エレクトロポレーション法により遺伝子発現を誘導した。3 日後に精巣を取り出し全体を蛍光顕微鏡で観察した結果、コントロールに比べて EGFP と EOSFP の有意なシグナルが観察された(下図)。さらに、精巣から



精細胞を回収し、先体マーカーの PNA と共染色したところ、EGFP と EOSFP のシグナルは、主に精子形成過程の細胞で存在していることが分かった。これらの結果から、構築した Lifact ベクターは、精子形成過程の精細胞で特異的に発現していることが示唆された。

TG マウスを作製するため、Lifact ベクターを受精卵前核へマイクロインジェクション法で注入した。受精卵での Lifact ベクターの発現は、注入後の胎盤胞期の胚を回収し、ゲノム PCR 法により確認した。注入した受精卵は、1 細胞期の段階で偽妊娠マウス卵管へ移植した。現在までのところ、複数の産仔が得られている。予定していた TG マウスの解析は、ベクター構築にかなりの時間を費やしたため、本研究期間内で行うことはできなかった。次の研究課題で引き続き、Lifact マウスの解析を進めていく予定である。

一方で、ACRBP とアクチンを含む細胞骨格因子との関連性を明らかにするため、さまざまな方法で ACRBP 結合タンパク質の同定を試みた。酵母 2 ハイブリッド法では、マウス精巣 cDNA ライブラリーと ACRBP-V5 の発現用コンストラクトを酵母に導入した。ACRBP-V5 と結合したタンパク質を含む酵母のシークエンス解析を行った結果、LARP1、UNC50、PPM1J、ALDOB、PRM1、SERTAD2、および LRR18 を同定した。次いで、ACRBP-W もしくは ACRBP-V5 の TG マウスから得られた精巣抽出液に対し、His もしくは GFP プルダウン実験を行った。結合タンパク質を質量分析器で解析した結果、LRR57、LDHC、および PSMC4 が同定された。これら ACRBP 結合候補因子の精巣と精巣上体精子での存在を調べるために、各種抗体を用いたウエスタンブロット分析を行った。その結果、PPM1J、LRR57、ALDOB、および PSMC4

は精巣と精子で存在が確認された。UNC50 は精巣のみで存在していた。加えて、精子形成細胞での候補因子の局在を調べるために免疫染色を行った結果、PPM1J、UNC50、LRR57、および ALDOB は細胞質に局在することが明らかになった。一方、PSMC4 は球状精細胞では細胞質に局在し、伸長精細胞で先体に局在することが判明した。

以上の結果から、ACRBP 結合因子として、複数因子が同定された。今後はこれらの因子とアクチン細胞骨格構造への作用について明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Kanemori, Y., Koga, Y., Sudo, M., Kang, W., Kashiwabara, S., Ikawa, M., Hasuwa, H., Nagashima, K., Ishikawa, Y., Ogonuki, N., Ogura, A., Baba, T. Biogenesis of sperm acrosome is regulated by pre-mRNA alternative splicing of Acrbp in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 113: 3696-3705. (2016) 査読あり
doi:10.1073/pnas.1522333113.

(2) Ishikawa, Y., Usui, T., Yamashita, M., Kanemori, Y., Baba, T. Surfing and swimming of ejaculated sperm in the oviduct. Biol.Reprod. 115:1-9. (2016) 査読あり
doi:10.1095/biolreprod.115.135418.

〔学会発表〕(計 11 件)

(1) Nagashima K., Usui, T., Ishikawa-Yamauchi, Y., Yamashita, M., Kanemori, Y., Baba, T. Migration of ACRBP-null mouse sperm in the female reproductive tract Gordon Research Conference, Fertilization & Activation of Development. 2017 年

(2) Kanemori, Y., Baba, T. Biogenesis of sperm acrosome is regulated by pre-mRNA alternative splicing of Acrbp in the mouse. The Joint Meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of Zoological Society of Japan.2016 年

(3) Nagashima, K., Kanemori, Y., Koga, Y., Sudo, M., Kang, W., Kashiwabara, S., Ikawa, M., Hasuwa, H., Ishikawa, Y., Ogonuki, N., Ogura, A., Baba, T. Biogenesis of sperm acrosome is regulated by pre-mRNA alternative splicing of Acrbp in the mouse. SSR 2016 49th Annual Meeting.2016 年

(4) Ishikawa, Y., Usui, T., Yamashita, M.,

Kanemori, Y., Baba, T. Surfing and swimming of ejaculated sperm in the mouse oviduct. SSR 2016 49th Annual Meeting. 2016年

(5) 石川祐、臼井智之、山下美鈴、兼森芳紀、馬場忠 Surfing and swimming of ejaculated sperm in the oviduct. 第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年

(6) 臼井智之、石川祐、山下美鈴、兼森芳紀、馬場忠 Mechanism of mouse sperm migration through the oviduct. 第 108 回日本繁殖生物学会大会、2015 年

(7) 石川祐、臼井智之、山下美鈴、兼森芳紀、馬場忠、Sperm surfing and swimming in the oviduct. The Gordon Research Conference (GRC) on Fertilization and Activation of Development. 2015 年

(8) 石川祐、臼井智之、山下美鈴、兼森芳紀、馬場忠 Sperm surfing and swimming in the oviduct. The Gordon Research Seminar (GRS) on Fertilization and Activation of Development. 2015 年

(9) 臼井智之、山下美鈴、石川祐、兼森芳紀、馬場忠 Difference of fertilization mechanism between in vivo and in vitro. 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年

(10) 兼森芳紀、首藤舞、古賀義隆、岡部勝、馬場忠 マウス精子アクロソームタンパク質 ACRBP/sp32 の機能解析、第 107 回日本繁殖生物学会大会、2014 年

(11) Kanemori Y, Sudo M, Koga Y, Okabe M, Baba T. ACRBP/sp32 is essential for acrosome formation during mouse spermatogenesis. The 12th International Symposium on Spermatology. 2014 年

〔その他〕

ホームページ関係

(1) 筑波大学生命環境科学研究科分子発生制御学研究室
(<http://agbi.tsukuba.ac.jp/~acroman/>)

(2) Facebook ページ
筑波大学馬場研究室
(<https://www.facebook.com/acrosin/>)

報道関連情報

(1) 朝日新聞デジタル版 2016 年 6 月 28 日
(<http://www.asahi.com/articles/ASJ6S5CTKJ6SUJHB017.html>)

(2) 筑波大学ホームページ 注目の研究
精子頭部を正しく形作るために必要なタンパク質を発見

(<http://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/p201606140300.html>)

(3) 日本経済新聞 2016 年 6 月 17 日号

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼森 芳紀 (KANEMORI, Yoshinori)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：40529088