

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32717

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462465

研究課題名(和文) 精嚢分泌タンパク質による糖鎖を介した細胞膜流動性と受精能獲得制御機構解明

研究課題名(英文) Carbohydrate chain-mediated cell membrane fluidity by seminal vesicle secreted protein and elucidation of fertility acquisition control mechanism

研究代表者

吉田 薫 (Yoshida, Kaoru)

桐蔭横浜大学・医用工学部・准教授(移行)

研究者番号：70398973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：精嚢分泌タンパク質による精子受精能獲得の抑制機構について、主にヒトを対象として研究を行った。受精能獲得はコレステロールの流出で開始する。そこで、コレステロールによって制御される脂質ラフト構成成分であるガングリオシドGM1、また、精子最外表面をコートしているグリコカリックスとその構造の中心を担う ディフェンシン126への精嚢分泌タンパク質SEMGの作用を検討した。SEMGはコレステロールへの明確な結合を示さなかったが、ガングリオシドGM1及びGM2への結合を示した。男性不妊症患者(無精子症は除く)DNA検体の ディフェンシン126遺伝子多型検査ではその頻度分布に正常群との差はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the mechanism that sperm motility and fertility are regulated by seminal vesicle secretion protein during the fertilization process. Here, we studied sperm fertility through control of sperm membrane structure by seminal secretory protein mainly on human subjects. It is a well-known that capacitation starts in cholesterol efflux. Therefore, the effect of human seminal vesicle secretory protein, SEMG on ganglioside GM1 which is a lipid raft constituent component controlled by cholesterol and on glycoalyx which is considered to coat the outermost surface of sperm and defensin 126 which plays the center of its structure were examined. SEMG showed no clear binding to cholesterol similar to murine homologous protein SVS 2, but it was confirmed to show binding to gangliosides GM 1 and GM 2. In male infertility patients (excluding azoospermia), the frequency distribution of -defensin 126 gene polymorphism in DNA specimens showed no difference from the normal group.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精子 精嚢分泌タンパク質 糖脂質 コレステロール 受精能獲得 男性不妊

1. 研究開始当初の背景

精巣内で形成された哺乳類精子は機能的には未熟である。精巣上体で細胞外膜の修飾を受け、運動能を獲得し、放精の際に運動を開始する。さらに、雌生殖道内において、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。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示された。これまでに、精漿中の精子受精能獲得を抑制する因子(受精能抑制因子)として種々の物質が研究されている。このように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。一方、副生殖腺の一つである精囊からも精子運動抑制因子が同定されている。特に、近年は *in vivo* での受精過程を検討することにより“受精能獲得”という現象を根本的に理解しようとする研究が始まっており、精子の外部環境因子として精囊分泌タンパク質は重要と考えられている。研究代表者である吉田薫は研究分担者である岩本晃明、吉池美紀との共同研究で精囊由来のヒト精子運動抑制物質である semenogelin 1&2(SEMG1&2)の研究を行い、SEMG の PSA(前立腺特異抗原)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。さらにヒト精子の運動調節については、運動活性化における亜鉛イオンの働きが SEMG を介したものであること、また SEMG は精子膜電位の過分極を引き起こし、膜構造を変化させるものであることを明らかにした。しかし、ヒトを対象とした研究のみでは *in vivo* での受精過程を検討することは不可能であるため、ここ数年はマウスにおける精囊分泌タンパク質による受精能獲得調節機構の研究を進めることで、これまで不明であ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。まず、SEMG のマウスにおける相同タンパク質である SVS2 が *in vivo* において受精能抑制因子として働くことが明らかになった。さらに、研究代表者も参加して、その分子の作用機構の研究を行い、精子細胞膜のガングリオシド GM1 が SVS2 の標的分子であることを明らかにした。また、最近、SVS2 のもう一つの標的分子は精子細胞膜のコレステロールであり、細胞膜へコレステロールを戻す働きがすなわち、受精能獲得抑制因子としての作用本体であることを明らかにした。また、既に SVS2KO マウスの表現系解析は終了しており、子宮内で精子が死滅することによる雄性不妊であることを明らかにしている。このように、これまで精囊分泌タンパク質の受精能獲得抑制作用は *in vitro* の阻害因子という形で評価されてきたが、*in vivo* では受精の場、タイミングまで受精能を抑制しておくことこそ重要であり、それは精子の生存に直結する機構であることが示唆された。しかしながら、どのようにして精囊分泌タンパク質は精子の受精能獲得を、そして結果として、生存をコントロールしているのかは不明である。

上記マウスの研究と平行して、申請者は臨床応用を見据えたヒトを対象とした基礎研究を行ってきたが、今までのところ、ヒト精子膜上に SEMG の受容体となるタンパク質分子を特定するに至っていない。そこで、対象をタンパク質受容体から広げて探索する必要があると考えた。その候補は、ひとつには、ガングリオシド GM1、もう一つは ディフェンシン 126 である。ガングリオシド GM1 は脂質ラフトに局在し、ラフト形成はコレステロールの含有量に影響を受け、マウスでは相同タンパク質 SVS2 が結合することを既に示している。一方、精子膜に存在する「糖衣」グリコカリックスとその中心タンパク質 ディフェンシン 126 の機能が哺乳類の受精において、やはり受精の場、タイミングまで受精能を抑制する役割において重要であり、同時に精子の生存に関与していることが近年明らかにされている。この双方に対する SEMG の影響を探ることは直接の検討が困難であるヒトにおける *in vivo* 精子受精能獲得機構解明につながると思われる。このように、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を進めることが必須であると考え、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・受精能が精囊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。本申請課題の研究期間においては精囊分泌タンパク質による精子膜構造の制御を介した精子受精能獲得の抑制機構について、主にヒトを対象として研究を行う。受精能獲得がコレステロールの流出で起こることは周知の事実である。そこで、着目する精子膜構造としては、コレステロールによって制御される脂質ラフト構成成分であるガングリオシド GM1、また、精子最外表面をコートしていると考えられるグリコカリックスとその構造の中心を担う ディフェンシン 126、つまり、精子の表面に存在する糖鎖への精囊分泌タンパク質の作用について検討する。

3. 研究の方法

上記のようにマウスでの研究成果を基本とし、まず、ヒトにおける相同性を次の2つの項目について検討する。(1)SEMG とコレステロールとの相互作用。(2)SEMG とガングリオシド GM1 との相互作用。さらに、(3)SEMG と精子最外表面のグリコカリックス、特にその構造の中心を担う ディフェンシン 126 の O 結合型糖鎖との相互作用について明らかにする。これらにより、SEMG と精子膜表面との相互作用点が明らかになる。次に、それぞれの分子をラベル・可視化し、膜の流動性変化と受精能獲得、および細胞膜の破壊、細胞死について検討することにより SEMG による受精能抑制分子機構の解明を目指す。また、ヒト ディフェンシン 126 遺伝子(DEFB126)における多型(2塩基欠損による終止コドン消失)は妊孕性の低下と関連することが示されているが、申請者が臨床応用として検討してきた“精子の質”を判定するマーカーとしての精子膜残存

SEMG との関連については未検討であるため、抗体を用いた2重染色により関連性を検討する。同時に、マーカーとしての有用性を評価する目的で、申請者が既に収集済みのDNAバンクを対象として DEFB126 多型と妊孕性を後ろ向きに検討する。

4. 研究成果

(1)SEMG とコレステロールとの相互作用

ヒト精子膜のコレステロールを蛍光色素フィリピンで標識し、蛍光顕微鏡観察により SEMG の影響を検討した。これまでに細胞膜コレステロールの除去効果があるとされているメチル サイクロデキストリン(MbCD)およびアルブミン(BSA)の作用と比較したが、本研究期間中には明確な影響は検出されなかった。個体によるばらつきが大きいため、更に例数を増やした検討が必要である。

(2)SEMG とガングリオシド GM1 との相互作用

水晶発振子マイクロバランス法により、発振子センサー金表面に SEMG と BSA(コントロール)を固相化し、PBS 中で GM1 および GM2 との相互作用を検討した。SEMG は GM1、GM2 の両方に結合することが示された。

(3)SEMG と精子最外表面のグリコカリックス、特にその構造の中心を担う ディフェンシン 126 の O 結合型糖鎖との相互作用

本研究期間中には SEMG と ディフェンシン 126 の直接的な相互作用を確認することはできなかった。男性不妊症患者(無精子症を除く)DNA 検体の DEFB126 多型検査結果は、159 例中、wt/wt が 39 例(24.5%)、wt/del が 76 例(47.8%)、del/del が 44 例(27.7%)であり、先行研究における正常検体での検討と比較してその頻度には有意な差が見られなかった。

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2件)

Kang, W., Kawano, N., Yamatoya, K., Yoshida, K., Yoshida, M., and Miyado, K. Critical roles of seminal plasma on sperm migration in the female reproductive tract. *Journal of Reproduction Engineering*, 査読有、18 巻、2016、5-10.

Araki, N., Yoshida, K., Kang, W., Kawano, N., Miyado, K., and Yoshida, M. Seminal vesicle proteins SVS3 and SVS4 facilitate SVS2 effect on sperm capacitation. *Reproduction*, 査読有、152 巻、2016、313-321、doi:10.1530/REP-15-0551

[学会発表](計13件)

吉田 薫、山崎一恭、吉池美紀、岩本晃明、精子機能評価における SEMG 結合率について、第 59 回日本生殖医学会学術講演会、2014 年 12 月 5 日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

中田久美子、小野千紘、吉田 薫、吉池美紀、岩本晃明、吉田雅人、吉田学、山下直樹、水素分子処置による精子無力症患者の凍結保存精子の運動性の回復について(セモノジェリンの併用とペントキシフィリンとの比較検討)、日本アンドロロジー学会第 34 回学術集会、2015 年 6 月 26 日~27 日、福岡大学病院メディカルホール(福岡県福岡市)

吉田 薫、荒木直也、河野菜摘子、宮戸健二、吉田学、SVS2 による精子膜ステロールレベル調節を介した受精能獲得制御、日本アンドロロジー学会第 34 回学術集会、2015 年 6 月 26 日~27 日、福岡大学病院メディカルホール(福岡県福岡市)

吉田学、荒木直也、吉田 薫、河野菜摘子、宮戸健二、精囊分泌タンパク質 SVS3 と SVS4 の受精能獲得への影響、日本アンドロロジー学会第 34 回学術集会、2015 年 6 月 26 日~27 日、福岡大学病院メディカルホール(福岡県福岡市)

宮戸健二、河野菜摘子、吉田 薫、吉田学、受精における副生殖腺の役割、第 60 回日本生殖医学会学術講演会、2015 年 4 月 27 日パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

河野菜摘子、康宇鎮、吉田 薫、吉田学、宮戸健二、精漿タンパク質 SVS2 欠損マウスから見てきた精子を殺すメスの免疫機構、BMB2015、2015 年 12 月 1 日~4 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

中田久美子、吉田 薫、吉田学、山下直樹、水素分子処置はヒト精子の ATP 量を増加させる、第 57 回日本卵子学会、2016 年 5 月 14 日~15 日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市)

中田久美子、河野博臣、吉田雅人、早川繁、吉田 薫、吉田学、山下直樹、極少数精子凍結保存用デバイス“MAYU”を用いた精子保存条件の検討、第 57 回日本卵子学会、2016 年 5 月 14~15 日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市)

中田久美子、吉田 薫、吉田学、山下直樹、水素分子処置後のヒト精子の ATP 量は増加する、第 109 回日本繁殖生物学会大会、2016 年 9 月 12~15 日、麻布大学(神奈川県相模原市)

Nakata, K., Yoshida, K., Yoshida, M., and Yamashita, N, Hydrogen molecule treatment enhances ATP production in human spermatozoa
2016 American Society for Reproduction Medicine Scientific Congress (ASRM2016), October 15-19, 2016, Salt Palace Convention Center, Salt Lake City, UT, USA.

中田久美子, 吉田 薫, 吉田 学, 山下直樹, 水素分子とペントキシフィリンによるヒト精子運動性改善作用の相違点, 第 61 回日本生殖医学会学術講演会, 2016 年 11 月 3~4 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

山崎一恭, 吉田薫, 吉池美紀, 岩本晃明, SEMG 結合率と妊娠結果について, 第 61 回日本生殖医学会学術講演会, 2016 年 11 月 3~4 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔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・医用工学部・准教授
研究者番号：70398973

(2) 研究分担者

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

吉池 美紀 (YOSHIIKE, Miki)
聖マリアンナ医科大学・医学部・研究員
研究者番号：60398964