

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：22101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893216

研究課題名(和文) 人工エピディモソーム(ARTEPS)技術の開発と精子受精能獲得機構の解明

研究課題名(英文) Development of artificial epididymosome (ARTEPS) and elucidation of the sperm capacitation mechanism

研究代表者

加藤 侑希 (KATO, YUKI)

茨城県立医療大学・公私立大学の部局等・研究員

研究者番号：60733649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、哺乳動物の精子の機能的成熟に於けるepididymosome(EPS)の役割が注目されている。本研究では、EPSによって精子に供給されるアルドース還元酵素(AR)に着目してcapacitation(CPN)のメカニズムを解析し、ARが細胞質型NADP+イソクエン酸脱水素酵素と共にCPNに伴ってチロシンリン酸化されて、前者は活性上昇、後者は活性低下を来す事により精子内ROSレベルを調節してCPNを担っている事を明らかにした。また、EPSによる機能タンパク質の精子への供給不全が精子成熟不全の一因と考え、人工EPSによる精子へのタンパク質供給システムの開発を試みた。

研究成果の概要(英文)：In mammals, only the sperm that have undergone stepwise activation, including maturation in the epididymis and capacitation (CPN) in the tubal isthmus, are able to initiate both hyperactivated motility and acrosome reaction to fertilize an ovum. Although the mechanisms in CPN remain unclear, the tyrosine phosphorylation of functional proteins and the production of reactive oxygen species (ROS), are thought to be particularly important. In the present study, I first performed the functional analyses of aldose reductase (AR) and NADP+ isocitrate dehydrogenase (IDPC) that were tyrosine-phosphorylated during the capacitation. Second, I tried to develop the protein delivery system to immature sperm using artificially formed epididymosome.

研究分野：生殖生化学

キーワード：精子 受精能獲得 エピディモソーム 精子成熟

### 1. 研究開始当初の背景

近年、体外受精、顕微受精といった不妊治療を受ける人が増加し、妊娠を望むカップルの7組に1組は不妊症の時代である。不妊の原因は、卵巣機能障害、精子の形態異常、精子数の不足など様々であるが、原因不明のケースも多い。精子の段階的活性化の過程はブラックボックスが多く残された分野であり、その理解が不妊の理解に繋がるものと考えられる。ICSIなどの顕微受精技術の進歩により、精子の運動や先体反応を経ずに受精卵を得るツールを我々は手にしているが、高度不妊治療に伴う卵子へのダメージや母体への負荷を軽減しつつ受精率・出産率を上げるためには、精子活性化を促す生殖補助技術の進歩が欠かせない。こうした背景から、精子の活性化プロセスの研究、なかでも、最も大きなブラックボックスであるcapacitation (CPN) 過程の分子機構の解明に向けた研究を始めた。

### 2. 研究の目的

精巣で作られる未熟精子は、精巣上体細管を通過する過程でエピディディモソーム(EPS)とよばれるリポソーム様小胞によって、精巣上体由来の因子が供給されることで成熟精子となる。さらに成熟精子は輸卵管峡部でCPNと呼ばれる活性化を受けて初めて受精能力を獲得する。CPNの反応は精子細胞膜に存在するコレステロールの脱離、Ca<sup>2+</sup>と重炭酸イオンの細胞内流入、cAMPレベルの上昇、活性酸素種(ROS)の産生、機能タンパク質のチロシン残基のリン酸化などが複雑に関わる一連の連鎖反応から成ると考えられているがそのスイッチングの仕組みは混沌としている。その為、本研究では、次のことを目的に研究を行った。1)、代表者等がこれまでに、CPN特異的にチロシンリン酸化されるタンパク質として同定した、アルドース還元酵素(Aldose Reductase: AR)及びNADP<sup>+</sup>依存性イソクエン酸脱水素酵素(IDPc)の機能解析を行う。2)、人工のエピディディモソーム(ARTEPS; ARTificial EPididymoSomes)による精子へのタンパク質のデリバリーシステムを新たに開発し、人為的に任意の機能を精子に付与できる新しい技術を生み出す。

以上により、未だ解明されていないCPNの詳しいメカニズムを明らかにしようというチャレンジが本研究の趣旨である。

### 3. 研究の方法

(1) 精子サンプルの調製 本研究では、ヒトへの応用を考慮し、精子の形状が最も近い、ブタの精子を実験に用いた。ブタ精巣上体尾部より採取した精子にCPN非誘導培地(Non-cap medium)或いは、CPN誘導培地(Cap medium)を各々加え、37°C、5% CO<sub>2</sub>の条件下で3時間培養した。培養後、顕微鏡下で観察し、運動している精子の割合が

95%以上の個体で解析を行った。またCPNの判定はchlortetracycline (CTC) 結合パターンの変化、CASAによる運動性パラメーターの変化、及び、鞭毛の屈曲性の変化を評価することでを行い、70%以上の精子がCPNを起こしたサンプルのみをCapacitated spermとして実験に用いた。

### (2) 人口エピディディモソーム (ARTEPS) 技術の開発

①リポソーム化薬剤を用いた精子へのARの導入 先ずは、脂質組成の異なる市販のリポソーム化薬剤(COATSOME EL series)数種へ蛍光標識したARを導入した。続いて、ウェスタンブロットを行い、それぞれのリポソームの封入効率の検討を行った。その後、調整したリポソームをブタ精子に導入し、免疫蛍光染色により検出した。それぞれの実験で、リポソームの処理時間、温度や濃度の各パラメーターを操作し、最高の導入効率を得られる条件の探索を行った。

②運動性の解析 ARTEPS技術によるAR導入前後の精子サンプルの運動性を比較解析した。運動性の解析にはCASAを用いた。

### (3) ARの機能解析

①ARの精子内局在とCPNに伴うチロシンリン酸化の解析 先ずは、自作した抗AR抗体を用いて培養後の精子の免疫染色を行った。続いて、Okamura & Sugita. [6]の方法に基づいて、精子をサイトゾル、膜、鞭毛、頭の各フラクションに分画し、それぞれの画分からの抽出タンパク質を用いて、免疫沈降やウェスタンブロットを行い、リン酸化の確認を行った。これにより、ARが精子内のどこに局在し、また、どこに局在しているARがCPNに伴いチロシンリン酸化しているのかを明らかにした。

②CPNに伴うARの活性変化の解析 ①で得られた各画分のタンパク抽出液を用いて、ARの活性を測定した。ARの活性測定は、Katoh et al. [3]の方法に基づいて行った。即ち、分光光度計で340 nmの吸光度を測定することで、反応により消費されるNADPH量を測定し、その値からAR活性を算出した。

③ARの膜透過性特異的阻害剤alrestatinを用いた解析 alrestatinを用い、CPNに深く関わりがある、ROSの産生、超活性化運動の誘起、CTCの染色パターン及びグルタチオン(GSH)レベルの変化を解析した。ROSレベルの測定は、ROSの蛍光試薬(6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein Diacetate, Diacetoxymethyl Ester)を用いて、その蛍光を観察し、また超活性化運動誘起の解析はCASAを用いて行った。また、ROSの消去系として重要なGSHレベルは市販のキット(Total Glutathione Quantification kit)により測定した。

#### (4) IDPcの機能解析

①IDPcの精子内局在とCPNに伴うチロシンリン酸化の解析 ARと同様に、自作した抗IDPc抗体を用いて、培養後の精子の免疫染色を行った。チロシンリン酸化の解析は、免疫沈降、SDS-PAGE及び、ウェスタンブロットを行い確認した。

②CPNに伴うIDPcの活性変化の解析 培養後、0, 30, 90, 180分後の精子からソニケーションによりタンパク質を抽出し、サンプルとした。活性測定は、Cordoba et al. [1]の方法に基づいて行った。即ち、分光光度計で340 nmの吸光度を測定することで、反応により生成されるNADPH量を測定し、その値からIDPc活性を算出した。

②精子内NADPHレベル、ROSレベル及び運動性の培養時間依存的な変化の解析 ②同様、培養後、0, 30, 90, 180分後の精子を用いて、精子内NADPHレベル、ROSレベル及び運動性の解析を行った。精子内NADPH量の測定は、EnzyChrom™ NADP+/NADPH Assay Kitを用いて行った。また、ROSレベルと運動性の解析は前述(3)・③の方法で行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ARTEPS技術の開発

①ARTEPS技術の最適化 先ずは、蛍光標識した外来性の水溶性物質を市販のリポソーム化薬剤に封入し、その後、調整したリポソームを精子に導入することを試みた。本研究では、COATSOME EL seriesを用い、蛍光標識したARを精子に導入した。図1に示す通り、COATSOME EL-01-N及びCOATSOME EL-01-Aで多くのタンパク質が封入でき、また、精子に導入する事にも成功した。

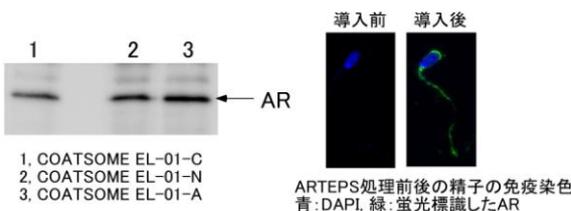


図1、ARのリポソーム化薬剤への封入と精子への導入

②導入後の精子運動性の解析 CASAを用いて、①で作製した精子の運動性の解析を行った。導入前後で精子の前進運動性には有意な差が認められなかった。一方、超活性化運動誘起には一定の効果が認められた。しかしながら、時間的余裕から、実際に体外受精及び顕微授精を行い受精能力向上の確認は行うことができなかったため、今後、受精能力の確認を行い、本研究により認められた運動性の変化が、実際の受精に密接に関与しているのか精査し、研究成果を広く発信していく予定である。またARやIDPcばかりでなくCPNに深く関係するカルシウム結

合タンパク質などにも着目し、精子への導入を行っていく。

##### (2) CPNのメカニズムの解明

①ARの機能解析 先ずは、自作した抗ブタAR抗血清を用いて、精巣と精巣上体各部位の組織切片の免疫組織染色を行った。その結果、精子のARは精子形成、特に精巣上体での成熟過程で体細胞から精子に付与される外来タンパク質であることが明らかとなった。また、精子内においては、ARの大部分は先体の可溶性画分(サイトゾル画分)に存在し、残りの僅かが細胞膜及び鞭毛の顆粒画分に存在していることが明らかになった。そこで、実際に精子のどこに局在するARがCPNに伴ってチロシンリン酸化し、またその活性を上昇させているのか解析を行ったところ、鞭毛に局在するARがその調節を担っていることが判明した(図2)。

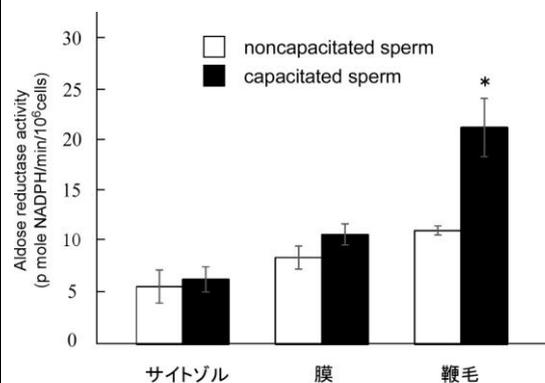


図2、CPNに伴うARの活性変化

次に、ARの膜透過性の特異的阻害剤であるalrestatinを用いて、その効果を解析したところ、CPNに伴って認められるARの活性上昇、ROSの上昇、CASAにより測定された精子の運動性の変化、精子頭部へのCTC結合パターンの変化、及び、GSHレベルの低下、ARのチロシンリン酸化の全てが、阻害されることが明らかとなり(図3)、ARがCPNの誘起において少なくともトリガーの一つになっていることを世界に先駆けて発見し、科学雑誌で報告した[2, 3]。

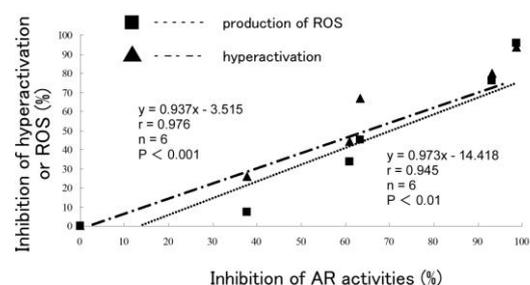


図3、AR活性阻害と超活性化運動誘起及びROS産生阻害の相関

②IDPc の機能解析 先ずは、精子の免疫染色を行い、IDPc の精子内局在を確認した。その結果、IDPc の多くは鞭毛主部に存在していることが明らかとなった。そこで、酵素活性を確認したところ、AR とは反対に、CPNに伴いチロシンリン酸化することで、活性を低下させていることが判明した (図 4)。

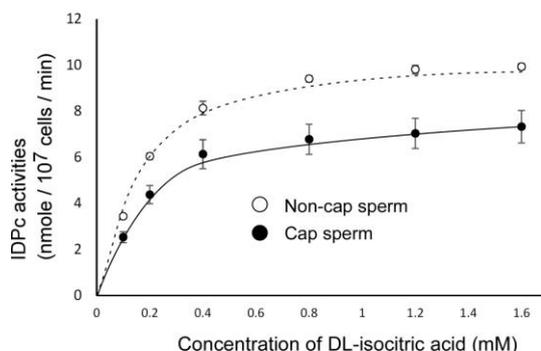


図4, CPNに伴うIDPcの活性変化

次に、IDPc の酵素活性、チロシンリン酸化及び精子細胞内 ROS レベル、NADPH レベル、精子運動性の時間依存的変化の解析を行った。その結果、CPN 誘導後 30 分後には、IDPc はチロシンリン酸化し、活性を低下させ、それに伴い NADPH レベルは低下し、反対に ROS レベルは上昇していることが明らかになった。一方、運動性の変化が認められるのは培養開始後 90 分以降だった。これらの結果から、IDPc のチロシンリン酸化に伴う活性変化が CPN 及び超活性化運動に関与している可能性が示唆された (投稿準備中)。

③結論 AR は NADPH 消費酵素であり、反対に IDPc は NADPH 産生酵素であることから、CPN に伴うチロシンリン酸化による AR の活性上昇と IDPc の活性低下は、精子内 NADPH 量の減少を導くことが推察される。更に、NADPH 量の減少は、ROS の消去機構として重要であるグルタチオンサイクルの働きを障害し、結果として精子内 ROS レベルを上昇させる。ROS は適切な濃度で調節されていることを条件に、精子が CPN を起こすために重要な調節因子になっていると考えられており [4, 5]、精子内 AR と IDPc は、その調節の中枢を担っていると考えられた (図 5)。加えて、AR と IDPc は共に鞭毛に局在していることから、超活性化運動にも密接に関与している可能性が示唆された。

これまで、精子で産生される ROS は主にミトコンドリアを起源とするとされてきたが、本研究結果は新しい ROS 産生系の存在を示したものと見える。

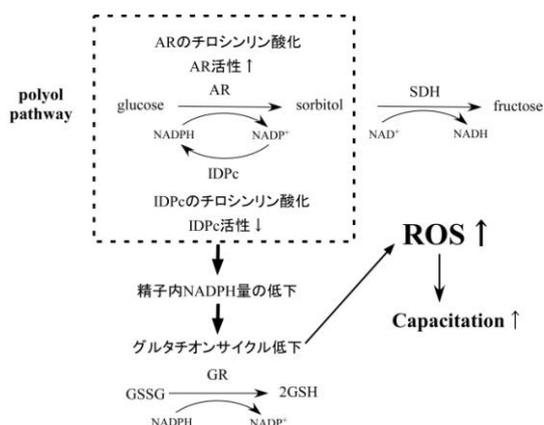


図5, ブタ精子CPNにおけるタンパク質チロシンリン酸化とROSレベルの関与

<引用文献>

- 1, Córdoba M, Pintos L, Beconi MT. Differential activities of malate and isocitrate NAD(P)-dependent dehydrogenases are involved in the induction of capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrologia* 2005; 37: 40-46.
- 2, Katoh Y, Kikuchi K, Matsuda M, Tamba M, Tsukamoto K and Okamura N. Tyrosine phosphorylation of the flagellar aldose reductase is involved in the boar sperm capacitation. *J. Reprod. Engineer.* 2016; 18: 11-19.
- 3, Katoh Y, Takebayashi K, Kikuchi A, Iki A, Kikuchi K, Tamba M, Kawashima A, Matsuda M, Okamura N. Porcine sperm capacitation involves tyrosine phosphorylation and activation of aldose reductase. *Reproduction.* 2014; 148(4): 389-401. (doi: 10.1530/REP-14-0199.)
- 4, de Lamirande E, O'Flaherty C. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1784: 106-15.
- 5, O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic Biol Med.* 2006; 41: 528-40.
- 6, Okamura N, Sugita Y. Activation of spermatozoan adenylate cyclase by a low molecular weight factor in porcine seminal plasma. *J Biol Chem.* 1983; 258(21): 13056-62.

## 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4件)

① Yuki KATOH, Kazuhiro KIKUCHI, Manabu MATSUDA, Michiko TAMBA, Kazumi TSUKAMOTO and Naomichi OKAMURA. Tyrosine phosphorylation of the flagellar aldose reductase is involved in the boar sperm capacitation. J. Reprod. Engineer. 査読有 2016; 18: 11-19. <http://sreprod.jp/Cntents.htm>

② Kawashima A\*, Kigoshi T\*, Katoh Y\*, Ishikawa Y, Shawki HH, Inoue N, Tamba M, Matsuda M, Okamura N. CABCOCO1, a novel coiled-coil protein with calcium-binding activity, is localized in the sperm flagellum. Mol Reprod Dev. 査読有 2016 [Epub ahead of print] DOI : 10.1002/mrd.22639.

③ Shawki HH, Kigoshi T, Katoh Y, Matsuda M, Ugboma CM, Takahashi S, Oishi H, Kawashima A. Identification, localization, and functional analysis of the homologues of mouse CABS1 protein in porcine testis. Exp Anim. 査読有 2016 [Epub ahead of print] DOI : 10.1538/expanim.15-0104

④ Katoh Y, Takebayashi K, Kikuchi A, Iki A, Kikuchi K, Tamba M, Kawashima A, Matsuda M, Okamura N. Porcine sperm capacitation involves tyrosine phosphorylation and activation of aldose reductase. Reproduction. 査読有 2014; 148(4):389-401. DOI : 10.1530/REP-14-0199

[学会発表] (計3件)

① 加藤 侑希, 丹波道子, 菊地和弘, 松田学, 岡村直道, ブタ精子 capacitation の分子機構—タンパク質チロシンリン酸化と ROS レベルの関与について—, 2015年度日本生殖工学会 シンポジウム 招待講演, 2015年12月13日, 明治大学

② 加藤 侑希, 丹波道子, 菊地和弘, 松田学, 岡村直道, ブタ精子 capacitation における AR と IDPc の役割の解析, 第108回日本繁殖生物学会, 2015年9月16-20日, 宮崎大学

③ 加藤 侑希, 丹波道子, 松田学, 岡村直道, ブタ精子 capacitation における IDPc の役割の解析, 第67回日本動物学会 関東支部大会, 2015年3月14日, 早稲田大学

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 侑希 (KATO H YUKI)  
茨城県立医療大学  
公私立大学の部局等  
研究員

研究者番号 : 6 0 7 3 3 6 4 9

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :