

〈原著〉

ブタ 135kDa α -D-mannosidase (MAN2B2) の マウスホモログの存在部位と受精に対する作用

平本真介¹, 野口純子², 岡村直道³

Localization and Effects on the Fertilization of a Mouse Homologue of the Porcine 135kDa α -D-mannosidase (MAN2B2)

Hiramoto Shinsuke¹, Noguchi Junko², Okamura Naomichi³

Abstract

1. In order to determine the distribution of mMAN2B2 both in the testis and matured sperm prepared from the cauda epididymis of mouse, we carried out immunocytochemical analysis using the monospecific anti-mMAN2B2 antibody. On the testis, the signals of mMAN2B2 were localized in the acrosomal granule of spermatids at the Steps 2-3, and then they were located in the acrosome throughout the later stages of the spermiogenesis. Immunocytochemical staining clearly showed the specific shape of the acrosome at each step of the spermiogenesis.
2. Although signals of mMAN2B2 protein were also observed in the acrosome of the matured sperm from the cauda epididymis, the signal was not detected after the acrosome reaction.
3. The ability of matured sperm to attach to the oocyte was inhibited by adding the monospecific anti-mMAN2B2 antibody, therefore, the fertilization rate was reduced.

These results indicate that mMAN2B2 plays an important role on the fertilization in mouse.

Key words : MAN2B2, fertilization, spermatogenesis, spermatid, acrosome

はじめに

精巣でつくられた精子は機能的には未熟であり、精子が精巣上体頭部の終りから体部を通過する段階で潜在的な運動能と受精能を獲得することが知られている。このことから、この部位の精巣上体上皮細胞から特異的に分泌されるタンパク質が精子の成熟において重要な働きを担っていると考えられる。我々はその働きを持つ物質の一つとして135kDaタンパク質をブタ精巣上体分泌液から単離した¹⁾。この135kDaタンパク質はそれまで報告の無かった新規の α -D-mannosidase (MAN2B2)である。分泌された

MAN2B2は未熟精子の頭部全体に結合するが、成熟に伴って、結合の局在部位が変わることが明らかにされた。成熟精子では、精子頭部先端と、先体のすぐ後ろの赤道帯に局在するようになる。ブタの精子は、これらの結合部位を介して、卵透明帯と卵膜に作用することが知られており、MAN2B2と精子の受精能との関連が示唆されている^{1) 2)}。更にマウスMAN2B2ホモログ (mMAN2B2) のmRNAの発現部位を調べたところ、ブタにおいては精巣上体の頭部から体部にかけての上皮細胞で最も発現が認められたのに対し、マウスではstage 9～12及び1～4の

1. (財) 国際科学振興財団

2. 独立行政法人 農業生物資源研究所 遺伝資源研究グループ生殖質保全研究チーム

3. 筑波大学医療技術短期大学部

1. Foundation for Advancement of International Science.

2. Germ Cell Conservation Laboratory, Genetic Diversity Department, National Institute of Agrobiological Sciences.

3. College of Medical Technology and Nursing, University of Tsukuba.

精原細胞で多く発現している事が明らかになった³⁾。

そこで、本研究では抗mMAN2B2抗体を用いて精巣と成熟精子におけるmMAN2B2の存在部位の同定を行い、さらに受精におけるこのタンパク質の役割について調べた。

材料と方法

1. 抗mMAN2B2抗体の作成

mMAN2B2のcDNAの3'側約2/3をコードするクローン41-3をタンパク質発現ベクターpGEX-2Tと結合させた。宿主大腸菌JM109にGST (glutathione S-transferase) 融合タンパク質として発現させ、それを精製した。

精製クローン41-3-GST融合タンパク質を抗原としてウサギに免疫して抗血清を得た。この抗血清には、mMAN2B2を認識する抗体以外にGST部分を認識する抗体も含まれている。そこでクローン41-3をタンパク質発現ベクターpET30 (C) に連結させ、これを宿主大腸菌BL21 (DE3) pT-Trxへ移入してタンパク質を発現させた。得られた菌の抽出液をSDS-PAGEで分離し、Hybond-C extra nitrocellulose membrane (Amersham) に転写後、クローン41-3発現タンパク質のバンドを切り出した。100倍に希釈した抗血清をmembraneと共にincubateしてmMAN2B2のみを認識する抗体を吸着させた。membraneを洗浄後、Elution Buffer (0.2M glycine, 1mM EDTA, pH2.8) によってmembraneから遊離した抗体をmonospecific抗mMAN2B2抗体として回収した。

2. capacitation と先体反応の誘導

成熟雄マウス精巣上体尾部から精子を採取し、HTF培地⁴⁾に懸濁した。精子数が 4×10^6 sperm/mlになる様に希釈し、37°C、5% CO₂で1時間培養し、capacitationの誘導を行った。先体反応の誘導はcalcium ionophore A23187を最終濃度5 μg/mlになるようにHTF培地に加え37°C、5% CO₂で1時間培養して行った。

3. マウス精巣の免疫組織化学的観察

成熟雄マウスから精巣を採取し、直ちにブアン液に投入して固定を行った。組織を包埋したパラフィンブロックから0.4 μm厚の切片を作製し、シランコート・スライドガラスにマウントして風乾させたものにアビジン・ビオチン・コンプレックス (ABC) 法を用いた免疫組織化学的処理を行った。monospecific抗体、あるいは、対照として抗原未感作血清を

一次抗体として用いた。二次抗体として、ビオチン化抗ウサギIgGを用いた。ABC溶液 (VECTASTAIN; VECTOR Laboratories, Inc) を反応させた後、0.025% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.003% H₂O₂, 0.02% (NH₄) NiSO₄, 0.025% CoCl₂ のTris-saline溶液 (0.15M NaCl in 50mM Tris, pH 7.6) に浸漬し、発色後封入した。光学顕微鏡下にて陽性反応部分を確認した。

隣接した切片は、精子形成のステージ、および陽性反応部位の同定を行うため、ヘマトキシリン・エオジン染色、及び、PAS染色を行った。

4. マウス精子の免疫細胞化学的観察

精子の免疫染色にはVECTASTAIN Elite ABC kit (VECTOR Laboratories, Inc) を用いた。capacitationの誘導を行なった精子、または、先体反応を誘導した精子のPBS懸濁液 (約 10^5 sperm/ml) をVECTABOND™ Reagent (VECTOR Laboratories, Inc) で処理したスライドガラス上に滴下し、風乾した。固定は4%パラホルムアルデヒドで行い、monospecific抗体、あるいは、対照として抗原未感作血清を一次抗体として用いた。二次抗体としてビオチン化抗ウサギIgGを用いた。その後の手順は前述の方法と同じである。発色後、封入し、光学顕微鏡下にて陽性反応部分を確認した。

5. in vitro での受精実験

4週齢の性的に未熟な雌マウスに5units hCGを投与し、48時間後に5units PMSを投与して、排卵を誘導した。PMS投与15時間後に卵管膨大部より卵をHTF培地中に採取した。卵をmonospecific抗体 (100 μg/ml) を含むHTF培地で1時間前培養した後、終濃度 4×10^4 sperm/mlになるようにcapacitationの誘導を行なった精子を加えた。対照としてmonospecific抗体の代わりにnormal rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology) (100 μg/ml) を加えた培地で前培養した卵を用いた。受精率の測定は、媒精後24時間における2細胞胚へ発生した卵の数を基に算出した。

結果

1. 精子形成過程におけるmMAN2B2の局在部位

図1に示されるように、マウスの精子形成過程は12のステージに分けられている。精細管の横断面には、精細管基底層側から内腔側に向かって精原細胞 (spermatogonium) から精母細胞 (spermatocyte)、精細胞 (spermatid) へと一つのステージに認められる

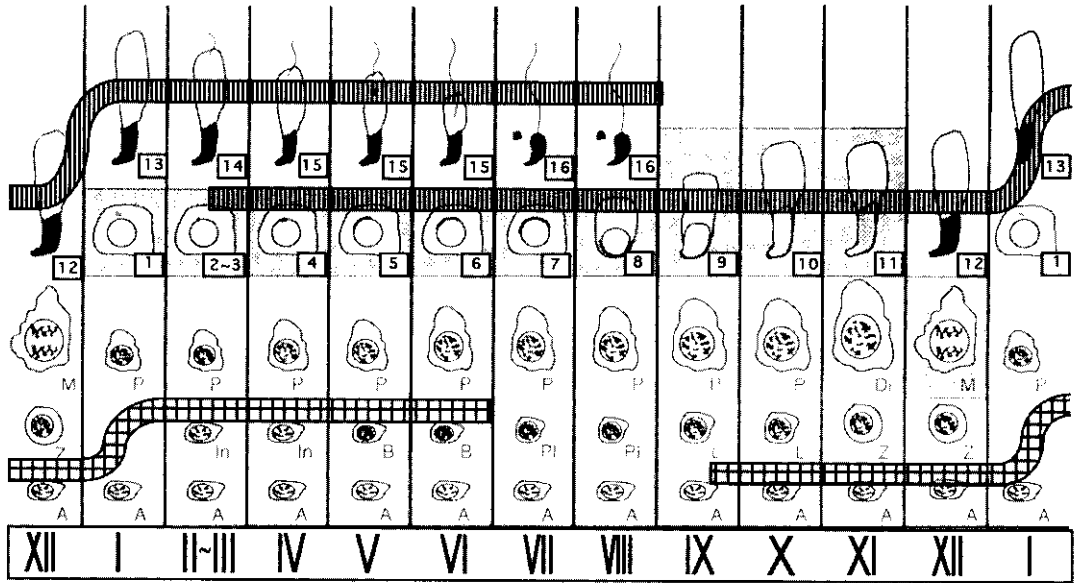


図1. マウスの精子形成サイクル

精子形成サイクルは12のステージに分けられる。A:精原細胞-タイプA, In:精原細胞-中間型, B:精原細胞-タイプB, PI:プレレプトテン期精母細胞, L:レプトテン期精母細胞, Z:サイゴテン期精母細胞, P:パキテン期精母細胞, Di:ディプロテン期精母細胞, M:減数分裂, 1~16:精細胞⁵⁾。

□: mMAN2B2 mRNA の存在が認められた精原細胞。

▬: mMAN2B2 タンパク質の存在が認められた精細胞。

様々な精子形成過程の細胞が並んでいる⁵⁾。精原細胞から精子が形成されるには12のステージを約4.5回繰り返し返す必要がある。精細胞が起こす一連の複雑な構造変化は精子完成と呼ばれ、16のステップに分別されている。12のステージが異なるステップの精細胞により構成されていることから、各ステージの鑑別は主に精細胞に着眼して行われる。

成熟マウス(8週齢)の精巣において、mMAN2B2の陽性部分は、生殖細胞にのみ認められた。さらに、精子形成過程を追って調べると、精原細胞や精母細胞には認められず、精子形成ステージ2~3に存在するステップ2~3の精細胞の核膜に隣接する先体小胞で初めて確認された。以後、陽性部位は、先体の形成を反映するように核を半円上に囲み、先体の形に沿ってその局在領域が変化することが分かった。図2-A, Bに示した様に、陽性部位は精細胞のステップが進むに従って変化する。すなわち、先体小胞が核膜に沿って広がるのにつれて陽性部位も広が

り、ステップ7では先体と陽性部分の弧のなす角度は共に約120度を超えるほどになる。以後、陽性部分は伸長する先体部分に認められ、ステップ15, 16の精細胞では、マウス精子に特徴的な鎌型の先体と同じ形に局在する。

一方、精子形成がまだ行われていない20日齢のマウスの精巣を用いて免疫染色を行ったものでは、mMAN2B2 mRNAの存在が認められた精原細胞は存在するものの、抗原の陽性部分を確認することは出来なかった。

2. 成熟精子におけるmMAN2B2の局在部位

精巣上体尾部より採取した成熟精子を用いた免疫染色を行ったところ、先体反応を起こしていない精子では、前述のステップ16の精細胞と同様に、先体部分に陽性部分が確認出来たが、図3に見られる先体反応を誘導した精子では、先体の消失に伴いその陽性部分も確認出来なくなった。

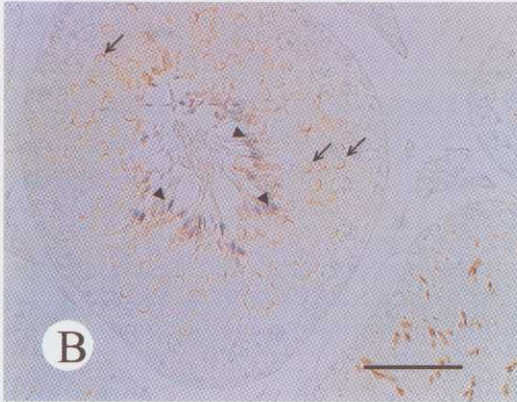
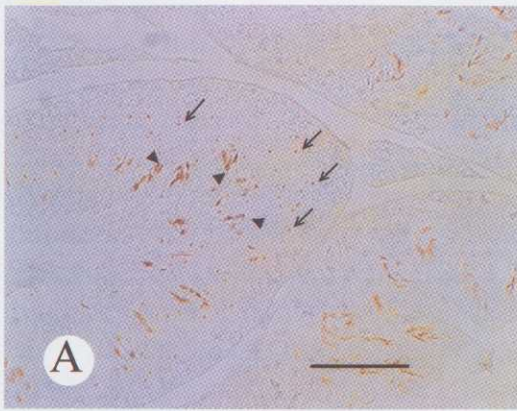


図2. 精巣におけるmMAN2B2の局在を示す光学顕微鏡写真

A: ステップ4とステップ15の精細胞の先体の染色性の違いを示すステージIVの写真。←はステップ4の精細胞を示す。◄はステップ15の精細胞を示す。B: ステップ7とステップ16の精細胞の先体の染色性の違いを示すステージVIIの写真。←はステップ7の精細胞を示す。◄はステップ16の精細胞を示す。スケールバーは50 μ mを示す。

3. 抗mMAN2B2抗体の受精率への影響

「材料と方法-5」で述べた条件で受精を行い、抗mMAN2B2抗体の受精率への影響を調べた。媒精後24時間での2細胞胚へ発生した卵の割合で受精率を決定したところ、抗体非存在下では受精率は $86.9 \pm 7.4\%$ であったのに対し、monospecific抗体存在下では $65.9 \pm 6.0\%$ であった。抗体の存在下では非存在下に対して75.9%の受精率を示したにすぎなかった。

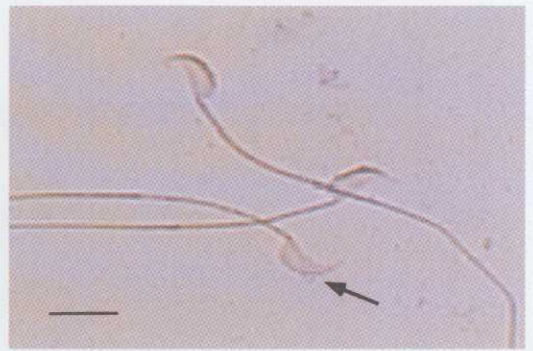


図3. マウス成熟精子におけるmMAN2B2の局在を示す光学顕微鏡写真

先体反応を起こした精子に矢印を付けて示した。スケールバーは10 μ mを示す。

また、媒精後、1.5時間での卵への精子の接着の有無について調べたところ、抗体非存在下では78.3%の卵に精子が接着していたのに対して、抗体存在下では50%であり、抗体による卵への精子の接着の抑制が認められた。

考察

今回の研究により、精巣におけるmMAN2B2タンパク質の存在部位は精細胞以降の先体部分であることが判明した。即ち、mMAN2B2の陽性部位はステップ2~3の精細胞の核膜に隣接する先体小胞で初めて確認され、以後、精子形成過程の進行と共に、先体の変形に合わせて、その局在部位が変化した。精原細胞、精母細胞、あるいは他の精巣の体細胞ではmMAN2B2の陽性部位は確認することが出来なかった。このことからmMAN2B2はこれまで一般的に行われてきたPAS染色を用いた精子形成ステージの判定よりも、より容易にステージの検定を行えるマーカーとして活用することが出来ると言える。さらに成熟した精子においても同様に先体部分に陽性部分が見られたこと、先体反応を誘導した精子では陽性部分が消失したことから、mMAN2B2が受精における精子と卵の相互作用の早い段階で働いていることが示唆された。

さて、我々は先の研究によりmMAN2B2 mRNAが精原細胞で発現していることを確認している³⁾。しかし、本研究では精原細胞にmMAN2B2タンパク質の存在は確認されず、転写と翻訳に時間的なずれが認められた。この事については、幾つかの可能性が

考えられる。まず、mMAN2B2 mRNA が、精母細胞から精細胞にまで存在が確認されているmRNAの保持能を持つchromatoid bodyの中に存在していたため、*in situ* hybridizationで確認できなかった可能性である。また、精原細胞、精母細胞で翻訳されたmMAN2B2タンパク質が精細胞のステップ2～3の先体小胞内に濃縮されるまで、今回の免疫組織化学的手法の感度では確認できなかった可能性も考えられる。いずれにしても、現時点ではその正確な理由は不明である。しかし精巣で発現が確認されている幾つかのタンパク質においてはmMAN2B2同様、転写と翻訳の間に時間的なずれが生じていることが報告されているものもあり、今後の研究により生殖系に特異的なタンパク質発現調節のメカニズムが解明されるかもしれない¹⁴⁾。また、最近、mMAN2B2 mRNA が精原細胞の無いW/W^v-mutant mouseにも存在しているとの報告もあり¹⁵⁾、我々が確認した精原細胞のMAN2B2以外にも、ブタ精巣上でmRNAの発現が見られた様に、精巣の体細胞においてもMAN2B2ホモログが存在している可能性も否定できない。

*in vitro*での受精実験において、monospecific抗MAN2B2抗体によって受精率が21%程度減少することが明らかになった。また、卵への精子の接着数も低下する傾向が見られた。同様に、ラットにおいて精子表層の α -D-mannosidaseに対する抗体、あるいは、卵の透明帯に存在するマンノース糖鎖の存在下では、精子の卵への接着が減少することが認められている。また、マンノース糖鎖の存在下での受精実験では、今回我々がマウスで得たmonospecific抗mMAN2B2抗体によるものとはほぼ同様の受精率の低下が認められている⁸⁾。この事からも、mMAN2B2は受精時に精子と卵の初期の相互作用に何らかの働きを持っている事が推察される。

結論

1. 精巣、および精巣上体尾部より採取した成熟精子におけるmMAN2B2の存在部位の同定を行うために、monospecific抗mMAN2B2抗体を用いて免疫組織化学的観察、および免疫細胞化学的観察を行った。mMAN2B2の陽性部位は生殖細胞でのみ認められた。更に、精原細胞や精母細胞の段階では検出されず、ステップ2～3の精細胞の核に隣接する先体小胞で初めて確認され、精子に至るまでの各ステップの精細胞に特徴的な先体の形を表わすように局在していた。
2. 成熟精子においてもmMAN2B2の陽性部位は先

体部位に存在していたが、先体反応後は検出する事は出来なくなった。

3. monospecific抗mMAN2B2抗体は卵への精子の接着を抑制した。また、抗体存在下では受精率の低下が認められた。

これらの結果から、mMAN2B2が受精過程において重要な働きをしているものと考えられた。

謝辞

本研究の機会を与えて下さった(財)国際科学振興財団の坂部知平博士に深く感謝致します。また、本研究を行うにあたり、その一部は文部科学省「科研費」13027208の助成を受けて行われた。

参考文献

- 1) Okamura, N., Dacheux, F., Venien, A., Onoe, S., Huet, J.C. and Dacheux, J.L. (1992) Localization of a maturation-dependent epididymal sperm surface antigen recognized by a monoclonal antibody raised against a 135-kilodalton protein in porcine epididymal fluid. *Biol Reprod*, 47, 1040-1052.
- 2) Okamura, N., Tamba, M., Liao, H.J., Onoe, S., Sugita, Y., Dacheux, F. and Dacheux, J.L. (1995) Cloning of complementary DNA encoding a 135-kilodalton protein secreted from porcine corpus epididymis and its identification as an epididymis-specific alpha-mannosidase. *Mol Reprod Dev*, 42, 141-148.
- 3) Hiramoto, S., Tamba, M., Kiuchi, S., Jin, Y.Z., Bannai, S., Sugita, Y., Dacheux, F., Dacheux, J.L., Yoshida, M. and Okamura, N. (1997) Stage-specific expression of a mouse homologue of the porcine 135kDa alpha-D-mannosidase (MAN2B2) in type A spermatogonia. *Biochem Biophys Res Commun*, 241, 439-445.
- 4) Quinn, P., Kerin, J.F. and Warnes, G.M. (1985) Improved pregnancy rate in human *in vitro* fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril*, 44, 493-498.
- 5) 高橋道人, (1994) 精巣毒性評価のための精細管アトラス ラット, マウス, イヌ, ソフトサイエンス社.
- 6) Tsunekawa, N., Matsumoto, M., Tone, S., Nishida, T. and Fujimoto, H. (1999) The Hsp70 homolog gene, Hsc70t, is expressed under translational control during mouse spermiogenesis. *Mol Reprod Dev*, 52, 383-391.
- 7) Tascou, S., Nayernia, K., Engel, W., Burfeind, P. (2000) Refinement of the expression pattern of a mouse

homologue of the porcine 135kDa alpha-D-mannosidase (MAN2B2). *Biochem Biophys Res Commun*, 272, 951-952.

- 8) Yoshida-Komiya, H., Tulsiani, D.R., Hirayama, T. and Araki, Y. (1999) Mannose-binding molecules of rat spermatozoa and sperm-egg interaction. *Zygote*, 7, 335-346.