

# 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 -

2 0 1 4

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

加 藤 侑 希

# Contents

## 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 -

<b>1 章 Introduction</b>	<b>… P1</b>
1-1 背景	
1-2 Capacitation	
1-3 ROS 産生と capacitation	
<b>2 章 Purpose</b>	<b>… P8</b>
<b>3 章 Materials and Methods</b>	<b>… P9</b>
3-1 実験材料	
3-1-1 動物	
3-1-2 試薬	
3-2 精巣及び精巣上体精子の調製	
3-3 精巣上体尾部精子の培養 : Capacitation 誘起	
3-3-1 精子サンプルの選択	
3-3-2 培地作成	
3-3-3 精子の培養	
3-4 Capacitation の判定	
3-4-1 Chlortetracycline (CTC) 染色	
3-4-2 運動性の測定	

- 3-5 精子タンパク質の抽出
- 3-6 二次元電気泳動
- 3-7 MALDI-TOF-MS によるタンパク質の同定
- 3-8 組換え aldose reductase、及び IDPc の作製
  - 3-8-1 total RNA の抽出
  - 3-8-2 RT-PCR による目的断片の増幅
  - 3-8-3 制限酵素処理
  - 3-8-4 ゲル切り出しと精製
  - 3-8-5 ligation と transformation
  - 3-8-6 IPTG によるタンパク質の発現誘導
  - 3-8-7 GST 融合組換えタンパク質の精製
- 3-9 抗体作成
  - 3-9-1 ウサギへの免疫作業
  - 3-9-2 抗血清の調製
- 3-10 Western blot
  - 3-10-1 SDS-PAGE
  - 3-10-2 blotting
  - 3-10-3 immunodetection
- 3-11 Immunoprecipitation
- 3-12 免疫組織染色
  - 3-12-1 組織の固定 - 標本作製
  - 3-12-2 免疫組織染色
  - 3-12-3 対比染色・封入
  - 3-12-4 精子の免疫染色

3-13 Aldose reductase の活性測定

3-13-1 サンプル調製

3-13-2 活性測定

3-14 グルタチオン (GSH) 測定

3-14-1 サンプル、Standard の調製

3-14-2 GSH 測定

3-15 ROS の測定

3-16 IDPc の活性測定

3-16-1 サンプル調製

3-16-2 活性測定

3-17 精子内の NADPH 量の測定

3-17-1 サンプル調製

3-17-2 NADPH 測定

3-18 統計解析

**4 章 Results**

… P31

4-1 Capacitation に伴いチロシンリン酸化されるタンパク質の同定

4-1-1 ブタ精巣上体尾部精子の capacitation 誘導とその評価

4-1-2 Capacitation に伴いチロシンリン酸化されるタンパク質の同定

4-1-2-1 Aldose reductase

4-1-2-2 IDPc

4-1-2-3  $\beta$ -enolase

4-2 Capacitation における aldose reductase の役割の解析

4-2-1 精巣上体での精子成熟過程における aldose reductase の動態

- 4-2-1-1 抗ブタ aldose reductase 抗血清の特異性
- 4-2-1-2 精巣と精巣上体各部位及び精子における aldose reductase の局在
- 4-2-2 Capacitation に伴う aldose reductase のチロシンリン酸化レベルの変化
- 4-2-3 Capacitation 過程での aldose reductase の活性変化
- 4-2-4 Alrestatin を用いた aldose reductase の阻害実験
- 4-2-5 精子の運動性調節における aldose reductase の関与
- 4-3 Capacitation における IDPc の役割の解析
  - 4-3-1 IDPc の精子内局在
  - 4-3-2 Capacitation 過程での IDPc の活性の変化
  - 4-3-3 Capacitation 誘導に伴う細胞内 NADPH 量と ROS レベルの変化

**5 章 Discussion** … P46

**References** … P54

**Table**

**Figure**

**Acknowledgements**

# 1 章 Introduction

## 1-1 背景

哺乳動物の精子は精巣で形成されるが、この段階ではまだ未熟で前進運動性や受精能力は持たない。精子は精巣を離れ、精巣輸出管を経て精巣上体に運ばれる。精巣上体は一本の細管でできた器官で精巣に近いほうから形態的に頭部 (caput)、体部 (corpus)、尾部 (cauda) に区別されるが、精巣上体細管の上皮細胞は部位によって機能的に分化していることが知られている。精巣の未熟精子は、精巣上体細管を通過する過程で、各部位の上皮細胞由来の因子が直接あるいは epididymosome と呼ばれる小胞などによって精子に供給されることで (Sullivan et al. 2007)、鞭毛運動と受精の潜在的な能力を獲得して成熟精子となるが、その後、更に 2 回の活性化を経なければ実際に運動性や受精能力を発揮できない。第 1 の活性化は、射精時に起こる前進運動の開始である。重炭酸イオン濃度が 2 mM と低濃度である精巣上体尾部分泌液から 20 mM と高濃度である精囊腺分泌液に精子が曝されることで、アデニル酸シクラーゼが活性化され、精子内 cAMP レベルの上昇と機能タンパク質のリン酸化が起こり、それが運動開始の引き金となっていると考えられている (Okamura et al. 1985, Tajima et al. 1987, Okamura et al. 1991)。第 2 の活性化は輸卵管峡部で起こる capacitation (受精能獲得反応) であり、これによって精子は初めて

hyperactivation (超活性化運動) と呼ばれる運動性を示すようになる (Visconti & Koph 1998, Arcelay et al. 2008)。即ち、射精によって精子は、対称的な鞭毛運動による直進性の運動を開始するわけだが、capacitation 反応によって、非対称的な鞭毛運動による円運動、8の字運動、star-spin 運動を呈する hyperactivation へとその運動性を変化させる (Yanagimachi 1994, Suarez & Ho 2003)。この運動性の変化は、精子が輸卵管の粘膜上皮を離れ、卵子に向かって泳いでいくために必要であり、また進む方向を様々に変化させることで卵子と出合いやすくしていると考えられている (Suarez 1996)。また、capacitation を起こした精子のみが卵子に対して先体反応を起こし、受精することが可能となる。Capacitation 誘起には、精子細胞膜に存在するコレステロールの脱離、 $\text{HCO}_3^-$ と  $\text{Ca}^{2+}$ の細胞内流入 (Baldi et al. 1991, Visconti et al. 1998)、精子内部の pH の上昇 (Wilberg & Parrish 1995)、cAMP レベルの上昇 (Fraser et al. 2005, Osiguwa & Fraser 2007)、reactive oxygen species (ROS) の産生 (Roy & Atreja 2007, Koppers et al. 2008, Storey 2008)、タンパク質のチロシン残基のリン酸化 (Visconti et al. 1995, Leclerc et al. 1996, Mededovic & Fraser 2004, Fraser 2008) などの複雑な反応が関わっているとされている。しかしながら、これら一連の連鎖反応のスイッチングの仕組みは未だ明らかにされていない。

さて、現在、妊娠を望むカップルの 10 組に 1 組は妊娠及び出産に生殖補助医療の助けが必要とされている。不妊の原因は、卵巣機能障害や精子数不足など多岐にわたるが、原因不明

の場合もあり、その一部には **capacitation** の分子メカニズムの解明によって治療法が見出される可能性もあると考えられる。**ICSI** などの顕微受精技術の進歩により、精子運動の活性化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及び出産率を上げるためには、精子活性化を促し、できる限り自然の状態に近い生殖補助技術の進歩が欠かせない。

一方、凍結保存精子からの産子の作製技術の進歩は、ヒトの不妊治療のみならず、家畜の改良育種、野生動物の種の保存や実験動物の系統保存などにとって欠くことができないが、本研究で用いたブタにおいては精子凍結保存法が確立できておらず、凍結精子の融解後の生存率は 50%程度であり、受精能力の低下は著しい。それは、氷晶の形成、浸透圧変化や低温による傷害などに加えて、融解直後に **cryocapacitation** と呼ばれる **capacitation** 様の反応が他の動物種に比べて起き易いことが原因であると考えられている。上述のように **capacitation** は哺乳動物の精子が受精するためには必須の反応であるが、一方で未受精卵と遭遇することができる適切なタイミングで起こらないと、精子を死に至らしめる変化となってしまう。凍結 - 融解によって引き起こされる **cryocapacitation** は精子にとっては早すぎるタイミングでの **capacitation** 誘起となっているのである。つまり、**capacitation** のメカニズムを解明し、その分子機構に基づいた方法で早すぎる **capacitation** を抑えることができれば、ブタ凍結保存精子を用いた人工授精による繁殖成績が飛躍的に向上す



る可能性があるといえる。

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** 過程の分子機構の解明に向けた研究を始めた。

## 1-2 Capacitation

射出された精子は卵管に到達しても、すぐに卵子に侵入していくことはできない。1951年に **Chang** と **Austin** がウサギとラットを用いた実験によって精子が数時間卵管峡部の中にいる間に構造的及び機能的変化を受けて初めて卵子に侵入していくことができるようになることを明らかにした。**Austin** は精子に誘起されるこのような生理学的変化を **capacitation** と名づけた。また1964年には柳町、**Chang** の研究により、*in vitro* で擬似的に雌性生殖器管内の環境を作り、**capacitation** 反応を誘起できるようになった。現在の発生工学・生殖工学あるいは生殖医療は、精子に *in vitro* で **capacitation** を起こさせることができるようになって初めて大きな進展を見せたといえる (**Yanagimachi & Chang 1964, Shivaji et al. 2007, Fraser 2010**)。また、**capacitation** により精子は受精能力を獲得すると同時に直線的な前進運動から回転運動や8の字運動へとその運動性を変化させ、激しく首を振ったり、鞭毛の屈曲角度を大きくしたりする。これは、**hyperactivation** と呼ばれ、**capacitation** を起こした精子の判別法の一つとして利用されている。

現在までの研究により、**capacitation** は次のように反応が

進むのではないかと予想されている。まず、精子細胞膜に存在するコレステロールの脱離が起こる。コレステロールは細胞膜の脂質二重層の構造を安定化させ、膜の流動性を抑えることで、機能タンパク質の膜内移動や構造変化が起こりにくい状態を形成している。コレステロールによって抑制されている精子細胞膜表面の機能タンパク質の働きや膜を介した様々な反応が、コレステロールが脱離することにより活性化される。即ち、 $\text{HCO}_3^-$ や $\text{Ca}^{2+}$ などのイオンの細胞膜透過性が高まり、精子内部のpHの上昇やROSレベルの上昇、更にはアデニル酸シクラーゼの活性化によるcAMPレベルの上昇が引き起こされる。その結果、protein kinase A (PKA)によりタンパク質がリン酸化され、最終的にタンパク質のチロシンリン酸化修飾が増大することによってcapacitationが誘発される。実際に、精子内部のpH上昇がcapacitationに関与していることは既に示唆されており (Zeng et al. 1996)、また精子細胞膜からコレステロールを脱離する作用を持つ $\beta$ -cyclodextrinが精子のcapacitation誘導培地に $\text{HCO}_3^-$ が含まれている条件下で、cAMP及びPKA系を介してタンパク質のチロシンリン酸化の増加を起こしていることも明らかとなっている (Visconti et al. 1999a)。これらの知見から、チロシンリン酸化タンパク質はcapacitationにおいて精子運動能力の向上、精子-卵子相互認識、先体反応などに関わる重要な役割を担っていると考えられている (Visconti et al. 1999b)。

### 1-3 ROS 産生と capacitation

前述のように、**capacitation** を起こすためには様々な反応が複雑に関わっているが、近年、特に ROS 産生と機能タンパク質のチロシンリン酸化が重要な因子ではないかと考えられている (Visconti et al. 1995, 2002, Leclerc et al. 1996, Lewis & Aitken 2001, O'Flaherty et al. 2006, de Lamirande & O'Flaherty 2008) 。

スーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) は **capacitation** 過程で NAD(P)H オキシダーゼから産生され (Bedard & Krause 2007, Sabeur & Ball 2007, de Lamirande & Lamothe 2009) 、また一酸化窒素 (NO) は一酸化窒素合成酵素 (NOS) によって精子の頭と鞭毛で産生されることが知られている (Hou et al. 2008, de Lamirande et al. 2009) 。 また、ヒトにおいては、低濃度の  $O_2^-$  や過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) などの ROS を精子細胞外から与えると、**capacitation** やタンパク質のチロシンリン酸化が亢進すること、そして ROS の消去剤であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) やカタラーゼ、また NOS の阻害剤である L-NAME や L-NMMA がそれらの反応を阻害することが明らかにされている (de Lamirande & Gagnon 1993a, b, Aitken et al. 1996, de Lamirande & O'Flaherty 2008) 。

更に、ROS レベルの上昇に伴う PKA の活性化は **capacitation** 誘起 30 分後にピークを向かえ (Lefievre et al. 2002) 、それに伴いタンパク質がリン酸化され、結果的に **capacitation** を誘導することも報告されている (O'Flaherty et al. 2004, 2006) 。 これらの事実と **hyperactivation** やタンパク質のチロシンリン酸化が **capacitation** 誘起 1 時間後以降でようやく認められるようになる事 (Leclerc et al. 1996) を

合わせ考えると、ROS は capacitation の初期段階の反応に関与し、ひいてはそれに伴う hyperactivation や先体反応を誘導することが示唆される。加えて、 $O_2^-$ がヒト精子のアデニル酸シクラーゼ活性を促進することで細胞内 cAMP レベルを高めること (Zhang & Zheng 1996) や PKA の阻害剤である H89 が ROS によるチロシンリン酸化の増加や capacitation 反応を阻害することも知られており、これらは ROS が capacitation の初期段階だけではなく、cAMP 及び PKA 系を介してもチロシンリン酸化や capacitation を制御していることを示唆している。

一般的には、ROS は細胞膜の構造や流動性に影響して精子の形態異常や運動障害などを引き起こし、男子不妊症の一因であると考えられている。しかし、一方で、上述のように capacitation を誘導するためには、ROS が適切なタイミングで産生され、またそのレベルが適切に制御されていることが必要であるといえ、capacitation における ROS レベルの調節の重要性がうかがえる。

## 2 章 Purpose

哺乳動物の精子は、精巣で発生した段階ではまだ受精能力を備えていない。精巣上体における精子成熟及び、輸卵管峡部における **capacitation** という段階的な活性化を受けた精子だけが、**hyperactivation** 及び先体反応を起こして卵と受精することが可能となる。

**Capacitation** の詳しいメカニズムは未だ明らかにされていないが、**capacitation** に直接結びつく反応として機能タンパク質のチロシンリン酸化と **ROS** 産生が特に重要であると考えられている。しかし、これまでに **capacitation** に伴ってチロシンリン酸化されるタンパク質の存在については報告があるものの、そのリン酸化タンパク質の機能を明らかにしたものは少ない。

本研究では、**capacitation** に伴いチロシンリン酸化されるタンパク質として新たに同定した **aldose reductase** と **isocitrate dehydrogenase 1 (IDPc)** について、それらのタンパク質のチロシンリン酸化が精子の **capacitation** や精子内 **ROS** レベルの調節にどのように関わっているのかを明らかにすることを目的とした。

## 3 章 Materials and Methods

### 3-1 実験材料

#### 3-1-1 動物

全ての動物実験の実施については、動物の愛護及び管理に関する法律（昭和 48 年法律第 105 号）、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成 18 年環境省告示第 88 号）、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年文部科学省告示第 71 号）、動物の殺処分方法に関する指針（平成 19 年環境省告示第 105 号）その他の法令等に定めがあるものの他に、筑波大学動物実験取扱規程に基づいて行なった。

本研究では、ブタの精巣、精巣精子、精巣上体、及び精巣上体精子を実験に用いた。生殖年齢に達したブタ精巣及び精巣上体は実験当日に茨城協同食肉株式会社で屠殺されたものを購入した。

#### 3-1-2 試薬

Alrestatin は Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA) から購入した。Lysyl endopeptidase、NADPH、DTNB、Glutathione reductase (GR), 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, diacetoxymethyl ester (H<sub>2</sub>DCFDA) は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) から購入した。Glutathione (GSH) は

Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) から購入した。Chlortetracycline (CTC), polyvinylpyrrolidone (PVP-40) , peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody, peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG, Freund's complete adjuvant, Freund's incomplete adjuvant は Sigma-Aldrich (Poole, Dorset, UK)から購入した。Protein A Sepharose 4 Fast Flow, Glutathione Sepharose 4B resin, ECL plus, PreScission Protease は GE Healthcare (Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, UK)から購入した。Protease Inhibitor Cocktail, Phosphatase Inhibitor Cocktail, Chemi-Lumi One L は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) から購入した。Sorbitol dehydrogenase inhibitor, CP-470,711 は Pfizer (New York, NY, USA) から提供された。

### 3-2 精巣及び精巣上体精子の調製

ブタ精巣、精巣上体頭部、体部、尾部から精子を採取した。精巣精子は、精巣上体を切り離した部分の精巣輸出管に直接ビニールカテーテルを挿入し、少し力をかけて精巣網液を押し出して回収した。精巣上体頭部及び体部の精子は、顕微鏡下でピンセットを用いて精巣上体細管をループ状に 1 mm 程度引き出し、その根元を手術糸で軽く縛った。縛った精巣上体細管ループの先端に切れ目を入れ、そこに毛髪ほどの太さに引き伸ばしたビニールカテーテルを挿入し、軽く縛っておいた糸をきつく縛り、ビニールカテーテルを固定した。ビニールカテーテルと

結合させたシリンジを押して空気を送り込むと、精巣上体液が押されて流れていくのが分かるので、その流れの先の管を切り、精巣上体液が出てくるまでゆっくりと空気を送り続けた。精巣上体液が出てきたら、空気が抜け終わるまで回収した。精巣上体尾部の精子は、輸精管に結合させたシリンジから空気を送り、空気圧によって採取した。それぞれの方法によって採取した精巣または精巣上体各部位の内腔液を 400 x g, 5 min, 25°C で遠心し、ペレット (ppt) を精子サンプルとして実験に用いた。また、上清は回収後さらに 20,000 x g, 10 min, 4°C の遠心を行い、その上清を内腔液サンプルとして実験に用いた。

### **3-3 精巣上体尾部精子の培養：Capacitation 誘起**

#### **3-3-1 精子サンプルの選択**

本研究に用いたブタは多くの哺乳動物の中でも、精子の凍結保存法が確立できていない動物種の一つであり、ブタ精子の capacitation の分子メカニズムの理解がその問題を解決すると考えられる。また、ブタ精子は精巣上体尾部（液）内では成熟しているにもかかわらず運動性を示さず、副生殖腺液と共に射精されることで初めて前進運動を開始することが知られている。射出精子では、精漿に含まれる様々な成分の影響を受けて、前進運動を開始してしまっているため、精巣上体での精子成熟と capacitation との関連が精査できなくなってしまう。このような理由から、本研究ではブタの精巣上体尾部の成熟精子を用いて capacitation に関する実験を行った。



### 3-3-2 培地作成

Capacitation を誘導させずに精子を培養する medium を “Non-cap medium” とし、Krebs Ringer bicarbonate buffer (Tardif et al, 2001) に基づいて作製した。その組成は、4.8 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 95 mM NaCl, 2 mM Na-pyruvate, 5.56 mM glucose, pH 7.4 である。一方、capacitation の誘導には Non-cap medium に 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.4% BSA, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.4 を添加した培地、“Cap medium” を用いた (Visconti et al, 1998)。また、aldose reductase の膜透過性の特異的阻害剤である alrestatin を用いた阻害実験では、Cap medium に適当な濃度の alrestatin を加えた。

### 3-3-3 精子の培養

精巣上体尾部より採取した精子に Non-cap medium 或いは、Cap medium を各々加え、400 x g, 5 min, 25°C で 2 回遠心し、精子を洗浄した。洗浄した精子にそれぞれの medium を加え ( $5 \times 10^6$  cells/ml)、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 3 時間培養した。この時、Non-cap medium で培養した精子を “Non-cap sperm”、Cap medium で培養した精子を “Cap sperm” と定義した。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、前進運動の測定では精巣上体尾部から採取した精子を直ちに氷上に置いて前進運動の開始を遅らせた。その後、

氷冷した尾部精子 20  $\mu$ l を 37°C の medium (Non-cap medium + 20 mM NaHCO<sub>3</sub>) 1 ml に加え ( $5 \times 10^6$  cells/ml) 3 分間平衡化した後、顕微鏡で精子を観察し、各視野で前進運動性を示す精子の割合 (%) を測定した。

### 3-4 Capacitation の判定

#### 3-4-1 Chlortetracycline (CTC) 染色

CTC 染色は Wang et al. (1995) の方法に基づいて行った。396  $\mu$ l の精子懸濁液 ( $5 \times 10^6$  cells/ml) に 4  $\mu$ l Hoechst solution (100  $\mu$ g Hoechst bis-benzimide 33258/mBO medium [112.0 mM NaCl, 4.02 mM KCl, 2.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.83 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.52 mM MgCl<sub>2</sub>, 37.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 13.9 mM glucose, 1.25 mM sodium pyruvate]) を加え、vortex 後、暗所で 3 分間 incubation した。その後、精子懸濁液を 4 ml 3% PVP-40/PBS (Sigma) の上に重層し、500 x g, 6 min, 4°C で遠心した。遠心後の ppt に mBO medium を 50  $\mu$ l 加え再懸濁した。続いて、懸濁液 45  $\mu$ l に CTC solution (750  $\mu$ M CTC, 5 mM cysteine, 130 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.8) を 45  $\mu$ l と 12.5% paraformaldehyde/0.5 mM Tris-HCl, pH 7.4 を 8  $\mu$ l 加えよく混和した。このサンプルを蛍光顕微鏡で観察し、以下の 3 つの染色パターンを示す精子の割合 (%) を算出し、B pattern の精子を capacitated sperm とした (Fig. 1a)。

F pattern (Non-cap sperm) : 精子の頭全体が染まる。

B pattern (Cap sperm) : post-acrosomal region の蛍光が帯状に欠落

する。

AR (acrosome reacted sperm) : 精子の頭全体の蛍光が弱くなる。

### 3-4-2 運動性の測定

Capacitation 誘起前後の精子を顕微鏡で観察し、各視野で前進運動性を示す精子の内、hyperactivation を起こしている精子の割合 (%) を測定した。

Hyperactivation の判定は computer-assisted sperm analysis (CASA) system (HTM-CEROS; Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA) を用いて曲線速度 : curvilinear velocity (VCL;  $\mu\text{m/s}$ ), 直線速度 : straight-line velocity (VSL;  $\mu\text{m/s}$ ), 平均速度 : average path velocity (VAP;  $\mu\text{m/s}$ ), 直進性 : linearity of the curvilinear trajectory (LIN;  $\text{VSL} \times 100/\text{VCL}$ ), 直線性 : straightness (STR;  $\text{VSL} \times 100/\text{VAP}$ ), 頭部振幅 : amplitude of lateral head displacement (ALH;  $\mu\text{m}$ ), 頭部振幅数 beat cross-frequency (BCF; Hz) の各運動パラメーターを算出し、またその精子の軌跡を解析した。 更には、鞭毛の動きを精査するために、精子の運動を Nikon-NY-D5100 Super System (Microscope Network, Saitama, Japan) で記録し、Schmidt & Kamp (2004) の方法に基づき、flagellar beat angle (FBA) と flagellar curvature ratio (FCR) の測定を行った。 一定時間に左右に振れた鞭毛に頭と中片部の接合部から接線を引きその角度を FBA とした。 一方、FCR は頭と中片部の接合部から最初の変曲点に向かって直線を引き、その直線距離を  $x$  とし、また変曲点までの鞭毛の実測長を  $y$  とした時の  $x/y$  の値と

して求めた。

### 3-5 精子タンパク質の抽出

精子 ( $2.5 \times 10^7$  cells/5 ml of 20 mM Tris-HCl, 2.5% protease inhibitor cocktail, 0.25% phosphatase inhibitor cocktail, pH 7.4 with or without 1% Triton X-100) を sonication により破砕した後、 $105,000 \times g$ , 60 min,  $4^\circ\text{C}$ で超遠心し、上清をサンプルとした。この時 sonication buffer として、20 mM Tris-HCl, 2.5% protease inhibitor cocktail, 0.25% phosphatase inhibitor cocktail, pH 7.4 with 1% Triton X-100 を用いたものを”whole sperm extract”とし、20 mM Tris-HCl, 2.5% protease inhibitor cocktail, 0.25% phosphatase inhibitor cocktail, pH 7.4 を用いたものを”soluble fraction”とした。また、soluble fraction 回収後の精子を 20 mM Tris-HCl, 2.5% protease inhibitor cocktail, 0.25% phosphatase inhibitor cocktail, pH 7.4 with 1% Triton X-100 に再懸濁し、sonication 後、超遠心した上清を”particulate fraction”とした。

また、Okamura & Sugita. (1983) の方法に基づき、ショ糖密度勾配遠心法による精子分画を行った。20 ml の 1.3 M sucrose - 0.15 M NaCl の上に incubation 後の精子 10 ml を重層し、 $12,100 \times g$ , 70 min,  $4^\circ\text{C}$ で遠心し、遠心後の ppt を PBS で 2 回洗浄した。洗浄後の精子を 10 ml 5 mM HEPES, pH 7.0 に再懸濁し sonication した。Sonication 後の懸濁液を 10 ml 2.0 M sucrose - 0.15 M NaCl、10 ml 1.7 M sucrose - 0.15 M NaCl、8 ml

1.3 M sucrose - 0.15 M NaCl の sucrose 不連続密度勾配上に重層し、100,000 x g, 180 min, 4°C (Beckman SW 28 rotor)で超遠心した。遠心後、最上層を cytosol fraction、cytosol fraction と 1.3 M sucrose の境界、そして 1.3 M sucrose と 1.7 M sucrose の境界のものを membrane fraction、1.7 M sucrose と 2.0 M sucrose の境界のものを flagellar fraction、ppt を head fraction として回収した。Membrane、flagellar、head fraction は回収後、抽出 buffer (1% Triton-X 100, 20 mM Tris-HCl, 2.5% protease inhibitor cocktail, 0.25% phosphatase inhibitor cocktail, pH 7.4) に再懸濁し、sonication 後、100,000 x g, 35 min, 4°Cの超遠心を行い、上清をサンプルとして実験に用いた。

### 3-6 二次元電気泳動法

調製したサンプル (119 µl タンパク質抽出液, 1.6 mg DTT, 110.5 mg Urea, 0.5 µl Bio-Lyte 3/10 Ampholyte [BIO-RAD], 1 µl BPB solution)を二次元電気泳動装置に各レーン 150 µl ずつ入れ、ReadyStrip™ IPG Strips (BIO-RAD, 7 cm, pH 3-10) を上に重ね、室温で 60 min 静置し、strip にサンプルを吸着させた。その後、乾燥を防ぐために 800 µl mineral oil を重層し、等電点電気泳動装置 (BIO-RAD, PROTEAN IEF Cell) で泳動を行った。等電点電気泳動後、strip を buffer I (3.6 g Urea, 2 ml 10% SDS, 2.5 ml 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 2.7 ml 75% glycerol, 400 mg DTT) で 10 min 平衡化し、更に buffer II (3.6 g Urea, 2 ml 10% SDS, 2.5 ml 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 2.7 ml 75% glycerol, 250 mg

Iodoacetamide) で 10 min 平衡化した。その後、実験に最適な濃度のポリアクリルアミドゲルに調製した strip を乗せ、電気泳動を行った。

### 3-7 MALDI-TOF-MS によるタンパク質の同定

Capacitation に伴いチロシンリン酸化レベルが変化したタンパク質を 2-DE により分離しゲルから切り出した。切り出したゲルに 100% acetonitrile (ACN) を 100  $\mu$ l 加え、56°C, 10 min 恒温槽で攪拌しゲルの脱水収縮を行った。その後、溶媒を取り除き、遠心乾燥を行った。続いて、還元溶液 (10 mM DTT, 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) を 100  $\mu$ l 加え、56°C, 1 h 反応させた。還元後、溶媒を取り除きアルキル化溶液 (55 mM  $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ , 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) を 100  $\mu$ l 加え、遮光状態で 15 min 攪拌した。その後、ゲルを 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  と ACN の中で交互に攪拌することで DTT と  $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$  の除去を行い、除去後に遠心乾燥を行った。次に乾燥したゲルに消化溶液 (0.01  $\mu$ g/ $\mu$ l Lysyl endopeptidase [Wako], 100 mM Tris-HCl, pH 9.0) を加え、ゲルを膨潤しつつ on ice で 45 min 静置した。その後、溶液を取り除き、新たに乾燥防止用に Lysyl endopeptidase を除いた溶液 (100 mM Tris-HCl, pH 9.0) を 100  $\mu$ l 加え、37°C, 20 時間反応を行った。反応終了後、25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液をゲルがつかる程度加え、15 min 攪拌した。その後、さらに等量の ACN を加えてもう一度 15 min 攪拌し、上清を回収した。溶液を回収した後、5% Trifluoroacetic acid (TFA)/50% ACN をゲルがつかる程度加え

15 min 攪拌し、上清を回収した。この操作を 2 回繰り返した後、回収したすべての上清をまとめ、減圧濃縮遠心機で 10  $\mu$ l 程度になるまで濃縮した。濃縮後、0.1% TFA を加えて 100  $\mu$ l にし、再度、減圧濃縮遠心機にて 10  $\mu$ l 程度になるまで濃縮した。続いて、ペプチド抽出を ZipTipC18 ピペットチップ (Millipore) を用いて行った。まず ZipTipC18 を膨潤させるために、0.1% TFA/50% ACN を吸引、排出する操作を 3 回繰り返した。次に、0.1% TFA を吸引、排出を 5 回行うことで ZipTipC18 の平衡化を行った。その後、サンプルの吸引、排出を 30 回繰り返し、ZipTipC18 にペプチドを吸着させた。吸着後、ZipTipC18 の洗浄・脱塩のために 0.1% TFA を 5 回吸引、排出した。最終的には 0.1% TFA/50% ACN を用いて洗浄した ZipTipC18 からペプチドを溶出し、サンプルプレートに乗せ、サンプルが乾燥した後に、マトリクス溶液を 0.5  $\mu$ l 添加し測定を行った。得られたデータを Mascot search program (Matrix Science, London, UK) を用いてデータベース検索を行い、タンパク質の同定を行った。

### **3-8 組換え aldose reductase、及び IDPc の作製**

#### **3-8-1 total RNA の抽出**

ブタ精巣組織を 0.1 g 採取し、ISOGEN (NIPPON GENE) を 1 ml 加え Polytron (KINEMATICA) にてホモジナイズを行った。室温で 5 分間静置した後、クロロホルムを 0.2 ml 加えて 15 秒間振とうを行い、3 分間室温で静置した。その後、12,000  $\times$  g, 5 min, 4°C で遠心を行った。遠心後の上清に 0.5 ml のイソ

プロパノールを加え、室温で 10 分間静置し 12,000 x g, 20 min, 4°Cで遠心を行った。遠心後の ppt を 1 ml の 70% EtOH でリンスを行った後風乾し、100 µl の DEPC に溶解した。抽出した RNA の濃度は Nano Drop (Nano Drop Technologies) を用いて測定した。

### 3-8-2 RT-PCR による目的断片の増幅

Super Script III First-Strand (invitrogen) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。Total RNA 1 µg、oligo dT primer、dNTP を混合し、65°C、5 分間インキュベートし、さらに氷上に 1 分間静置した。ここに cDNA 合成 mixture (2µl 10 x RT Buffer, 4µl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 2µl 0.1 M DTT, 1µl RNase OUT, 1µl Super Script) を加え、50°C-5 min、55°C-15 min、85°C-5 min インキュベートを行った。その後、RNase H を 1 µl 加え、37°C-20 min インキュベートを行った。合成した cDNA を鋳型として PCR を行った。primer は aldose reductase (accession no. AK398724; Fig. 2) に対するものは、(forward: 5'-GTGCTCTACACCGGATCCAAGATGCCCATC-3', reverse: 5'-AGGCACAGACCCTCGAGTTCCTGTTGTAGC-3') で行い、インサートの長さは 886 bp となった。一方、IDPc (accession no. ABD77226.1 ; Fig. 3) に対するものは、(forward: 5'-TGGA ACTGGATCTGCACAGCTACG-3', reverse: 5'-CTCCTGTCCTTTCTGGGACATTTG-3') で行い、インサートの長さは 868 bp となった。PCR には TAKARA ExTaq (TAKARA)



を用い、PCR 反応条件は、94°C- 4 min、[ 94°C-30 sec、58°C-30 sec、72°C-2 min ] を 28 サイクル、72°C-7 min で行った。

### 3-8-3 制限酵素処理

目的断片を PCR により増幅後、aldose reductase は BamH I と Xho I で、IDPc は EcoR I と Sal I で制限酵素処理を行った。また、pGEX 6p-2 vector (GE Healthcare) もそれぞれと同様の酵素で制限酵素処理をした。

### 3-8-4 ゲルの切り出しと精製

制限酵素処理後の aldose reductase 或いは IDPc と、pGEX 6p-2 vector を 1 % agarose gel で電気泳動後、Mupid-STAIN eye (ADVANCE) を用い agarose gel を染色し目的断片を切り出した。切り出したゲルの精製には illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) を用いた。

### 3-8-5 ligation と transformation

pGEX 6p-2 vector と精製した遺伝子を 3 : 1 になるように混合し、DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (TAKARA) を用い 16°C、over night で ligation を行った。凍結状態にある大腸菌 DH5α コンピテントセルを氷上で自然解凍させた。10 µl の ligation 反応後の溶液を 100 µl のコンピテントセルに加え、攪拌せず氷上で 30 分間静置した。その後、42°C, 45 sec ヒートショックを加えた後に急冷し、全量を LB + ampicillin (LB + amp)プレートへ添

加し 37°Cで培養を行った。培養後のプレートからコロニーを採取し plasmid DNA を回収した。回収した plasmid DNA をシーケンスにかけ、目的断片が挿入されている菌体を選抜した。

### **3-8-6 IPTG によるタンパク質の発現誘導**

シングルコロニーをピックアップし、50 ml の LB + amp 液体培地に植菌して 37°C、over night で振とうしながら前培養を行った。前培養をした培養液を 150 ml の LB + amp 液体培地に加え、37°Cで 1 時間振とう培養を行った。1 時間後に IPTG を最終濃度で 100  $\mu$ M になるよう加え、25°Cで 8 時間培養を行った。培養終了後、遠心により集菌作業を行った。

### **3-8-7 GST 融合組換えタンパク質の精製**

集菌後のペレットに PBS を 10 ml 加え、sonication を行った。Sonication 後、1,200 x g, 30 min, 4°Cで遠心し、上清を 0.45  $\mu$ m のフィルターに通した。0.45  $\mu$ m のフィルターを通過した溶液をあらかじめ PBS で平衡化しておいた Glutathione Sepharose 4B resin (GE Healthcare) に加え、4°C、over night で転倒混和を行った。その後、1,200 x g, 15 min, 4°Cで遠心を行い、resin のみを回収し、PBS で 5 回洗浄した。洗浄後の resin に PBS を 200  $\mu$ l 加え、そこに GST タグを切断する制限プロテアーゼである Precision (GE Healthcare) を加え、4°C、over night で転倒混和を行った。最後に、1,200 x g, 15 min, 4°Cで遠心を行い、上清を組換え aldose reductase または組換え IDPc として回

収した。

## **3-9 抗体作製**

### **3-9-1 ウサギへの免疫作業**

組換えタンパク質を抗原としブタ aldose reductase、IDPc に対する抗体を作製した。組換えタンパク質 200 µg を Freud's complete adjuvant (Sigma) と混合し、エマルジョンを作製した。このエマルジョンを初回免疫として雌の Japanese White 種ウサギの背中 of 皮下へ注射した。追加免疫は 400 µg の抗原を Freud's incomplete adjuvant (Sigma) と混合してエマルジョンを作製し、初回免疫から 14 日目、21 日目、28 日目、35 日目、42 日目に行った。

### **3-9-2 抗血清の調製**

最終抗原投与から 4 日後にウサギの耳の静脈から血液を 50~100 ml 採取した。採取した血液を 37°C、1 時間静置した。保温後 4°C で over night 静置した。翌日 800 x g, 30 min, 4°C で遠心を行い、上清を抗血清とした。抗血清は最終濃度で 0.01 % (w/v) となるようチメローサル (Sigma) を加え、-20°C に保存した。

## **3-10 Western blot**

### **3-10-1 SDS-PAGE**

抽出タンパク質に、3 x SDS Sample Buffer (最終濃度 62.5

mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol [w/v], 2% SDS [w/v], 0.01% BPB [w/v], 5%  $\beta$ -mercaptoethanol [v/v]) を加えて 5 分間ボイルしたものを縦 6 cm×横 9 cm×厚さ 1 mm の 10% SDS ポリアクリルアミドゲルにアプライし、200 V 定電圧により泳動した。泳動タンパク質の検出は、ゲルを CBB 溶液 (0.25% CBB [w/v], 5% MeOH [v/v], 7.5% CH<sub>3</sub>COOH [v/v]) につけ 30 分間振とう後、脱色液 (25% MeOH [v/v], 7.5% CH<sub>3</sub>COOH [v/v]) でバンドが適度に見えるまで脱色して行った。

### 3-10-2 blotting

ゲル中のタンパク質の転写は、セミドライブロットイング装置 (ATTO) で、10% MeOH、1% CAPS を転写 buffer (TB) として用いて行った。Pore size 0.45  $\mu$ m の PVDF 膜 (Amersham Hybond<sup>TM</sup>-P, GE Healthcare) を 100% MeOH に数秒浸けた後、TB に 3 MM Whatman 濾紙と共に浸け平衡化した。電気泳動終了後のゲルは TB 中で 10 分間振とうして平衡化した。ブロットイング装置の陽極から濾紙 3 枚、PVDF 膜、ゲル、濾紙 3 枚の順に重ね、余分な TB を吸い取った後、1 番上の濾紙に TB を少量かけた。転写は、1 mA/cm<sup>2</sup> で 90 分間行った。転写終了後の PVDF 膜を Ponceau S (0.1% Ponceau [w/v], 1% CH<sub>3</sub>COOH [v/v]) に 5 分間浸した後、直ちに Distilled Water (DW) で PVDF 膜を洗浄し、適度な染色状態にしてタンパク質の転写効率の確認をすると共に 18 G の注射針で分子量マーカーの部分に穴を開けた。その後さらに DW で洗浄を行い、Ponceau S を落とした。

### 3-10-3 immunodetection

PVDF 膜を 4°C、over night でブロッキング後、下記で述べる洗浄液で PVDF 膜を 5 min x 2 回洗浄した。洗浄後、PVDF 膜を 1 次抗体に浸け、37°C、60 min 反応させた。1 次抗体反応後、PVDF 膜を洗浄液で 10 min x 4 回洗浄した。続いて、2 次抗体を 37°C、60 min 反応させた。2 次抗体反応後、PVDF 膜を洗浄液で 10 min x 4 回洗浄した。検出は、ECL plus (GE Healthcare) または、Chemi-Lumi One L (Nacalai Tesque) を用いて行った。チロシンリン酸化タンパク質を検出する実験では、3% BSA/TBS (10 mM Tris-HCl [pH7.4], 100 mM NaCl) でブロッキングを行い、洗浄液・抗体希釈液には TBST (0.1% Tween20 in TBS) を用いた。一方、それ以外の場合には、3% スキムミルク/PBS でブロッキングを行い、洗浄液及び抗体希釈液には PBST (0.1% Tween20 in PBS) を用いた。抗体濃度は実験毎に最適な濃度を選択した。

### 3-11 Immunoprecipitation

精子タンパク質抽出液 500 µl (1 mg protein) に 20 mM Tris-HCl, pH 7.4 で平衡化した Protein A resin を 10 µl 加え 4°C, 60 min 反応させた。反応後、2500 x g, 10 min, 4°C で遠心し上清を回収した。回収した上清 450 µl に pre-immune 血清または anti-AR 血清を 50 µl 加え、4°C, 120 min 反応させた。続いて、Protein A resin を 20 µl 加え、更に 90 min 反応させた。その

後、反応後の resin を回収し、洗浄液 (0.1% Triton-X 100 in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) で 3 回遠心洗浄し、洗浄後の resin をサンプルとした。

### 3-12 免疫組織染色

#### 3-12-1 組織の固定-標本作製

ブタ精巣、精巣上部頭部、精巣上部体部、精巣上部尾部から組織を採取し、ブアン固定液 (水飽和ピクリン酸 : ホルマリン : 酢酸 = 15 : 5 : 1) に浸け、over night 振とうした。その後、EtOH により脱水後パラフィンに包埋した。包埋した組織をマイクロトームを用いて、厚さ 4  $\mu\text{m}$  に薄切後、スライドガラス上へ伸展して組織標本とした。

#### 3-12-2 免疫組織染色

免疫組織染色には VECTASTAIN ABC kit (FUNAKOSHI) を用いた。組織標本を脱パラフィン後蒸留水で 5 min 洗浄した。内在性ペルオキシダーゼ活性の除去を 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、5 分間処理することで行い、PBS で 3 分間洗浄を行った。その後、kit に付属しているブロッキング試薬にてブロッキング操作を 20 分間行った。反応終了後、ブロッキング液を吸い取り、PBS で 3000 倍に希釈した抗 aldose reductase 血清を組織標本に滴下し、30 min 反応させた。PBS で 5 min x 3 回洗浄を行った後、kit 付属のビオチン標識二次抗体を滴下し、30 min 反応させた。その後、PBS で 5 min x 3 回洗浄を行い、ABC 試薬を滴下して、30 min 反

応させた。 反応後、PBS で 5 min x 3 回洗浄を行い、基質である DAB を添加し、適度な反応が認められ次第蒸留水で洗浄し、反応を止めた。 また、negative control として、あらかじめ組換え aldose reductase と抗ブタ aldose reductase 抗血清を重量比で 5 : 1 で混合し、4°C、over night で反応させた中和抗体を 1 次抗体として用いた。

### 3-12-3 対比染色・封入

免疫染色後、対比染色を行った。 スライドガラスをヘマトキシリン溶液につけ 5 min 静置し、その後流水で洗浄した。 脱水後、透徹し非水溶系封入剤ビオライトで封入した。

### 3-12-4 精子の免疫染色

培養後の精子懸濁液 ( $5 \times 10^7$  cells/1 ml of Non-cap or Cap medium) を PBS で遠心洗浄後、4% パラホルムアルデヒドによる固定、3%  $H_2O_2$ /PBS による内在性のペルオキシダーゼの除去を行い、続けて、PBS で洗浄後、3% BSA/PBS でブロッキングを 1 時間行った。 反応終了後、ブロッキング液を取り除き、PBS で 100 倍に希釈した一次抗体を室温で 2 時間反応させた。 その後、PBS で 5 min x 3 回遠心洗浄を行った後、PBS で 250 倍に希釈した二次抗体を室温で 30 分間反応させた。 反応終了後の精子懸濁液を PBS で洗浄し、スライドガラスに滴下し、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus) で観察を行った。

### 3-13 Aldose reductase の活性測定

#### 3-13-1 サンプル調製

精子 ( $2.5 \times 10^7$  cells/5 ml of 20 mM Tris-HCl, pH 7.4 with or without 1% Triton X-100) を sonication により破砕した後、 $105,000 \times g$ , 60 min,  $4^\circ\text{C}$  で超遠心し、上清をサンプルとした。この時 sonication buffer として、20 mM Tris-HCl, pH 7.4 with 1% Triton X-100 を用いたものを "whole sperm extract" とし、20 mM Tris-HCl, pH 7.4 を用いたものを "soluble fraction" とした。また、soluble fraction 回収後の精子を 20 mM Tris-HCl, pH 7.4 with 1% Triton X-100 に再懸濁し、sonication 後、超遠心した上清を "particulate fraction" とした。

#### 3-13-2 活性測定

Aldose reductase の活性測定は、Kador et al. (1980) の方法に基づいて行い、反応により消費される NADPH 量を分光光度計 (Gene Spec III) を用いて、340 nm の吸光度変化として測定した。即ち、精子抽出タンパク質 200  $\mu\text{l}$  を 0.15 mM NADPH, 120 mM リン酸 Buffer, pH 6.2 に加え、測定直前に DL-glyceraldehyde を最終濃度で 10 mM になるように入れ、total volume を 1 ml とし、 $20^\circ\text{C}$ , 10 min の吸光度変化を記録した。また negative control として、試料の代わりに DW を入れたものを測定した。



### 3-14 グルタチオン (GSH) 測定

#### 3-14-1 サンプル、Standard の調製

Capacitation 誘導前後の洗浄した精子 ( $5.3 \times 10^7$  cells) に 5% スルホサリチル酸を 500  $\mu$ l ずつ加え sonication を行った。その後、100,000 x g, 35 min, 4°C で遠心し上清を回収しサンプルとした。800  $\mu$ M GSH を 1.3% スルホサリチル酸/10 mM HCl で希釈し、グルタチオン定量用 standard とした (0.5~80  $\mu$ M)。

#### 3-14-2 GSH 測定

GSH の測定は Vandeputte et al. (1994) の方法に基づき、Total Glutathione Quantification kit (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用いて行った。

調製した blank, standard, サンプル 20  $\mu$ l に 200  $\mu$ l mixture (1 mM DTNB, 0.34 mM NADPH, 104 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.6 mM EDTA, pH, 7.4) を加え、20°C, 10 min incubation した。その後、GR (1.2 IU/ml) を 40  $\mu$ l ずつ加え、10 分後の 412 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Varioskan, Thermo Fisher) により測定した。

### 3-15 ROS の測定

ROS の測定は、Awda et al. (2009) の方法に基づいて行った。capacitation 誘導の incubation 終了 30 分前に、精子培養液に ROS 蛍光試薬 (6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein

Diacetate, Diacetoxyethyl Ester[Wako]) を最終濃度が 50  $\mu\text{M}$  になるように加えた。Incubation を終えた精子を Non-cap medium で 400 x g, 5 min, 4°C で 2 回遠心洗浄した。その後、蛍光顕微鏡により 490 nm の蛍光を観察した。また、観察後、96 穴プレートに精子を 100  $\mu\text{l}$  ずつ分注してマイクロプレートリーダー (Varioskan, Thermo Fisher, Yokohama, Japan) にて 490 nm の蛍光を測定し、ROS を定量した。

### 3-16 IDPc の活性測定

#### 3-16-1 サンプル調製

培養後の精子 ( $1.0 \times 10^9$  cells/5 ml DW) を凍結 - 融解後、sonication により破碎し、105,000 x g, 30 min, 4°C で超遠心し、上清を IDPc 画分とした。

#### 3-16-2 活性測定

IDPc の活性測定は Cordoba et al. (2005) の方法に基づいて行い、反応により生成される NADPH 量を分光光度計 (UV mini 1240, SHIMADZU) を用いて測定した。即ち、900  $\mu\text{l}$  reaction buffer (70 mM Tris-HCl, 8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{MnCl}_2$ , 20 mM citric acid, 1.2 mM DL-isocitric acid, 0.5 mM NADP, pH 7.5) に、測定直前に精子 IDPc 画分を 100  $\mu\text{l}$  ( $2 \times 10^7$  cells) 加え、total volume を 1 ml とし、反応開始後、37°C で 0 min と 5 min の吸光度 (340 nm) を測定し、5 分間の吸光度変化から活性を算出した。

### 3-17 精子内の NADPH 量の測定

#### 3-17-1 サンプル調製

精子内 NADPH 量の測定は、EnzyChrom™ NADP<sup>+</sup>/NADPH Assay Kit (BioAssay Systems) を用いて行った。培養後の精子 ( $1.25 \times 10^8$  cells) を PBS で 2 回遠心洗浄した。洗浄後の ppt に 100  $\mu$ l NADPH extraction Buffer を加え、60°C, 10 min 反応させた。その後更に、20 ml Assay Buffer と 100 ml NADP extraction Buffer を加えて中和し、Vortex 後 12,100 x g, 15 min, 4°C で遠心し、上清を回収しサンプルとした。

#### 3-17-2 NADPH 測定

96 well plate の各 well に 40  $\mu$ l サンプル ( $1.6 \times 10^7$  cells) と 80  $\mu$ l Working Reagent (60  $\mu$ l Assay Buffer, 10  $\mu$ l 1M Glucose, 14  $\mu$ l MMT solution, 1  $\mu$ l Enzyme Mix) を加えよく混和し、反応開始後 0 min と 30 min の吸光度 (565 nm) を測定し、30 分間の吸光度変化から NADPH 量を算出した。

### 3-18 統計解析

データは mean  $\pm$  S.E.M. で表し、少なくとも 3 回の実験を行った。統計解析には、two-way ANOVA、t-test 及び Tukey's test を使用し、P < 0.05 の統計結果を有意とした。

## 4 章 Results

### 4-1 Capacitation に伴いチロシンリン酸化されるタンパク質の同定

#### 4-1-1 ブタ精巢上体尾部精子の capacitation 誘導とその評価

精子は capacitation の進行に伴い、対称的な鞭毛運動による前進運動から、非対称的な鞭毛運動により更に活性化された運動に運動性を変化させる。この運動性の変化は、hyperactivation と呼ばれ、CTC 染色パターンの変化や先体反応の誘起とともに capacitation の指標となっている。本研究では、hyperactivation の程度と CTC 染色の染色パターンの変化によって capacitation を評価した。

Non-cap medium で培養した精子 (Non-cap sperm) の運動性は、直線的な前進運動であった。一方、Cap medium で培養した精子 (Cap sperm) の運動性は、hyperactivation に特徴的な動きである円運動、8の字運動、star-spin 運動が見られた (Fig. 4a)。加えて、上述のように精子は hyperactivation に伴い、鞭毛の動きを対照的な動きから非対称的な動きへと変化させ、更にはその振れ幅を激しくする。その鞭毛の動きの変化を評価する FBA と FCR の値は、ブタ精子において FBA は  $87^\circ$  以上、FCR は 0.7 以下であることが hyperactivation の閾値となっている (Schmidt & Kamp 2004)。Fig. 4b,c に示したように、FBA と FCR の値が Non-cap sperm が  $42.7^\circ \pm 1.6$  と  $0.89 \pm 0.01$  なのに

対し、Cap sperm は  $146.1^{\circ} \pm 8.8$  と  $0.59 \pm 0.02$  であった。また、CASA により精子の運動性パラメーターを評価すると、Non-cap sperm に比し、Cap sperm では VCL、VSL、VAP、ALH の値が上昇し、LIN と STR の値が減少した (Table 1)。これらの変化は capacitation (hyperactivation) を起こした時に特徴的な変化である (Schmidt & Kamp 2004, Matás et al. 2010)。

また、CTC 染色においては、CTC がカルシウムに依存して精子細胞膜表層に結合すること、また capacitation に伴って精子細胞膜のコレステロールの脱離やカルシウムイオンの細胞内流入が起こることから、その染色パターンが F pattern から B pattern に変化することが知られている (Ward & Storey 1984, Wang et al. 1995)。本研究で用いた Cap sperm は 80% を超える精子が capacitation を起こした精子に特徴的な染色パターンである B pattern を示した (Fig. 1b)。

本研究では、以上の条件を満たしている精子サンプルを capacitation が誘導された精子とした。

#### 4-1-2 Capacitation に伴いチロシンリン酸化されるタンパク質の同定

Materials and Methods に示した方法で抽出した capacitation 前後のブタ精巣上体尾部精子のタンパク質をそれぞれ 2-DE によって分離し、western blot を行いチロシンリン酸化タンパク質の検出を行った。Capacitation 前後でチロシンリン

酸化レベルが上昇している spot を切り出し、MALDI-TOF-MS によりタンパク質の同定を行った。本研究では capacitation に伴いチロシンリン酸化されるタンパク質として、aldose reductase、isocitrate dehydrogenase 1 (細胞質型 NADP<sup>+</sup>依存性 isocitrate dehydrogenase; IDPc)、 $\beta$ -enolase の 3 種類を同定した (Fig. 5a-e)。

#### 4-1-2-1 Aldose reductase

Aldose reductase の Sequence coverage は 42%、Mascot score は 118 であった (Fig. 5e, spot 3)。更に、自作した抗 aldose reductase 抗血清を用いて western blot (Fig. 6a,b) と Immunoprecipitation (Fig. 6c) を行い、capacitation に伴う aldose reductase のチロシンリン酸化を確認した。

Aldose reductase は NADPH を補酵素として glucose を sorbitol に変化させる酵素である。さらに、sorbitol は NAD<sup>+</sup> を補酵素とする sorbitol dehydrogenase によって、fructose に変えられる (Hwang et al. 2003, Schmidt et al. 2005, Cao et al. 2009)。精子の主なエネルギー源の一つである fructose を産生するこの一連の経路を polyol pathway と言い、その律速酵素である aldose reductase は、精子のエネルギー代謝において非常に重要な酵素の一種である (Taragnat et al. 1990, Tilton et al. 1995, Kobayashi et al. 2002, Kaneko et al. 2003, Baumann et al. 2007)。Aldose reductase については、protein kinase C (PKC) 依存的にリン酸化されることが既に報告されているが (Varma et al. 2003)、ブタ

精子 capacitation に伴ってチロシンリン酸化修飾を受けるという事実は、本研究により新しく発見した知見である。

また、polyol pathway は、ROS の産生にもかかわっていると考えられている。上述のように、polyol pathway を担う酵素である aldose reductase と sorbitol dehydrogenase は、それぞれ NADPH と NAD<sup>+</sup>を補酵素として利用している。そのため、polyol pathway の亢進は、NADPH を消費し NADH を増加させる事と同義であり、ひいては NADPH 減少による精子内グルタチオン量の減少や NADH 酸化反応の亢進による過酸化水素の生成を引き起こし、結果的に ROS の産生を増進すると考えられる。1章で述べたとおり、ROS は capacitation を誘導する重要な因子の一つである。更に ROS は protein tyrosine phosphatase (PTP) の活性を阻害するなどの報告もあり (Frenette et al. 2004, Pruneda et al. 2006, Awad et al. 2009) 、aldose reductase は capacitation において重要な働きを担っていると考えられた。

#### 4-1-2-2 IDPc

IDPc の Sequence coverage は 24%であり、Mascot score は 58であった (Fig. 5e, spot 2)。

哺乳動物の isocitrate dehydrogenase (IDH) には、ミトコンドリア型の NAD<sup>+</sup>依存性、または NADP<sup>+</sup>依存性 IDH と細胞質型の NADP<sup>+</sup>依存性 IDH (IDPc) の 3種類が存在することが知られている。ミトコンドリア型 NAD<sup>+</sup>依存性 IDH は TCA 回路で重要な役割を果たしていることが既に知られている。一方、ミ

トコンドリア型 NADP<sup>+</sup>依存性 IDH と本研究で同定した IDPc の生理的役割は未だ不明な点が多い。それでも、ウシ精子においては、それらの活性がプロゲステロンによる細胞内カルシウムの増加に関与し、更には卵の受精能力にも関与している可能性が示唆されている (Cordoba et al. 2005)。

また、精子内 IDPc のチロシンリン酸化については、未だ報告例がなく本研究での報告が初めてである。加えて、IDPc は NADP<sup>+</sup>を補酵素として NADPH を産生する酵素であることから、精子内 NADPH 量の調節に関与する酵素であり、ひいては、ROS 産生を介した capacitation の調節に関与する可能性が示唆される。

#### 4-1-2-3 $\beta$ -enolase

$\beta$ -enolase の Sequence coverage は 12%、Mascot score は 62 であった (Fig. 5e, spot 1)。

Enolase は解糖系酵素の一種で、2-phosphoglycerate を phosphoenolpyruvate に変換する酵素として知られており、ウシ (*Bubalus bubalis*) 精子においては、capacitation に伴ってチロシンリン酸化する酵素として既に同定されている (Mohanarao & Atreja 2011)。また、ヒト精子においては、様々な組織に広く分布している enolase- $\alpha\alpha$  (ENO- $\alpha\alpha$ ) と sperm-specific enolase isoform (ENO-S) の 2 つの isoform が存在していることが確認されている (Edwards & Grootegoed 1983)。更に、健常男性の精液中では ENO- $\alpha\alpha$  に対し ENO-S が非常に多く発現しその活性も



高くなっている一方、不妊症患者では ENO- $\alpha\alpha$  の発現量が増加し、ENO-S の発現量は減少して、それに伴い ENO-S 活性も低下することが知られている (Force et al. 2002)。

Capacitation に伴ってチロシンリン酸化されることが判明している enolase が本研究でも同定されたことは、本研究の実験手法が適正であることを示している。本研究では、新規に同定した aldose reductase と IDPc の capacitation との関連について更に解析を進め、enolase については取り扱わないこととした。

## 4-2 Capacitation における aldose reductase の役割の解析

### 4-2-1 精巣上体での精子成熟過程における aldose reductase の動態

#### 4-2-1-1 抗ブタ aldose reductase 抗血清の特異性

作製した抗ブタ aldose reductase 抗血清の特異性は、精巣上体尾部精子の抽出タンパク質に対して western blot を行い確認した (Fig. 6c)。その結果、aldose reductase の分子量である 35 kDa 付近に単一バンドのシグナルが得られ、本抗体血清が aldose reductase に対して特異的であることが確認できた。

#### 4-2-1-2 精巣と精巣上体各部位及び精子における aldose reductase の局在

自作した抗ブタ aldose reductase 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、精巣ではセルトリ細胞に aldose reductase が局在していることが判明し、精子形成過程の生殖細胞には発現していないことが明らかとなった。一方、精巣上体頭部では基底細胞と微絨毛での局在が見られ、精巣上体体部、尾部においては基底細胞のみでの局在が確認できた (Fig. 7)。また、aldose reductase の mRNA の発現は、精巣、精巣上体頭部、体部で同程度発現しており、尾部では発現量が少なくなっていた (Fig. 8a)。

Aldose reductase は、精子が精巣上体を通過する過程で epididymosome を介して、精巣上体液から付与されることが示唆されている (Caballero et al. 2010)。本研究においても、精巣、精巣上体の各部位から採取した内腔液と精子を用いて、western blot を行い、aldose reductase の量的変化を調べたところ、精巣上体液における aldose reductase の量は、精巣から精巣上体頭部にかけて顕著に増加し、体部で維持され、尾部に移行するとその量が顕著に減少していた (Fig. 8b,c)。一方、精子における aldose reductase の量は、精子が精巣から頭部、体部に移行するにつれ徐々に増加し、尾部ではその量が維持されていることが明らかとなった (Fig. 8d,e)。加えて、精子に移行した aldose reductase はその多くが先体に存在し、また微量ではあるが鞭毛にも存在していることが明らかとなった (Fig. 9a)。

以上の結果から、精子の aldose reductase 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り、更には先体反応及び hyperactivation 誘起に関与している可能性が示唆された。

#### **4-2-2 Capacitation に伴う aldose reductase のチロシンリン酸化レベルの変化**

Materials and Methods で示した方法で、whole sperm、soluble、particulate、cytosol、membrane、flagellar、head の各 fraction からタンパク質抽出液を調製し、2-DE と western blot を行い、capacitation 前後の aldose reductase のチロシンリン酸化レベル

の変化を解析した。

一般的に大部分の aldose reductase は細胞質可溶性画分に存在していることが知られている。 Whole sperm extract で capacitation に伴った aldose reductase のチロシンリン酸化レベルの上昇が認められたので (Fig. 5)、更に精子を soluble fraction と particulate fraction に分画して同様に実験した結果、soluble fraction の aldose reductase は Non-cap、Cap ともにチロシンリン酸化は認められなかった。一方、soluble fraction に比べ量的には微量である particulate fraction の aldose reductase は capacitation に伴い、チロシンリン酸化レベルが顕著に上昇することが明らかとなった (Fig. 10a-e)。そこで、更に精査するために、精子を membrane、flagellar、head fraction に分画して、それぞれのタンパク質抽出液で、同様の実験を行った。その結果、flagellar fraction の aldose reductase が capacitation に伴い、チロシンリン酸化していることが明らかとなった (Fig. 11a-d)。

#### 4-2-3 Capacitation 過程での aldose reductase の活性の変化

Whole sperm extract、soluble fraction、particulate fraction において、aldose reductase の活性を測定した。 Whole sperm extract では Non-cap sperm に比べ Cap sperm で活性が顕著に上昇していた。また、particulate fraction の aldose reductase も capacitation に伴い顕著に活性が上昇した。一方、soluble fraction の aldose reductase は capacitation 前後で活性の変化はなく、Non-cap、Cap sperm ともに particulate fraction に存在する

aldose reductase より低い活性を示した。 4-2-2 で得られた結果と合わせ考えると、capacitation に伴う aldose reductase 活性の上昇はチロシンリン酸化によるものであることが強く示唆された。また、capacitation 後の soluble fraction と particulate fraction の aldose reductase の量比が 7.5 : 1 であること (Fig. 10e) 、更には、particulate fraction の aldose reductase は soluble fraction の aldose reductase の約 6 倍の活性を持つこと (Fig. 12) を合わせ考えると、capacitation に伴いリン酸化された particulate fraction の aldose reductase はリン酸化されていない soluble fraction の aldose reductase に比し、45 倍の比活性を持つことが明らかとなった。

#### 4-2-4 Alrestatin を用いた aldose reductase の阻害実験

上述したように、aldose reductase の活性が精子の capacitation と密接に関わっている可能性が示唆されたため、capacitation に関連する様々な因子に対する alrestatin (aldose reductase の膜透過性の特異的阻害剤) の効果を調べた。

4-1-1 と 4-1-2 で述べたように、ブタの精巣上体尾部精子は capacitation を起こすとその運動性を変化させ (hyperactivation) 、同時に CTC 染色の染色パターンも変化させる。Capacitation によるこのような変化を 500  $\mu$ M alrestatin は有意に阻害することが明らかとなった (Fig. 1, Fig. 13a) 。また、alrestatin は aldose reductase のチロシンリン酸化や ROS レベルの増加も阻害し (Fig. 13b, Fig. 14) 、更には capacitation に

よる GSH レベルの減少も有意に阻害した (Fig. 15)。

続いて、aldose reductase 活性、hyperactivation、ROS レベルに対する alrestatin の阻害作用の濃度依存性を検討したところ、それぞれの  $K_i$  (阻害定数) は  $45 \mu\text{M}$ 、 $53 \mu\text{M}$ 、 $80 \mu\text{M}$  とほぼ等しく (Fig. 16a)、aldose reductase 活性と hyperactivation、または ROS レベル上昇の alrestatin による阻害には正の相関関係があることが明らかになった (hyperactivation : [n = 6; r = 0.976; P < 0.001], ROS : [n = 6; r = 0.945; P < 0.01]; Fig. 16b)。

以上の結果より、aldose reductase がチロシンリン酸化を受け活性化することで、capacitation に深く関係する ROS 産生と hyperactivation が起こることが示唆された。

#### 4-2-5 精子の運動性調節における aldose reductase の関与

成熟精子のエネルギー産生は、精子外液中のエネルギー産生基質に依存している。そこで、aldose reductase と capacitation の関係性をさらに詳しく調べるために、精子培養 medium に入れている glucose を fructose に置き換え、前進運動の開始と capacitation 誘起後に hyperactivation を示す精子の割合を比較した。ブタ精巣上体尾部の成熟精子は、射精時に初めて前進運動を開始する。この前進運動開始には精子細胞内 cAMP レベルの上昇とタンパク質のリン酸化が必要とされるが、ROS の関与については明らかではない。そこで、前進運動開始に aldose reductase がどのように関わっているか調べた。即ち、精巣上体尾部の精巣上体細管から空気で押し出された精子 (精

巢上体尾部内腔液中の精子) は、殆ど前進運動性を示さないが、 $\text{NaHCO}_3$ を含む培養液で希釈すると、直ちに前進運動を開始する。この時、培養液中の呼吸基質として *glucose* を用いた場合と *fructose* を用いた場合で精子の運動性に差が認められるか、また、それぞれに対する *alrestatin* の効果を比較した。その結果、どちらの単糖を基質にした場合でも  $\text{NaHCO}_3$  によって 70%以上の精子が前進運動を開始し、両者の間で有意な差は認められなかった。また、*glucose* 存在下での前進運動開始が *alrestatin* によって 60%程度阻害されたのに対し、*fructose* では全く阻害効果は認められなかった (Fig. 17a)。

対して、*capacitation* 誘起後の *hyperactivation* に関しては、*glucose* を基質として *incubation* した精子は 80%以上の精子が *hyperactivation* を起こすのに対し、*fructose* を基質として *incubation* した精子は 50%以下の精子しか *hyperactivation* を起こさなかった (Fig. 17b)。また、*alrestatin* は *glucose* 存在下で認められた *hyperactivation* をほぼ 90%阻害したが、*fructose* 存在下での *hyperactivation* に対しては 35%程度の阻害しか示さなかった。

これらの結果から、前進運動の開始には *glucose* から *fructose* を産生する *polyol pathway* の寄与は小さいことが明らかになった。一方、前進運動の場合とは異なり、精子が *hyperactivation* を起こすためには、*glucose* から *fructose* が産生される *polyol pathway* の寄与が大きいということが明らかになった。言い換えれば、*polyol pathway* の律速酵素である *aldose*

reductase は、hyperactivation の誘導にはエネルギー産生以外の重要な働きを持っていることが示唆された。



### 4-3 Capacitation における IDPc の役割の解析

#### 4-3-1 IDPc の精子内局在

Material and Methods に示した方法で、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 (Fig. 9b)。このことから、IDPc は capacitation に伴う hyperactivation の誘起に関与している可能性が示唆された。

#### 4-3-2 Capacitation 過程での IDPc の活性の変化

Material and Methods に示した方法で、capacitation 誘導後の Non-cap sperm と Cap sperm の IDPc の活性を測定した。この時、Non-cap 及び Cap sperm からの抽出液中の IDPc 量が等しいことは自作した抗 IDPc 抗血清を用いた western blot により確認した (Fig. 18a)。Capacitation 誘導に伴い、Cap sperm は Non-cap sperm に比し、IDPc 活性の減少が認められた。また両者の  $K_m$  と  $V_{max}$  を比較すると、Non-cap sperm が  $K_m = 3.94 \text{ mM}$ 、 $V_{max} = 12.5 \text{ nmole} / 10^7 \text{ cells} / \text{min}$  なのに対し、Cap sperm は  $K_m = 4.02 \text{ mM}$ 、 $V_{max} = 8.8 \text{ nmole} / 10^7 \text{ cells} / \text{min}$  となり、capacitation に伴って  $K_m$  は変化しないが、 $V_{max}$  が減少するという結果が得られた (Fig. 18a,b)。そこで更に、capacitation 誘導後のどの時期に活性が変化しているのかを明らかにするために、誘導開始後 0、30、90、180min における IDPc の活性を測定した。Non-cap sperm は 180 分間で活性変化が認められないが、Cap sperm は capacitation 誘導 30 min 後には活性が減少し、180 min まで

Non-cap sperm よりも有意に低い活性を示した (Fig. 19)。

#### 4-3-3 Capacitation 誘導に伴う細胞内 NADPH 量と ROS レベルの変化

Capacitation 誘導開始後、0、30、90、180 min の時の細胞内 NADPH 量と ROS レベルの測定を行った。両者ともに、Non-cap sperm では 180 分間で変化が認められなかった。しかし、Cap sperm では細胞内の NADPH 量は capacitation 誘導 30 min 後には減少し、以降 180 min 後まで Non-cap sperm よりも低い値を示した (Fig. 20a)。一方、細胞内 ROS レベルは時間経過とともに徐々に上昇していくことが明らかとなった (Fig. 20b)。

以上の結果から、精子の aldose reductase と IDPc は、capacitation 誘導条件下でチロシンリン酸化されることによって、前者は活性上昇、後者は活性低下をきたし、NADPH レベルを下げる方向に調節されることが判明した。NADPH を介した抗酸化ストレス系の働きの低下によって、ROS レベルの上昇が起きていることが強く示唆された。

## 5 章 Discussion

精巣で形成された哺乳動物の精子は精巣上体を通過する過程で、精巣上体上皮細胞の働きによって作られる精巣上体細管の内腔液の作用を受けて潜在的な受精能力を備えた成熟精子へと変化する。この成熟過程には、精巣上体の各部位で特異的に発現して精子に取り込まれるタンパク質が特に重要と考えられている。本研究において、**capacitation** に伴ってチロシンリ酸化するタンパク質として同定された **aldose reductase** と精巣上体における精子の成熟との関連を検討したところ、**aldose reductase** は精子自身で発現するタンパク質ではなく、精子形成過程にはセルトリ細胞、精巣上体移動中には精巣上体細管上皮細胞に由来する **aldose reductase** を取り込んでいることが判明した。精巣上体細管上皮細胞で作られたタンパク質の一部は **epididymosome** と呼ばれる小胞によって管腔内に放出され、精子に取り込まれることが知られている。**Aldose reductase** も **epididymosome** に含まれることが **Sullivan 等 (2007)** によって報告されており、**aldose reductase** が **epididymosome** を介して精巣上体を通過する精子に移行して精子の機能的な成熟を担う重要な働きをしている因子の一つであることが強く示唆された。

さて、**aldose reductase** は細胞質に存在する酵素であることがよく知られているが、ブタ精子においても取り込まれた **aldose reductase** の大部分は可溶性画分に存在し、12%程度が顆粒(膜)画分に存在することが明らかになった。そこで、

capacitation に伴う aldose reductase のチロシンリン酸化に、存在部位による違いがあるか調べたところ、顆粒画分(鞭毛)の aldose reductase のみが capacitation に伴ってチロシンリン酸化していることが明らかとなった。 これまでに、capacitation に伴って精子内の局在を変えるタンパク質が存在し、それらの中にはチロシンリン酸化タンパク質も含まれていること (Boue et al. 1996, Visconti et al. 1997) 、また、protein kinase C の刺激により aldose reductase がリン酸化され、ミトコンドリアに移動するという報告がある (Varma et al. 2003) 。 本研究では、capacitation 前後で aldose reductase の局在が変化するという明確な結果は得られなかった。 あらかじめ膜近傍に局在していた aldose reductase が capacitation に際してチロシンリン酸化されているのか、チロシンリン酸化により存在部位が細胞質から膜へと変化するのかは今後の検討課題である。

また、aldose reductase をリン酸化するチロシンキナーゼを早急に明らかにする必要がある。 SRC family がヒトやラット等の capacitation に関与していること (de Lamirande & Gagnon 2002, O' Flaherty 2005, 2006, Bragado et al. 2012) や 34 kDa~45 kDa のチロシンキナーゼによるタンパク質のリン酸化が capacitation に関与しているということなどが報告 (Tardif et al. 2001) されている。 これらのチロシンキナーゼは、先体や赤道帯、また中片部や鞭毛主部にも存在することから、精子の先体反応や hyperactivation にも密接に関与している可能性が示唆されている。 これらが aldose reductase のリン酸化に関与している

のか非常に興味深い。

さて、本研究により、aldose reductase がチロシンリン酸化によってその活性を上昇させることが初めて明らかとなった。Aldose reductase は aldo-keto reductase superfamily に属する酵素で比較的広い基質特異性と glucose に対する  $K_m$  が大きいことが知られている。糖尿病では、細胞内 glucose 濃度が増大することで、aldose reductase が働き polyol pathway を亢進させる。この亢進により、細胞内 ROS レベルの上昇や細胞内に sorbitol が蓄積されることによる細胞内浸透圧の上昇などが引き起こされ、結果として、神経障害などの種々の合併症を引き起こすと考えられている (Raskin & Rosenstock 1987, Kinoshita & Nishimura 1988, Burg 1995)。

Polyol pathway の基質であり呼吸基質でもある glucose の細胞外濃度が著しく低い精巣上体尾部までは精子内 aldose reductase は不活性な状態が保たれている (Pruneda et al. 2006)。即ち、ブタ精巣上体尾部管腔液中の glucose 濃度は  $0.03 \pm 0.02$  mM と非常に低い一方、fructose 濃度は  $0.21 \pm 0.07$  mM であることが報告されている (Pruneda et al. 2006)。更に精液中の fructose 濃度は精嚢腺由来の fructose によって 0.6 mM まで上昇することが知られている (新家畜繁殖学 著：鈴木 et al)。このことから射精時の前進運動開始の際には fructose が精子の主たるエネルギー源となっていると考えられる。一方、capacitation が起こる輸卵管内では、精液中とは異なり fructose よりも glucose の方が圧倒的に多いことが知られている。ブタでは glucose 濃

度は 0.7 mM であるのに対して、fructose は痕跡程度、またヒツジでも glucose 濃度は 1.7 mM 程度であるのに対して、fructose 濃度は 0.003 mM と非常に低いことが報告されており (Iritani et al. 1969, Spilman et al. 1970, Iritani et al. 1974) 、capacitation において主に利用される単糖は glucose であるといえる (Mann 1946, Hugentobler et al. 2008, Larose et al. 2012) 。

本研究において、in vitro 系で、精子の前進運動開始に対する aldose reductase の関与について glucose 存在下と fructose 存在下で違いが認められるか解析した結果、精子の前進運動では glucose も fructose 同様の効果が認められたが、hyperactivation では glucose の方が fructose より非常に有効であることが判明した。更に、alrestatin による阻害でみた、polyol pathway の関与は、前進運動に対しては 60%程度であるのに対して、glucose 存在下での hyperactivation の誘起は alrestatin によって 90%程度が阻害された。また、fructose 存在下での hyperactivation 誘起は glucose に比し明らかに少なかった。これらの事実から、capacitation に伴う hyperactivation には、単なる解糖の促進によるエネルギー産生というだけではなく、polyol pathway の律速酵素としての aldose reductase の活性が非常に重要であることを示している。

また、ヒトの赤血球の aldose reductase は G-6-P と NADPH、glucose とのインキュベーションによる活性化に伴い、glucose との Km を 9.0 mM と 0.9 mM の二相性から 0.68 mM の単層性に変化させることが知られており (Srivastava et al. 1985) 、この Km

の値は排卵期の輸卵管の glucose 濃度と同程度であり、これは aldose reductase は活性化することでようやく、輸卵管内でその働きを発揮することができるようになることを示唆している。即ち、チロシンリン酸化による aldose reductase の活性上昇は、精子の輸卵管における capacitation において非常に重要な因子であることが強く推察された。

一方、fructose を基質にした場合でも 30% の精子が hyperactivation を起こした。精子が hyperactivation を起こすためには、ATP レベルの上昇が必要とされることから考えると (Miki et al. 2004, Arcelay et al. 2008)、これは fructose が hexokinase によって F-6-P に変換されることで解糖が促進され、ATP 産生が進んだ為と推察される。また、fructose 存在下の精子の hyperactivation に対しても alrestatin による阻害が認められたのは、aldose reductase の広い基質特異性によるものと思われる。即ち、解糖の中間代謝産物である glyceraldehyde 3-phosphate は非常に親和性のよい生理的な aldose reductase の基質であることが知られており、これを基質とした反応により、後で述べる NADPH レベルの低下を始めとする一連の反応が起きたと考えられる。Alrestatin の polyol pathway 以外への作用の存在も可能性としては考えられるが、今後の検討が必要である。

以上のように、精子は fructose が多く存在する精巣上体尾部から glucose が多く存在する輸卵管へと成熟の場を移すが、aldose reductase が精子の受精活性の最終的な発現調節において重要な役割を果たしていることが明らかになり、aldose reductase

は正に精子成熟を担うタンパク質であるといえる。

Aldose reductase の膜透過性特異的阻害剤である alrestatin を用いて、capacitation における aldose reductase の役割について検討した。Alrestatin で aldose reductase 活性が阻害されることによって capacitation や hyperactivation は著しく阻害された。更に、チロシンリン酸化レベルの上昇、ROS レベルの上昇、GSH レベルの減少など capacitation に関連する様々な現象を alrestatin は有意に阻害した。これらの結果から、aldose reductase は Fig. 21 で示すメカニズムによって capacitation を調節しているのではないかと考えられた。先ず、aldose reductase がチロシンリン酸化され、活性化することで polyol pathway による glucose の代謝が促進される。この反応の促進により、精子内 NADPH 量は減少する。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 ROS レベルを上昇させる。本研究では、capacitation に伴って精子全体の GSH レベルは 10%程度の減少が認められた。チロシンリン酸化した aldose reductase と IDPc が精子の鞭毛に存在することから、鞭毛局所的に見れば更なる GSH レベルの減少が認められるかもしれない。これまでに、capacitation 前後で精子内 GSH レベルの変化を明らかにした報告はないが、精子凍結融解時に GSH レベルが 30%程度減少することで cryocapacitation と呼ばれる capacitation 様の反応が起こることが示唆されていることから (Gadea et al. 2004)、本研究で認められた ROS レベルの上昇が精子内 GSH レベルの減少



に起因している可能性は高いと思われる。1章で述べたように、ROS は適切な濃度で調節されていることを条件に、精子が capacitation を起こすために重要な調節因子になっており、精子内 aldose reductase は、その調節の中樞を担っていると考えられる。

多くの細胞で NADPH の細胞内レベルの維持に中心的な役割を果たしているのは、ペントースリン酸経路 (PPP) である。実際に、ヒトやマウスの精子では PPP の最初の酵素である glucose-6-phosphate dehydrogenase が活性を持ち、PPP による NADPH の再生系が精子と卵の融合過程に関与していることが報告されている (Aitken et al. 1995)。しかしながら、ブタやウシの精子では glucose-6-phosphate dehydrogenase 活性が認められず、PPP は生理的な役割を果たしていないことが推察されている。これらの動物の精子内 NADPH 生成には malic enzyme と IDPc が働いていると考えられている。本研究では aldose reductase と共に IDPc も capacitation に伴ってチロシンリン酸化するタンパク質として同定された。更にチロシンリン酸化によって、aldose reductase とは逆に活性が低下することが明らかになった。このことは、チロシンリン酸化されることによって活性化した aldose reductase による NADPH 消化の増大を IDPc 活性で補償できないことを示唆していると言える。IDPc がチロシンリン酸化されることによって、Vmax が減少して活性が抑えられ、NADPH レベルが低いまま維持され、capacitation に必要な ROS レベルが保たれる可能性が考えられた。Aldose reductase

と IDPc のチロシンリン酸化状態によって精子内の NADPH レベルが制御され、それが生理的な ROS レベルの調節に結びついて、精子の種々の活性が調節されている可能性が推察された。一方、精子の malic enzyme についてはこれまでほとんど文献がなく、この酵素の精子における生理機能についての説明が待たれる。

Capacitation に伴ってチロシンリン酸化されるタンパク質として同定した aldose reductase 及び IDPc の解析から、精子が生理的な ROS 産生系を持ち、それが細胞内 NADPH レベルによって制御されていることが強く示唆された。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いえる。Capacitation を始めとする精子の機能が ROS によって調節されていることは明らかであるが、ROS のどの分子種が、どこにどのように働いているかは、更なる検討が必要である。精子における ROS を介した機能調節系の全体像を明らかにすることによって、不妊治療や避妊、育種や遺伝資源の保存などに際して、精子の受精能を有効に制御することが可能となると考える。

## References

**Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, van Duin M** 1995 Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci* **108** 2017-25.

**Arcelay E, Salicioni AM, Wertheimer E, Visconti PE** 2008 Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int J Dev Biol* **52**(5-6) 463-72. (doi: 10.1387/ijdb.072555ea.)

**Awda BJ, Mackenzie-Bell M, Buhr MM** 2009 Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biol Reprod* **81**(3) 553-61. (doi: 10.1095/biolreprod.109.076471)

**Baldi E, Casano R, Falsetti C, Krausz C, Maggi M, Forti G** 1991 Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl* **12**(5) 323-30.

**Baumann C, Davies B, Peters M, Kaufmann-Reiche U, Lessl M, Theuring F** 2007 AKR1B7 (mouse vas deferens protein) is dispensable for mouse development and reproductive success.

*Reproduction* **134**(1) 97-109.

**Bedard K, Krause KH** 2007 The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* **87** 245-313.

**Boué F, Blais J, Sullivan R** 1996 Surface localization of P34H an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biol Reprod* **54**(5) 1009-17.

**Bragado MJ, Gil MC, Martin-Hidalgo D, Hurtado de Llera A, Bravo N, Moreno AD, Garcia-Marin LJ** 2012 Src family tyrosine kinase regulates acrosome reaction but not motility in porcine spermatozoa. *Reproduction* **144**(1) 67-75. (doi: 10.1530/REP-11-0075.)

**Burg MB** 1995 Molecular basis of osmotic regulation. *Am J Physiol* **268** F983-96.

**Caballero J, Frenette G, Sullivan R** 2010 Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. *Vet Med Int.* **2010** 2011 757194. (doi: 10.4061/2011/757194)

**Cao W, Aghajanian HK, Haig-Ladewig LA, Gerton GL** 2009 Sorbitol can fuel mouse sperm motility and protein tyrosine phosphorylation via sorbitol dehydrogenase. *Biol Reprod* **80**(1) 124-33. (doi: 10.1095/biolreprod.108.068882)

**Córdoba M, Pintos L, Beconi MT** 2005 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* **37**(1) 40-6.

**Edwards YH, Grootegoed JA** 1983 A sperm-specific enolase. *J Reprod Fertil* **68**(2) 305-10.

**Force A, Viallard JL, Grizard G, Boucher D** 2002 Enolase isoforms activities in spermatozoa from men with normospermia and abnormospermia. *J Androl* **23**(2) 202-10.

**Fraser LR** 2008 The role of small molecules in sperm capacitation. *Theriogenology* **70**(8) 1356-9. (doi:10.1016/j.theriogenology.2008.07.016.)

**Fraser LR** 2010 The "switching on" of mammalian spermatozoa: molecular events involved in promotion and regulation of capacitation. *Mol Reprod Dev* **77**(3) 197-208. (doi:

10.1002/mrd.21124)

**Fraser LR, Adeoya-Osiguwa S, Baxendale RW, Mededovic S, Osiguwa OO** 2005 First messenger regulation of mammalian sperm function via adenylyl cyclase/cAMP. *J Reprod Dev* **51**(1) 37-46.

**Frenette G, Lessard C, Sullivan R** 2004 Polyol pathway along the bovine epididymis. *Mol Reprod Dev* **69** 448-56.

**Gadea J, Sellés E, Marco MA, Coy P, Matás C, Romar R, Ruiz S** 2004 Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* **62**(3-4) 690-701.

**Hou ML, Huang SY, Lai YK, Lee WC** 2008 Geldanamycin augments nitric oxide production and promotes capacitation in boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci* **104** 56-68.

**Hugentobler SA, Humpherson PG, Leese HJ, Sreenan JM, Morris DG** 2008 Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle. *Mol Reprod Dev* **75** 496-503.

**Hwang YC, Bakr S, Ellery CA, Oates PJ, Ramasamy R** 2003 Sorbitol dehydrogenase: a novel target for adjunctive protection of

ischemic myocardium. *FASEB J* **17**(15) 2331-3.

**Iritani A, Gomes WR, Vandemark NL** 1969 Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in ewes. *Biol Reprod* **1**(1) 72-6.

**Iritani A, Sato E, Nishikawa Y** 1974 Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in sows. *J Anim Sci* **39**(3) 582-8.

**Kador PF, Kinoshita JH, Tung WH, Chylack LT Jr** 1980 Differences in the susceptibility of various aldose reductases to inhibition. II. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **19** 980-2.

**Kaneko T, Iuchi Y, Takahashi M, Fujii J** 2003 Colocalization of polyol-metabolizing enzymes and immunological detection of fructated proteins in the female reproductive system of the rat. *Histochem Cell Biol* **119** 309-15.

**Kinoshita JH, Nishimura C** 1988 The involvement of aldose reductase in diabetic complications. *Diabetes Metab Rev* **4** 323-37.

**Kobayashi T, Kaneko T, Iuchi Y, Matsuki S, Takahashi M, Sasagawa I, Nakada T, Fujii J** 2002 Localization and physiological

implication of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase in reproductive tracts and spermatozoa of male rats. *J Androl* **23** 674-83.

**Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ** 2008 Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* **93**(8) 3199-207. (doi: 10.1210/jc.2007-2616.)

**de Lamirande E, Gagnon C** 1993a A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl* **16**(1) 21-5.

**de Lamirande E, Gagnon C** 1993b Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic Biol Med* **14**(2) 157-66.

**de Lamirande E, Gagnon C** 2002 The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway is involved in human sperm function and modulated by the superoxide anion. *Mol Hum Reprod* **8**(2) 124-35.

**de Lamirande E, Lamothe G** 2009 Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* **46**(4) 502-10. (doi:



10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.004)

**de Lamirande E, Lamothe G, Villemure M** 2009 Control of superoxide and nitric oxide formation during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* **46**(10) 1420-7. (doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.022.)

**de Lamirande E, O'Flaherty C** 2008 Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta* **1784** 106-15

**Larose J, Laflamme J, Côté I, Lapointe J, Frenette G, Sullivan R, Bilodeau JF** 2012 The polyol pathway in the bovine oviduct. *Mol Reprod Dev* **79**(9) 603-12. (doi: 10.1002/mrd.22067)

**Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C** 1996 Cyclic adenosine 3',5'monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod* **55** 684-92.

**Lefièvre L, Jha KN, de Lamirande E, Visconti PE, Gagnon C** 2002 Activation of protein kinase A during human sperm capacitation and acrosome reaction. *J Androl* **23**(5) 709-16.

**Lewis B, Aitken RJ** 2001 A redox-regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa. *J Androl* **22** 611-22.

**MANN T** 1946 Studies on the metabolism of semen; fructose as a normal constituent of seminal plasma; site of formation and function of fructose in semen. *Biochem J* **40** 481-91.

**Matás C, Sansegundo M, Ruiz S, García-Vázquez FA, Gadea J, Romar R, Coy P** 2010 Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration ability of ejaculated and epididymal boar spermatozoa. *Theriogenology* **74**(8) 1327-40. (doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.06.002)

**Mededovic S, Fraser LR** 2004 Angiotensin II stimulates cAMP production and protein tyrosine phosphorylation in mouse spermatozoa. *Reproduction* **127**(5) 601-12.

**Miki K, Qu W, Goulding EH, Willis WD, Bunch DO, Strader LF, Perreault SD, Eddy EM, O'Brien DA** 2004 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**(47) 16501-6.

**Mohanarao G, Atreja SK** 2011 Identification of capacitation

associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle spermatozoa. *Anim Reprod Sci* **123**(1-2) 40-7. (doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.11.013.)

**O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C** 2005 Reactive oxygen species and protein kinases modulate the level of phospho-MEK-like proteins during human sperm capacitation. *Biol Reprod* **73**(1) 94-105.

**O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C** 2006 Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* **40**(6) 1045-55.

**O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C** 2006 Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic Biol Med* **41** 528-40.

**Okamura N, Sugita Y** 1983 Activation of spermatozoan adenylate cyclase by a low molecular weight factor in porcine seminal plasma. *J Biol Chem* **258**(21) 13056-62.

**Okamura N, Tajima Y, Onoe S, Sugita Y** 1991 Purification of bicarbonate-sensitive sperm adenylylcyclase by 4-acetamido-4'-

isothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid-affinity chromatography. *J Biol Chem.* **266**(27) 17754-9.

**Okamura N, Tajima Y, Soejima A, Masuda H, Sugita Y** 1985 Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem.* **260**(17) 9699-705.

**Osiguwa SA, Fraser LR** 2007 Cathine, an amphetamine-related compound, acts on mammalian spermatozoa via beta1- and alpha2A-adrenergic receptors in a capacitation state-dependent manner. *Hum Reprod* **22**(3) 756-65.

**Pruneda A, Pinart E, Bonet S, Yeung CH, Cooper TG** 2006 Study of the polyol pathway in the porcine epididymis. *Mol Reprod Dev* **73**(7) 859-65.

**Raskin P, Rosenstock J** 1987 Aldose reductase inhibitors and diabetic complications. *Am J Med* **83**(2) 298-306.

**Roy SC, Atreja SK** 2008 Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Anim Reprod Sci* **107** 68-84.

**Sabeur K, Ball BA** 2007 Characterization of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa. *Reproduction* **134** 263-70.

**Schmidt RE, Dorsey DA, Beaudet LN, Parvin CA, Yarasheski KE, Smith SR, Williamson JR, Peterson RG, Oates PJ** 2005 A potent sorbitol dehydrogenase inhibitor exacerbates sympathetic autonomic neuropathy in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Exp Neurol* **92**(2) 407-19.

**Schmidt H, Kamp G** 2004 Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction* **128**(2) 171-9.

**Shivaji S, Kumar V, Mitra K, Jha KN** 2007 Mammalian sperm capacitation: role of phosphotyrosine proteins. *Soc Reprod Fertil Suppl* **63** 295-312.

**Spilman CH, DUBY RT, Black DL** 1970 Effect of an intrauterine device on sheep oviduct fluids: chemical composition and stimulation of spermatozoan respiration in vitro. *Biol Reprod* **3**(1) 76-81.

**Srivastava SK, Hair GA, Das B** 1985 Activated and unactivated forms of human erythrocyte aldose reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA **82** 7222-6.

**Storey BT** 2008 Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *Int J Dev Biol* **52**(5-6) 427-37. (doi: 10.1387/ijdb.072522bs.)

**Suarez SS** 1996 Hyperactivated motility in sperm. *J Androl* **17**(4) 331-5.

**Suarez SS, Ho HC** 2003 Hyperactivated motility in sperm. *Reprod Domest Anim* **38**(2) 119-24.

**Sullivan R, Frenette G, Girouard J** 2007 Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl* **9**(4) 483-91.

**Tajima Y, Okamura N, Sugita Y** 1987 The activating effects of bicarbonate on sperm motility and respiration at ejaculation. *Biochim Biophys Acta* **924** 519-29.

**Taragnat C, Berger M, Jean CL** 1990 Tissue and species specificity of mouse ductus deferens protein. *J Androl* **11**(3) 279-86.

**Tardif S, Dubé C, Chevalier S, Bailey JL** 2001 Capacitation is

associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod* **65** 784-92.

**Tilton RG, Chang K, Nyengaard JR, Van den Enden M, Ido Y, Williamson JR** 1995 Inhibition of sorbitol dehydrogenase. Effects on vascular and neural dysfunction in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* **44**(2) 234-42.

**Vandeputte C, Guizon I, Genestie-Denis I, Vannier B, Lorenzon G** 1994 A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biol Toxicol* **10** 415-21.

**Varma T, Liu SQ, West M, Thonhboonkerd V, Ruvolo PP, May WS, Bhatnagar A** 2003 Protein kinase C-dependent phosphorylation and mitochondrial translocation of aldose reductase. *FEBS Letters* **534** 175-9.

**Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS** 1995 Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* **121** 1129-37.

**Visconti PE, Galantino-Homer H, Moore GD, Bailey JL, Ning X,**

**Fornes M, Kopf GS** 1998 The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl* **19**(2) 242-8.

**Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Alvarez JG, Kopf GS** 1999a Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem* **274**(5) 3235-42.

**Visconti PE, Johnson LR, Oyaski M, Fornés M, Moss SB, Gerton GL, Kopf GS** 1997 Regulation, localization, and anchoring of protein kinase A subunits during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* **192**(2) 351-63.

**Visconti PE, Kopf GS** 1998 Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* **59**(1) 1-6.

**Visconti PE, Stewart-Savage J, Blasco A, Battaglia L, Miranda P, Kopf GS, Tezón JG** 1999b Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biol Reprod* **61**(1) 76-84.

**Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S,**



**Diekman AB** 2002 Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* **53** 133-50.

**Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR, Niwa K** 1995 Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J Reprod Fertil* **104** 305-13.

**Ward CR, Storey BT** 1984 Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol* **104**(2) 287-96.

**Yanagimachi R** 1994 Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, 2nd edn, pp 189-317. Eds E Knobil, JD Neill. New York: Raven Press.

**Yanagimachi R, Chang MC** 1964 IN VITRO FERTILIZATION OF GOLDEN HAMSTER OVA. *J Exp Zool* **156** 361-75.

**Zeng Y, Oberdorf JA, Florman HM** 1996 pH regulation in mouse sperm: identification of Na(+)-, Cl(-)-, and HCO<sub>3</sub>(-)-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Dev Biol* **173**(2)

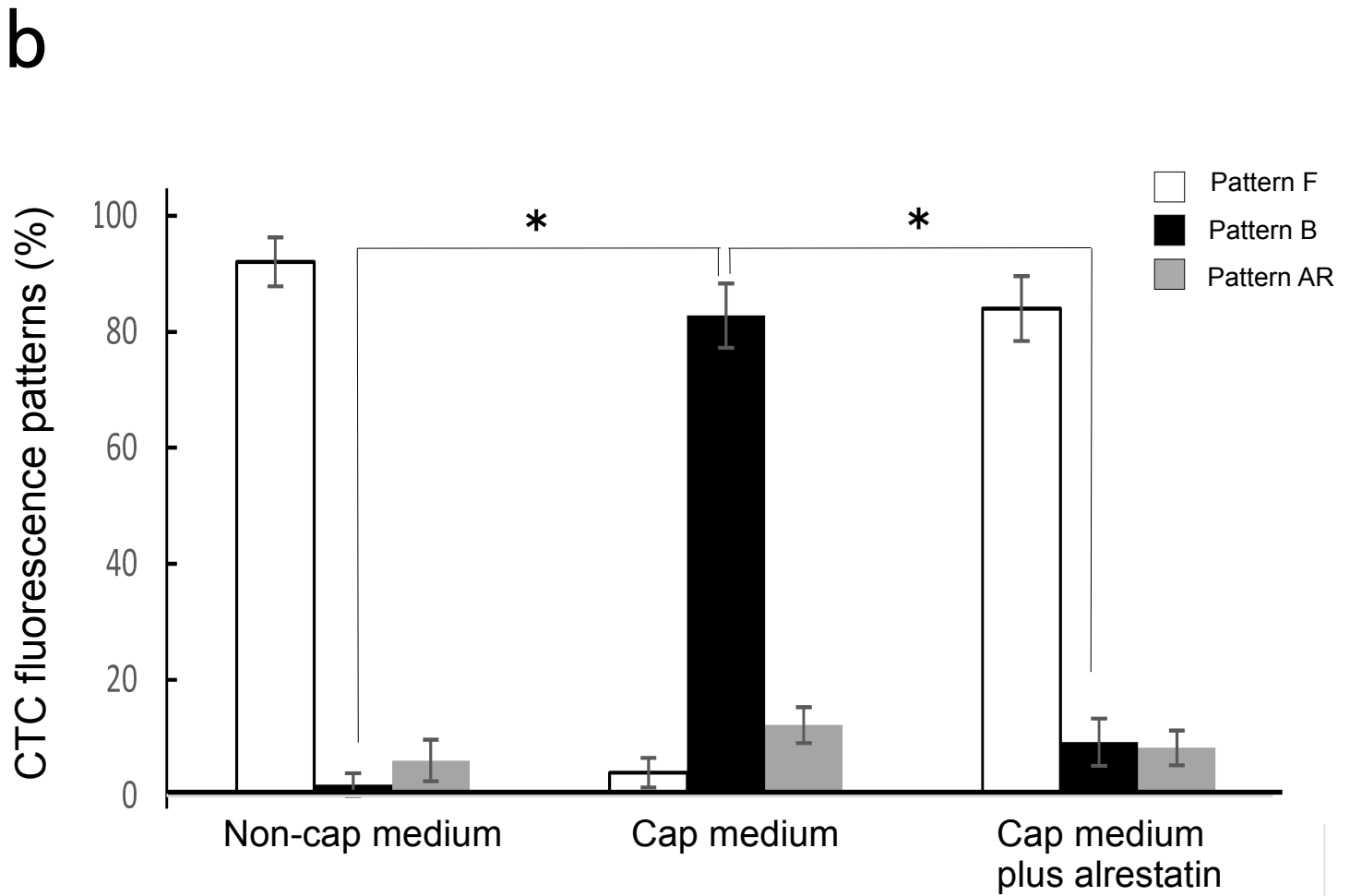
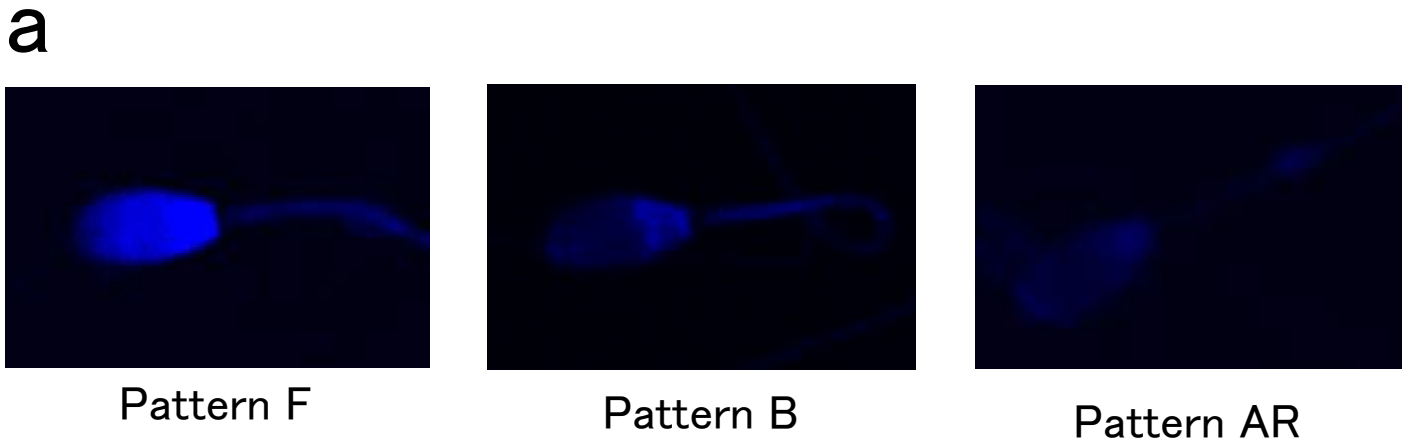
510-20.

**Zhang H, Zheng RL** 1996 Promotion of human sperm capacitation by superoxide anion. *Free Radic Res* **24**(4) 261-8.

Treatment	VCL( $\mu\text{m/s}$ )	VSL( $\mu\text{m/s}$ )	VAP( $\mu\text{m/s}$ )	LIN(%)	STR(%)	ALH( $\mu\text{m}$ )	BCF(Hz)
Non-cap	67.03 $\pm$ 24.62	26.60 $\pm$ 3.97	35.47 $\pm$ 4.70	46.33 $\pm$ 3.51	73.33 $\pm$ 3.06	3.90 $\pm$ 0.66	32.13 $\pm$ 1.88
Cap	144.37 $\pm$ 20.11	47.43 $\pm$ 8.00	73.37 $\pm$ 14.16	33.67 $\pm$ 2.52	60.33 $\pm$ 1.53	5.97 $\pm$ 1.00	30.33 $\pm$ 2.33
Cap + Alrestatin	83.13 $\pm$ 16.57	27.53 $\pm$ 5.11	40.93 $\pm$ 4.58	48.00 $\pm$ 4.36	69.67 $\pm$ 2.52	3.87 $\pm$ 0.32	27.67 $\pm$ 5.13
p-Value	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	>0.05

Table. 1 CASAによる精子運動性の評価

Non-cap medium、Cap medium、Cap + alrestatin mediumのそれぞれのmediumで培養した精子の運動性パラメータを評価した。データはmean  $\pm$  S.E.M. (n = 3, \*P<0.01, \*\*P<0.05) を示す。



**Fig. 1 Capacitationに伴うCTC染色パターンの変化**

Non-cap medium、Cap medium、Cap medium + alrestatinのそれぞれのmediumで培養した精巣上部尾部精子のCTC染色パターンを示す。

a: CTC染色の3つの典型的パターン (F、B、AR pattern) を示す。

b: それぞれのmediumで培養した精子の染色パターンの割合を示す。

データはmean ± S.E.M. (n = 6, \*P < 0.001) で示す。

```

1      ggttggcctactggaggctatttaaggaccatactgccacctcggctgcgtggctcctcc
61      ggtccgagctctgaggagctccgcagtc[atg]gccagccacctcgtgctctacaccggtgcc
           M A S H L V L Y T G A
121      aagatgcccatcttggggctgggcacctggaagtcacctccaggcaaagtgacagaggct
           K M P I L G L G T W K S P P G K V T E A
181      gtgaaggtggccattgaccttgggtaccgccacattgactgtgcccatgtgtaccagaac
           V K V A I D L G Y R H I D C A H V Y Q N
241      gagaacgaggtggggctgggcctccaggagaagctccaagggcaggtggtgaagcgtgag
           E N E V G L G L Q E K L Q G Q V V K R E
301      gacctcttcatcgtcagtaagctgtgggtgcacagaccatgagaagaacctggtgaaaggg
           D L F I V S K L W C T D H E K N L V K G
361      gcctgccagacgacctccgcaacctgaagctggactacctggacctctaccttatccac
           A C Q T T L R N L K L D Y L D L Y L I H
421      tggcccaactggcttcaagcctggcaaggacctttcccgtggatggcgacggcaactgtg
           W P T G F K P G K D P F P L D G D G N V
481      gttctgatgagagcgatthtggagacgtgggaggccatggaggagctggtggacgaa
           V P D E S D F V E T W E A M E E L V D E
541      gggctggtgaaagccattggcgtctccaacttaaccatctgcaagtggagaagatctta
           G L V K A I G V S N F N H L Q V E K I L
601      aacaaacctggcctgaataacaagccagccgtaaccagatcgaggtccaccataacctc
           N K P G L K Y K P A V N Q I E V H P Y L
661      actcaggagaagttaatcgaatactgcaagtccaaaggcatcgtggtgactgcctacagc
           T Q E K L I E Y C K S K G I V V T A Y S
721      ccctcggctctcccagagccctgggccaagcctgaggaccttccctcctggaggac
           P L G S P D R P W A K P E D P S L L E D
781      cccaggatcaaagcgattgcagccaagtacaataaaaccacagccaggttctgatccgg
           P R I K A I A A K Y N K T T A Q V L I R
841      ttccccatgcagaggaacttgatcgtcatcccccaagtcctgacgcctgaacgcattgcc
           F P M Q R N L I V I P K S V T P E R I A
901      gagaacttccaggtcttgaacttgaactgagccctgaggatatgaacaccttactgagc
           E N F Q V F D F E L S P E D M N T L L S
961      tacaacaggaactggagggtctgtgccttgatgagctgtgcctcccacaaggattatccc
           Y N R N W R V C A L M S C A S H K D Y P
1021    tttcacaggaatat[tga]agctgggggtgcctgccttccccaggtgacctgctgtttcc
           F H E E Y *
1081    ctctcgettccccctgcccagtgagctcggccctgtccctcggcagcgggtcagcg
1141    acccaccgagcgcagctgggcgcttggcctgcatggtgtggggcccgaagagcactacc
1201    tgtagattggaagtcctccagtttcttgcctccttctgtccagctgcggacagcg
1261    cgccgtgaataaccttttctaagttgaatthtcaaagtgaaaacagcacctctaacagtt
1321    ggatthtgaactgtgtcctttcagctagactthtcccttgcctcaataaaa
1381    aagtgccttatgaatthtcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Fig. 2 Aldose reductaseの塩基配列とアミノ酸配列

下線部は作製した組み換えタンパク質を示す。  
shaded boxはTOF-MSで同定された6つのペプチドを示す。  
start及びstop codonはopen boxで示す。

1    tcactcattttccctatgtggaactggatctgcacagctacgatttaggcatagagaat  
   S L I F P Y V E L D L H S Y D L G I E N  
61    cacgatgccacccatgaccaggtcaccgaggacgctgcagaagctataaagaagtacaac  
   H D A T H D Q V T E D A A E A I K K Y N  
121    gttggtgtcaagtatgccaccatcaccccgatgagaagagagtggagaagttcaagttg  
   V G V K Y A T I T P D E K R V E K F K L  
181    aaacaaatgtggaatctcccaatggcaccatccgaattatcttgggtggcactgtcttc  
   K Q M W K S P N G T I R I I L G G T V F  
241    agggaagctattatctggaaaaatatgcctggcttgtgagcggatgggtaaaaccatt  
   R E A I I W K N M P W L V S G W V K P I  
301    atcataggtcatcatgcttacggggatcaatatagagcaaccaattttgttgtgccggg  
   I I G H H A Y G D Q Y R A T N F V V P G  
361    cctgaaaagtagagacgtcctacatgccaaagtgatggatcccccaaatggtataccta  
   P G K V E T S Y M P S D G S P K M V Y L  
421    gtatataacttcacagagagtgggtggttggcatggggatgtacaatcaagataagtca  
   V Y N F T E S G G V A M G M Y N Q D K S  
481    atagaagattttgcatacagttctttccagatggcttgtctagaattggccttgtat  
   I E D F A Y S S F Q M A L S K N W P L Y  
541    cggagcaccaaaaacactattctgaagaaatacaatggacgttttaaagacatctttcag  
   R S T K N T I L K K Y N G R F K D I F Q  
601    gagatacatgacaagcagtacaaatctgaatttaaagctcagaatactggtatgagcac  
   E I H D K Q Y K S E F K A Q N I W Y E H  
661    aggctcattgatgacatgggtggccaagctatgaaatcggagggggcttcatttggcc  
   R L I D D M V A Q A M K S E G G F I W A  
721    tgtaagaactatgatggggacgtgcagttggactccatggccaaggttatggctcttc  
   C K N Y D G D V Q L D S M A Q G Y G S L  
781    ggcatgatgactagtgtgctggtttgtccagatggcaagacagtagaagcagaggctgcc  
   G M M T S V L V C P D G K T V E A E A A  
841    cacgggactgtaaccgctactacaaatgtcccagaaaggacaggagcgtccaccaat  
   H G T V T R H Y Q M S Q K G Q E T S T N  
901    cccattgcttcatttttgcctggaccagaggcctagcccacagagctaagctggatagc  
   P I A S I F A W T R G L A H R A K L D S  
961    aataaagagctcagcatctttgcaaatgctttggaagaagtctgtattgagaccattgag  
   N K E L S I F A N A L E E V C I E T I E  
1021    gctggttcatgaccaaggacttggctgcttgtattaaagtttaccacgctttac  
   A G F M T K D L A A C I K G L P N V Y

Fig. 3 Isocitrate dehydrogenase 1の塩基配列とアミノ酸配列

下線部は作製した組み換えタンパク質を示す。

shaded boxはTOF-MSで同定された5つのペプチドを示す。

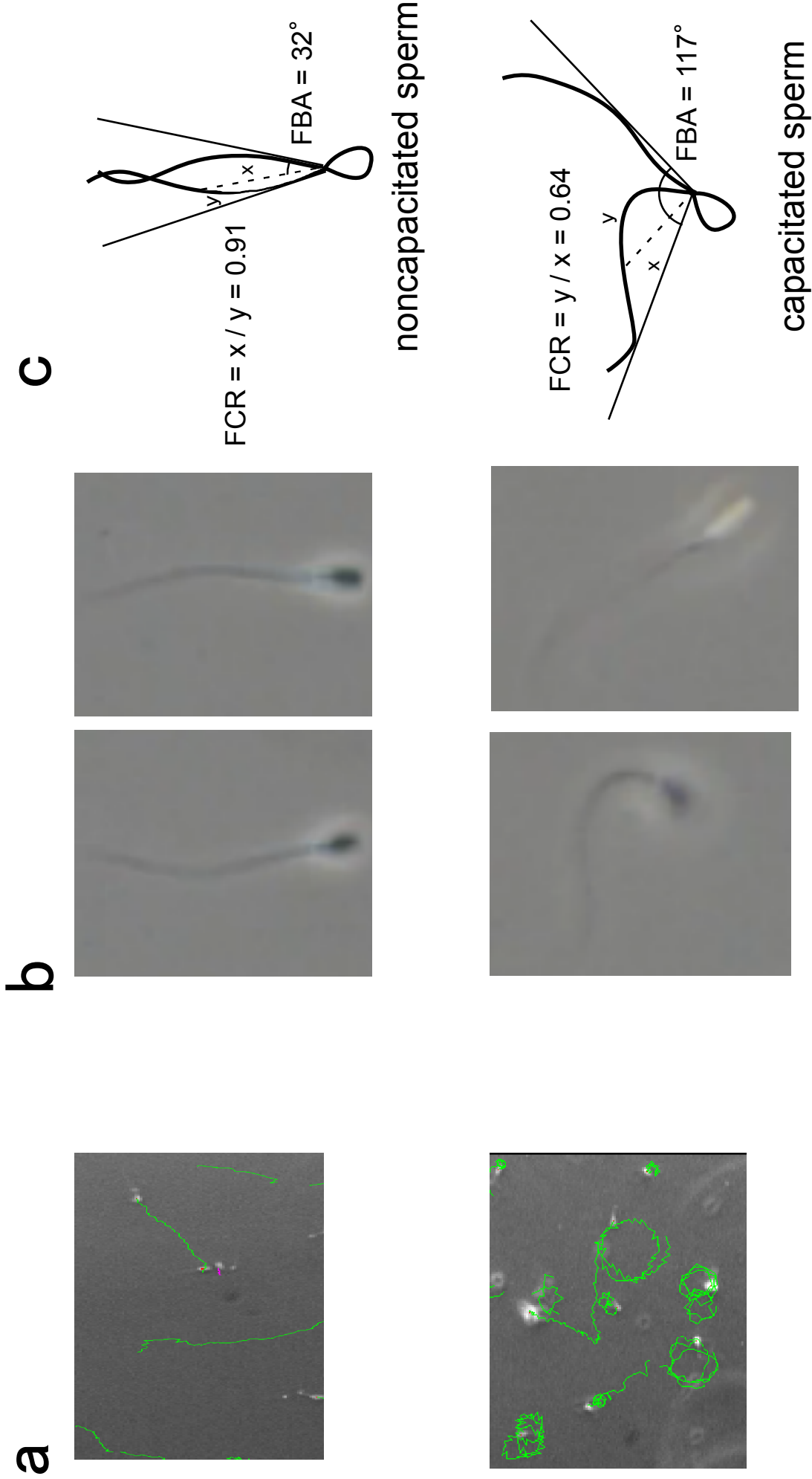
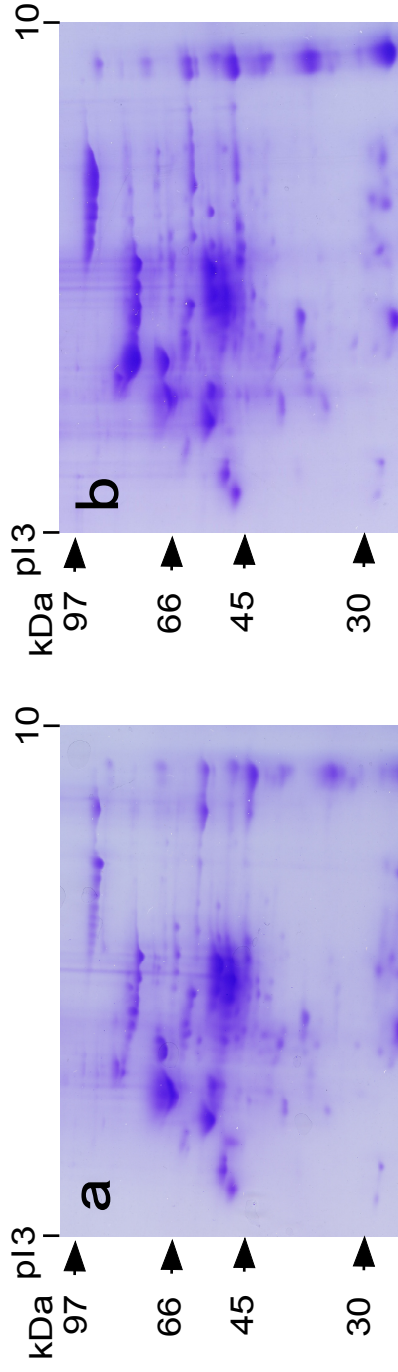
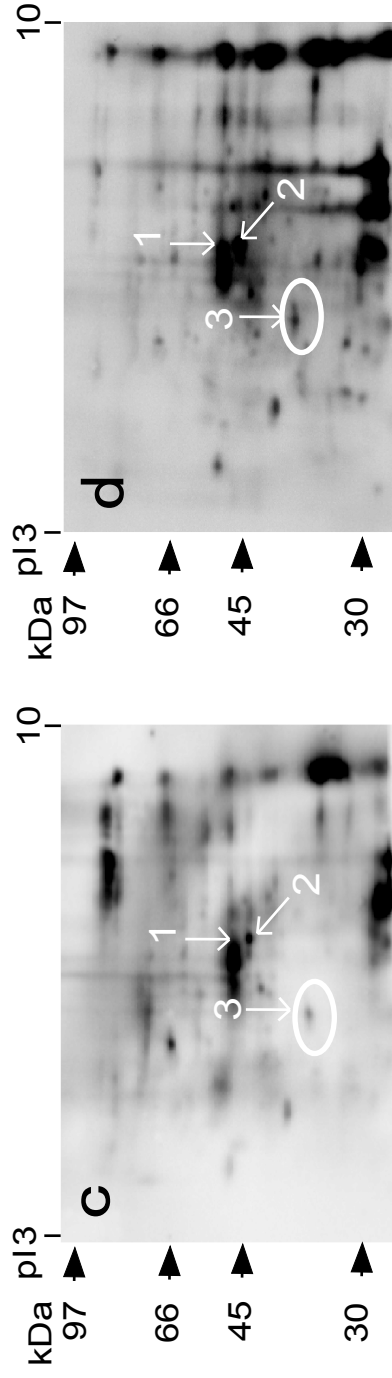


Fig. 4 精子運動性の解析

a : CASAIによる精子の運動の軌跡を示す。(frame rate 30 Hz, frame acquired 80)  
 b : 鞭毛の左右への振れの動きを示す。  
 c : bの図の精子の頭を起点にトレースし、鞭毛の動き (FBA, FCR) を算出した。  
 FCR, FBAの値はmean ± S.E.M. (n = 10) で示す。Non-cap sperm : 上段、Cap sperm : 下段



CBB staining



Western blot (抗チロシンリン酸化)

Western blot (抗チロシンリン酸化)

e

Spot ID	Protein name	Theoretical Mr(kDa)/pI of matched protein	Peptides matched	Mowse score	Sequence coverage (%)	NCBI accession number
1	$\beta$ -enolase 3	47.1/8.05	3	62	12	ABG73136.1
2	Isocitrate dehydrogenase 1	40.5/6.37	5	58	24	ABD77226.1
3	Aldose reductase (AKR1B1)	35.8/5.89	6	118	42	AK398724

Fig. 5 Capacitationに伴いチロシンリン酸化するタンパク質の同定

Non-cap sperm (a,c) とCap sperm (b,d) のタンパク質抽出液で2-DE及びwestern blottingを行い、チロシンリン酸化するタンパク質を検出した (a-d)。矢印で示す1~3のspotをcapacitationに伴いチロシンリン酸化するタンパク質としてMALDI-TOF-MSにより同定した (e)。白い円はaldose reductaseのspotを示す。



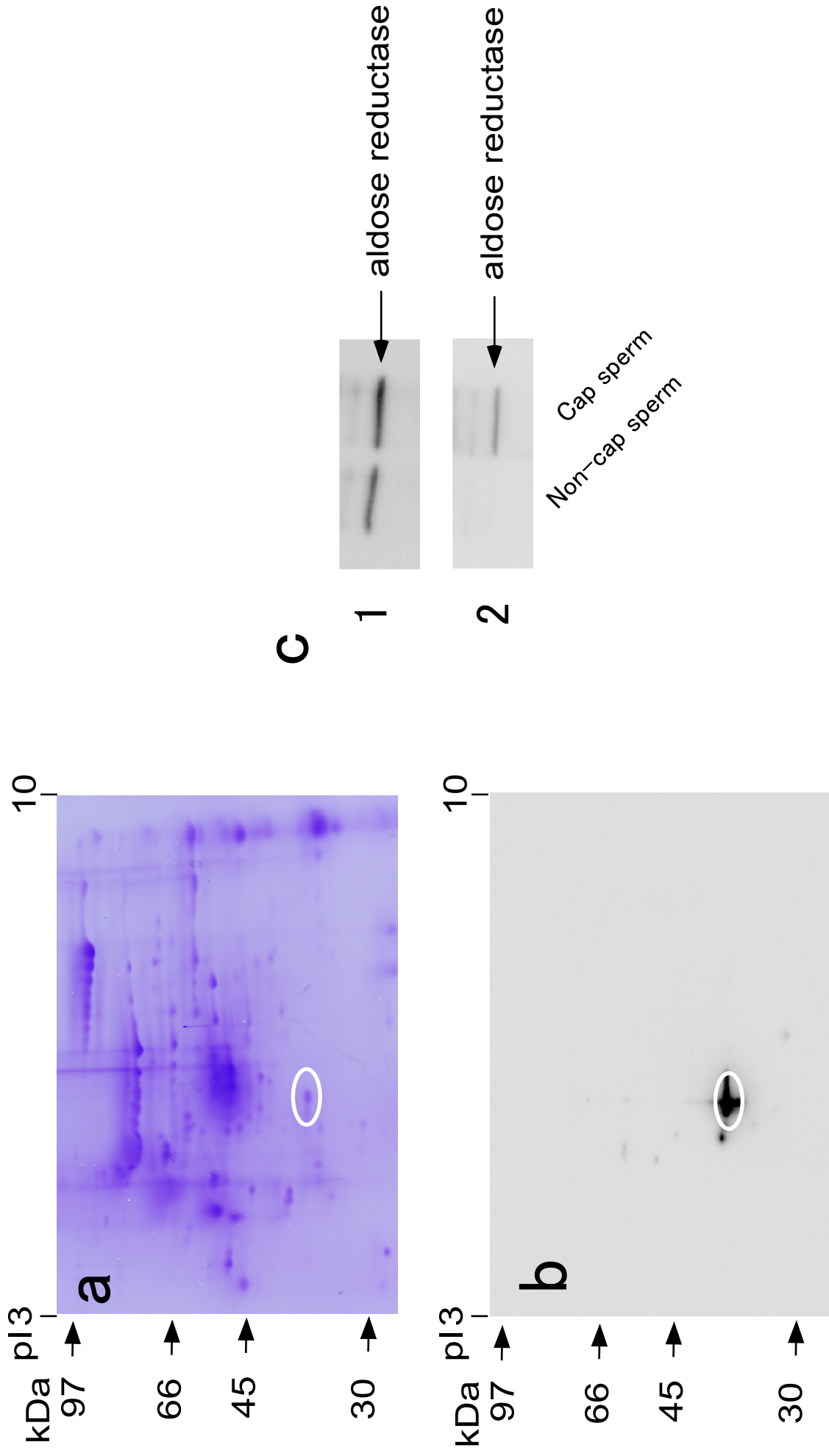


Fig. 6 Capacitationに伴うaldose reductaseのリン酸化と作製した抗ブタaldose reductase抗血清の特異性  
 Whole sperm extractで2-DEを行い、その後CBB staining (a) と自作した抗aldose reductase抗血清を用いたwestern blotを行い、  
 抗体の特異性を確認した。  
 また、immunoprecipitation (c) を行い、capacitationに伴うaldose reductaseのチロシンリン酸化を確認した。  
 1: 抗aldose reductase抗血清 2: 抗チロシンリン酸化抗体  
 白い円はaldose reductaseのspotを示す。

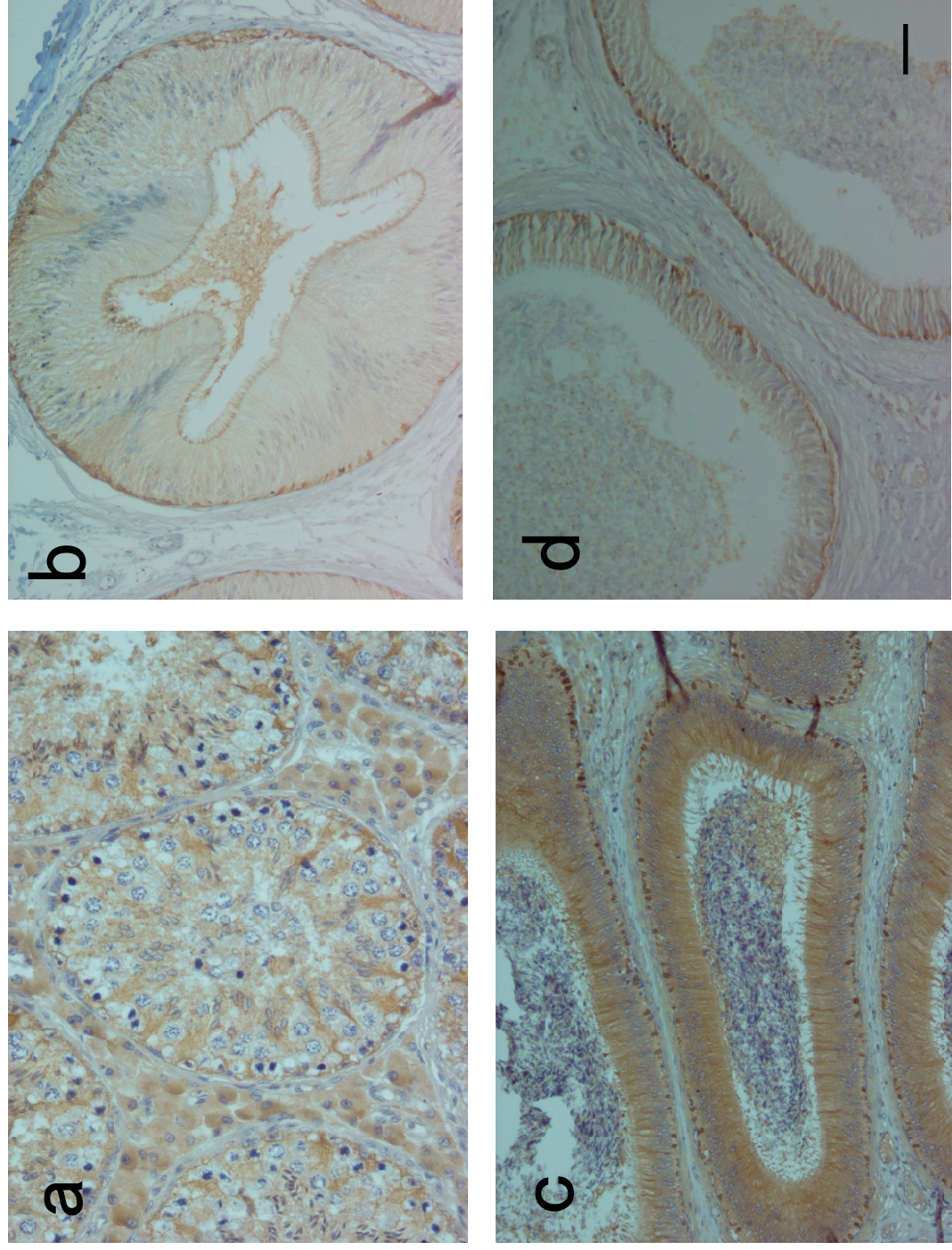


Fig. 7 精巣・精巣上体におけるaldose reductaseの局在

抗aldose reductase抗血清を用いて、ブタの精巣 (a) と精巣上体頭部 (b)、体部 (c)、尾部 (d) の免疫組織染色を行った。  
Bar = 50  $\mu$ m

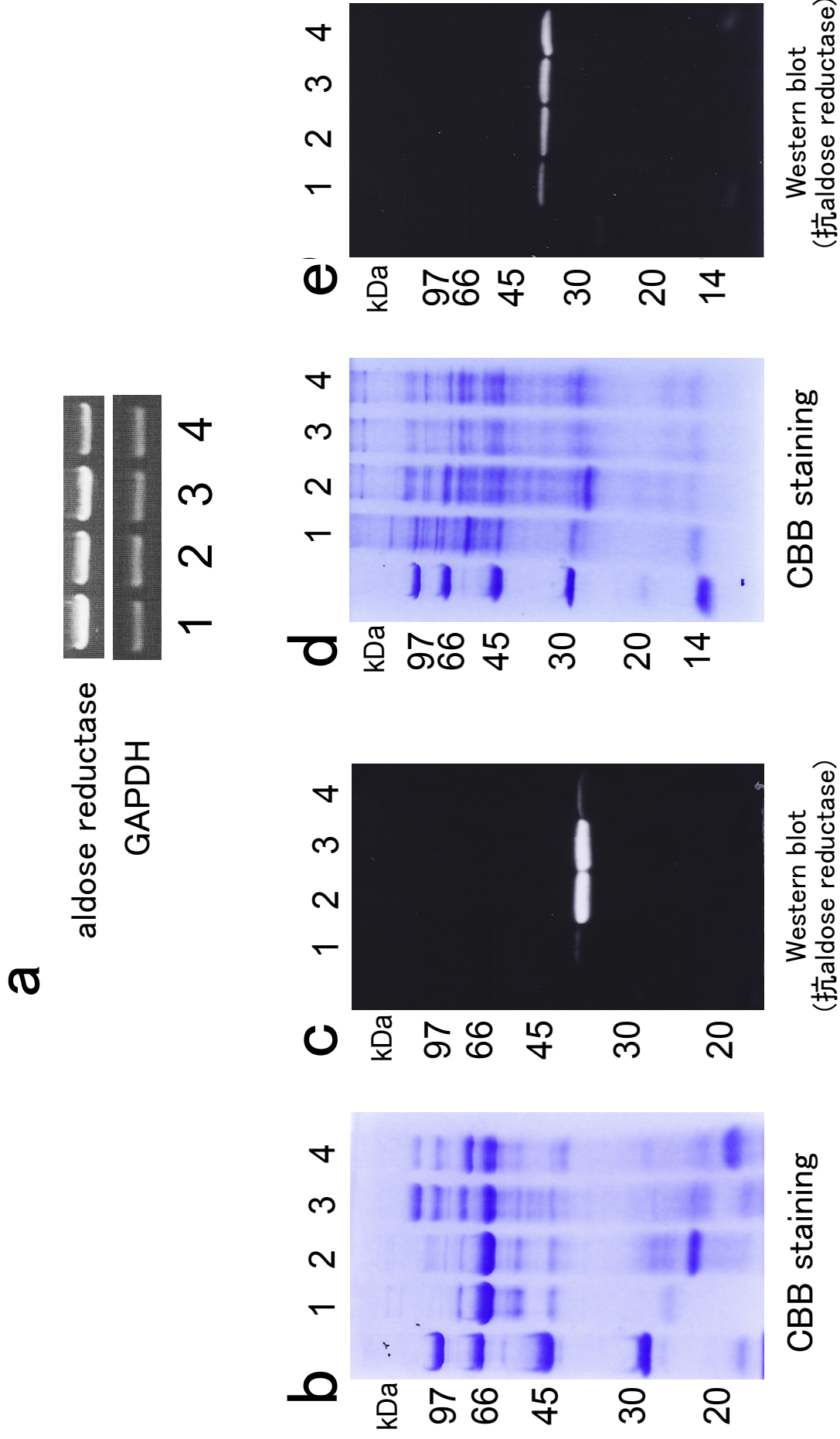


Fig. 8 精巣および精巣上体各部位におけるaldose reductaseの発現

a : RT-PCRによるmRNAの発現を示す。  
 b,c : 各部位内腔液中のaldose reductaseの発現を示す。  
 d,e : 各部位精子のaldose reductaseの発現を示す。  
 1 : 精巣、2 : 精巣上体頭部、3 : 精巣上体体部、4 : 精巣上体尾部

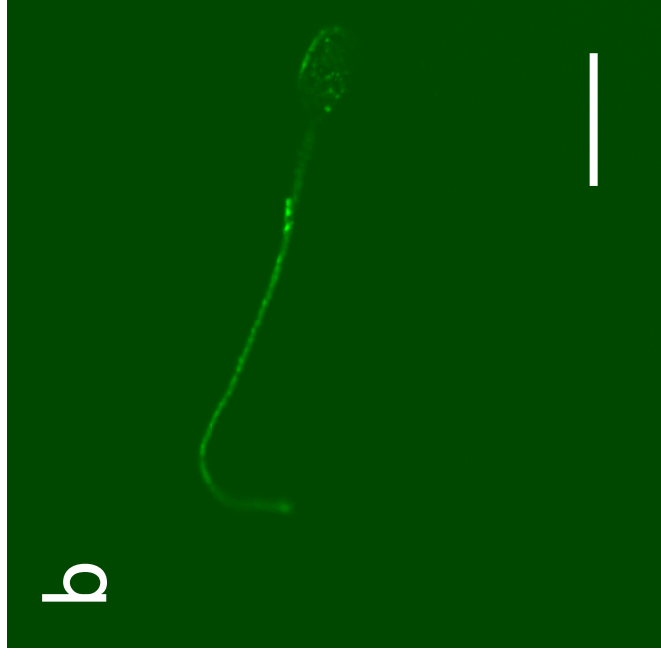
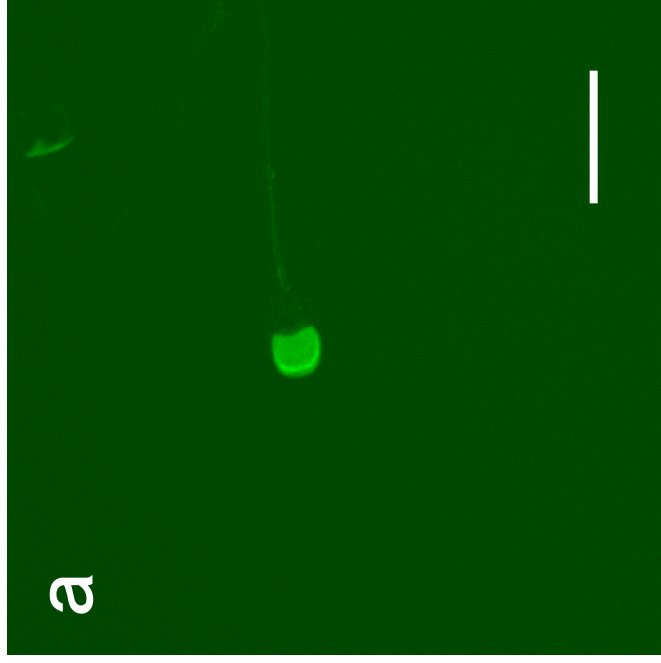


Fig. 9 Aldose reductase 及び IDPc の精子内局在

抗aldose reductase抗体 (a) 及び抗IDPc抗体 (b) を用いて、免疫蛍光染色を行い、それぞれの局在部位を観察した。  
Bars = 10  $\mu$ m

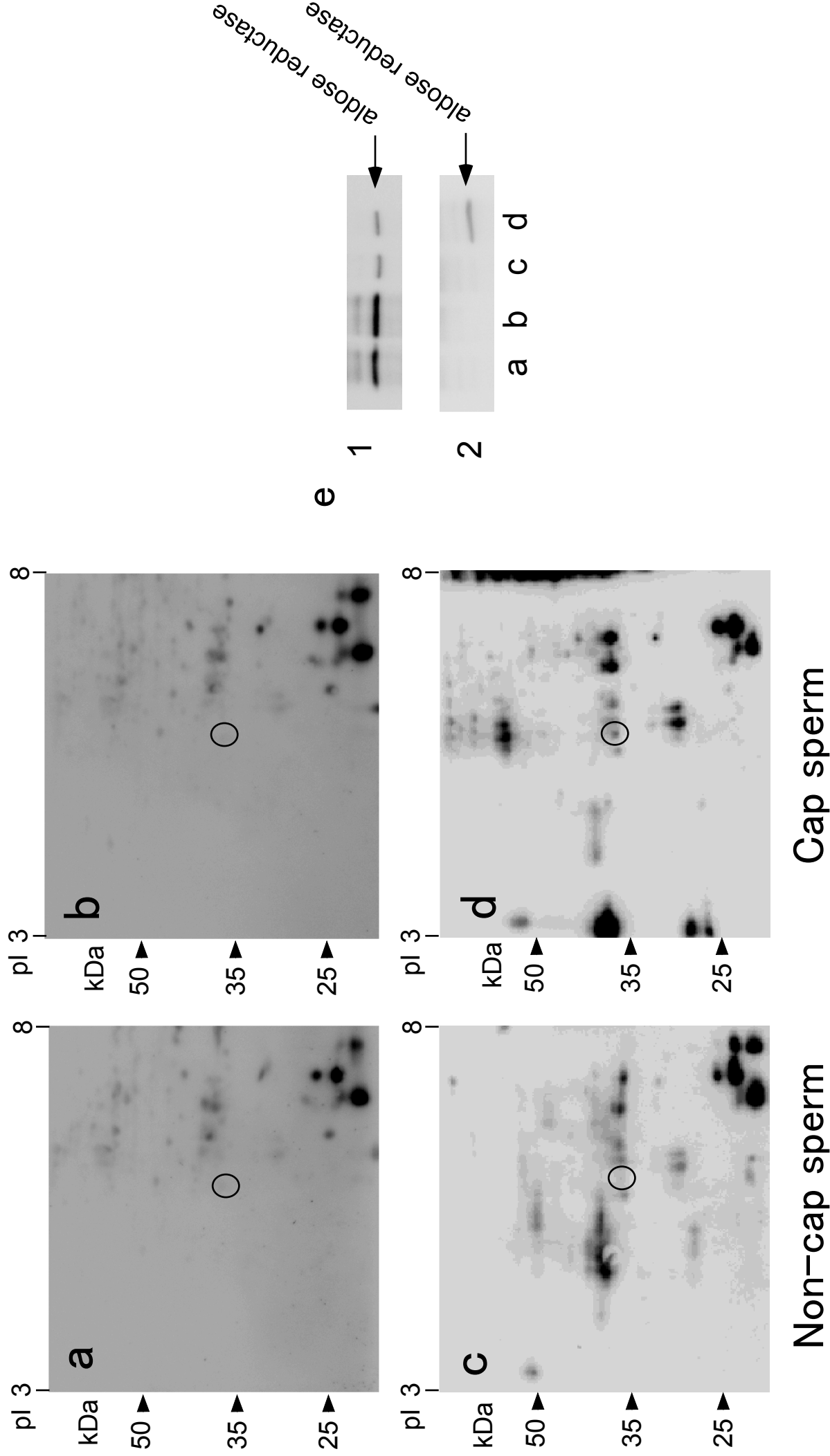


Fig. 10 Capacitationに伴うaldose reductaseのチロシリン酸化 (soluble fractionとparticulate fraction) soluble fraction (a, b) とparticulate fraction (c, d) のタンパク質抽出液を用いて、2-DE及びwestern blotを行い、チロシリン酸化しているタンパク質の検出を行った。  
 更に、同様のサンプルを用いてImmunoprecipitationを行い (e)、抗aldose reductase抗血清 (1) と抗チロシリン酸化抗体 (2) を用いて、capacitationに伴うaldose reductaseのチロシリン酸化を確認した。  
 a~dの円はaldose reductaseのspotを示す。

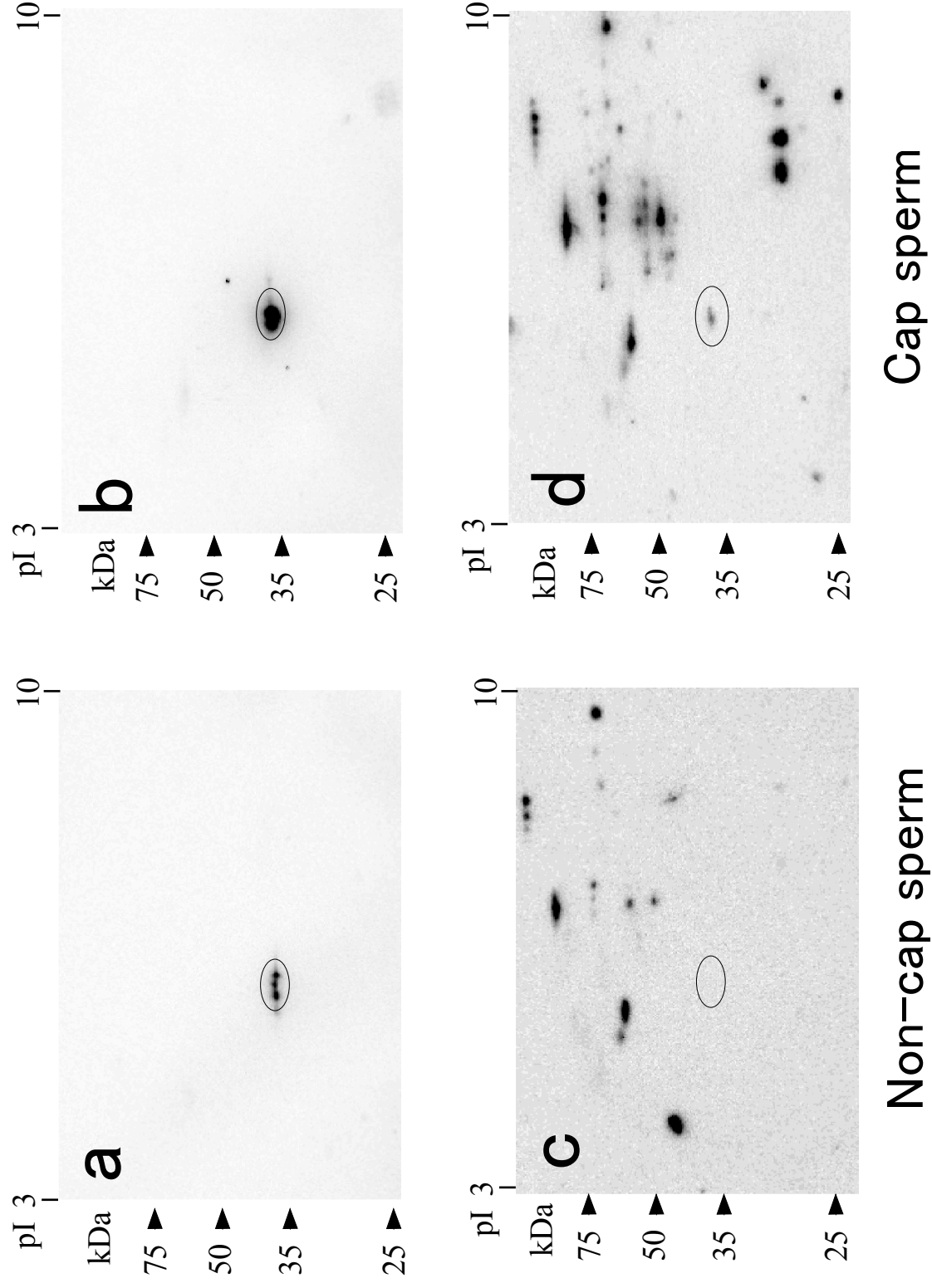


Fig. 11 Capacitationに伴うaldose reductaseの子ロシリン酸化 (flagellar fraction)

Non-cap sperm (a, c) とCap sperm (b, d) のflagellar fractionのタンパク質抽出液を用いて、2-DE及びwestern blotを行った。  
 Western blotは、aldose reductase抗体 (a, b) と抗チロシリン酸化抗体 (c, d) を用いて検出を行った。  
 a~dの円はaldose reductaseのspotを示す。

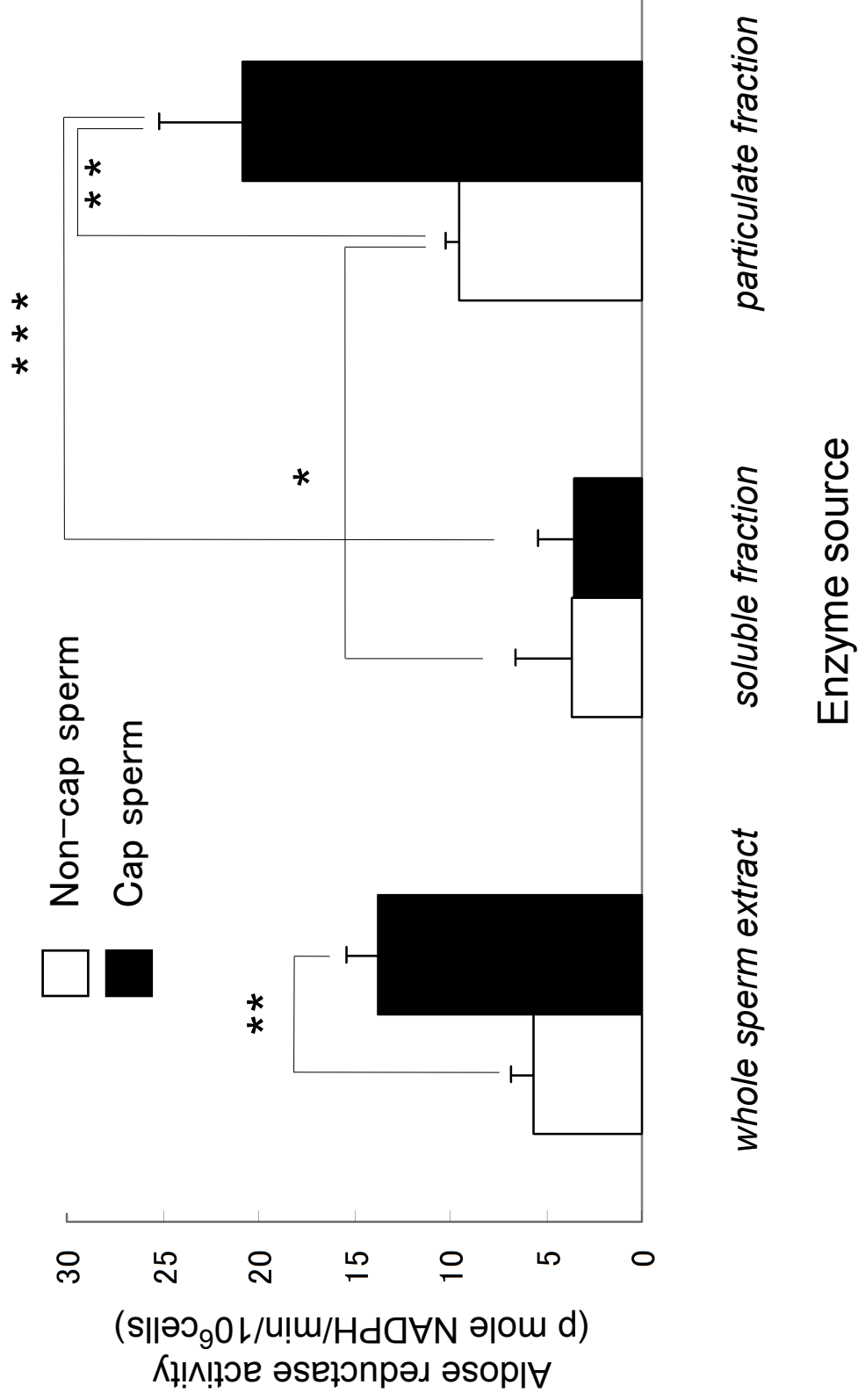


Fig. 12 Capacitationに伴うaldose reductaseの活性変化

Methodsで示した各方法で抽出したタンパク質抽出液を用いて、aldose reductaseの活性を測定した。データは、mean ± S.E.M. (n = 6, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001) で示す。

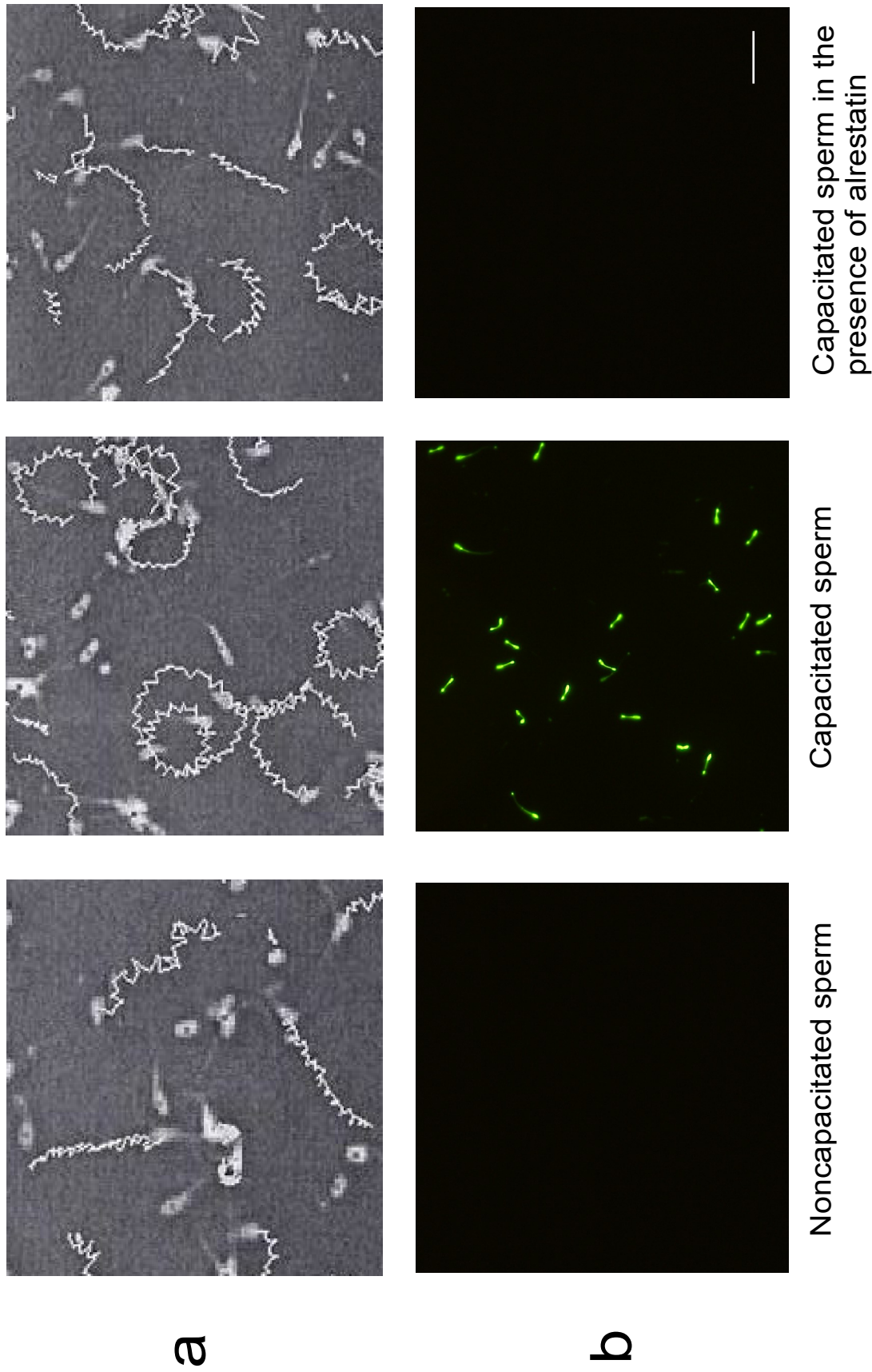


Fig. 13 Capacitationに伴うhyperactivation誘起とROSレベル上昇に対するalrestatinの効果

Aldose reductaseの膜透過性の特異的阻害剤であるalrestatinの効果を検討した。

a : CASAを用いて精子の軌跡を観察し (frame rate 60 Hz、frame acquired 55)、運動性の変化に対する効果を検討した。  
 b : H<sub>2</sub>DCFDAを用いて精子のROSレベルの観察を行い、それに対するalrestatinの効果を検討した。

Bar = 100μM



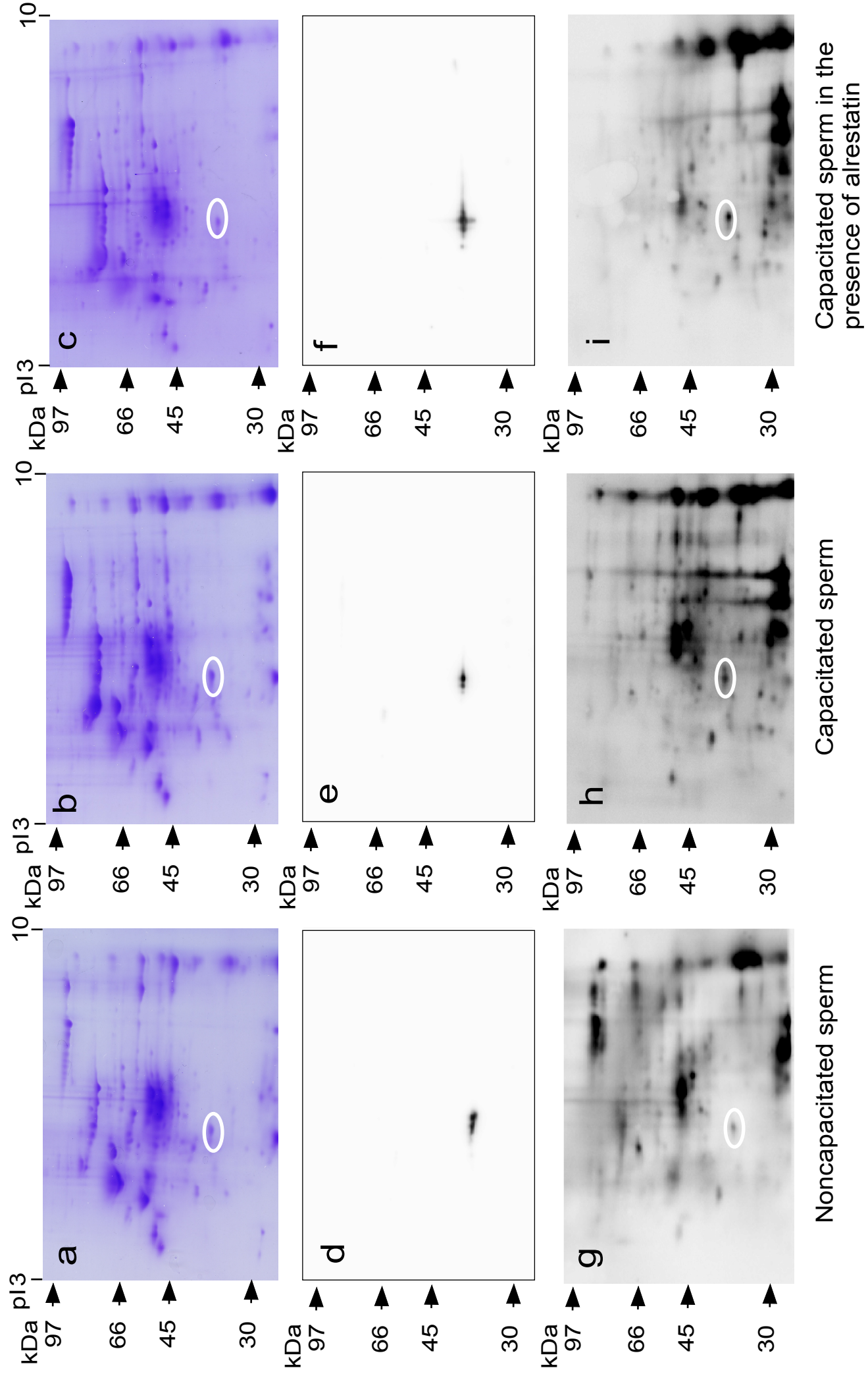


Fig. 14 Capacitationに伴うチロシンリン酸化レベルの上昇に対するalrestatinの効果

Non-cap sperm, Cap sperm, Cap sperm + alrestatinのそれぞれのタンパク質抽出液を用いて2-DEを行い、その後、CBB染色 (a-c) 及び、抗aldehyde reductase抗体 (d-f)、または抗チロシンリン酸化抗体を用いたwestern blotting (g-i) を行った。白い円はaldehyde reductaseのspotを示す。

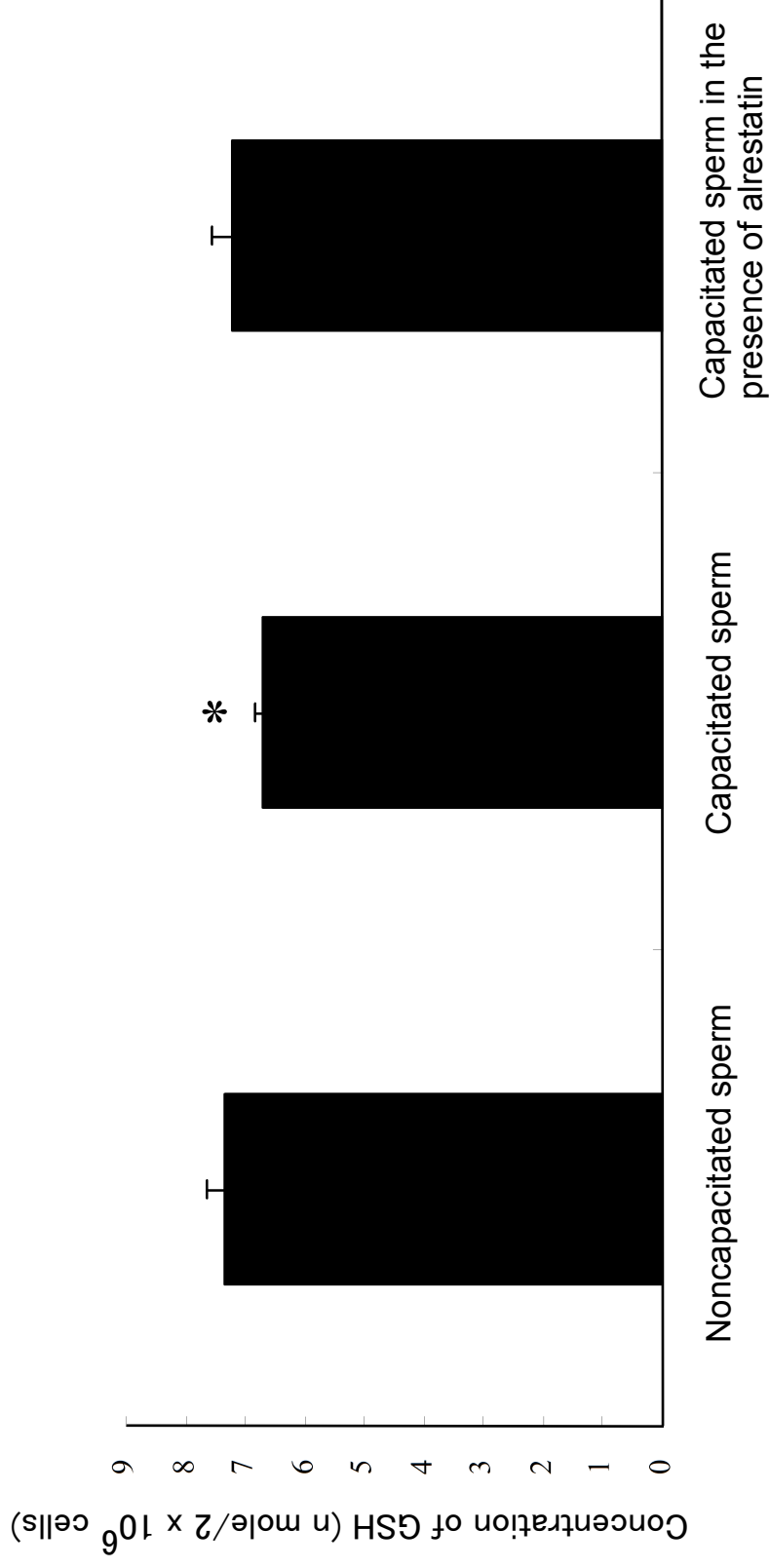
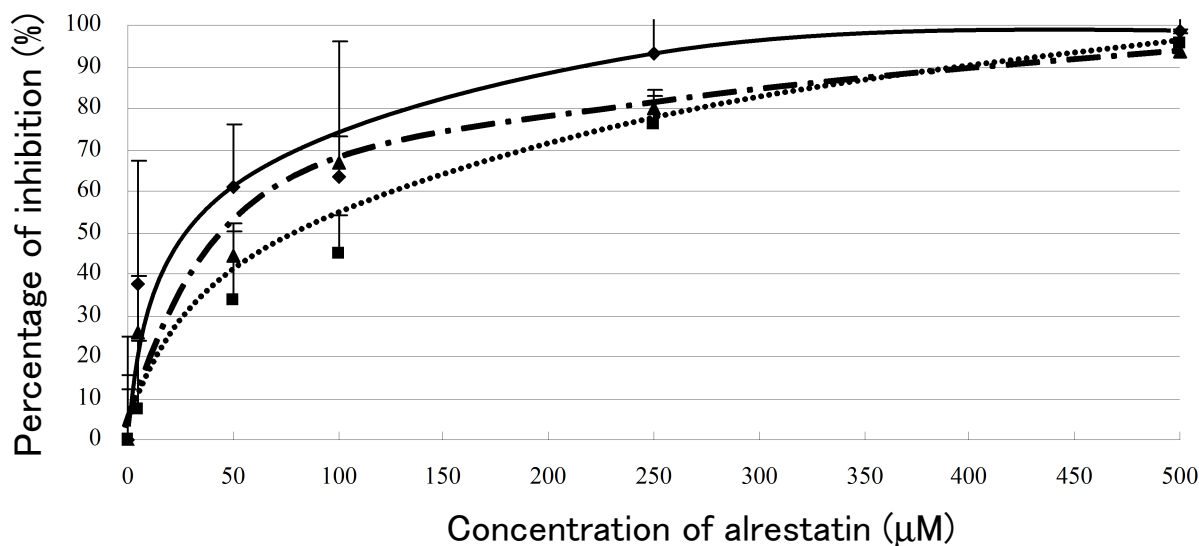


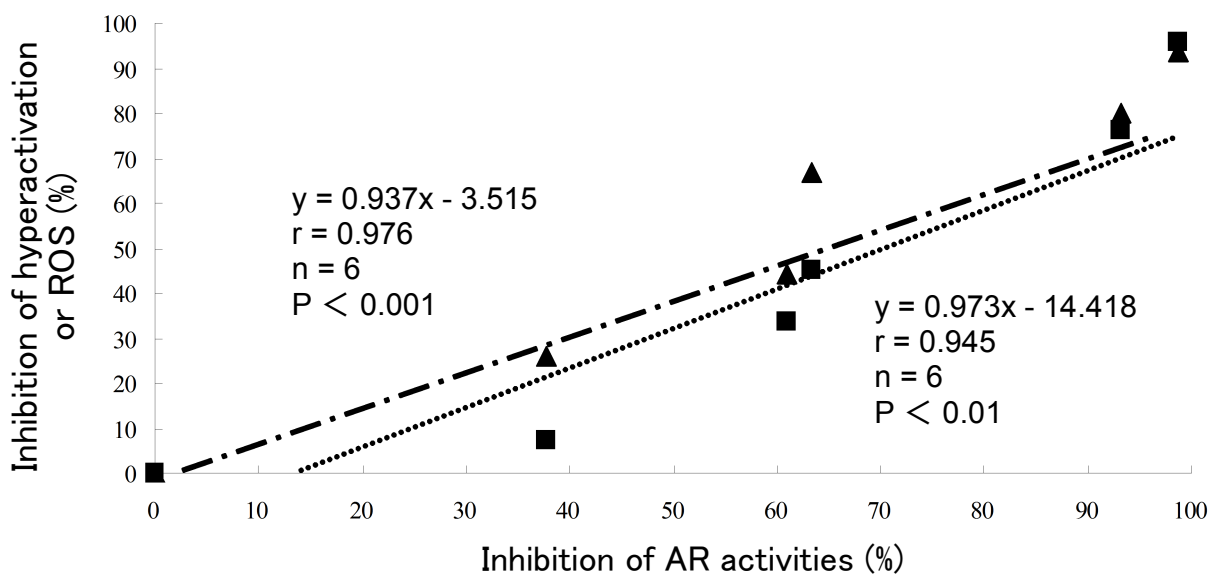
Fig. 15 Capacitationに伴うGSHレベルの変化とそれに対するalrestatinの効果

Materials and Methodsに示す方法で測定した精子細胞内のGSH量を示す。  
データはmean ± S.E.M. (n = 6, \*P<0.05) で示す

a



b



● — aldose reductase activities  
 ■ - - - production of ROS  
 ▲ - - - hyperactivation of motility

Fig. 16 Aldose reductase活性、ROS産生、hyperactivation誘起に対するalrestatinによる阻害の濃度依存性とその相関

a : aldose reductase活性、ROS産生、hyperactivation誘起に対するalrestatinによる阻害の濃度依存性を表す。データはmean ± S.E.M. (n = 4) で示す。  
 b : aldose reductase活性阻害とROS産生阻害、またはhyperactivation誘起の阻害との相関を示す。

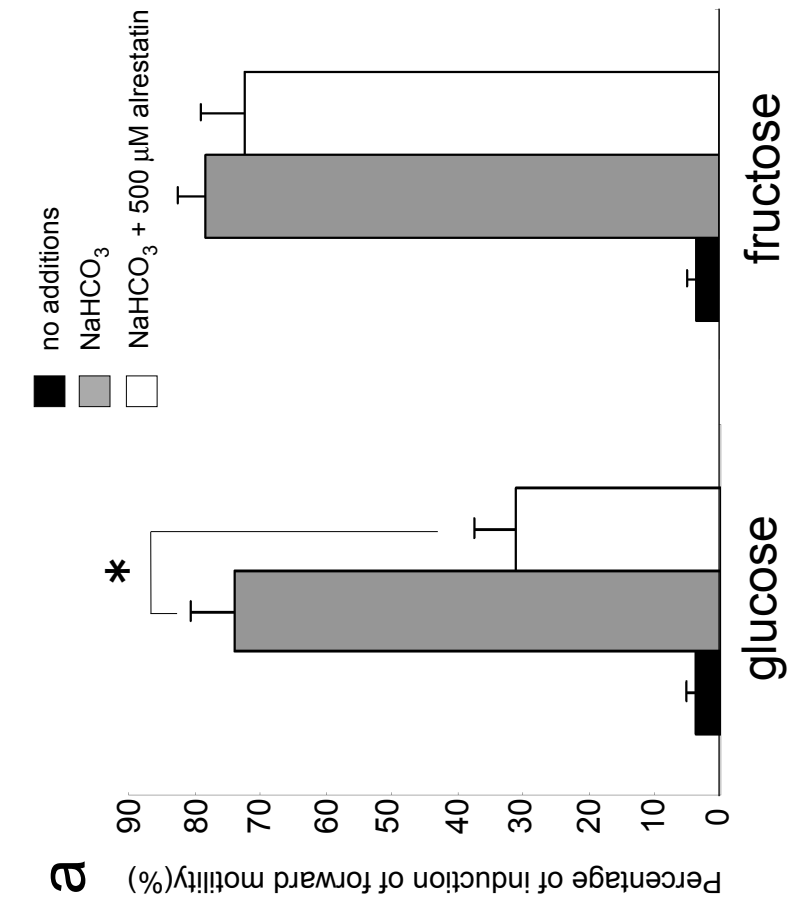
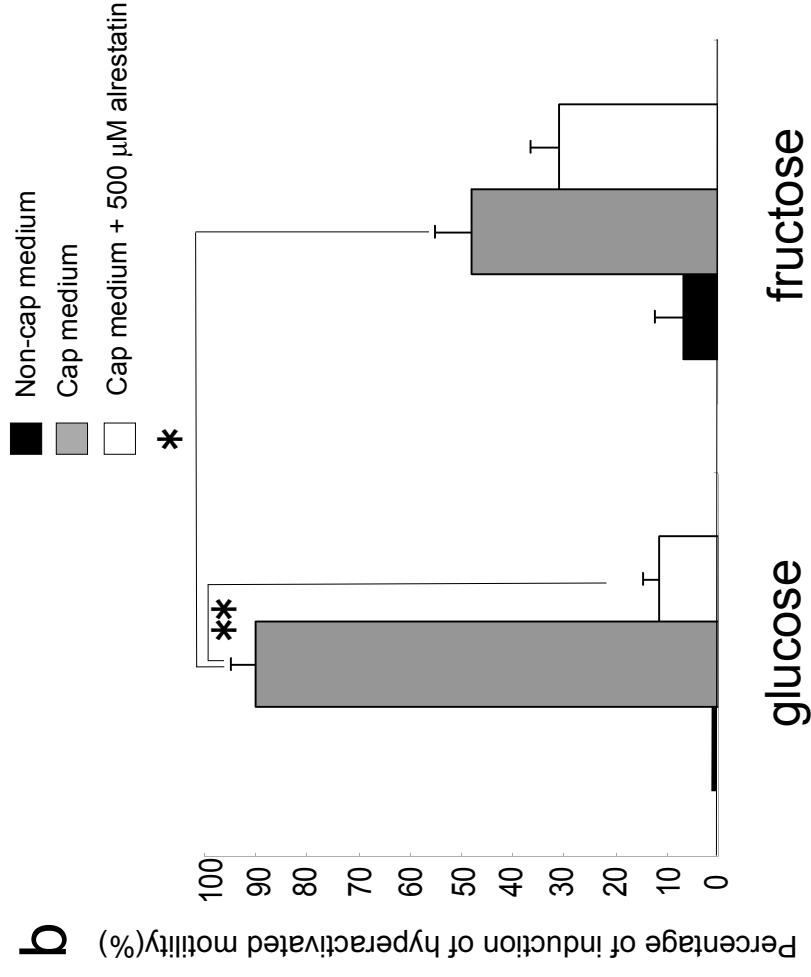


Fig. 17 Glucose又はfructoseが精子運動性に及ぼす影響

a : glucose又はfructose存在下でNaHCO<sub>3</sub>によって開始した前進運動に対するalrestatinの効果を示す。  
 b : glucose又はfructose存在下で誘導したhyperactivationに対するalrestatinの効果を示す。  
 データはmean  $\pm$  S.E.M. (n = 3, \*P<0.01, \*\*P<0.001) で示す。

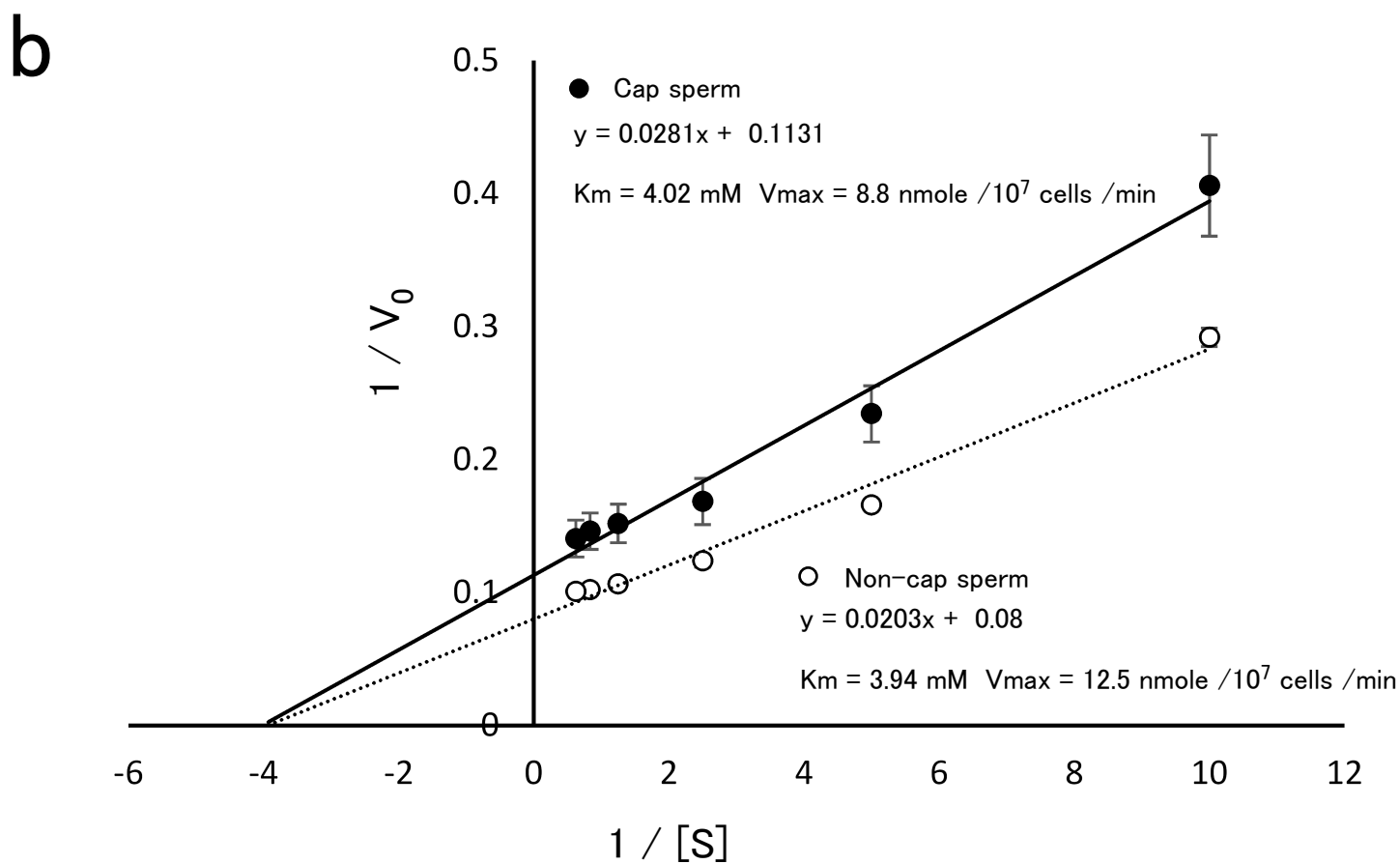
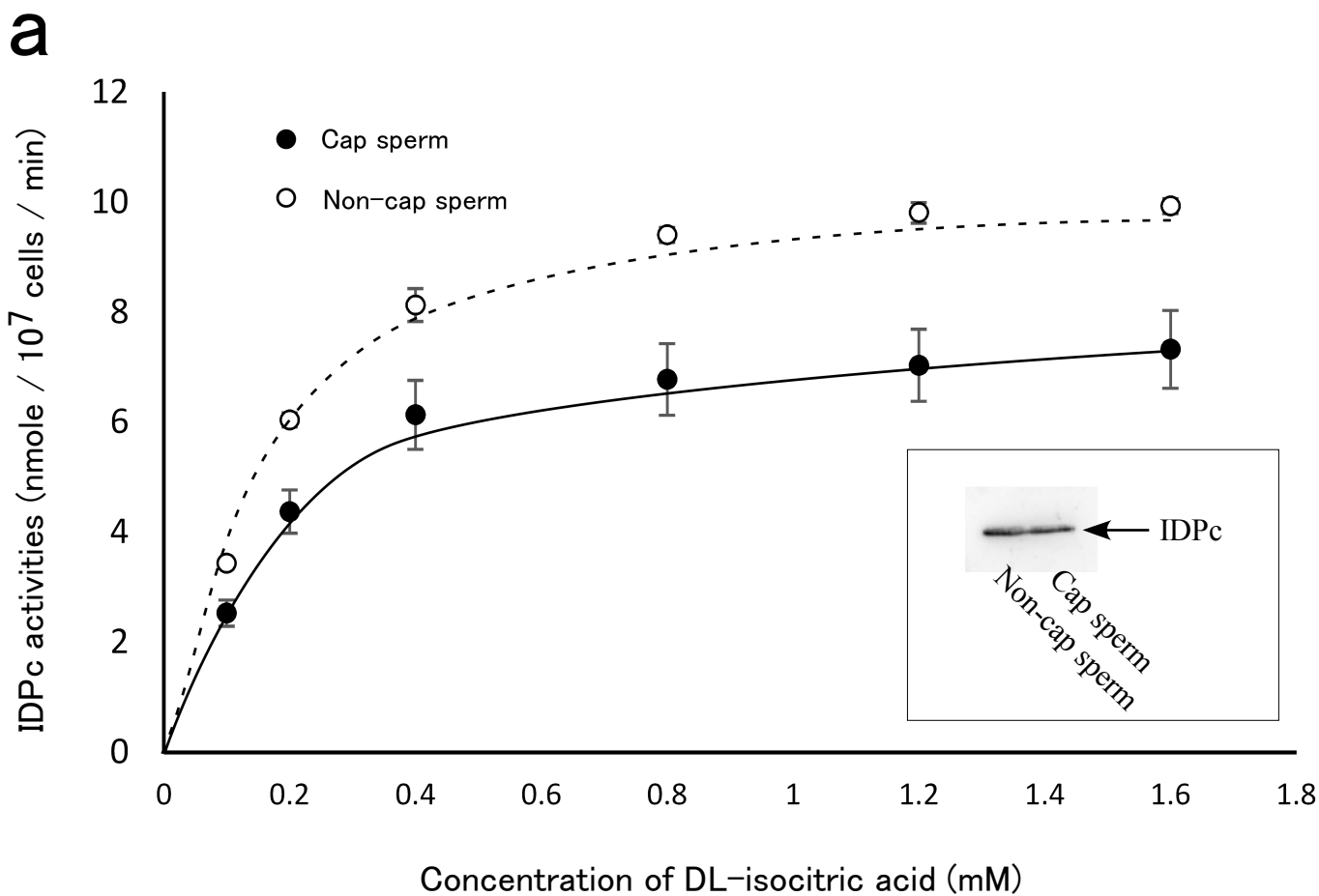


Fig. 18 Capacitationに伴うIDPcの活性変化

a : IDPc活性の基質濃度依存性を示す。  
 b : aをLineweaver-Burkプロットしたものを示す。  
 データはmean  $\pm$  S.E.M. (n=6)で示す。

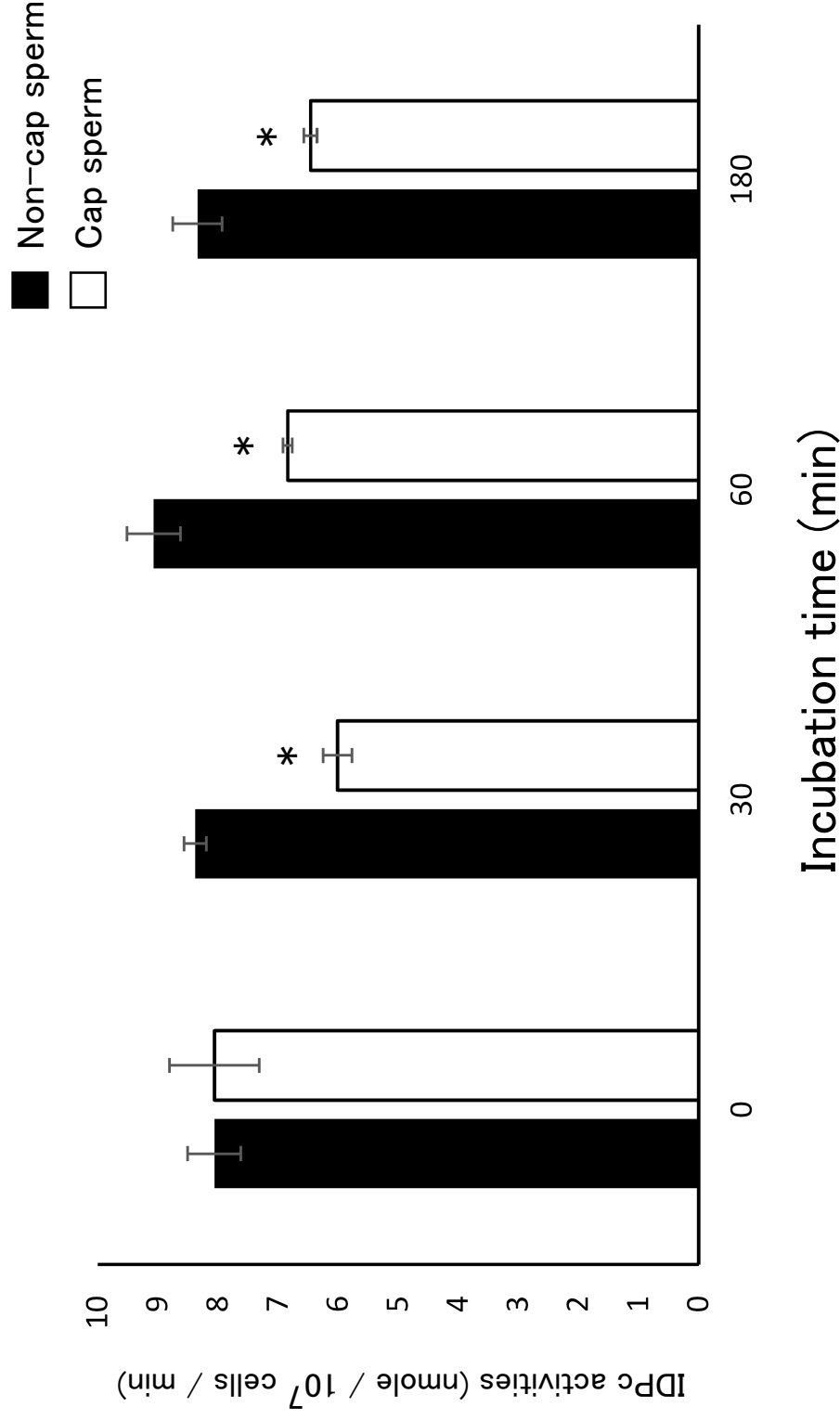


Fig. 19 Capacitationの誘導時間に伴うIDPcの活性変化

Non-cap medium又はCap mediumで培養開始後、0、30、60、180 minにおける活性変化を示す。  
データはmean ± S.E.M.(n=6, \*P<0.01) で示す。

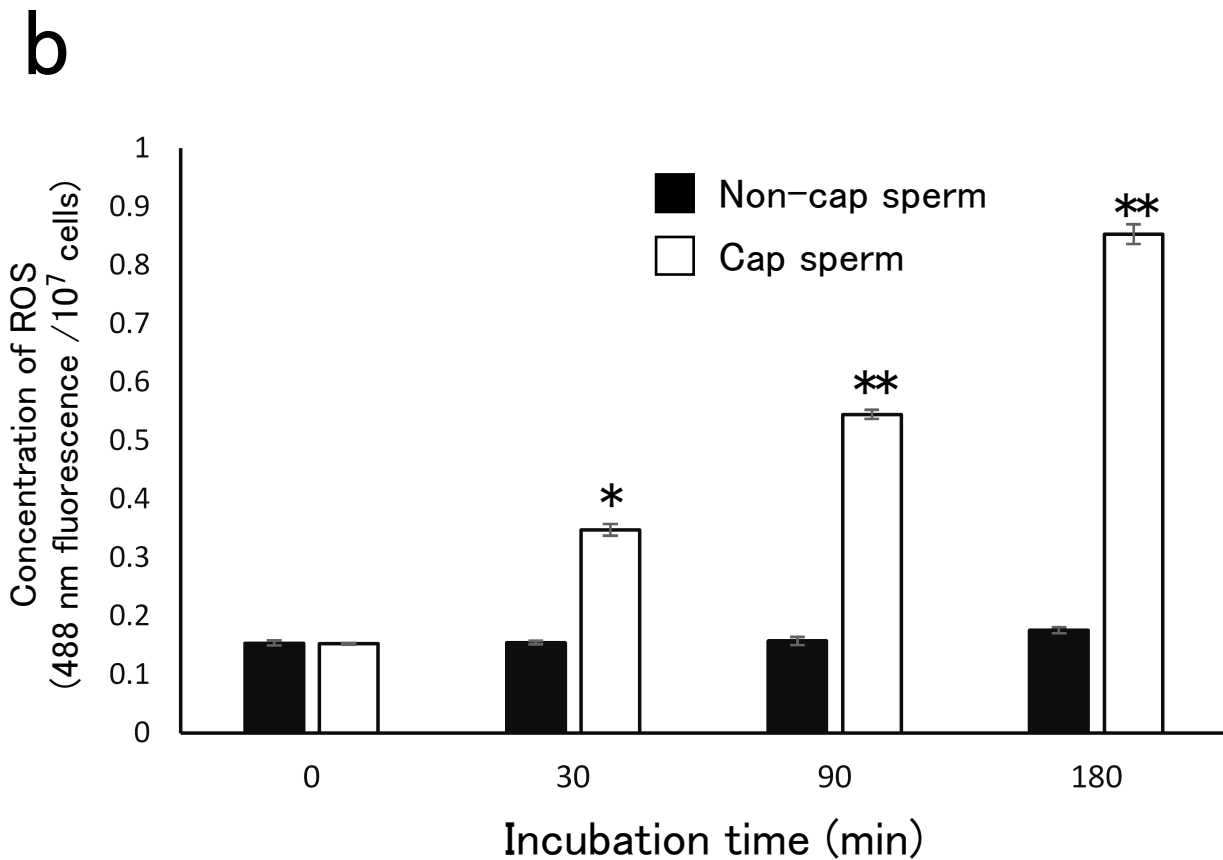
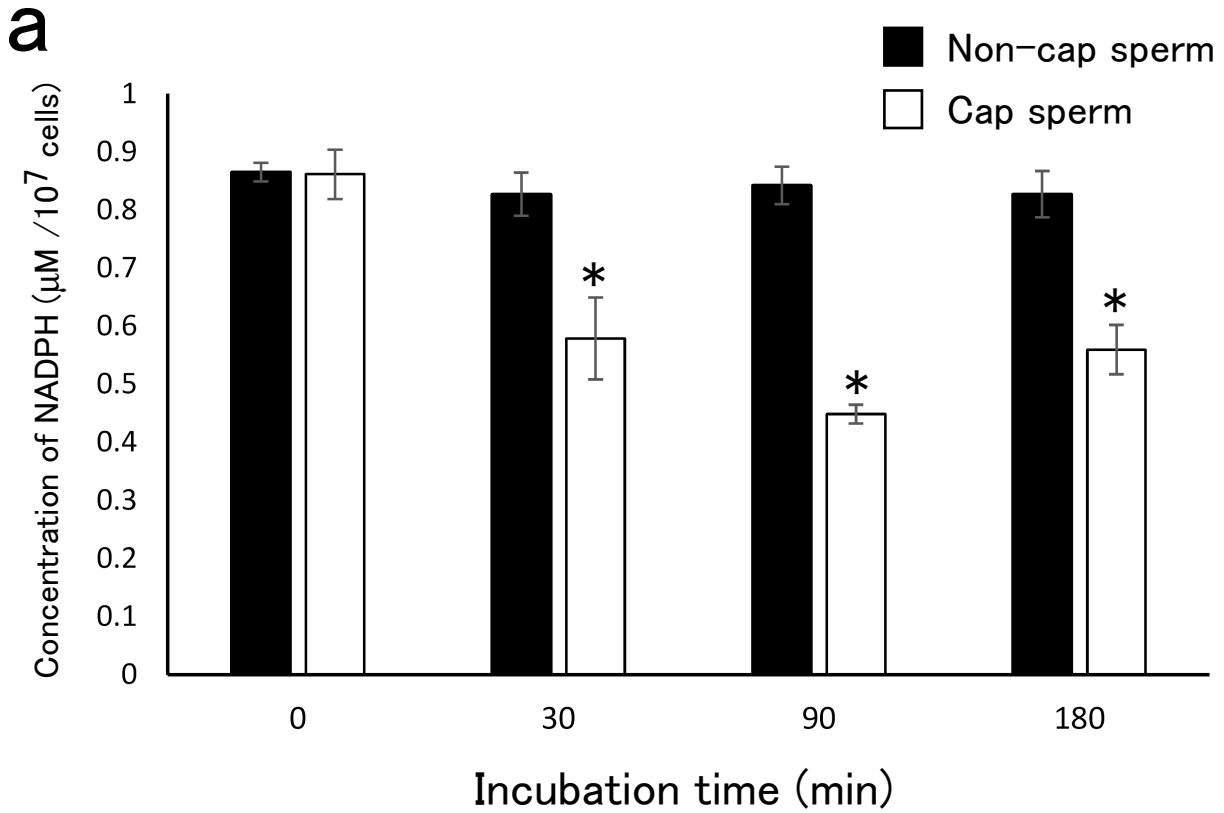


Fig. 20 Capacitationの誘導時間に伴う細胞内NADPH量とROSレベルの変化

a : 培養開始後、0、30、60、180 minにおける精子細胞内のNADPH量の変化を示す。  
 b : 培養開始後、0、30、60、180 minにおける精子細胞内のROSレベルの変化を示す。  
 データはmean  $\pm$  S.E.M.(n=3, \*P<0.01 \*\*P<0.001) で示す。

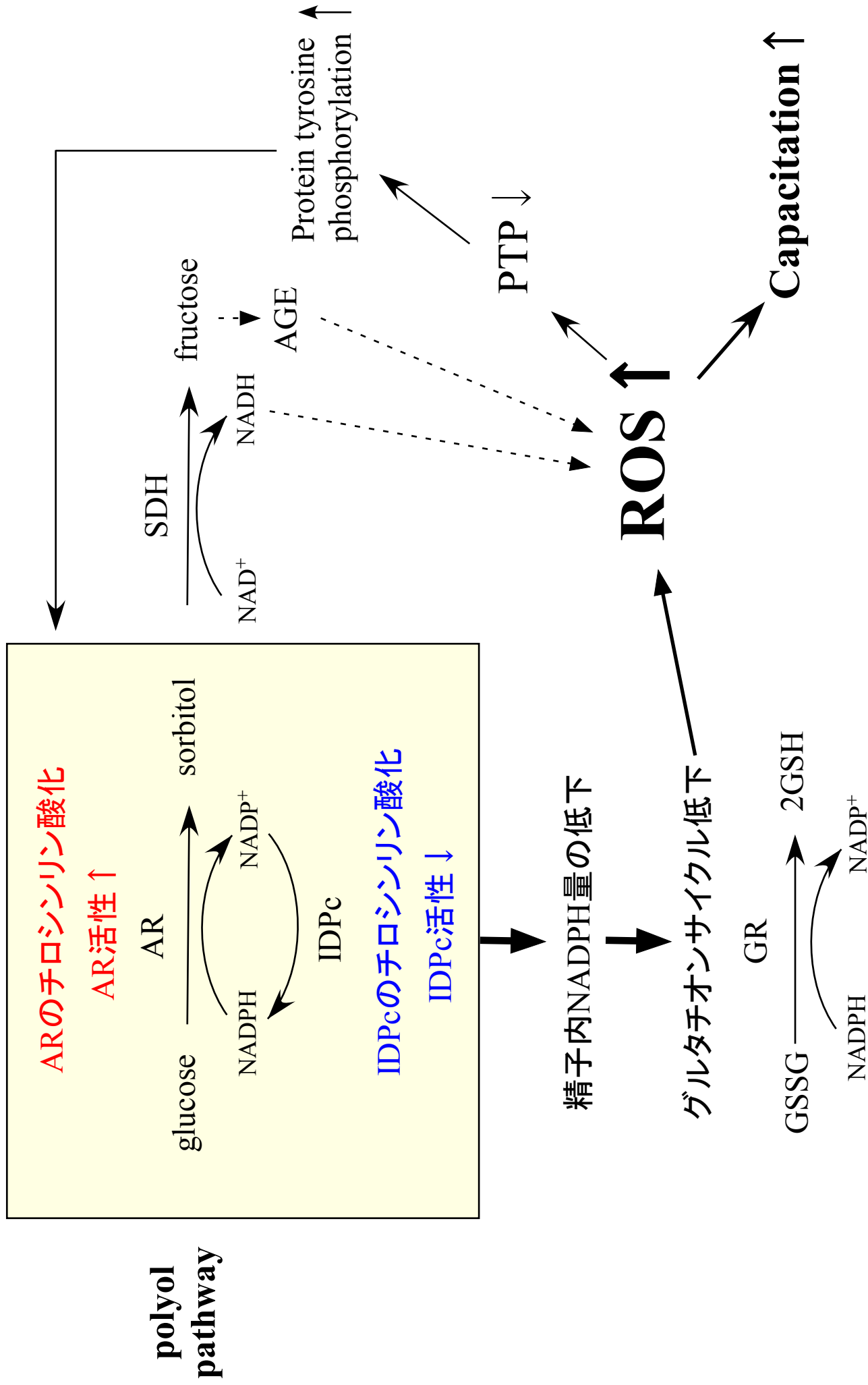


Fig. 21 ブタ精子capacitationにおけるタンパク質チロシリン酸化とROSレベルの関与

AR : aldose reductase、SDH : sorbitol dehydrogenase、GSSG : glutathione、PTP : protein tyrosine phosphatase  
AGE : advanced glycation end products



## Acknowledgements

本研究を進めるにあたり常日頃から実験について多大なる御指導、御教示を賜りました岡村直道教授（筑波大学大学院人間総合科学研究科 生命システム医学専攻 生殖生化学研究室）に厚く御礼を申し上げます。また、松田学講師（同研究室）、川島明弘助教（同研究室）、丹波道子氏（筑波大学技術職員）、菊地和弘氏（独立行政法人農業生物資源研究所上級研究員）に御礼を申し上げます。更に研究遂行にあたり、温かく見守って頂いた研究室のメンバーに御礼申し上げます。

最後に、博士論文研究の継続及び遂行に温かい御理解と御支援を賜りました大西健教授（茨城県立医療大学人間科学センター長）と相良順一准教授（同センター）に深謝致します。