

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07761

研究課題名(和文) 鳥類精子の受精機構分子基盤における膜ラフトマイクロドメインの機能的役割

研究課題名(英文) Roles of membrane rafts in molecular basis of fertilization in avian sperm

研究代表者

浅野 敦之 (ASANO, Atsushi)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：10630981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：膜ラフトの機能性を網羅的に調べるため、ショットガンベース相対定量プロテオミクスを行った結果、82分子が膜ラフトに特異的あるいは豊富に存在することが分かった。

膜ラフトの先体反応誘起機構における役割を検討した結果、膜ラフトは可溶性および膜貫通型AC活性を制御することでPKA経路を介し、先体反応誘起に関与することが分かった。さらに、グルコースは膜ラフト上のGLUTを介して取り込まれ、AMPKを活性化することで先体反応を促進することも分かった。

以上の知見を元に精子凍結保存法開発に着手し、ニワトリ精子に種々のステロールを充填すると、凍結融解後の受精能低下を阻止できることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Qualitative analysis of functional roles of membrane rafts was conducted using quantitative proteomics combined with dimethyl-labeling approach, demonstrating at least 82 proteins are relatively or exclusively enriched in membrane rafts.

Membrane rafts regulate adenylyl cyclase isoforms, such as sAC and tmAC, and glucose transporter activities, thereby stimulating acrosome reaction induction in chicken sperm.

Above results led to development of avian sperm cryopreservation and demonstrated that adding sterols into the plasma membranes of chicken sperm dramatically improves the post-thaw semen quality.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精子 先体反応 鳥類 細胞内シグナリング 細胞膜マイクロドメイン ステロール

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ウシの受胎率低下、およびヒトにおける突発性受精障害の発生は深刻な問題である。この状況下、雄性側では精子の受精機能選抜法の開発が進められているが、信頼できる手法は何れの動物種でも確立されていない。この原因は、精子の受精能力の根幹に関わる分子メカニズムに不明な点が多く残されていることにある。

動物における人工繁殖技術において、精子の凍結保存技術の確立は必要不可欠であるが、凍結融解過程に起こる精子の受精能力の低下は予めから障害であった。最近までの研究により、この精子受精能の低下は、凍結融解処理による主要膜脂質ステロールの細胞膜が、早熟な受精能獲得および先体反応を引き起こすことに起因することが分かった。さらに、マウスおよびヒト精子において細胞膜からのステロールの流出が、受精に必須である細胞内シグナル伝達経路の一つプロテインキナーゼ A(PKA)経路を介して、タンパク質チロシン残基のリン酸化を促進することが明らかになった。しかし細胞膜の変化がどのようなメカニズムで精子の機能発現を制御しているのか、未だ明らかではない。本研究の最終的な目的は、鳥類精子において細胞膜を起点とした受精機構分子基盤の解明を進め、得られた知見を元に新たな精子凍結保存法構築にむけた基盤技術の開発を行うことにある。

## 2. 研究の目的

遺伝子の転写翻訳活性を持たない精子は、受精能力の獲得において外部因子の作用に依存しなければならない。雌性生殖器官内に射出された精子は、子宮腔を受精の場まで上走していく際にコレステロール結合タンパクの作用により、細胞膜からのステロールの流出を引き起こす。この細胞膜レベルの変化は、引き続き鞭毛における運動性の獲得、および頭部における先体反応の誘起を引き起こす。このように特定の細胞内部位が特殊な機能有す特性は、受精の達成に向け自己に予め組込まれた機能性分子を効率的に利用しなければならない精子において重要である。しかし、精子細胞膜からのステロールの流出がどのようなメカニズムで特定の領域に機能発現を誘導するのか明

らかではない。

膜ラフトマイクロドメインはステロール、ガングリオシド  $G_{M1}$  および機能性膜関連タンパクを豊富に含む動的な細胞膜マイクロドメインであり、近年様々な細胞種で細胞生理現象の時空間制御に関わることが明らかになりつつある。最近我々のグループは、マウス精子におけるライブセルイメージングを駆使して、この膜ラフトが先体反応に関わる膜領域(APM)に豊富に存在していることを初めて明らかにした。さらに、膜ラフトはブタ精子の APM にも存在し、先体反応の誘起および精子—卵子間の結合に関与していることが報告された<sup>7)</sup>。以上の知見、ならびに膜ラフトがウシ、ヒト精子にも存在する報告を考慮すると、動物種を超えて、膜ラフトは精子における受精機能の発現に関与していると考えられる。最近我々のグループは、マウス精子において膜ラフトによる先体反応の促進が、APM からのステロールの流出によって引き起こされることを明らかにした。このことから、膜ラフトはステロールの流出を起点のシグナルとして活性化し、精子において受精機能を誘起すると考えられる。

一方、鳥類精子は、受精に際し受精能獲得を起こしている必要は無く、内卵黄膜に存在する糖鎖リガンドに結合後直ちに先体反応を誘起する。最近までの研究により、鳥類精子の先体反応には種々のタンパク質リン酸経路が関与していることが報告されているが、内卵黄膜のリガンドへの結合刺激がどのようなメカニズムでタンパク質リン酸化を促進するのか明らかではなかった。最近、我々はニワトリ精子において、頭部原形質膜にステロールを豊富に含む膜ラフトが存在することを発見した。さらに最近、ニワトリ精子における膜ラフトからステロールの流出は、タンパク質チロシンリン酸化を誘起しないことが分かった。哺乳動物精子においてタンパク質チロシンリン酸化は受精機構において必須であることから、膜ラフトはニワトリ精子において未知の細胞内シグナル伝達経路を介して受精機構を制御している可能性が推察される。

本研究ではニワトリ精子における受精機構分子基盤を膜ラフトの機能を通して統括的に解明するため、①膜ラフトにより機能

制御されているタンパク質群の網羅的プロテオーム解析、②膜ラフトを起点とする細胞内シグナリング経路ならびに機能的役割の探査、③膜ラフトの人為的制御法を確立し、ニワトリ精子の新規凍結保存法の開発に取り組んだ。

### 3. 研究の方法

#### (1)膜ラフトの網羅的プロテオーム解析

膜ラフト特異的に発現するタンパク質群を網羅的に同定するため、精子から回収した膜ラフト分画を、ジメチル標識相対定量プロテオミクスに供した。

また、膜ラフトの精子-卵結合における役割を調べるため、膜ラフト分画を使った内卵黄膜へのオーバーレイアッセイおよびウェスタンブロットを実施した。

#### (2)膜ラフトを起点とする細胞内シグナリング経路ならびに機能的役割の探査

精子の先体反応制御機構における膜ラフトの関与を調べるため、膜ラフト阻害剤である 2-hydroxy-propyl-cyclodextrin (2OHCD)で処理したニワトリ精子の先体反応性を調べた。またこれらの精子において cAMP 依存的シグナル経路の活性を調べるため、細胞内 cAMP 含量およびプロテインキナーゼ A(PKA)基質タンパク質リン酸化を調べた。またシグナル経路上流域を同定するため、同様の実験を溶性および膜貫通型アデニルシクラーゼ阻害剤および促進剤存在下で行った。

一方、膜ラフトの先体反応における役割を、グルコース代謝経路の点に着目し解明するため、まずグルコースが先体反応および運動性に及ぼす影響を調べた。次に Glucose transporter 3(GLUT3)の精子における発現と局在、ならびに膜ラフトとの生化学的関係性を調べた。次に Glucose transporter および膜ラフトのグルコース取込における制御機構を調べるため、各種阻害剤の存在下で蛍光標識された非分解型グルコース(2-NBDG)で処理した精子においてスペクトロフォトメトリーを行った。

さらにグルコース依存的シグナル経路の下流域を同定するため、AMP 活性化キナーゼによる先体反応誘起機構に注目し、様々な阻害剤存在下で先体反応テスト、2-NBDG 取り込み試験およびウェスタンブ

ロットによるリン酸化 AMPK の検出を実施した。

#### (3)膜ラフトの人為的制御法による新規凍結保存法開発

まず凍結保存による細胞膜の成分変化と細胞障害の実態を解明するため、凍結融解に伴う精子および膜ラフトにおけるステロールおよび GM1 の変化を定量した。次に凍結融解した、あるいは膜ラフト阻害剤で処理した精子において、アポトーシスの指標であるホスファチジルセリン(PS)の細胞外転移状況を調べた。

次にコレステロールあるいはデスモステロール充填シクロデキストリン(CLC あるいは DLC)で処理した精子を凍結保存後、生存性、運動性、先体胞正常性、PS 転移状況、先体反応性評価試験に供した。

### 4. 研究成果

#### (1)膜ラフトの網羅的プロテオーム解析

まず精子より抽出した膜ラフトおよび非ラフト分画のジメチル標識相対定量プロテオミクスに供した結果、総計 258 のタンパク質が検出された。その内 82 は膜ラフトに特異的あるいは豊富に含まれることが明らかになった。次にデータベースを使って、これらのタンパクの機能を分類した結果、ニワトリ精子の膜ラフトは様々な機能に関与している可能性が明らかになった。

さらにニワトリ精子-卵結合機構への膜ラフトの関与を調べた結果、膜ラフト特異的に発現している 60 KDa の新規分子が精子の卵への結合を仲介するが分かった<sup>9)</sup>。鳥類精子の卵への結合は先体部のアクロシン(45KDa)により仲介されることが知られていた。これらの結果は鳥類精子-卵との結合に新たなメカニズムの存在を示唆した。以上の成果は PLoS One に掲載された。

#### (2)膜ラフトを起点とする細胞内シグナリング経路ならびに機能的役割の探査

ニワトリ精子を 2OHCD 処理し先体反応性、運動性、PKA 基質タンパクおよびタンパク質チロシンリン酸化を調べた結果、運動性およびチロシンリン酸化に変化は認められないが、2OHCD 濃度依存的(1-10mM)に先体反応および PKA 基質タンパクリン酸化は阻害された。次に PKA 活性化剤である dbcAMP の存在下で 1mM 2OHCD 処理を行った結果、先体反応および PKA 基質タンパクリン酸化の阻害は解除された。さらにシグナル伝達経路上流域を同定するため、2OHCD 処理精子における細胞内 cAMP 量を定量した。その結果、膜ラフトの崩壊により cAMP 生合成量が低下することが分かった(図 1)。以上の結果は、膜ラフトが cAMP

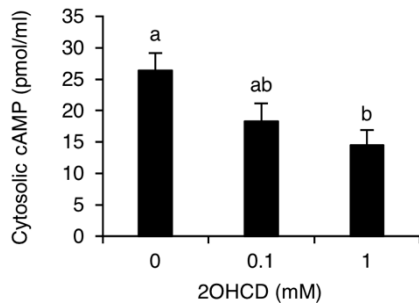


図 1 ニワトリ精子の cAMP 定量

合成を制御することで PKA を介して先体反応機構に参与していることを示した。そこで溶性および膜貫通型アデニルシクラーゼ(sAC および tmAC)の発現と先体反応への機能関与について、各種阻害剤を使って検討した。その結果、ニワトリ精巣には ADCY1, ADCY3, ADCY5, ADCY7, ADCY8, ADCY9, ADCY10 が発現していることが分かった。また sAC および tmAC 阻害剤は先体反応および PKA 基質タンパクのリン酸化を抑制した。このことからアデニルシクラーゼアイソフォームは先体反応に参与していることが分かった。そこで膜ラフト崩壊による先体反応および PKA 基質タンパクのリン酸化にアデニルシクラーゼアイソフォームが関与している可能性を調べた。その結果、sAC および tmAC 促進剤は膜ラフト崩壊によるこれらの阻害効果を消去した。以上の結果、膜ラフトは sAC および tmAC 活性を制御することで cAMP 依存的経路を介して先体反応有能に参与していることが分かった(図 2)。以上の成果は Biology of Reproduction に掲載された。

膜ラフトの先体反応における役割を、グルコース代謝経路の点に着目し解明するため、まず先体反応機構におけるグルコース代謝の役割を調べた結果、グルコースは先体反応を劇的に促進することが分かった。さらに Glucose Transporter (GLUT) 3 は先体部および尾部に局在し、膜ラフトと極め

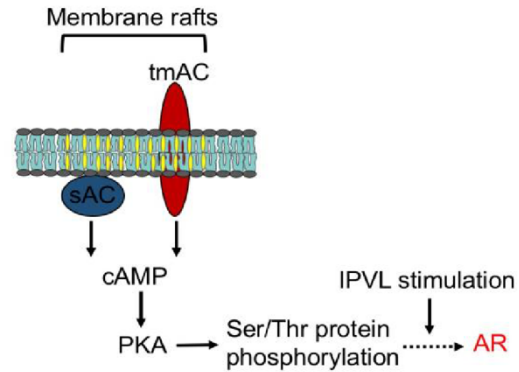


図 2 膜ラフトによる cAMP 依存的経路を介した先体反応誘起制御

て強い親和性を示すことが分かった。また、グルコースは膜ラフト上の Glucose transporter を介して取り込まれ、AMPK を活性化することで先体反応を促進することが分かった。以上の成果は投稿準備中である。

### (3)膜ラフトの人為的制御法による新規凍結保存法開発

ニワトリ精子および膜ラフトにおいて凍結保存に伴う膜組成の変化を調べた結果、GM1 量に変化は認められないが、ステロール量が劇的に減少する事が分かった。さらに受精障害のメカニズムを解明するため、凍結精子および人工的にステロール流出を誘起した精子で PS 転移状況を調べた。その結果、凍結保存による細胞膜からのステロール流出は PS 転移を促進することでアポトーシスを促進することが分かった。以上の成果は Journal of Poultry Science に掲載された。この結果から凍結保存前にステロールを補充すれば、ニワトリ精子の凍結傷害を阻止できる可能性が示唆された。そこでコレステロールおよびデスモステロールを充填したシクロデキストリン (CLC および DLC) を作成し、種々のステロール補充が凍結融解精子の生存性と機能性に及ぼす影響を検討した。その結果、CLC および

DLC 処理により凍結融解後の精子生存性、運動性、先体胞正常性に加え、アポトーシス発生が劇的に改善されることが分かった。そこでステロール補充が先体反応性に及ぼ

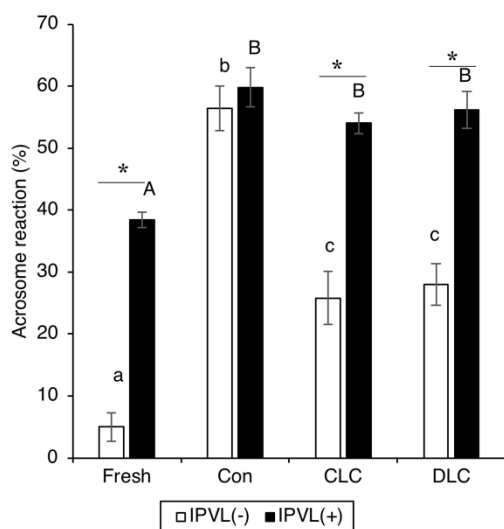


図3 CLC および DLC 処理凍結保存精子の先体反応性

す影響を調べると、従来法による凍結融解精子では異常先体反応が起こるのに対して、CLC および DLC 処理精子ではこの異常が解消されることを明らかにした(図3)。以上の結果から、凍結保存前のステロール補充は鳥類精子の凍結保存技術に有用であることを報告した。以上の成果は、*Reproduction, Fertility and Development* に掲載された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件) 全て査読有

1. Priyadarshana C, Tajima A, Ishikawa N, Asano A.  
Membrane Rafts Regulate Sperm Acrosome Reaction via cAMP-dependent Pathway in Chickens (*Gallus gallus domesticus*)  
*Biology of Reproduction*, accepted (2018)
2. Ushiyama A, Tajima A, Ishikawa N, Asano A.  
Characterization of the functions and proteomes associated with membrane rafts in chicken sperm  
*PLoS ONE* 12:e0186482(2017)

3. Ushiyama A, Tajima A, Ishikawa N, Asano A.  
Modification of membrane cholesterol and desmosterol in chicken sperm improves post-thaw survival and prevents impairment of sperm function after cryopreservation  
*Reproduction, Fertility and Development* 30: 591-599 (2017).
4. Ushiyama A, Ishikawa N, Tajima A, Asano A.  
Comparison of membrane characteristics between freshly ejaculated and cryopreserved sperm in the chicken.  
*Journal of Poultry Science* 53: 305-312 (2016).

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Priyadarshana C, Ishikawa N, Tajima A, Asano A.  
Involvement of membrane rafts in acrosome reaction of avian sperm via cAMP-dependent pathway  
American Society for Cell Biology Meeting (2017).
2. Ushiyama A, Tajima A, Ishikawa N, Asano A.  
Membrane rafts regulate acrosome reaction via glucose signaling pathways in chicken sperm  
American Society for Cell Biology Meeting (2017).
3. 牛山愛、田島淳史、石川尚人、浅野敦之.  
鶏精子の先体反応に及ぼすグルコースの影響  
日本畜産学会、第122回大会(2017).
4. Priyadarshana C, Ishikawa N, Tajima A, Asano A.  
Membrane rafts regulate acrosome reaction in chicken sperm via PKA pathway.  
Society for the Study of Reproduction 2017 Annual Meeting (2016).
5. Ushiyama A, Tajima A, Ishikawa N, Asano A.

Possible involvement of membrane rafts in functional damages of the cryopreserved chicken sperm.  
Society for the Study of  
Reproduction 2016 Annual Meeting  
(2016).

6. 牛山愛、田島淳史、石川尚人、浅野敦之.  
ニワトリ精子膜ラフトの生化学分析と機能性の検討  
日本家禽学会 2016 年度春季大会  
(2016)
7. 牛山愛、田島淳史、石川尚人、浅野敦之.  
ニワトリ精子へのコレステロールの充填は凍結融解後の生存率を向上させる  
動物生殖工学研究会、第32回大会  
(2015)
8. 牛山愛、田島淳史、石川尚人、浅野敦之.  
ニワトリ凍結融解精子の生存性へ及ぼすコレステロール充填の効果  
日本繁殖生物学会、第 108 回大会  
(2015)
9. 牛山愛、神戸瞳、田島淳史、石川尚人、浅野敦之.  
鶏凍結融解精子における細胞膜変化の意義.  
日本畜産学会、第 119 回大会  
(2015).

〔図書〕(計 1 件)

1. Asano A, Tajima A.  
Development and preservation of avian sperm.  
Avian Reproduction: From Behavior to Molecules (eds, Sasanami T),  
Advances in Experimental Medicine and Biology 1001: 59-73, Springer  
(2017).

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

浅野 敦之 (ASANO, Atsushi)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号 : 10630981