

課題名：精子の持つ「電気信号」センシング機構

大阪大学大学院 医学系研究科

河合 喬文

1 研究の背景と目的

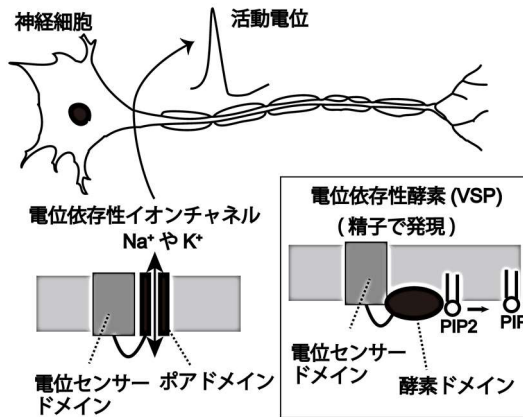


図1 細胞の膜電位シグナル

通常、神経細胞などの膜電位シグナルは電位依存性チャンネルにより、生成、感知される。一方、電位依存性酵素(VSP)は特殊な構造により、電位依存的な酵素活性を示す。

神経活動を見る「脳波」や、心臓の動きを調べる「心電図」に代表されるように、我々の身体の至るところでは、「電気信号」が生成されている。このような「電気信号」の生成・感知メカニズムについては古くから研究がなされており、主に「電位依存性イオンチャンネル」と呼ばれる分子が「電気信号」を感知することで、細胞内へのイオンの流れを引き起こすことが知られてきた(図1左下)。また、このような「電気信号」の感知システムはあらゆる組織や細胞で共通しているものと考えられてきた。しかし最近になって我々は、この電気

信号を感知しながらもその情報を酵素活性(ホスファターゼ活性)に変換する蛋白質VSP(図1右下)が、マウスの精子で機能してその運動性を制御していることを以下のように見出した(Kawai et al., PNAS, 2019)。

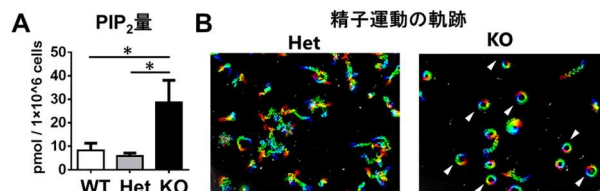


図2 VSP 欠損精子は運動異常を示す

A. 成熟した精子の PIP₂ 量は KO で上昇している。B. KO の精子では精子が回転運動を示し(矢じり)、異常を示す。

VSP は、重要な細胞膜を構成する重要な膜脂質分子であるイノシトールリン脂質 PIP₂ を基質とする電位依存的なホスファターゼである(図1右)。我々はこれまでに成熟した精子を用いた解析を行い、(1) VSP が既に成熟精子で酵素活性を示していること(図2A)、(2) VSP を欠損すると精子の運動性に異常が生じ(図2B)、(3)体外受精能が劇的に低下すること

とそのメカニズムと共に明らかにした(東京医科歯科大学・佐々木雄彦教授、大阪大学・伊川正人教授、宮田治彦准教授との共同研究)。以上の内容は、生体内の細胞(この場合は精子)に膜電位依存的な酵素活性があることを示す初めての発見である。また、我々はこれまでに凍結レプリカ法を用いた PIP₂ の標識実験により、マウス精子の鞭毛膜では PIP₂ が軸方向に勾配をもって分布することを見出しており(図3A)、さらにこの勾配の形成に VSP が重要であることを明らかにした(図3B, 順天堂大・藤本教授との共同研究)。したがって VSP は精子の鞭毛において PIP₂ の勾配を作り出していると考えられる。一方で、

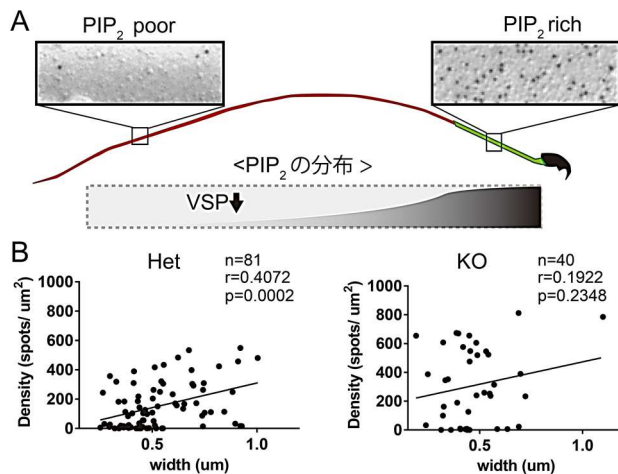


図3 VSP は精子鞭毛に PIP₂ の勾配を作り出す

A. 凍結レプリカ法の結果。PIP₂ を金粒子によって標識している。精子鞭毛の近位部では PIP₂ が多く含まれるのに対し (PIP₂ rich)、遠位部では PIP₂ が殆ど見られない (PIP₂ poor)。B. 縦軸に PIP₂ の密度、横軸に鞭毛の太さをプロットしている。Het の精子では有意に PIP₂ の勾配が認められるのに対し、KO ではそれが消失する。は認められない。

なかった膜電位シグナルの新たな感知機構について明らかにしたいと考えた。また、上記の点に加え、マウスの VSP についてはその分子機能に関する理解が他の動物種と比較して大幅に遅れているという問題点も存在している。そこで、本研究では、この点も解析することを目標とした。

2 研究方法・研究内容

2-1. 精子における VSP の局在と局所的な電気信号

これまで、マウス精子における VSP の局在については、過去の研究から精子の尾部に発現しているであろうことが示唆されているが、その詳細は依然として不明である。その理由として、これまで免疫細胞化学に使用可能である VSP に対する抗体が存在していないことが挙げられる。この点を克服するため、我々は VSP に Flag タグを融合させて蛋白質を発現する遺伝子改変マウスを作製していたため、これらを用いて、VSP の詳細な分布を検証することを試みた。また、局所的な電気信号については、膜電位プローブを精子へと発現させることで、その詳細な空間情報を取得することを試みた。

2-2. 精子の成熟状態に応じた VSP の酵素活性の評価

上述の通り、これまでの研究では VSP について、成熟した精子においてのみその活性評価が行われており、本活性が、精子が未成熟から成熟する過程で生じているのか、或いは成熟するようになってから初めてその活性が現れるのかについては、知見が存在していない。そこで本研究では、様々な成熟段階にある精子を野生型或いは VSP 欠損型のマウスから収集し、そのイノシトールリン脂質の量を比較することで、この点を解析しようと考えた。様々な成熟段階にある精子については、フローサイトメトリーや遠心による分画を組み合わせることによって行った。また、イノシトールリン脂質の定量については、その生化学的な解

これまでのところ VSP がどの部位に局在しているのか、またどの部位の膜電位情報が VSP の活性化をもたらしているのか、については全く分かっていない。

以上の研究背景を踏まえ、これまでに明らかにされていない問いが以下のように存在する。すなわちこれまでのところ、(1) 精子における VSP による酵素活性が、どの段階から顕著に見られるのか、また(2)精子におけるイノシトールリン脂質の分布局在がどのようなメカニズムによって形成されているのか、は未だ不明のままである。そこで本研究では、この **新規膜電位感知機構の時空間的な側面を明らかに** することで、従来想定されてこ

析に精通している、東京医科歯科大・佐々木雄彦教授に依頼することによって行った。

2-3. マウス VSP の分子機能に関する研究

前述の通り、マウスの VSP についてはその分子機能に関する理解が他の動物種と比較して大幅に遅れているという問題点も存在していた。その理由の一つとして、マウスの VSP については他の動物種と比較して、発現系細胞に発現したときに細胞膜への輸送効率が大きく下がってしまう、という原因が挙げられる。この問題は哺乳類の VSP において顕著であり、例えば VSP が最初に同定されたホヤや、ゼブラフィッシュ、ニワトリ、アフリカツメガエル、などの非哺乳類の動物種では十分な細胞膜での発現が得られるために、その分子メカニズムが十分に理解されている。今回、我々はこのマウス VSP における問題を克服するため、マウスの VSP に様々な工夫を凝らすことで、細胞膜へと効率よく輸送される分子を作製することを試みた。解析には、これまで他の VSP の解析で実績のある、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いることによって行った。また、VSP による作用のリードアウトとしては、これらの解析によく使用される KCNQ2/3 を共発現させることによって行った。

3 研究成果

3-1. 精子における VSP の局在と局所的な電気信号

前述した VSP-Flag 融合分子を発現する遺伝子改変マウスの精子を用い、抗 Flag 抗体を用いることでその精子における局在を検証した。ネガティブコントロールとしては野生型マウスの精子を使用した。結果としては、残念ながら、VSP-Flag 遺伝子改変マウスに特異的なシグナルを認めることはできなかった。その原因を探るために、VSP-Flag 遺伝子改変マウスから精子を収集し、抗 VSP 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって蛋白質の発現を検証した。その結果、この遺伝子改変マウスの精子では VSP 蛋白質の発現自体が大幅に減少してしまっていることが示唆された。精子においては、同様に融合タンパク質を発現させることでその発現量自体が大幅に影響を受けてしまうことが、知られている。したがって、今後は発現量に影響を及ぼさないような他のタグを使うことが推奨される。一方、精子鞭毛における局所的な電気信号の存在も膜電位プローブを用いることによって検証したが、そのシグナルに偏りは観察されなかった。このことから、膜電位の極性が VSP 活性の極性を形成しているという可能性は低くなったと考えられる。

3-2. 精子の成熟状態に応じた VSP の酵素活性の評価

VSP による活性が、精子の成熟状態に応じて発揮されている可能性を検討した。上述の通り、各成熟段階の精子については、フローサイトメトリーや遠心による分画を組み合わせることによって行った。実際に目的の成熟段階の精子が得られていることについては、各サンプルについて免疫染色や DAPI 染色を組み合わせることによって確認した。当該サンプルについて東京医科歯科大の佐々木雄彦教授に解析を依頼した。収集可能な細胞数に限りがあったため、上手く測定できるかどうかについて不安があったものの、綺麗な測定結果を得ることが出来た。その結果、成熟精子の結果から考えてもリーズナブルな成果を認めることができ、成熟状態に応じた VSP の酵素活性について、一定の理解を得ることが出来た。本研究結果の詳細については、出来るだけ早い機会に海外の雑誌に投稿したいと考えているため、その詳細な内容についてはここでは割愛したい。

3-3. マウス VSP の分子機能に関する研究

前述の通り、マウスの VSP については発現実験系では、細胞膜での発現が低いためにその

詳細な分子機能の評価が出来ないという問題があったため、細胞膜で発現するマウス VSP の変異体を見出すことを目標として研究を行った。多くの試行錯誤の結果、マウス VSP の構造が殆ど保存された状態で細胞膜にある程度発現する分子を作製することに成功した。その結果、マウスの VSP が他の動物種の VSP と比較しても遜色のない電位依存性を示すことも確認された。本研究内容についても、詳細は出来るだけ早い機会にあ海外雑誌に投稿したいと考えているため、詳細については割愛したい。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究を進めることで、「精子が電気信号を感知するメカニズム」について大幅に理解を進めることが出来たと考えている。本分子はマウスに限らずあらゆる脊椎動物にも保存されていることから、その理解が進むことで、将来的には不妊治療や農業分野での繁殖事業などへの応用にも期待されると考えられる。