

## 論文の内容の要旨

### Studies on sperm capacitation of mouse regulated by seminal vesicle secretion proteins

(精嚢分泌タンパク質によるマウス精子受精能獲得の制御機構に関する研究)

荒木直也

#### 序論

哺乳類の精子は射精された時点では卵と受精する能力をもたず、雌性生殖器内にしばらく滞在すると受精できるようになる(受精能獲得)。受精能獲得の分子機構は未だよく分かっていないが、*in vitro*での受精能獲得誘起の研究から、成熟精子の細胞膜に多く含まれるステロールが細胞外に流出し、細胞膜においてステロールとスフィンゴ脂質に富むドメイン構造である脂質ラフトの再構成が起き、受精能獲得が誘起されると考えられている。一方 *in vitro*での受精(体外受精)の研究から、精子の受精能獲得処理を行う際に精漿が混入すると、受精能獲得が抑制されることが知られている。精漿は、脱受精能獲得と呼ばれる、一度獲得した受精能が破棄される現象も起こす。受精能獲得の抑制を起こす因子は複数報告されているが、*in vivo*での作用機構や生物学的意義は十分に解明されていない。

雄性性腺付属器官の1つである精嚢から分泌されるタンパク質は SVSs(seminal vesicle secretions)として知られ、精漿の主要成分として交尾や受精において重要な機能を有している。マウスでは7種類の主要な SVS タンパク質が存在しており(SVS1~7)、そのうち SVS2 が受精能獲得抑制因子であることが報告されている。子宮内の精子には細胞膜上のガングリオシド GM1 を介して SVS2 が結合していること、卵管内に進入した精子には GM1 も SVS2 も存在しないことが分かっている(図 1)。また SVS2 がマウス精子は子宮内で死んでしまい、卵管に進入できず、不妊になることが示された。これらの結果から SVS2 は GM1 を介して精子の受精能獲得を制御し、この機能は子宮での精子の生存に不可欠であると考えられるが、詳細な機構は不明である。GM1 は脂質ラフトに存在することから、SVS2 が脂質ラフトやそこに含まれるステロールの動態に影響している可能性が考えられる。また、SVS2 以外の SVS タンパク質が受精能獲得に影響しているのかは不明である。

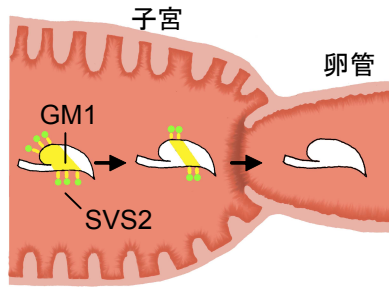


図1. 雌性生殖器内におけるSVS2動態の模式図  
SVS2は精漿成分として子宮内に進入する。そこで、精子の頭部後方に局在するガングリオシドGM1と結合する。精子が子宮後方に達するとGM1の分布が赤道面に変化し、それに伴ってSVS2の分布も変化する。卵管内に入った精子にはSVS2もGM1も分布していない。  
(Kawano & Yoshida, 2007; Kawano et al., 2008)

本研究では、マウス SVSs による受精能獲得制御機構の解明を目的とした。まず、主要な因子であると考えられる SVS2 の受精能獲得抑制機構の解明を試みた。また、SVS2 以外の SVSs の受精能獲得に対する影響を調べるために、SVS3 と SVS4 の作用を評価した。

## 第1章

### SVS2 による受精能獲得制御機構

本章では、受精能獲得抑制における SVS2 の作用機構を調べるため、脂質ラフトの動態に与える SVS2 の影響を、特に受精能獲得の誘起につながると考えられているステロールの流出に着目して検討した。

ステロールを細胞膜から除去する性質をもつメチル-β-シクロデキストリン(MβCD)で精子を処理すると受精能獲得を誘起することができる。しかし、MβCD と共に SVS2 で処理すると受精能獲得が抑制された。また、MβCD で受精能獲得処理した精子に後から SVS2 を添加すると、脱受精能獲得が生じた。SVS2 がこれらの作用を発揮するには培地中におけるコレステロール(Ch)の存在が必須であった。

次に、ステロール結合性色素 filipin を用いて精子細胞膜におけるステロールレベルの測定を行った。その結果、SVS2 は精子細胞膜からのステロール流出を抑制し、さらに脱受精能獲得の際には外液中の Ch を用いて細胞膜ステロールレベルを上昇させた。また、蛍光標識 Ch を用いて Ch の動態を可視化したところ、SVS2 がある時のみ外在性の Ch が精子に取り込まれた。

受精能獲得に伴う脂質ラフト再構成に与える SVS2 の影響を評価するために、ラフトのマーカー分子である GM1 の分布をコレラ毒素 B サブユニット(CTB)染色により調べた。精子頭部後方に局在する GM1 は受精能獲得処理に伴い拡散するが、処理時に SVS2 を添加しておくことで拡散が抑制され、脱受精能獲得の際には分布が受精能獲得前の状態に戻った。以上の結果より、SVS2 は精子細胞膜からのステロール流出を抑制し、さらに外在性 Ch を細胞膜に挿入することで、脂質ラフト再構成を含む受精能獲得現象の進行を抑制することが示唆される。

*in vivo* でもこの SVS2 の作用が見られるかを確認するため、交尾により雌性生殖器内に進入した精子のステロールレベルを測定した。野生型マウス精子は子宮内で精巣上体精子よりも高いステロールレベルを示し、卵管内でレベルの低下が起きていた。対して、SVS2<sup>-/-</sup>マウス精子は子宮内でステロールレベルの有意な低下が起き、卵管内には精子が見られなかった。

これらの結果から、SVS2 は精子のステロールレベルを維持することで、受精能獲得の抑制状態を保つことが示唆された。SVS2 は Ch と相互作用するタンパク質に共通して見られるドメイン

を有し、Ch との結合性が予測される。また、SVS2 は GM1 との結合性が報告されている。これらの結果から、SVS2 は捕捉した Ch を、GM1 を介して細胞膜内に挿入する作用があると考えられる。

## 第 2 章

### *in vivo* における精子の受精能獲得誘起機構

本章では、*in vivo* における受精能獲得機構を調べるため、*in vivo* での受精能獲得抑制因子であると思われる SVS2 の雌性生殖器内における動態を、免疫組織化学の手法を用いて考察した。また、*in vivo* における受精能獲得誘起因子の検討を行った。

まず、交尾後のマウス雌性生殖器を抗 SVS2 抗体で免疫染色した。SVS2 は子宮と子宮卵管接合部(UTJ)の特に上皮組織内腔に沿って見られたが、卵管内腔には見られなかった。CTB を用いて、SVS2 結合性をもつ GM1 の分布を調べたところ、発情期の子宮上皮組織に多く存在していた。

次に、SVS2 の子宮内における存在意義を調べるために、*in vivo* での受精能獲得誘起因子であると思われるアルブミンが子宮内液に含まれるかを検討した。各性周期の子宮内液を回収しアルブミン濃度を測定したところ、いずれの時期においても受精能獲得を誘起するのに十分な量が存在していた。

以上の結果より、SVS2 の雌性生殖器内動態は GM1 を有する子宮上皮細胞が制御している可能性が示された。子宮内精子には GM1 と SVS2 が結合しているが、卵管内精子には存在しないという先行研究を考慮すると、GM1 と SVS2 は UTJ において精子から脱離すると考えられる。また、子宮内でもアルブミンにより受精能獲得は起こりうるが、SVS2 が精子に結合しているためにそれが抑制されており、卵管に入る精子から GM1 と SVS2 が脱離することで受精能獲得の抑制が解除されることが示唆された。

## 第 3 章

### SVS3 と SVS4 の受精能獲得への影響

本章では、SVS2 以外の SVS タンパク質が受精能獲得に与える影響を検討した。

SVSs の中で SVS2~6 は同一染色体上に存在し、SVS3、4 が SVS2 と近い位置を占める。さらに、SVS3 と SVS4 はアミノ酸配列において SVS2 とそれぞれ 31%、21%の相同性を示す。また、SVS3 は SVS1、2 と共に交尾栓の成分となっている。以上の点から SVS3 と SVS4 において受精能獲得に対する作用を調べた。SVS3 は単独では受精能獲得を抑制しなかったが、SVS2 と共処理することで SVS2 単独よりも強い抑制作用を示した。また、SVS4 は単独で受精能獲得を抑制した。しかし、SVS3 と SVS4 は脱受精能獲得作用は示さなかった。SVS3、SVS4 の GM1 に対する相互作用を調べたところ、SVS2 よりも弱い、結合性を有していた。また、SVS3 は SVS2 と結合することが示された。一方、Ch 相互作用ドメインは SVS3 には 2 つあり、SVS4 には存在しなかった。以上の結果より、「受精能獲得の抑制」と「脱受精能獲得」は別の機構であり、前者には GM1 を介した精子への結合が、後者には Ch との相互作用が重要であると考えられる。

以上のように、SVS2 以外の SVS タンパク質も受精能獲得を制御しうることが示された。

## 考察

SVS2<sup>-/-</sup>マウス精子は人工授精は正常に起こるが、*in vivo* では精子が子宮内で死に、卵管に進入できないため、雄性不妊になることが分かっている。このことから SVS2 による子宮内精子の受精能獲得抑制が受精の成立に必須であると示唆される。本研究は、子宮内における受精能獲得の抑制機構に光を当て、この過程に SVS2 が機能していることを示した。さらに、SVS2 による受精能獲得制御には2つの段階があると思われる(図2)。第一段階では、子宮内で SVS2 が GM1 を介して精子に結合し、精子膜ステロールレベルを高く保つことで受精能獲得抑制状態を維持している。第二段階では SVS2 と GM1 がおそらく UTJ で精子から脱離することで抑制を解除し、卵管内に進入した精子の受精能獲得が誘起される。以上より、*in vivo* での受精能獲得は「誘起」ではなく、SVSs による「抑制」により制御されていることが明らかとなった。また、SVS2 の卵管への進入を阻害することで、確実な受精能獲得が保証されていることが示唆された。

現在までの知見から、受精能獲得において SVS2 が主要な作用因子であることが示唆される。しかし、本研究から SVS2 以外の SVS タンパク質も受精能獲得を制御していることが示された。SVS2<sup>-/-</sup>マウスは完全な不妊にはならないことから、これらのタンパク質が *in vivo* でも作用している可能性がある。今回解析した SVS3、4 の *in vivo* での機能や、それ以外の SVS タンパク質が受精においてどのような機能を有しているか、興味深いところである。

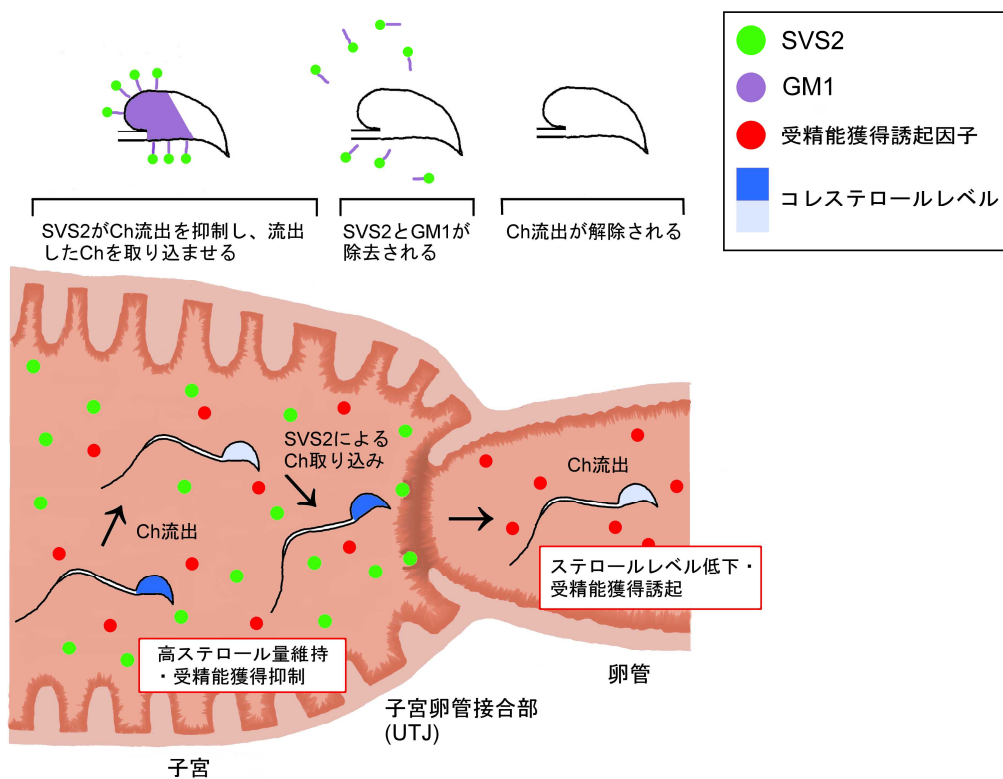


図2. SVS2による受精能獲得制御の模式図  
子宮内ではSVS2がGM1を介して精子に作用し、受精能獲得を抑制している。卵管に入るとSVS2とGM1が精子から脱離する。これにより抑制が解除され、受精能獲得が誘起される。