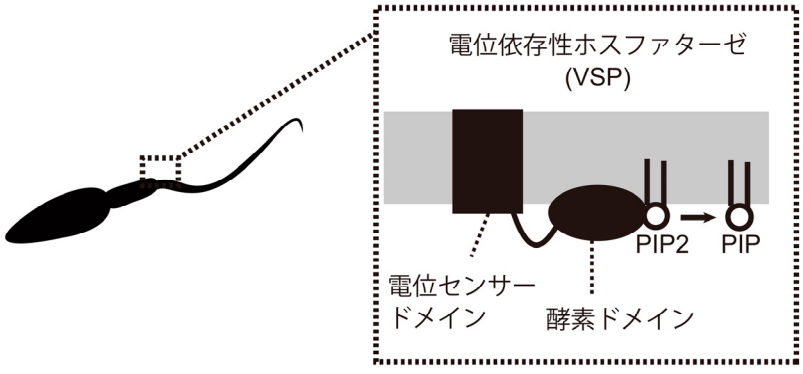
138　精子に存在する独自の膜電位感知メカニズムの解明	河合　喬文

【目的】脳波や心電図の計測から分かるように、我々の身体中では常に、「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教科書的には、主に「電位依存性イオンチャネル」が重要な役割を示すと考えられてきた。しかし最近になって我々は、これとは異なる電位感知蛋白質である、電位感受性フォスファターゼ（Voltage-sensing phosphatase : VSP）がマウスの精子で機能し、その運動性を制御していることを明らかにした。この VSP は細胞の膜電位に応じてイノシトールリン脂質へのフォスファターゼ活性を示すという、いわば「細胞の電気信号を化学信号に変換する」という分子である。興味深いことに、我々は精子の鞭毛上にイノシトールリン脂質の極性分布が存在することを明らかにし、これが VSP によって形成されていることも明らかにした（Kawai et al., PNAS, 2019）。一方で、これまでの研究では、このような VSP が精子の電気信号を成熟段階のどの段階で感知しているのか、またその空間的なイノシトールリン脂質の分布はどのようなメカニズムで形成されるのかについては明らかになっていない。そこで本研究では、精子の成熟過程に着目し、VSP によるイノシトールリン脂質の制御機構がどのような時間軸で生じてくるのかの検証、或いは検証を行うための準備を行った。

【方法】まず、VSP に Flag タグを融合させた蛋白質を発現する遺伝子改変マウスを作製し、VSP の詳細な分布を検証することを試みた。また様々な成熟段階にある精子を採取し、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。そのために様々な成熟段階の精子を、フローサイトメトリーや遠心法などによって分離し、その測定を東京医科歯科大学の佐々木雄彦教授に依頼することによって行った。最後に、マウス VSP の分子機能を検証するため、細胞発現系で測定可能なマウス VSP 分子を作製することを試みた。実験については、アフリカツメガエルの卵母細胞を用い、VSP 活性はこれによって制御される KCNQ2/3 電流を計測することで測定した。

【結果】VSP の局在については、遺伝子改変マウスについては予定通り作製されたものの、残念ながらその局在を可視化することが出来なかった。一方で、VSP の酵素活性については、試行錯誤の結果、各成熟段階の精子を分離することに成功し、またそのイノシトールリン脂質量をそのアイソタイプごとに測定できることも明らかとなった。さらに、マウス VSP についても、試行錯誤の結果、卵母細胞で発現するマウス VSP 分子の作製に成功し、これによって今まで明らかでなかった、マウス VSP の具体的な生理機能を明らかにすることに成功した。

精子に於いて電気信号が化学信号に変換されるメカニズム



精子成熟のタイミング？
精子における空間情報は？

138. 精子に存在する独自の膜電位感知メカニズムの解明

河合　喬文

大阪大学 大学院医学系研究科 統合生理学教室

Key words：電位依存性フォスファターゼ，精子，イノシトールリン脂質，電気信号

緒　言

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」が生成されており、この電気活動なくしては生命活動を維持することは不可能である。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、今ではその重要な分子として「電位依存性イオンチャネル」がその生成・感知に関わることが分かってきた。「電位依存性イオンチャネル」は数十種類もの分子群により形成され、ほぼ例外なく「電気信号」を感知する電位センサードメインと「イオン透過」を担うポアゲートドメインによって構成される。したがってこのような「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。一方で私の所属するグループでは、この電位センサードメインを持つにもかかわらずポアゲートドメインを持たず、更にはフォスファターゼドメインを有している珍しい蛋白質が電気信号を感知することを既に見出していた［1］。この電位感受性フォスファターゼ（Voltage-sensing phosphatase：VSP）は細胞の膜電位に応じてイノシトールリン脂質へのフォスファターゼ活性を示すという、いわば「細胞の電気信号を化学信号に変換する」という分子である。したがって、この分子の生体内での働きを明らかにすることは、生体内での新たな電気信号の感知システムを見出すことに繋がる。興味深いことに、我々は精子の鞭毛上にイノシトールリン脂質の極性分布が存在することを明らかにし、これがVSPによって形成されていることも明らかにした［2］。一方で、これまでの研究では、このようなVSPが精子の電気信号を成熟段階のどの段階で感知しているのか、またその空間的なイノシトールリン脂質の分布はどのようなメカニズムで形成されるのかについては明らかになっていない。そこで本研究では、精子の成熟過程に着目し、VSPによるイノシトールリン脂質の制御機構がどのような時間軸で生じてくるのかの検証、或いは検証を行うための準備を行った。

方　法

1. VSP-Flag タグ標識マウスの作製と精子におけるその発現の検証

これまで免疫細胞化学に使用可能であるVSP抗体が存在していないという問題があったため、この問題を克服するためにVSPがFlag×3によって標識されているマウスを作製することとした。具体的には大阪大学医学部附属動物実験施設の協力のもと、single-stranded oligodeoxynucleotides（ssODNs）を用いることで、VSPのC末端側に3つのFlagタグがタンデムに連結しているタグ標識マウスを作製した。スクリーニングの結果、目的の遺伝子改変マウスが得られていることを確認し、これらのマウスを交配していくことでヘテロ及びホモのタグ標識マウスを得ることに成功した。次に実際にVSP-Flagが精子で発現しているかどうかを、免疫細胞化学法ならびにウェスタンブロッティングによって検証した。

2. 異なる成熟段階の精子を用いたVSPの酵素活性の測定

精子の異なる成熟段階におけるVSP活性を測定したいと考えた。これまで、各成熟段階におけるVSPのタンパク質レベルでの発現について報告が存在しなかったため、この点を検証することにした。これまで我々が用いていた *VSP* 欠損マウスは、VSPの一部がtruncateしてVenusを融合させた機能欠損VSPを発現するマウスであった。本マウス

は、各成熟段階の精子における VSP 発現検証には適さない理由があったため、本実験には新たに微生物病研究所の伊川正人教授によって作製された *VSP* 欠損マウスを使用した。成熟個体の異なる精子を分離するために、フローサイトメトリーや遠心による分画法を組み合わせ、条件検討を行った。その結果、精巣の spermatid、精巣の精子、及び未成熟精子を上手く分画する条件を見出すことが出来た。そこで野生型或いは *VSP* 欠損型マウスを用い、これらの精子や精子前駆細胞からイノシトールリン脂質の量を解析した。具体的なイノシトールリン脂質の定量については、東京医科歯科大学の佐々木雄彦教授に依頼することによって行った。

3. マウス VSP の分子機能の詳細とその情報に基づいた新たな遺伝子改変マウスの作製

これまで、VSP の分子機能に関する検証についてはホヤやゼブラフィッシュなど、非哺乳類のものを用いた実験が積極的に行われ、マウスの VSP についてはその分子機能に関する知見が存在しないという問題が存在していた。その理由の一つとして、哺乳類の VSP では、他の動物種と比して、HEK やアフリカツメガエル卵母細胞などに発現させたときに、細胞膜へ上手く輸送されないという問題があった。そこで、この問題を克服するため、マウスの VSP を基として、その配列を人為的に操作することで、従来のマウス VSP と比較して細胞膜へ効率よく輸送される分子を作製することに成功した。今回、解析は、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。VSP の活性を正確に測定するため、PIP2 量の変化に対して高い感受性を有することが知られている K^+チャネル KCNQ2 および KCNQ3 の mRNA を VSP の mRNA と一緒に細胞へ注入し、二日から三日後に電流の測定を行うことによって計測した。測定は二本差し膜固定法によって行った。電極内液は 2 M KCl を充填し、細胞外液には ND96（2 mM KC1、96 mM NaCl、1 mM $MgCl_2$、1.8 mM $CaCl_2$、5 mM HEPES、pH 7.5）を使用した。

結果および考察

1. VSP-Flag タグ標識マウスの作製と精子におけるその発現の検証

前述の通り、VSP の C 末端が Flag×3 によって標識されているマウスを作製することに成功した。次にこのマウスの交配を重ねることによりホモマウスを作製した。この個体から精子を摘出し、Flag 抗体を用いることで精子における局在を検証した。しかし、残念ながら野生型の精子と比較して特異的な Flag のシグナルを検出することが出来なかった。また、Flag ホモマウス及び野生型マウスの精子から膜タンパク質を抽出し、Flag 抗体を用いてウェスタンブロッティングによる検証を行ったが、こちらも特異的なシグナルを検出することが出来なかった。その理由を探るためウェスタンブロッティングのみに使用可能である VSP 抗体を用い、VSP の発現量を両者で比較した。その結果、VSP- Flag×3 マウスの精子では VSP のシグナルが明らかに減少している様子が認められ（図 1）、このことから VSP の C 末端に Flag×3 を融合させること自体が精子における VSP の発現量低下を招いているものと考えられた。

2. 異なる成熟段階の精子を用いた VSP の酵素活性の測定

次に、精子の異なる成熟段階における VSP 活性を測定するために、成熟段階の異なる精子を分離する方法を検証した。精巣については、性質の異なる複数の種類の細胞が混在して存在していることが障壁となる。そこでコラゲナーゼ処理によって精巣を個々の細胞に分離した。精巣精子については遠心分離法を適用し、これを繰り返すことで、純度の高い精子得ることに成功した。次に精原細胞については、過去の報告から DAPI 染色を用いたフローサイトメトリーによる分離法が二報だけ報告されていたため、同様の手法を試みた。その結果、こちらについても純度の高いサンプルを得ることが出来た。またこの他にも未成熟の精巣上体精子を得たいと考えたが、こちらについては精巣上体頭部の精子を摘出することで、問題なく試料を得ることが出来た。次に、野生型および *VSP* 欠損型のマウスを用い、これらのサンプルを用い、東京医科歯科大学の佐々木雄彦教授に依頼してイノシトールリン脂質の測定を行った。その結果、問題なくイノシトールリン脂質を測定することに成功した。これにより、VSP が精子成熟のどの段階でその酵素活性を示しているのかについて、ヒントとなる結果を得ることが出来た。

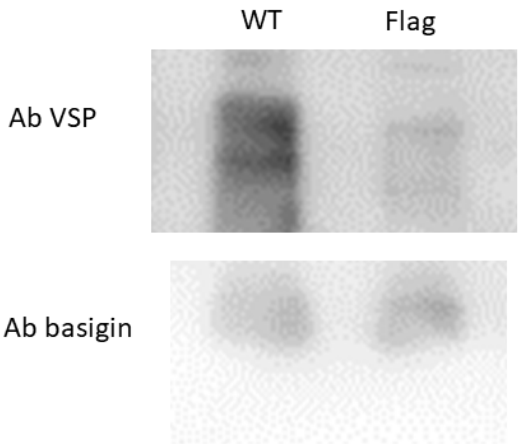


図 1. VSP-Flag タグ標識マウスにおける VSP 発現の検証結果

野生型及び VSP-Flag 標識マウスから成熟精子を摘出し、VSP の発現を検証した。野生型では VSP の発現が見られるのに対し、Flag 標識マウスでは十分なシグナルが見られなかった（上段）。一方、ポジティブコントロールとして用いた Basigin については、両方のサンプルにおいてシグナルを認めることができた（下段）。以上の検証結果から、VSP-Flag タグ標識マウスの成熟精子では、VSP 蛋白質の発現量自体が大きく低下していることが示唆された。

3. マウス VSP の分子機能の詳細とその情報に基づいた新たな遺伝子改変マウスの作製

試行錯誤の結果、アフリカツメガエル卵母細胞において発現するマウス VSP 分子を得ることが出来た。この分子ではマウス VSP の膜貫通領域と酵素領域が殆ど全て保存されているため、従来のマウス VSP と同様の酵素活性を示しているものと考えられる。このマウス VSP を KCNQ2/3 と共発現させ電流値の評価を行ったところ、0 mV 程の膜電位で活性が起きている様子が観察された（図 2）。したがって、マウス VSP の電位依存性も他の動物種のそれと電位依存性に大きな違いは存在しないことが改めて確認できた。また、精子の膜電位はおよそ 0 mV から−30 mV ほどの範囲にあることが我々の研究から分かっているため、この結果から、マウスの VSP が充分に精子の内因的な膜電位を感知して動作していることが推測された。

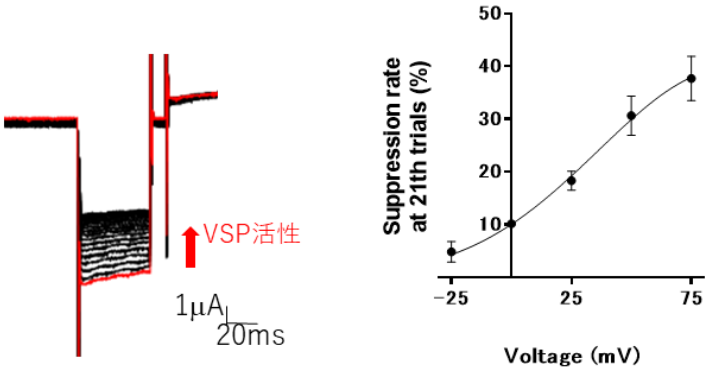


図 2. アフリカツメガエル卵母細胞を用いたマウス VSP の酵素活性の検出

アフリカツメガエル卵母細胞に、今回作製した改変型マウス VSP 及び、KCNQ2/3 チャネルを発現させた。VSP は 75 mV 1 秒のパルスを繰り返し与えることで活性化している。KCNQ2/3 電流が（図左）、VSP の活性化と共に徐々に小さくなってく様子が観察された（図左の赤矢印）。図の右にはこの電位依存性を示している。マウス VSP が 0 mV 以下でも活性化している様子が観察された。このことは、マウスの精子においても、VSP が実際に活性化しうることを示している。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学微生物病研究所の伊川正人教授、宮田治彦准教授、および東京医科歯科大学難治疾患研究所病態生理化学分野の佐々木雄彦教授である。

文　献

1） Murata Y, Iwasaki H, Sasaki M, Inaba K, Okamura Y. Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. Nature. 2005 Jun 30;435(7046):1239-43. Epub 2005 May 18. PMID: 15902207 DOI: 10.1038/nature03650.

2） Kawai T, Miyata H, Nakanishi H, Sakata S, Morioka S, Sasaki J, Watanabe M, Sakimura K, Fujimoto T, Sasaki T, Ikawa M, Okamura Y. Polarized PtdIns(4,5)P2 distribution mediated by a voltage-sensing phosphatase (VSP) regulates sperm motility. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Dec 17;116(51):26020-26028. Epub 2019 Nov 27. DOI: 10.1073/pnas.1916867116.