

哺乳類精子鞭毛の機能分子形態学

Morphological Studies of Functional Molecules Building Mammalian Sperm Flagella

飯田 弘, 栗尾 仁之, 金子たかね
Hiroshi Iida, Hitoshi Kurio and Takane Kaneko

^a九州大学大学院農学研究院動物学分野

要旨 精子はゲノムと卵活性化因子の運搬に特化した細胞であり、精子の運動、即ち鞭毛運動の分子基盤を理解することは精子を理解するために重要である。哺乳類精子鞭毛には軸糸に加え、それを取り囲む軸糸周辺構造体がある。軸糸周辺構造体は外側緻密線維、衛星線維、線維鞘、ミトコンドリア鞘からなり、軸糸と有機的に結合して鞭毛を構築している。そのため、哺乳類精子の鞭毛は軸糸のみから構成される下等動物の鞭毛よりも構造的に複雑である。これらを構成する分子の同定や機能解析により、少しずつ精子の構造や鞭毛運動の仕組みが解明されつつある。我々が最近研究対象としてきた分子を中心に、精子鞭毛内オルガネラの構造と機能について概説する。

キーワード：精子鞭毛、外側緻密線維、衛星線維、線維鞘、ミトコンドリア鞘

1. はじめに

精子は雄性ゲノムと卵活性化因子を卵母細胞へ運搬する役割を担っている。精子の形は無駄を一切省き、機能に徹した分子機械のように見える。円形の半数体精子細胞から精子への分化過程は、核クロマチンの濃縮、細胞質の伸長、アクロゾームや鞭毛の形成、余分な細胞質の放出など、他の細胞では見ることが出来ないドラマチックな形態変化を伴っており、そこに見事に調和した分子の共同作業が想像される。

我々はディファランシャルディスプレイ法によって、生後3週令以降のラット精巣に発現する新規遺伝子の探索を行ってきた。それらの中には、精巣のセルトリー細胞に特異的に発現する遺伝子も含まれているが¹⁾、多くは生殖細胞に発現する遺伝子である。生殖細胞に発現する遺伝子の中には、完成した精子の鞭毛に組み込まれるタンパク質をコードするものがある。また、発見した遺伝子を bait とした酵母 Two-Hybrid スクリーニングにより新たにクローニングした遺伝子の中にも、鞭毛構成タンパク質をコードするものもある。我々の研究室では、精子鞭毛に組み込まれる分子の局在をナノスケールレベルで明らかにするとともに、それらの分子ネットワーク解析を通じて、鞭毛軸糸と軸糸周辺構造体の構造解析を行っている。軸糸周辺構造体を構成する分子数はおそらく100以上ののぼると予測される。これらの解析には分子生物学的手法とともに、切片染色法による通常の免疫電顕に加え、包埋前染色法（精製した精子鞭毛をソニケーションによって部分

的に壊した後固定し、イムノゴールドを用いて染色する免疫電顕法）が非常に有効なツールとなる。目新しい方法ではないが、下記に紹介する精子内オルガネラに結合する分子の局在解析には、切片染色法よりも明瞭な結果を得る事ができる。

2. 精子鞭毛の全体構造と多様性

精子は頭部と鞭毛に分けられ、鞭毛はさらに中片、主部、終末部に分けられる（図 1a）。精子鞭毛の基本構造は微小管からなる軸糸である。軸糸は一組の中心微小管（central microtubules）とモーター分子ダイニンが付着した9個の外側二重微小管（outer doublet microtubules）からなる9+2構造を持ち、この軸糸構造は放射状スポーク（radial spoke）やネクシン（nexin）等によって維持されている。この鞭毛軸糸は動物界におけるほとんどの精子に見られる形質であり、ウニ精子やクラミドモナスなど下等生物の鞭毛を材料として、多くの構造解析研究がなされてきた。一方、粘性が高い雌性生殖洞を長時間泳がなければならぬ哺乳類、鳥類および爬虫類の精子では、鞭毛軸糸を取り囲むように軸糸周辺構造体、即ち、外側緻密線維（outer dense fibers）、衛星線維（satellite fibrils）、線維鞘（fibrous sheath）、および多数のミトコンドリアが存在する（図 1b および図 2）。精子における外側緻密線維と線維鞘の形成については文献^{2,3)}を参照されたい。この軸糸周辺構造体は、体外受精を行う動物種（下等動物、魚類、両生類）の精子鞭毛には存在せず、体内受精を行なう爬虫類以降の生物進化過程で獲得されてきた構造であり、精子鞭毛に構造的強度と弾性を与え、また軸糸との有機的結合により鞭毛運動のトルク増幅にも関わっている可能性が示唆されている。軸糸周辺構造体の構造は動物種により多様である。ジリスでは衛星線維が迷路様に高度に発達し、外側緻密線維

^a 〒 812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1
TEL: 092-642-2945; FAX: 092-642-2804
E-mail: iidahiro@agr.kyushu-u.ac.jp
2009年2月2日受付

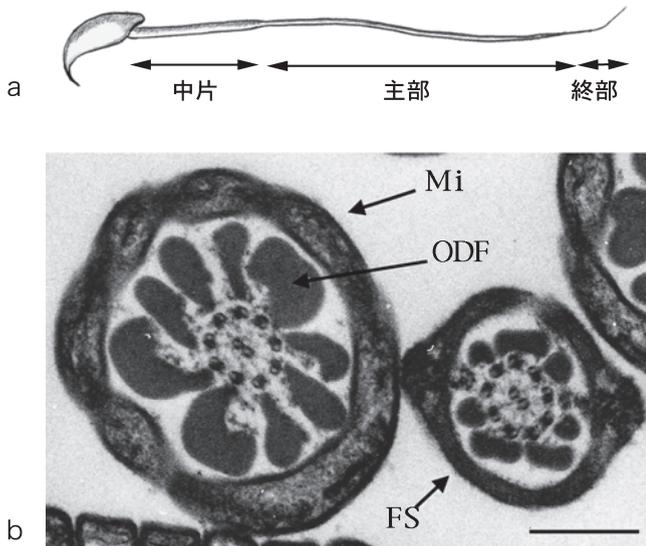


図1 (a) 齧歯類精子の模式図。鞭毛は中片，主部，終(末)部に分けられる。(b) ラット精子鞭毛の電顕写真(図の左は中片，右は主部の横断面)。ODF: outer dense fibers, FS: fibrous sheath, Mi: mitochondria, スケールバー: 0.3 μm 。

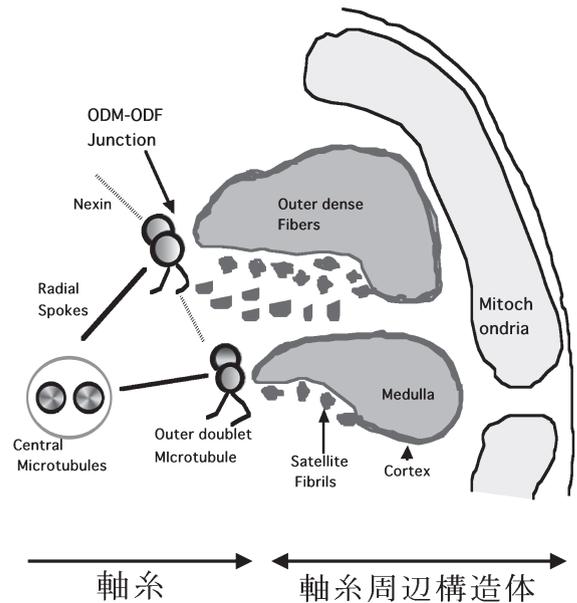


図2 鞭毛横断面の模式図。軸糸と軸糸周辺構造体の構成成分を示す。ODM-ODF junction は外側二重微小管と外側緻密線維の結合部を示す。

が鞭毛の外側に偏って存在している⁴⁾。食虫類スルクスでは外側緻密線維が不均等に分布し、2個の大きな外側緻密線維の内側に衛星線維が集中する傾向がある(図3)。鞭毛構成分子はこれまでに数多く報告されているが、それらを全て網羅することはできないので、以下、我々が研究対象としている分子に関連性があるタンパク質を中心として、軸糸周辺構造体の構成分子について概説する。

3. 外側緻密線維および衛星線維

外側緻密線維は構造的に皮質部(cortex)と髄質部(medulla)に分けられ、皮質部は衛星線維と構造的に連続している(図2)。外側緻密線維は、鞭毛中片では軸糸とミトコンドリア、鞭毛主部では軸糸と線維鞘の間に存在する。精子鞭毛の外側緻密線維は可溶化しにくい。皮質部は1% SDSによって可溶化されるが、髄質部は高濃度の尿素によっても部分的にしか可溶化されない。抽出物をSDS-PAGEにて展開することにより、多数のポリペプチドがゲル上に認められるが、クローニングされた分子は比較的少なく、外側緻密線維の主要タンパク質としてOdf1(27 kDa), Odf2(70~84 kDa), Odf3(110 kDa), Spag3(56 kDa)などが同定されている。Odf2は鞭毛特異的分子ではなく、中心体(centrosome)の成分としても機能しており⁵⁾、その遺伝子破壊は着床前致死をきたす⁶⁾。外側緻密線維のみを欠損するモデルマウスはこれまで報告されていないため、精子におけるその生理的機能については不明であるが、精子鞭毛の弾性的基盤あるいは鞭毛運動のトルク増幅等の役割があると考えられている。また、外側緻密線維には細胞内ATPの濃度調整に関わるアデニレートキナーゼ(AK-1, AK-2)が局在している⁷⁾。

我々は最近ディファランシャルディスプレイ法によって、

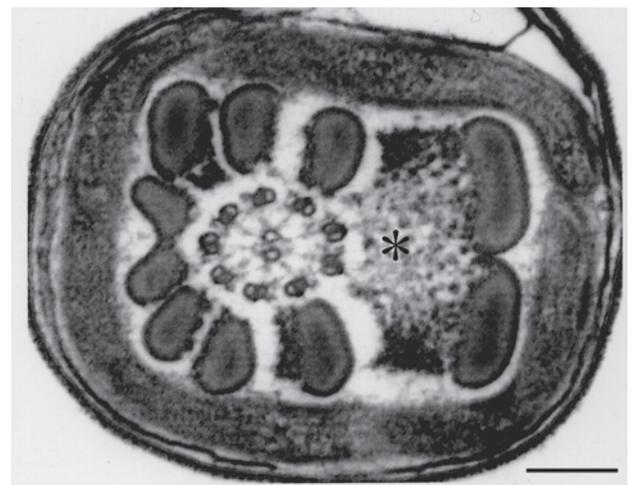


図3 スルクス精子鞭毛の電顕写真(図の*は集積した衛星線維を示す)。スケールバー: 0.15 μm 。

新規遺伝子 Spetex-1 をクローニングした。この遺伝子は生物種をこえて広く保持されており、coiled-coilモチーフと多数のシステインを持つことが特徴である。Spetex-1は精子鞭毛の外側緻密線維内側に局在し⁸⁾、おそらく衛星線維を構成する分子と思われる(図4)。また、Spetex-1をbaitとして酵母Two-Hybridスクリーニングを行ない、Tektin familyに属する新規分子Tektin4をクローニングした。Tektinは元々、ウニ精子鞭毛の軸糸を構成する微小管に結合する繊維性分子としてクローニングされた。ウニでは3分子種、Tektin A, B, Cが報告されており、いずれもcoiled-coilモチーフを持つ。我々が発見したTektin4はしかしながら軸糸ではなく、外側緻密線維の皮質部に局在する⁹⁾(図5)。後述するように新た

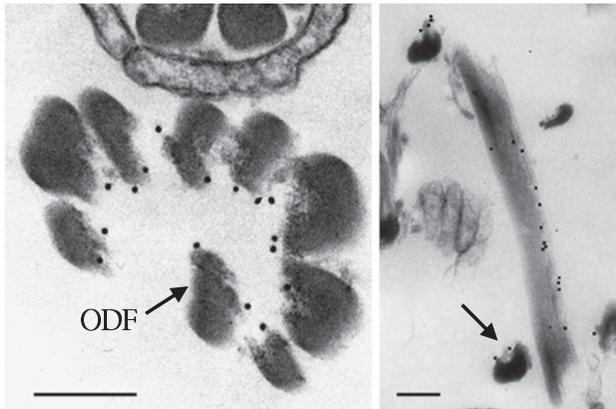


図4 ラット精子鞭毛における Spetex-1 の局在を示す免疫電顕像。10 nm イムノゴールドは外側緻密線維 (ODF) 内側部の衛星線維に認められる (右図矢印)。スケールバー: 0.2 μ m。

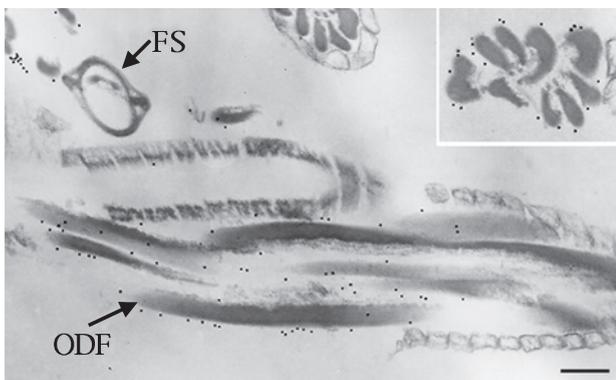


図5 ラット精子鞭毛における Tektin4 の局在を示す免疫電顕像。10 nm イムノゴールドは外側緻密線維 (ODF) に沿って認められ、線維鞘 (FS) には結合していない。Inset: 外側緻密線維横断面における Tektin4 の局在を示す。スケールバー: 0.2 μ m。

に発見された Tektin5 も軸糸には存在しない。培養細胞での発現解析から、Spetex-1 と Tektin4 は実際に細胞内で結合することが判明している。外側緻密線維皮質部に局在するもう一つの分子として Gcl-2 という分子をコードする遺伝子を最近クローニングした¹⁰⁾。Gcl-2 はゲノム上に重複して存在するイントロンレス遺伝子であり、現在 Gcl-2 と分子間結合するタンパク質の解析を行なっている。皮質部を構成する分子はおそらく多数であると推測され、それらが Wooley ら¹¹⁾によって報告されている striation (皮質部にある周期性を示す溝状構造物) の一部を構築しているのかも知れない。

Tektin2, Tektin3, Tektin4 に対してはノックアウトマウスが作成されている。Tektin2 KO 精子は鞭毛が屈曲し、運動性低下のため不妊性を示す。このマウス精子では、鞭毛軸糸のダイニンアームに異常が生じると報告されている¹²⁾。Tektin3 KO 精子は鞭毛の屈曲と運動性低下を示すが、妊性は維持される¹³⁾。Tektin4 KO 精子には形態学的な異常はほとんど認められないが、細胞内 ATP の非効率的消費のために、鞭毛運動を長時間維持できない¹⁴⁾。これらの結果は Tektin

分子が精子構造の維持や鞭毛運動に必須の成分であることを示している。我々は現在 Tektin2 の局在と Tektin2 に結合する分子の解析を行なっている。

4. 線維鞘

線維鞘は、精子成熟、受精能獲得、解糖、鞭毛運動、超活性化運動 (ハイパーアクチベーション) などのシグナル伝達に関わるタンパク質の scaffold (土台) として機能する役割を持つと考えられている。線維鞘を構成する主要タンパク質である AKAP4 (A-kinase-anchoring protein 4) は cAMP-dependent kinase (PKA), PI-3 kinase, SP17 などの分子と機能的に結合しており、AKAP4 欠損マウスの精子では線維鞘を欠く異常鞭毛が形成され、鞭毛運動の異常のため不妊をきたすとともに¹⁵⁾、線維鞘に元々結合している分子の解離が認められる。線維鞘にはその他に解糖系酵素である glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-s (GAPDH), aldolase, pyruvate kinase, hexokinase-1 (HK1-S) や fibrous sheath interacting protein1 and 2 (FSIP1 and 2), AKAP3 などが局在すると報告されている。最近精子の鞭毛運動あるいは超活性化運動には、ミトコンドリア TCA 回路により産出される ATP でなく、おもに線維鞘に存在する解糖系酵素により産出される ATP が使用されていることが *in vitro* の代謝実験やノックアウトマウスにおける実験から明らかにされている^{16,17)}。

5. ミトコンドリア

哺乳類精子鞭毛の中片では、多数のミトコンドリアが軸糸を取り巻いてミトコンドリア鞘を形成している。ミトコンドリアとその内側に存在する外側緻密線維の間には、低電子密度の不定形物質が存在している。ミトコンドリア鞘を形成する個々のミトコンドリア同士は強く接着しており、精子をソニケーション処理により部分的に破壊しても、ミトコンドリアをバラバラにする事は困難である。このミトコンドリア同士の接着因子として、我々は最近 Spergen-1 という新規分子を発見した¹⁸⁾。Spergen-1 は鞭毛中片のミトコンドリアに局在し (図6)、その N 末にミトコンドリア移行シグナルを持つ。C 末にはミトコンドリア同士の接着を促進する機能を持つ部位があり¹⁹⁾、培養細胞に過発現させると細胞内のミトコンドリアをすべて凝集してしまう (図6)。鞭毛においてミトコンドリア鞘が形成される際、精子細胞内のミトコンドリアは軸糸方向へと集合し、外側緻密線維の外側に見事なまでに整然と配列してゆく²⁰⁾。その際、個々のミトコンドリア間の接着分子として Spergen-1 は機能すると考えられる。

鞭毛のミトコンドリア外膜には格子状に規則正しく配列した分子が存在しているが²¹⁾、その構成分子や機能は不明である。我々は最近ミトコンドリア外膜に局在する新規分子として Tektin5²²⁾ や Tarm (未発表) を同定した。これらの分子がミトコンドリア外膜の高分子複合体を構成している可能性が考えられる。

鞭毛運動には解糖系酵素により産出される ATP が使用され

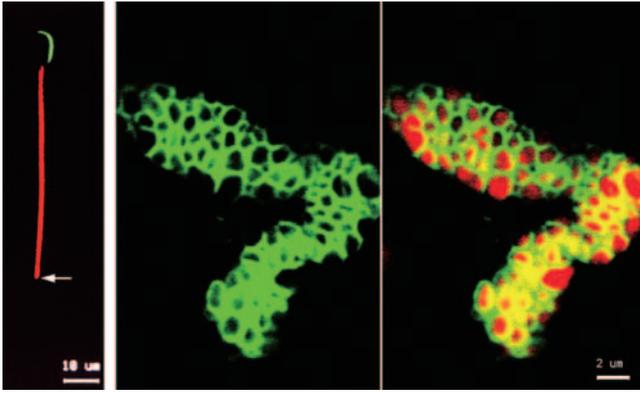


図6 共焦点走査型レーザー顕微鏡像による Spergen-1 の局在解析。(左) ラット精子鞭毛における Spergen-1 の局在。Spergen-1 (赤色) は鞭毛中片に存在する。矢印は中片と主部の境界を示す。アクロゾームは緑色に染色されている。(右) Spergen-1 遺伝子 C 末端に緑色蛍光蛋白質 EGFP を付加して構築した発現ベクターを COS-7 培養細胞に導入した。12 時間培養後、生細胞のミトコンドリアに蓄積する赤色蛍光マーカーであるマイトトラッカーと細胞をインキュベーションした後に細胞を固定し、共焦点走査型レーザー顕微鏡にて観察した。COS-7 培養細胞に過発現させた Spergen-1-EGFP (緑色) とミトコンドリア (赤色) の分布を示す。凝集したミトコンドリア間には発現した Spergen-1-EGFP が存在している。

表1 本講座で取り扱った分子の名称とそれらの精子オルガネラにおける局在

オルガネラ	分子の名称	
外側緻密線維および衛星線維	Odf1	Tektin4
	Odf2	Gcl-2
	Odf3	AK-1, AK-2
	Spag3	Spetex-1
ミトコンドリア	Spergen-1	Tarm
	Tektin5	
線維鞘	AKAP4	aldolase
	PKA	pyruvate kinase
	PI-3 kinase	HK1-S
	SP17	FSIP1 and 2
	GAPDH	AKAP3

ていることが報告されているが、鞭毛のミトコンドリアが全く機能していないとは考えにくく、何らかの生理的環境下のもとでは(例えば受精の際や雌性生殖洞のある場所において)、TCA 回路から産出される ATP が精子の鞭毛運動に供給されるのかもしれない。あるいは、鞭毛運動のために使用される ATP の供給源は、動物種によって異なることも考えられる。

6. おわりに

哺乳類精子鞭毛に局在する分子は多数報告されているが、蛍光抗体法などによる解析では、鞭毛のどこに存在しているのかわからない。哺乳類精子鞭毛には軸糸、外側緻密線維、衛星線維、線維鞘、およびミトコンドリア鞘があり、これら

が有機的に統合されているため軸糸のみからなる下等動物の鞭毛よりも構造的に複雑で、また構成分子も多い。今後、分子の同定、発現、局在およびそれらの相互作用、KO マウスの解析などを通して、哺乳類精子の構造と機能が少しずつ解明されてゆくと思われる(本講座で取り扱った分子は、表1にまとめて記載した)。また、前述したように精子の構造は動物種によって多様であり、特に頭部(核とアクロゾーム)の形態は種特異性を示す。例えば、齧歯類精子の頭部は一般に鎌状を呈するが、食虫類シンスのアクロゾームは巨大な団扇状を呈する²³⁾。精子の運動や受精の機構が動物種によって多様であることを示唆しているように思える。

文 献

- 1) Kurio, H., Murayama, E., Kaneko, T., Shibata, Y., Inai, T. and Iida, H.: *Biol. Reprod.*, **79**, 1062–1073 (2008)
- 2) Irons, M.J. and Clermont, Y.: *Am. J. Anat.*, **165**, 121–130 (1982)
- 3) Irons, M.J. and Clermont, Y.: *Anat. Rec.*, **202**, 463–471 (1982)
- 4) Phillips, M.D.: “SPERMIOGENESIS”, Academic Press INC, New York and London (1974)
- 5) Ishikawa, H., Kubo, A., Tsukita, S. and Tsukita, S.: *Nat. Cell Biol.*, **7**, 517–524 (2005)
- 6) Salmon, N.A., Reijo Pera, R.A. and Xu, E.Y.: *Genesis*, **44**, 515–522 (2006)
- 7) Cao, W., Haig-Ladewig, L., Gerton, G.L. and Moss, S.B.: *Biol. Reprod.*, **75**, 492–500 (2006)
- 8) Iida, H., Honda, Y., Matsuyama, T., Shibata, Y. and Inai, T.: *Mol. Reprod. Dev.*, **73**, 342–349 (2006)
- 9) Iida, H., Honda, Y., Matsuyama, T., Shibata, Y. and Inai, T.: *Mol. Reprod. Dev.*, **73**, 929–936 (2006)
- 10) Murayama, E., Katoh, M., Kanebayashi, A., Kaneko, T., Shibata, Y., Inai, T. and Iida, H.: *Reproduction*, **134**, 749–756 (2007)
- 11) Woolley, D.M.: *J. Cell Biol.*, **49**, 936–939 (1971)
- 12) Tanaka, H., Iguchi, N., Toyama, Y., Kitamura, K., Takahashi, T., Kaseda, K., Maekawa, M. and Nishimune, Y.: *Mol. Cell Biol.*, **24**, 7958–7964 (2004)
- 13) Roy, A., Lin, Y.N., Agno, J.E., Demayo, F.J. and Matzuk, M.M.: *Mol. Reprod. Dev.*, In press. (2008)
- 14) Roy, A., Lin, Y.N., Agno, J.E., DeMayo, F.J. and Matzuk, M.M.: *FASEB J.*, **21**, 1013–1025 (2007)
- 15) Miki, K., Willis, W.D., Brown, P.R., Goulding, E.H., Fulcher, K.D. and Eddy, E.M.: *Dev. Biol.*, **248**, 331–342 (2002)
- 16) Miki, K., Qu, W., Goulding, E.H., Willis, W.D., Bunch, D.O., Strader, L.F., Perreault, S.D., Eddy, E.M. and O’ Brien, D.A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 16501–16506 (2004)
- 17) Mukai, C. and Okuno, M.: *Biol. Reprod.*, **71**, 540–547 (2004)
- 18) Doiguchi, M., Yamashita, H., Ichinose, J., Mori, T., Shibata, Y. and Iida, H.: *Biol. Reprod.*, **66**, 1462–1470 (2002)
- 19) Doiguchi, M., Mori, T., Toshimori, K., Shibata, Y. and Iida, H.: *Dev. Biol.*, **252**, 127–137 (2002)
- 20) Ho, H.C. and Wey, S.: *Microsc. Res. Techn.*, **70**, 719–723 (2007)
- 21) Friend, D.S. and Heuser, J.E.: *Anat. Rec.*, **199**, 159–175 (1981)
- 22) Murayama, E., Yamamoto, E., Kaneko, T., Shibata, Y., Inai, T. and Iida, H.: *Mol. Reprod. Dev.*, **75**, 650–658 (2007)
- 23) Kaneko, T., Iida, H., Bedford, J.M. and Mori, T.: *Biol. Reprod.*, **65**, 544–553 (2001)