

cell-cell adhesion to fusion. *Scientific Reports* 1, Article number: 68

3) Gokoh M, Nishio M, Nakamura N, Matsuyama S, Nakahara M, Suzuki S, Mitsumoto M, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Yuo A, Saeki K. Early senescence is not an inevitable fate of human-induced pluripotent stem-derived cells. *Cell Reprogram*. 2011;13(4):361-370.

4) Tateno H, Toyota M, Saito S, Onuma Y, Ito Y, Hiemori K, Fukumura M, Matsushima A, Nakanishi M, Ohnuma K, Akutsu H, Umezawa A, Horimoto K, Hirabayashi J, Asashima M. Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. *J Biol Chem*. 2011; 286(23):20345-20353.

5) Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, Akutsu H, Umezawa A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet*. 2011; 7(5):e1002085.

6) Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Okino N, Ito M, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Lipid rafts enriched in monosialylGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos at cleavage stage. *BMC Dev Biol*. 2011;11:22.

7) Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem*. 2011; 286(13):11593-11603.

2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

加齢と受精現象に関する研究

研究分担者 宮戸 健二

国立成育医療研究センター研究所 生殖・細胞医療研究部 室長

研究要旨

本研究では、卵子と精子の細胞膜に局在する E-cadherin と β -catenin の受精における機能解析を行った。E-cadherin と β -catenin の局在は、共に細胞膜に局限しており、生化学的に複合体を形成していること、受精によって卵子と精子の細胞膜が接着した直後に細胞膜での局在が消失することが明らかになった。更に、卵特異的遺伝子欠損マウスを作製して解析を行ったところ、 β -catenin 欠損卵子では、精子との細胞接着能が有為に低下した。また、細胞接着と細胞融合のメカニズムは、別々のタンパク質によって制御されているが、タンパク質分解系の特異的阻害剤で処理された卵子は、 β -catenin の細胞膜からの消失が遅延し、卵子と精子の細胞融合率が低下することが示された。本研究の成果として、未解明であった卵子と精子の細胞接着のメカニズムの一端が明らかにすることができた。

A. 研究目的

加齢にともなう生殖能力の低下は古くから知られてきた。特に、卵子の老化は 30 歳代後半から急速に進行すると考えられており、女性の晩婚化は、出産にとって大きなリスクとなっている。

卵子の受精能力を回復・維持させる研究がおこなわれているが、受精の分子メカニズムに関する科学的知見が不十分なため、卵子の機能異常や機能改善に関する分子レベルでの指標が設定できず、卵子の加齢度合いの進行状況を診断することができないのが現状である。

我々は、遺伝子欠損マウスを用いた分子生物学的および生化学的アプローチから、膜 4 回貫通型タンパク質 CD9 が受精の膜融合に必須であることを報告した (Miyado *et al.* *Science*, 2000; Miyado *et al.* *PNAS*, 2008)。一方、卵子と精子の細胞接着のメカニズムは、教科書的な書籍にも記載されているインテグリンと ADAM ファミリーの関与が、遺伝子欠損マウスの解析によって否定されてしまった後、不明のままである。

本研究では、上皮細胞の細胞接着因子として知られる E-cadherin と細胞内領域の結合タンパク質 β -catenin が卵子および精子の細胞膜に局限していることに着目し、それら因子の卵子と精子の細胞接着における役割について検討した。

B. 研究方法

(1) 試料の作製

モデル動物として、8~12 週齢の性成熟した C57BL/6 系統のマウスを用いた。卵子は過排卵処理されたマウスの卵管膨大部より採取された。精子は同じ系統の 8~12 週齢の性成熟した雄マウスの精巢上体から集められた。

(2) 体外授精

8~12 週齢の性成熟した C57BL/6 系統の雌マウスから集められた卵子を、受精培地 (TYH 培地) を含むドロップ内に集め、事前に TYH 培地で 2 時間培養し、受精能を獲得させた精子を $1.5 \times 10^5/\text{ml}$ の最終濃度になるよう添加し、6、24 時

間培養、固定処理をした後、授精効率、融合精子数の測定を測定し、更に、免疫染色法によってタンパク質の局在解析を行った。また、卵子を取り囲む細胞外マトリックスである透明帯を、酸性タイロド液への数十秒の暴露によって除去した後、事前にTYH培地で2時間培養した精子を $1.5 \times 10^5/\text{ml}$ の最終濃度になるよう添加し、1時間培養後、卵子の細胞膜に接着した精子数を数えることにより、細胞接着能を定量化した。更に、卵子から精子への蛍光試薬である6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)の移行を利用して、卵子に融合した精子数も定量化した。

(3) 免疫染色

2%パラホルムアルデヒド、0.1%ホルムアルデヒドを含むHEPES溶液(pH8.0)(HBS)で処理した標本を3%牛血清を含む溶液で希釈した1次抗体と2時間反応させ、洗浄後Alexa488またはAlexa564結合2次抗体と1時間反応させた。同時に、細胞の核をDAPIで染色した。蛍光像の観察には、共焦点レーザー顕微鏡(LSM510, Zeiss)を用いた。撮影した写真の蛍光強度からヒストグラムを作成し、細胞膜での局在の変化を定量化した。

(4) ウェスタンブロット解析

HBS溶液中に集められた卵子および精子にSDSサンプルバッファを加え、沸騰処理し、遠心処理によりDNA成分を沈殿させた後、上清をサンプルとして用いた。SDS-PAGEにより展開した後、PVDF膜に転写し、1次抗体と室温2時間の反応を行った後、Horseradish Peroxidase (HRP)結合2次抗体と反応させ、洗浄の後、ECL検出キット(GEヘルスケア)により、抗体特異的に結合するタンパク質を検出した。

約1,000個のマウス卵子および1匹分の精巣上体精子を集めた後、タンパク質

複合体形成の有無について、免疫沈降法を用いて解析を行った。

(5) 卵特異的 β -catenin、E-cadherin、 α -catenin欠損マウスの作製

それぞれの遺伝子の両端にバクテリオファージ由来のLoxP配列を挿入したマウスを米国ジャクソン研より購入した。ジャクソン研のBB Knowles教授より、卵特異的にCre-recombinaseを発現するマウスを提供してもらい、交配によって卵特異的にそれぞれの遺伝子が欠損したマウスを3系統作製した。

(6) 統計処理

卵子の細胞膜に接着した精子数、融合精子数、2細胞期胚に発生が進んだ胚の数を測定した後、結果を t 検定により解析することにより、有為差について検定を行った。

(7) 倫理面への配慮

(独)国立成育医療研究センター動物実験委員会、遺伝子組換え委員会に実験計画を申請・承認の後(承認番号04-004および5-9)の実験指針に基づいて適切な管理基準の下で実験を行った。

C. 研究結果

(1) 卵子、精子におけるE-cadherin、 β -cateninの局在解析

野生型マウスの卵子および精子を採取し、免疫染色によってタンパク質の局在を調べた。 β -catenin、E-cadherinの局在は、共に卵子の細胞膜および細胞膜直下に認められ、細胞骨格の一つであるアクチンの突起上の局在と一致した(図1)。しかし、 β -cateninとアクチンの結合を介在すると考えられている α -cateninの局在は卵子の細胞質の中心部分に収束しており、E-cadherin、 β -cateninとは明らかに異なっていた。更に、E-cadherinおよび β -cateninは精子細胞膜にも存在することが、ウェスタンブロット解析によっても確認された

(図 2)。また、精子および卵子における β -catenin/E-cadherin 複合体の形成については、免疫沈降によって確認された (図 3)。

(2) β -catenin 欠損卵子の受精能に関する検討

β -catenin^{LoxP/LoxP} マウスと卵特異的に Cre-recombinase を発現するトランスジェニックマウスの交配によって、卵特異的に β -catenin を欠損させたマウス (β -catenin^{LoxP/LoxP} ZP3-cre) を作製した。 β -catenin 欠損卵子は、形態学的には野生型卵子と同様に形成され、野生型マウスと同等数の卵子が排卵されることがわかった。そこで、E-cadherin の卵子における局在を解析したところ、 β -catenin の消失にともない、E-cadherin のシグナルが細胞質内に観察され、細胞膜に局在できなくなることがわかった。

次に、体外授精によって β -catenin 欠損卵の受精能力を調べたところ、卵丘細胞や透明帯が存在する場合は、精子との融合効率、2 細胞期胚への移行効率の低下は観察できなかった。しかし、卵丘細胞および透明帯を除去した卵子では、精子との接着した精子数が少なく、その結果として精子の融合する頻度も有為に低いことがわかった (図 4)。以上の結果は、 β -catenin および E-cadherin が精子と卵子の細胞接着に重要な役割を果たしていることを示唆している。

(3) 細胞接着前後での β -catenin の局在変化に関する検討

体外授精によって受精能を調べる過程で、卵子および精子の細胞膜における β -catenin の局在についても観察を行った。その結果、最初は精子と卵子の細胞膜直下に局在していた β -catenin が、細胞膜が接着して少なくとも 30 分以内に、細胞膜の裏打ちから細胞膜から離れ、更に、蛍光シグナルが明らかに低下することが観察された (図 5)。以上の

結果は、細胞接着に依存した何らかのシグナルによって、 β -catenin の細胞膜の裏打ちからの遊離と、それに続くタンパク質分解が起こっている可能性を示している。

(4) タンパク質分解阻害剤を用いた β -catenin の分解の阻害と、膜融合への異常効率についての検討

体外授精に用いる前に、卵子をユビキチンを介したタンパク質分解系の特異的阻害剤であるユビキチン活性化酵素 E1 阻害剤 (UBE1-41) (BIOGENOVA) (10 μ M) で 1 時間処理することにより、精子と卵子の細胞接着および細胞融合の効率を調べた。その結果、卵子の細胞膜に接着する精子数は正常レベルであったものの、細胞融合の効率が有為に低下した。一方、 β -catenin 欠損卵子を UBE1-41 で処理した場合は、融合効率はコントロール卵子と比べて、差が認められなかった。以上のことから、 β -catenin は精子と卵子の細胞接着に重要な役割を果たすとともに、細胞接着後の速やかな細胞膜からの遊離および分解が、膜融合への移行に関与していることを示唆している。

D. 考察

β -catenin、E-cadherin は上皮細胞の細胞接着を制御するタンパク質である。上皮細胞以外にも、存在することが調べており、卵子でも細胞膜に局在する。本研究から、精子にも両者は細胞膜に存在することがわかり、精子と卵子の細胞接着に関わっていることが推測された。一連の解析から、 β -catenin/E-cadherin 複合体が精子および卵子の細胞膜に存在しており、受精での細胞接着に機能していることが明らかになった。更に、細胞接着後に、 β -catenin の速やかな細胞膜からの消失が起こることが判明し、 β -catenin が細胞接着だけでなく、細胞融合への移行にも関与していることが示

唆された。

本研究の成果から、世界に先駆けて、受精における細胞接着から、その後の膜融合への移行の分子メカニズムの一端を明らかにすることができた。この結果から、卵子の受精能力についての新しい指標を示すことができた。今後は、卵子が有するタンパク質分解のメカニズムを明らかにすることにより、受精のメカニズムについて、更に解析を進めると共に、得られた結果をヒト卵子の加齢の進行状況の診断、および治療法の開発に努めたい。

E. 結論

本研究から、精子と卵子の細胞接着には β -catenin/E-cadherin 複合体が関与しており、その後の膜融合への移行には β -catenin の細胞膜の裏打ちからの遊離と分解が関わっていることが明らかになった。

F. 研究発表

1. Zhang J, Dong J, Gu H, Yu S, Zhang X, Gou Y, Xu W, Burd A, Huang L, Miyado K, Huang Y, Chan HC. CD9 is critical for cutaneous wound healing through JNK signaling. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(1): 226-36 (2012) .
2. Ito M, Imai M, Muraki M, Miyado K, Qin J, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Hosoi Y, Saito H, Takahashi Y. GSTT1 is upregulated by oxidative stress through p38-MK2 signaling pathway in human granulosa cells: possible association with mitochondrial activity. *Aging*, 3(12):1213-23 (2011).
3. Takezawa Y, Yoshida K, Miyado K, Sato M, Nakamura A, Kawano N, Sakakibara K, Kondo T, Harada Y, Ohnami N, Kanai S, Miyado M, Saito

H, Takahashi Y, Akutsu H, Umezawa A. β -catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion. *Scientific Reports*, 1: Article 68 (2011) (Miyado K is a corresponding author) .

4. Sato B, Katagiri Y, Miyado K, Okino N, Ito M, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Lipid rafts enriched in monosialylGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos at cleavage stage. *BMC Dev Biol*, 11: 22 (2011).

G. 知的財産権 特になし

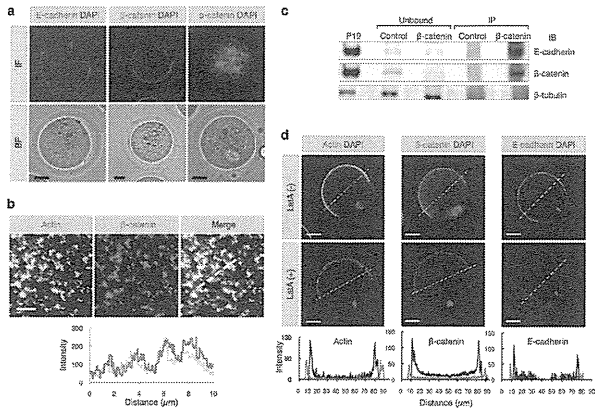


図 1. 卵細胞膜における E-cadherin、 β -catenin、アクチン繊維の共局在
 (a) E-cadherin (赤), β -catenin (赤), α -catenin (緑) の免疫染色
 (b) β -catenin とアクチンの共局在
 (c) E-cadherin/ β -catenin 複合体形成の免疫沈降による解析
 (d) アクチン重合阻害剤による E-cadherin、 β -catenin の局在変化

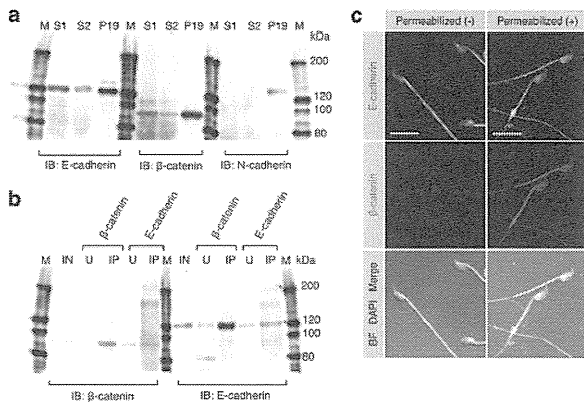


図 2. 精子における E-cadherin/ β -catenin 複合体形成の生化学的解析
 (a) ウェスタンブロット解析による E-cadherin, β -catenin, N-cadherin の発現解析
 (b) 免疫沈降による E-cadherin/ β -catenin 複合体形成の解析
 (c) 免疫染色による E-cadherin, β -catenin の局在解析

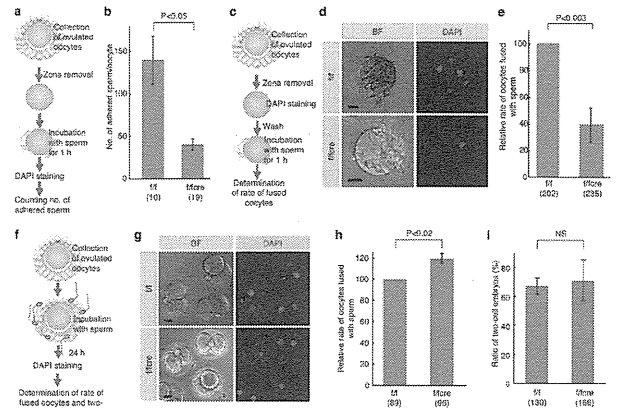


図 3. β -catenin 欠損卵子の受精能の検討
 (a) 透明帯除去卵子での接着アッセイの流れ
 (b) 卵細胞膜に接着した精子数の測定
 (c) 透明帯除去卵子での融合アッセイの流れ
 (d) 融合精子の顕微鏡画像
 (e) 融合精子数の測定
 (f) 2 細胞期胚の形成アッセイの流れ
 (g) 2 細胞期胚の顕微鏡画像 (h, i) 測定

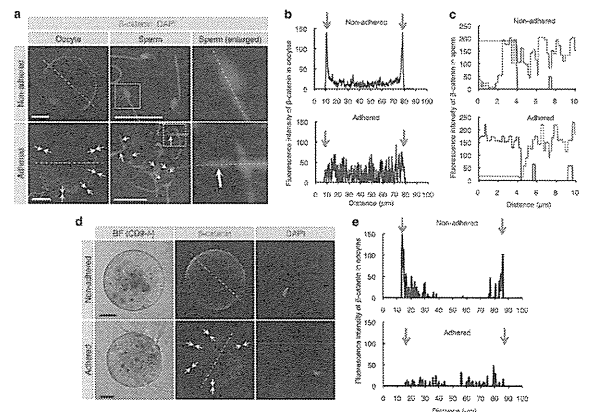
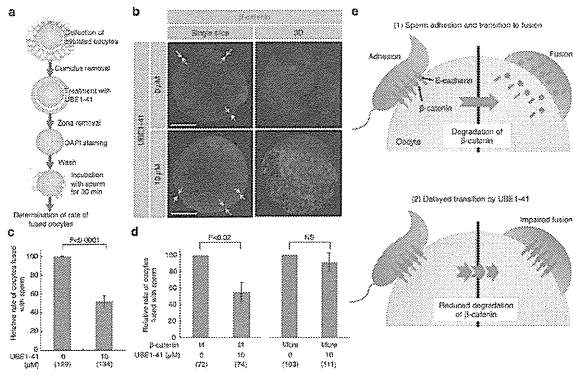


図 4. 精子と卵子の接着直後に起こる β -catenin の細胞膜からの消失
 (a) 野生型卵子での β -catenin の局在変化
 (b) デンシトメロリーによる卵子の画像解析
 (c) デンシトメロリーによる精子の画像解析
 (d) CD9 欠損卵子での β -catenin の局在解析
 (e) デンシトメロリーによる CD9 欠損卵子の画像解析

図 5. ユビキチン化阻害剤 UBE1-41 処理の受精能に対する効果



(a) 阻害剤処理アッセイの流れ

(b) 顕微鏡画像

(c) 野生型卵子での検討

(d) β -catenin 欠損卵子での比較検討

(e) モデル図

高血圧症と妊孕性
ー受精機構におけるACE2の機能解析ー

研究分担者 岡村 匡史
国立国際医療研究センター研究所 感染症制御研究部 室長

研究要旨

ACE2 は心臓及び腎臓に強く発現し、血圧調整機構のレニン- アンギオテンシン系(RAS)において、ACE と共に血圧調整に深く関与することが広く知られている。ACE は精巣および精子で発現し、ACE ノックアウト (KO) マウスでは、精子-卵透明帯結合能不全と精子の輸卵管への到達障害による雄性不妊が知られている。そのため、ACE2 は ACE と同様、受精過程に重要な機能があると考え、受精過程における ACE2 の機能解析を行った。ACE2 ノックアウトマウスでは、精子-卵透明帯通過能が亢進し、精子前培養培地中におけるアンギオテンシン II の活性も上昇していた。さらにアンギオテンシン II は濃度依存的に先体反応を亢進した。

以上の結果から、ACE2 の機能を阻害すると、精子先体反応が促進し、卵透明帯通過精子数が増加することから、ACE2 は精子受精過程、特に精子先体反応において、負の制御を行う重要な分子であると考えられる。さらに ACE2 の機能阻害により上昇したアンギオテンシン II は、濃度依存的に先体反応を亢進することから、精子先体反応においても RAS カスケードが機能していることが示唆された。

A. 研究目的

近年、女性の晩婚に伴う妊娠希望時の年齢の上昇や、生活習慣病患者数の増加による降圧剤の服用と妊孕性減弱の関連が指摘されている。血圧調整機構のレニン- アンギオテンシン系(RAS)において、ACE と ACE2 は拮抗的に働き、アンギオテンシン (1-7) およびアンギオテンシン II は、それぞれ血管を拡張および収縮し、血圧調整に関与することが広く知られている。

ACE2 は 2000 年に ACE のホモログとして同定され、ACE とアミノ酸レベルで 40%一致し、61%は類似した構造を有している。ヒト、マウス、ラットにおいて、ACE2 mRNA は精巣や循環器、消化器で強く発現しており (FEBS Letters, 2002、Peptides, 2005)、マウスおよびラットにおいて、ACE2 タンパク質は心臓、腎臓、脳で強く発現している (Peptides, 2005)。

さらに、ラット精巣では、ライディッヒ細胞に発現していることが報告されている (Endocrinology, 2004)。

ACE は、精巣および精子で発現し、さらに ACE ノックアウト (KO) 雄マウスは、不妊である (Nature, 1995)。その原因は、精子の輸卵管への到達障害と卵子透明帯への結合障害が報告されている (Proc Natl Acad Sci USA, 1998)。さらに近年、ACE が細胞表面から TESP5 および PH-20 などのグルコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型蛋白質を遊離する GPI アーゼ活性を有している事が見出され、ACE KO マウス精子では、受精に関与する精子膜上の GPI アンカー型蛋白質が全く遊離されない為、精子-卵透明帯結合能不全による雄性不妊になることが示された (Nature medicine, 2005)。

近年 RAS は、心臓、脳、脾、血管壁、

子宮-胎盤などの多くの組織でも存在が明らかになってきている。しかし、受精における ACE と ACE2 および RAS の関与については、明らかになっていない。

そこで本研究では、ACE2 に ACE と同様、受精に重要な機能があると考え、受精機構における RAS の関与を明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

1. 動物

ACE2 および CD9 ノックアウトマウスは、それぞれ秋田大学久場敬司博士および成育医療研究センター宮戸健二博士より分与をうけた。ACE ノックアウトマウスは、ジャクソン研究所より購入した。コントロール系統には C57BL/6N^{Cr} (日本 SLC) を使用した。

すべて SPF 動物として飼育され、照明時間は明 12 時間 (8:00~20:00)、暗 12 時間 (20:00~8:00)、室温 23±2°C、湿度 40~60% という飼育環境であった。水および標準飼料 (CE-2、日本クレア) は自由に摂取させ、Specific Pathogen Free 環境下で飼育した。

2. アンジオテンシン II 活性測定

成熟 ACE2 ノックアウト、C57BL/6N 雄マウスから精子を採取し、精子を 4 時間 HTF 培地中で前培養した。精子培養液を 150,000×rpm, 15 分間遠心し、上清を凍結乾燥し、EIA kit Buffer で融解し、これを Angiotensin II EIA kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc) を用いてアンジオテンシン II 濃度を測定した。

3. 表現型解析

1) 先体反応の評価

ACE2 ノックアウト雄マウスの精巢上体尾部より精子を採取し、HTF(BSA-)培地中で前培養した。各濃度のアンジオテンシン II を添加し、PBS で洗浄後、4% パラフォルムアルデヒドで固定した。CBB で染色後、スライドガラスへ塗抹し、倒立顕微鏡下で先体の有無を観察し

た。

2) 精子透明帯通過能の評価

CD9 ノックアウト雌マウスに過排卵処理を施し、卵管膨大部より未受精卵を採取した。上記と同様に前培養した精子を、150 sperm/ μ l になるように添加し、37°C で 5 時間培養後、ガラスキャピラリーで卵子を洗浄し、2%ホルマリンで固定後、ヘキスト染色により囿卵腔内精子数をカウントした。

(倫理面への配慮)

動物実験を行なう際には、動物実験計画書を国立国際医療研究センター動物実験委員会に提出し、承認を受けた後実施した。動物実験の実施に当たっては、「国立国際医療研究センターにおける動物実験に関わる指針」を遵守し、実験動物に無用な苦痛を与えないよう麻酔薬の投与、保安等に留意するとともに、実験動物の状態を定期的に観察し、必要に応じ適切な処置を施した。

C. 研究結果

1. ACE2 ノックアウトマウス精子の透明帯通過能

ACE2 ノックアウトマウス精子は、精子-卵透明帯結合能、精子先体反応が亢進されていることから、卵透明帯通過能を検討した。CD9 ノックアウトマウス卵子は、卵子細胞質の融合不全により精子が細胞質に融合できず囿卵腔内に留まる事が知られている。そのため、透明帯を通過した精子は、囿卵腔内に留まるため、囿卵腔の精子をカウントすることにより、精子の卵透明帯通過能を評価することができる。定法に従い、CD9 ノックアウトマウスの未受精卵に、C57BL/6N および ACE2 ノックアウトマウス精子を添加し、精子透明帯通過率ならびに囿卵腔内に存在する精子数をカウントした。その結果、精子が透明帯を通過している受精卵は C57BL/6N で 72.4±21.2%、

ACE2 ノックアウトマウスでは $89.2 \pm 8.4\%$ と、ACE2 ノックアウトマウス精子の通過率が高い傾向にあった。さらに透明帯通過精子数は C57BL/6N で 6.3 ± 7.9 個、ACE2 ノックアウトマウス精子で 10.4 ± 9.5 個と 囿卵腔に存在する精子が有意 ($P < 0.001$) に増加していた。

2. 精子前培養培地におけるアンギオテンシン II の定量

これまでに、精子先体膜上には ACE2 と共に、体細胞型 ACE が高発現していることを見出している。ACE2 の基質であるアンギオテンシン II の濃度を定量化するため、ACE2 ノックアウトマウス精子ならびに C57BL/6 系統マウス精子の精子前培養培地の上清をアンギオテンシン II EIA kit で解析した。

1000 万精子上清中のアンギオテンシン II 濃度は、ACE2 ノックアウトマウス精子上清で 0.3 ng/ml 、C57BL/6 系統マウス精子上清で 0.1 ng/ml と ACE2 ノックアウトマウス精子で有意に上昇していた。

3. アンギオテンシン II による先体反応促進効果

アンギオテンシン II は、精子頭部にある AT1 受容体を介して精子の cAMP 濃度を上昇させ、受精能獲得を促進させる事が知られている。ACE2 ノックアウトマウス精子の前培養培地中のアンギオテンシン II 濃度が有意に上昇していたことから、アンギオテンシン II の受精能獲得への促進効果を検討した。精子前培養液中にアンギオテンシン II を添加すると先体反応精子率は無添加区; $40.7 \pm 0.7\%$ 、 0.01 nM ; $43.3 \pm 3.0\%$ 、 0.1 nM ; $55.3 \pm 1.8\%$ 、 1 nM ; $64.0 \pm 1.7\%$ 、 10 nM ; $64.0 \pm 1.3\%$ 、 100 nM ; $63.3 \pm 1.0\%$ と濃度依存的に先体反応が亢進した。

D. 考察

本研究において、精子先体膜の ACE2 機能阻害は、精子前培養液中のアンギオテンシン II 濃度上昇を引き起こし、アン

ギオテンシン II は濃度依存的に先体反応が亢進を亢進する事が示された。さらに、ACE2 の機能阻害は、卵透明帯通過精子数を著しく増加させることから、受精機構においてもレニン-アンギオテンシン (RAS) 系が機能し、ACE2 は負の制御を行っていることが示された。また、低受精率のマウス凍結精子に ACE2 阻害剤を添加すると、受精率が改善することを見出しており、ACE2 阻害剤はヒトにおいても受精促進に効果がある可能性を示した。一方、ACE 阻害剤、AT1R 拮抗薬あるいは ACE2 活性化薬などの降圧剤の服用により、精子の受精能獲得が阻害され、卵透明帯通過精子数が低下する可能性も考えられる。

ACE および ACE2 は、共にメタロプロテアーゼであり、ACE がアンギオテンシン I の C 末端から 2 つのアミノ酸を切り出すのに対し、ACE2 はアンギオテンシン I とアンギオテンシン II の両方を基質とするが、C 末端から 1 つのアミノ酸だけを切り出すために、結果的にアンギオテンシン II の産生を抑制する RAS の負の制御因子として機能する。最近 RAS は、心臓、脳、膝、血管壁、子宮-胎盤などの多くの組織でも存在が明らかになっている。子宮に関連した疾患である妊娠高血圧症 (PIH) では、脱落膜のレニン、ACE、アンギオテンシノーゲン、AT1 受容体の産生亢進のみならず、胎盤 ACE も亢進されることが報告されているが、PIH における RAS がどのように作用しているのは明らかにされていない。さらに胎児発育においても、アンギオテンシノーゲン、ACE、AT1 受容体 KO マウスや ACE 阻害剤の投与により胎児は致死的な形態形成異常を呈する事から、胎児発育における RAS の関連も示唆されているが詳細は不明である。

一方で、受精機構については RAS とは全く別の機序が考えられている。ACE には、RAS を介して血圧調節に関与している体細胞型 ACE (sACE) と、雄性生殖

細胞でのみ発現している精巢型 ACE(tACE)の2つのアイソフォームが存在する。体細胞型 ACE は2つのメタロプロテアーゼドメインを持つのに対し、スプライスバリエントである精巢型 ACE のドメインは1つである。ACE ノックアウトマウスは、精子の子宮- 卵管移行能および卵透明帯との結合能の低下による生殖能低下が見られる。一方、体細胞型 ACE ノックアウトマウスの妊孕性の著しい低下は見られないことから、受精機構において、体細胞 ACE と精巢型 ACE は別の機能があり、精巢型 ACE には精巢内または精子において特有の機能・基質があることが示唆されている。特に、精巢型 ACE はジペプチダーゼ活性だけでなく、GPIase 活性を有し、この活性が精子- 卵透明帯結合に重要である事が示唆されている。これは血圧調節にかかわる RAS とは全く別の作業機序である。ACE2 は精巢型 ACE が有している活性ドメイン II を有しておらず、ACE2 と精巢型 ACE は異なる遺伝子であると考えられている。また、ACE2 は体細胞型 ACE と相同性があり、アミノ酸 10 個からなるアンギオテンシン I を共通基質とする。ACE により、アンギオテンシン I の末端 2 アミノ酸が切り出されて生成されるアンギオテンシン II は精液中に存在し、AT1 受容体を介して cAMP シグナル伝達経路を介して、精子の受精能獲得を誘導する事が知られている (Reproduction,2004)。さらに AT1 受容体は精子中片部や尾部で発現する事が知られている (Journal of Reproduction and Fertility,2000)。精巢上体の精細管内では高濃度のアンギオテンシン I とアンギオテンシン II が検出され (J.Endocrinol,1990)、精巢型 ACE と同様に体細胞型 ACE も存在することが知られている (Methods Enzymol,1995)。精巢上体で体細胞型 ACE により産生されたアンギオテンシン II は精巢上体の基底膜に強く存在し、

精巢上体の安定的な酸性化に関与し、酸性化は精子の貯蔵- 成熟に必要なだと考えられている (Cell,2008)。これらから精巢上体の精子成熟から精子における受精能獲得に至るまで RAS が関与している事が推察される。これまでの研究で、ACE2 ならびに体細胞型 ACE、精巢型 ACE がマウス精子先体膜で発現していること、さらに ACE2 ノックアウトマウス精子は著しく精子-卵透明帯結合能、精子先体反応が亢進することを見いだした。さらに、ACE2 ノックアウトマウス精子の卵透明帯通過能の亢進から、ACE2 は受精過程において、負の制御を行う重要な分子である可能性を示した。さらに精子前培養液中にアンギオテンシン II が存在し、アンギオテンシン II により濃度依存的に先体反応が亢進される。これらの知見から受精機構においても RAS が機能していることが示唆された。

E. 結論

受精能獲得においても RAS が機能し、ACE2 は受精過程において、ACE2 は負の制御を行っている重要な分子である。

F. 研究発表

1. Okudaira N, Goto M, Yanobu-Takanashi R, Tamura M, An A, Abe Y, Kano S, Hagiwara S, Ishizaka Y, Okamura T. Involvement of retrotransposition of long interspersed nucleotide element-1 in skin tumorigenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Cancer Sci. 102, 2000-2006 (2011).
2. Fujimoto T, Machida T, Tanaka Y, Tsunoda T, Doi K, Ota T, Okamura

- T., Kuroki M, Shirasawa S. KRAS-induced actin-interacting protein is required for the proper localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 407, 438-443 (2011).
3. *Sasawatari, S., *Okamura, T., *Kasumi, E., Tanaka-Furuyama, K., Yanobu-Takanashi, R., Senji Shirasawa, Kato, N. and Toyama-Sorimachi, N.* The solute carrier family15A4 regulates TLR9 and NOD1 functions in the innate immune system and promotes colitis in mice. *These authors equally contributed to this work., *Gastroenterology*, 140, 1513-1525 (2011)
4. Ohara-Imaizumi M, Yoshida M, Aoyagi K, Saito T, Okamura T, Takenaka H, Akimoto Y, Nakamichi Y, Takanashi-Yanobu R, Nishiwaki C, Kawakami H, Kato N, Hisanaga S, Kakei M, Nagamatsu S. Deletion of CDKAL1 affects mitochondrial ATP generation and first-phase insulin exocytosis. *PLoS One.* 5, e15553 (2010)

G. 知的財産権

特許公開「受精を促進するための組成物」（特許公開2010-150162）