

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450452

研究課題名(和文) 長鎖脂肪酸をシグナル分子とした精子の運動性調節メカニズム

研究課題名(英文) The regulatory mechanism of sperm motility using long-chain fatty acids as signal molecules

研究代表者

森山 隆太郎 (MORIYAMA, Ryutaro)

近畿大学・理工学部・講師

研究者番号：30411573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、長鎖脂肪酸がマウス精子に発現するGPR120を介してphosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt-protein kinase (Akt) およびp38 MAPK経路を活性化させることで、直進運動するマウス精子の移動速度が暴露前に比べて有意に速くなることなどを見出した。この結果は、細胞外液中の長鎖脂肪酸がシグナル分子として精子の運動性を制御するメカニズムの存在を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：In the present study, activation of GPR120 induced increase in sperm motility via PI3K/Akt and p38 MAPK pathway. This evidence suggests that extracellular LCFAs act as signal molecules that regulate sperm motility through FFAR4.

研究分野：繁殖学・神経内分泌学

キーワード：FFAR4 GPR120 長鎖脂肪酸 精子 運動性 Akt p38

1. 研究開始当初の背景

精子の運動性調節は、精子の細胞膜に含まれる脂肪酸の組成に焦点を当て、国内外で研究が進められてきた。例えば、精子の成熟とともに細胞膜の脂肪酸組成にリモデリングが起こり、不飽和度が増加すること、精子の膜におけるオメガ3系極長不飽和脂肪酸・ドコサヘキサエン酸の含量率と精子運動性には正の相関があることなどはマウス・ウシ・ニワトリからヒトに至るまで多くの脊椎動物で明らかとなっている。これらの結果は、不飽和脂肪酸が増加することで細胞膜の流動性が高まり、精子の運動性が亢進するメカニズムの存在を示している。しかし、精子の運動性は細胞内の脂肪酸組成のみで調節されているのだろうか。これまでの研究から、精子の細胞外液に存在する長鎖脂肪酸がシグナル分子として精子の運動性を調節するメカニズムが存在すると仮説提唱して当研究室では研究を進めている。

長鎖脂肪酸はエネルギー基質や細胞膜の構成成分であると同時にシグナル分子としても重要な役割を担う。近年、Gタンパク質共役型受容体であるGPR40と120のリガンドとして長鎖脂肪酸が同定された。これまでの研究から、長鎖脂肪酸受容体のうちGPR120がICRマウス精巣と精巣上体の精子頭部や中片部に局在していること；飽和脂肪酸であるパルミチン酸に暴露することで直進運動するICRマウス精子の移動速度が、暴露前より有意に遅くなること；不飽和脂肪酸であるオレイン酸、 γ -リノレン酸、ドコサヘキサエン酸やGPR120アゴニストであるGW9508に暴露することで直進運動するICRマウス精子の移動速度が、暴露前より有意に速くなること、などを見出している。これらより、精子の頭部や中片部に局在するGPR120を介して長鎖脂肪酸が尾部の運動性を調節するメカニズムが精子に存在する可能性を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は長鎖脂肪酸をシグナル分子とした精子における運動性調節の分子機構を明らかにすることにある。

3. 研究の方法

(1) 精子に局在する GPR120 下流で活性化 するシグナル伝達物質の同定

GPR120 の下流に存在するシグナル伝達物質として phospholipase C (PLC) / Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) / phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) / Akt-protein kinase (Akt) / AMP-activated protein kinase (AMPK) 等が報告されている (JBC2005, 2015)。そこで、受精能獲得前および後のICRマウス精子をGW9508に暴露したとき、上記のシグナル伝達物質が活性化するかwestern blotting法で調べた。

(2) 精子の運動性促進に關与する GPR120 下流のシグナル伝達物質を検討

(1)で調べるシグナル伝達物質の各種特異的阻害剤 (PI3K 阻害剤, Wortmannin, LY294002; Akt 阻害剤, MK2206; MEK1/2 阻害剤, U0126; p38 MAPK 阻害剤, SB203580; AMPK 阻害剤, Dorosomorphin) により、GW9508暴露による精子の運動性促進が阻害されるか検討した。運動性の評価法は「運動くん for windows」で移動速度・鞭毛の打頻度・鞭毛の振り幅・直進運動する精子の割合等を指標に解析した。

(3) 精子に発現している GPR120 が超活性化 に与える影響の検討

GPR120 の活性化が精子の超活性化に与える影響は、GW9508に暴露した精子のチロシンリン酸化を指標としてwestern blotting法で検討した。

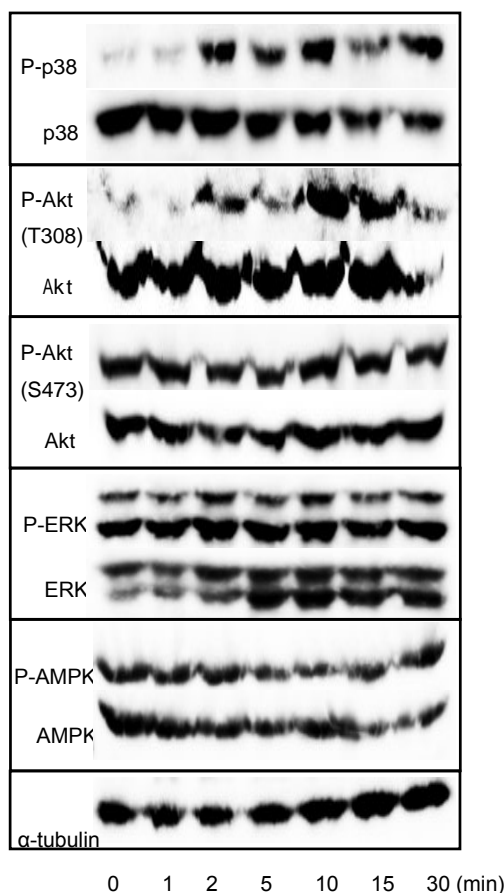
(4) 精子に発現している GPR120 が精子の先 体反応に与える影響の検討

GPR120 の活性化が先体反応に与える影響は、GW9508に暴露した受精能獲得後の精子

のレクチン PNA (peanut agglutinin) への結合割合を指標として検討した。

4. 研究成果

(1) 受精能獲得した精子および獲得前の精子を GPR120 アゴニストである GW9508 に暴露した結果、暴露開始から 2 分後より p38 MAPK と Akt (T308) のリン酸化が観察された。それに対して、AKT (S473)、ERK、AMPK のリン酸化は観察できなかった。このことから、精子において GPR120 へのリガンド結合は p38 MAPK および PI3K/Akt 経路を活性化することが明らかとなった。



(2) 受精能獲得した精子および獲得前の精子を GW9508 に暴露するとそれら精子の移動距離は増加した。この増加は PI3K 阻害剤である Wortmannin と LY294002、Akt 阻害剤である MK2206、MEK1/2 阻害剤である U0126、p38 MAPK 阻害剤である SB203580、および AMPK 阻害剤である dorosomorphin 投与により阻害された。このことから、精子

の運動性制御にはこれら分子の関与が示唆された。

(3) GW9508 に暴露した精子において暴露前の精子と比べた時、リン酸化チロシンの増加は観察できなかった。

(4) GW9508 に暴露した精子において暴露前の精子と比べた時、レクチン PNA への結合割合に変化は見出せなかった。

以上より、細胞外液中の不飽和脂肪酸は、GPR120 の下流に存在する p38 MAPK 経路ならびに PI3K/Akt 経路を介して直進運動するマウス精子の運動性を亢進するメカニズムの存在が明らかとなった。また、この GPR120 を介した経路は精子の超活性化や先体反応には関与しないことが示唆された。

<引用文献>

- S. Katsumata, N. Hatae, T. Yano, Y. Ruike, M. Kimura, A. Hirasawa, G. Tsujimoto, Free fatty acids inhibit serum deprivation-induced apoptosis through GPR120 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *J Biol Chem*, May 2005, Vol. 280, Issue20, 19507-19515
- N. Kim, J.O. Lee, H.J. Lee, H.I. Kim, J.K. Kim, Y.W. Lee, S.K. Lee, S.J. Kim, S.H. Park, H.S. Kim, Endogenous Ligand for GPR120, Docosahexaenoic Acid, Exerts Benign Metabolic Effects on the Skeletal Muscles via AMP-activated Protein Kinase Pathway. *Aug 2015*, Vol. 290, Issue33, 20438-20447

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

- R. Moriyama, T. Yamazaki, T. Kato, Y. Kato, Long-Chain Unsaturated Fatty Acids Reduce the Transcriptional Activity of the

Rat Follicle-Stimulating Hormone β -Subunit Gene. Journal of Reproduction and Development, 査読有, April 2016, Vol. 62, Issue 2, 195-199, DOI: 10.1262/jrd.2015-138.

R. Moriyama, C. Deura, S. Imoto, K. Nose and N. Fukushima, Expression of the long-chain fatty acid receptor GPR120 in the gonadotropes of the mouse anterior pituitary gland. Histochemistry and Cell Biology, 査読有, Jan 2015, Vol. 143, Issue1, 21-27, DOI: 10.1007/s00418-014-1257-3.

[学会発表](計 7件)

R. Moriyama, Y. Sogo, K. Ueda, Effect of estrogen and progesterone on the expression of long-chain fatty acid receptor GPR120 in mouse gonadotrophs., International Symposium on Pituitary Gland and Related Systems (ISPGR2016), Honolulu, Hawaii, September1-5, 2016

上田佳穂、十河由紀、森山隆太郎、マウス下垂体のゴナドトロフに局在する長鎖脂肪酸受容体 GPR120 発現におけるエストロゲンとプロジェステロンの役割、第 109 回日本繁殖生物学会大会、神奈川、麻布大学、2016 年 9 月 11-14 日

森山隆太郎、田近弘樹、ゴナドトロフにおけるリゾホスファチジン酸(LPA)の役割の検討、第 108 回日本繁殖生物学会大会、宮崎、宮崎大学、2015 年 9 月 17-19 日

森山隆太郎、山崎翼、加藤たか子、加藤幸雄、AMPK 経路を介した LH β 鎖発現抑制、第 30 回下垂体研究会学術集会、富山、宇奈月国際会館セレネ、2015 年 8 月 5-7 日

R. Moriyama, I. Wakasa, M.

Nakagawa, Long chain fatty acids exposure regulate mouse sperm motility. World Congress of Reproductive Biology 2014, Edinburgh International Conference Centre, Edinburgh, Scotland, September2-4, 2014., Reproduction Abstracts (2014) 1 P207, DOI:10.1530/repabs.1.P207.

森山隆太郎、山崎翼、中井愛、加藤たか子、加藤幸雄、グルコース利用性の低下が下垂体の性腺刺激ホルモン遺伝子の転写調節に与える影響、第 107 回日本繁殖生物学会大会、帯広、帯広畜産大学、2014 年 8 月 20-23 日

森山隆太郎、山崎翼、加藤たか子、加藤幸雄、性腺刺激ホルモン発現における長鎖脂肪酸の役割、第 29 回下垂体研究会学術集会、東京、八王子セミナーハウス、2014 年 8 月 8-10 日

[その他]

ホームページ等
<http://www.life.kindai.ac.jp/~mory/MNB2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森山隆太郎 (MORIYAMA, Ryutarō)
近畿大学・理工学部・講師
研究者番号：30411573

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし