

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06446

研究課題名(和文) 長鎖脂肪酸クオリティの変化をシグナルとした精子の運動性調節メカニズム

研究課題名(英文) Effect of fatty acid quality on sperm motility

研究代表者

森山 隆太郎 (Moriyama, Ryutaro)

近畿大学・理工学部・准教授

研究者番号：30411573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、肥満や低栄養など栄養状態の異常を起因とする不妊が家畜からヒトまで多くの動物で問題となっている。我々は長鎖脂肪酸に着目し、マウス精子の運動性に与える影響を検討した。その結果、不飽和脂肪酸は代謝エネルギーや膜の構成成分としてではなく、核内受容体であるPPAR を介して精子を活性化し、鞭毛運動を上昇させることを明らかとした。さらに、その運動上昇には、重炭酸イオン、CatSperチャネルを介した精子内へのカルシウムイオンの流入等の関与が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は長鎖脂肪酸が代謝エネルギーや膜の構成成分としてではなく、シグナル分子として精子の運動性を制御する生理的メカニズムについて明らかとした点にある。また、近年、世界的問題となっている肥満や低栄養が生殖に与える影響について新たな知見を加えることになる点が本研究の社会的意義である。

研究成果の概要(英文)：Recently, infertility caused by nutritional abnormalities such as obesity and undernutrition has become a problem in many animals, from livestock to humans. This study examined the effect of long-chain fatty acids on mouse sperm motility. We found that unsaturated-fatty acids increase sperm flagellar motility not as metabolic energy or a membrane component, but through the nuclear receptor PPAR. Furthermore, the involvement of bicarbonate ion and Ca²⁺ influx into sperm via CatSper channels were involved in the motor activation.

研究分野：繁殖学・生理学

キーワード：精子 鞭毛運動 CatSper PPAR 重炭酸イオン

1. 研究開始当初の背景

肥満は後天性不妊の一因である。しかし、なぜ肥満により不妊になるのか、そのメカニズムの詳細は解明されていない。肥満になると体内に蓄積・貯蔵される脂肪酸の量(クオンティティ)が増加すると同時に、脂肪酸の質(クオリティ)も不飽和脂肪酸リッチから飽和脂肪酸リッチへの変化が認められている。このことから、肥満によるこの脂肪酸クオリティの変化が不妊を誘起する因子の一つであると考えられる。肥満は雌動物のみならず、雄動物においても不妊の原因となる。実際、摂取脂肪酸と精子の質に関する研究結果が相次いで報告されている。具体的には飽和脂肪酸の摂取量が多い男性では摂取量が少ない男性に比べて射精あたりの精子濃度が低く、精子運動性も低下していること； $\omega 3$ 不飽和脂肪酸の摂取量が多い男性の精子には奇形が少ない傾向のあることなどが報告されている。これらの結果は、ヒトを含めたほ乳類の精子運動性に長鎖脂肪酸クオリティが重要な役割を担っていることを示唆するものである。これまで、精子と長鎖脂肪酸クオリティの関係は、精子の細胞膜に含まれる脂肪酸の組成と細胞膜の流動性に焦点を当て、多くの研究が進められてきた。しかし、精子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。申請者は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受容体を介して精子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研究を進めている。本研究で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で精子機能改善法開発の基盤を構築する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、長鎖脂肪酸が受容体を介して精子運動性を制御するシグナル伝達機構を明らかにすることにある。

3. 研究の方法

(1) 不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸が精子の運動性に与える影響を検討する実験

不飽和脂肪酸 ($\omega 3$ 脂肪酸: α -リノレン酸・エイコサペンタエン酸 EPA・ドコサヘキサエン酸 DHA、 $\omega 6$ 脂肪酸: リノール酸・アラキドン酸、 $\omega 9$ 脂肪酸: オレイン酸)、または飽和脂肪酸 (パルミチン酸) を曝露した時の ICR マウス精子の運動性を解析した。精子運動性解析にはディテクト社の精子運動解析システム (SMAS) を用いた。

(2) 長鎖脂肪酸が結合する受容体を同定する実験

マウス精巣において長鎖脂肪酸が結合する分子を RT-PCR 法で同定した。その後、それら分子の agonist と antagonist に曝露した精子の運動性を SMAS で解析した。

(3) 精子が長鎖脂肪酸により活性化するか電気生理学的に検討する実験

ラミネンコーティングによりカルチャーディッシュに固定した精子を用いて、whole-cell patch clamp 法により膜電流測定を行った。

(4) 長鎖脂肪酸を介した精子運動性調節に HCO_3^- が関与するか検討する実験

NaHCO₃濃度を変化させた培地を用いて GW9508 曝露時の精子の運動性を SMAS で解析した。

(5) 長鎖脂肪酸を介した精子運動性調節に細胞外 Ca²⁺の流入が関与するか検討する実験

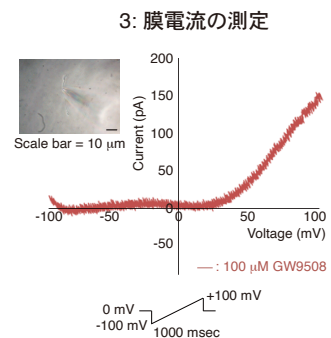
細胞内カルシウム濃度測定システム (HCImage Acquisition) を用いて不飽和脂肪酸や GW9508 曝露時の精子内 Ca²⁺動態を測定した。さらに CatSper チャネル阻害剤や Ca²⁺無添加培地に曝露した精子の運動性を SMAS で解析した。

4. 研究成果

(1) 不飽和脂肪酸に曝露した群の精子では曝露していないコントロール群の精子に比べて曲線速度に統計的有意な上昇が観察された。また、飽和脂肪酸であるパルミチン酸に曝露した精子では曲線速度、直線速度など測定した全ての値がコントロール群に比べて低下していた。これらのことから、不飽和脂肪酸は精子の鞭毛運動を亢進させるのに対して、飽和脂肪酸は低下させることが明らかとなった。

(2) 精巣において長鎖脂肪酸が結合する分子を同定するため、RT-PCR 精子を行った結果、マウス精巣には GPR120 と PPAR γ の発現していることが明らかとなった。次に、GW9508、TUG891 (GPR120 agonist) および Troglitazone (PPAR γ agonist) に曝露した精子の運動性を解析した結果、GW9508 および Troglitazone 曝露群の精子で曲線速度に統計的有意な上昇が観察された。しかし、TUG891 曝露群では観察できなかった。また、GW9508 や Troglitazone による曲線速度の上昇は GW9662 (PPAR γ antagonist) により阻害されたが、AH7614 (GPR120 antagonist) では阻害されなかった。これらの結果から、不飽和脂肪酸はシグナル分子として核内受容体である PPAR γ を介して精子の鞭毛運動を上昇させることが明らかとなった。

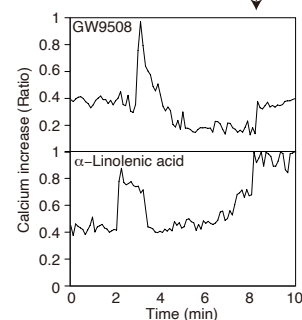
(3) -100 ~ 100 mV の電圧ランプパルスに対する膜電流変化を測定した結果、GW9508 暴露により -10 mV 付近で僅かに内向き膜電流応答が生じ、その後、40 mV 付近から外向き膜電流が記録された。これらは、GW9508 刺激により活性化された精子膜の Ca²⁺チャンネルや K⁺チャンネルを流れるイオン電流であると示唆される。この結果は、長鎖脂肪酸が受容体を介して活性する生理的メカニズムが精子に存在することを示すものである。



(4) NaHCO₃ 無添加および低濃度添加群の精子では GW9508 による曲線速度の上昇が観察できなかった。この結果は不飽和脂肪酸による精子の鞭毛運動亢進に HCO₃⁻刺激が関与することを示唆するものである。

5: 細胞内カルシウム測定 (測定 2 分後に投与)
10 μM A23187

(5) 不飽和脂肪酸や GW9508 曝露により精子頭部側から尾部側へ向けた細胞内 Ca²⁺の上昇が観察された。さらに不飽和脂肪酸、GW9508 および Troglitazone による曲線速度の上昇は、CatSper チャネル阻害剤である NNC 55-0396 や Mibefradil との共曝露群、ならびに Ca²⁺無添加培地群では観察できなかった。これらの結果から、不飽和脂肪酸による精子の鞭毛運動亢進に CatSper チャネル



を介した細胞内への Ca^{2+} 流入の関与が明らかとなった。

以上より、飽和脂肪酸は精子の鞭毛運動を低下させ、不飽和脂肪酸は亢進させること。不飽和脂肪酸はシグナル分子として PPAR γ に結合し、精子を活性化させることで鞭毛運動を亢進させること。その亢進には、 HCO_3^- や CatSper チャンネルを介した細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が関与することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Moriyama Ryutaro, Fukushima Nobuyuki	4. 巻 741
2. 論文標題 Expression of lysophosphatidic acid receptor 1 in the adult female mouse pituitary gland	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135506 ~ 135506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2020.135506	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 DEURA Chikaya, KIMURA Yusuke, NONOYAMA Takumi, MORIYAMA Ryutaro	4. 巻 66
2. 論文標題 <i>Gpr120</i> mRNA expression in gonadotropes in the mouse pituitary gland is regulated by free fatty acids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 249 ~ 254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2019-166	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 DEURA Chikaya, MORIYAMA Ryutaro	4. 巻 66
2. 論文標題 Short-term but not long-term high-fat diet induces an increase in gene expression of gonadotropic hormones and GPR120 in the male mouse pituitary gland	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 143 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2019-144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 NAKAMURA Sho, NODA Kohei, MIWA Masafumi, MINABE Shiori, HAGIWARA Teruki, HIRASAWA Akira, MATSUYAMA Shuichi, MORIYAMA Ryutaro	4. 巻 66
2. 論文標題 Colocalization of GPR120 and anterior pituitary hormone-producing cells in female Japanese Black cattle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 135 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2019-111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 MORIYAMA Ryutaro, IWAMOTO Koichi, HAGIWARA Teruki, YOSHIDA Saishu, KATO Takako, KATO Yukio	4. 巻 66
2. 論文標題 AMP-activated protein kinase activation reduces the transcriptional activity of the murine luteinizing hormone α -subunit gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 97 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2019-143	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森山隆太郎、中村祐哉、萩原央記、杉山真言、三井一鬼、中村翔、鈴木樹理
2. 発表標題 マカク雄生殖系組織におけるACE2受容体およびTMPRSS2発現細胞の組織学的検討
3. 学会等名 第39回内分泌代謝学サマーセミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森山隆太郎、池田隼也、原尚輝、北爪香菜子、萩原央記、和田哲幸
2. 発表標題 ゴナドトロフにおけるGPR120を介した性腺刺激ホルモン分泌調節メカニズム
3. 学会等名 第35回日本下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森山隆太郎、池田隼也、原尚輝、萩原央記、和田哲幸
2. 発表標題 GPR120を介した性腺刺激ホルモン合成および分泌調節メカニズムについて
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森山隆太郎、佐藤弘章、山本悠人、榎田千明、山本悠愛、若狭郁美、萩原央記、和田哲幸
2. 発表標題 不飽和脂肪酸によるマウス精子の運動活性化メカニズムについて
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森山隆太郎、宮崎崇史、吉川万莉乃、木村祐輔、向井久保崇裕、松本彬伸、高野恭男、日比野良祐
2. 発表標題 妊娠によるマウス母体のストレス応答性低下について
3. 学会等名 第34回下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎崇史、吉川万莉乃、木村祐輔、向井久保崇裕、松本彬伸、高野恭男、日比野良祐、森山隆太郎
2. 発表標題 妊娠成立によるマウス母体のストレス応答性低下について
3. 学会等名 第37回内分泌代謝学サマーセミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤弘章、山本悠人、榎田千明、山本悠愛、若狭郁美、萩原央記、和田哲幸、森山隆太郎
2. 発表標題 長鎖脂肪酸受容体を介したマウス精子の運動活性化メカニズムについて
3. 学会等名 第37回内分泌代謝学サマーセミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森山隆太郎、辻愛佳、佐藤弘章、山本悠人、和田哲幸
2. 発表標題 不飽和脂肪酸によるマウス精子の鞭毛運動活性化メカニズムについて
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

近畿大学理工学部生命科学科環境生理学研究室HP https://www.life.kindai.ac.jp/laboratory/moriyama

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関