【総 説】

4. 精子先体反応におけるリン脂質代謝の役割

深 見 希代子

東京薬科大学生命科学部

Roles of Phosphatidylinositol Metabolism in Acrosome Reaction of Sperm

Kiyoko FUKAMI

Faculty of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Science

Summary

Several Phospholipase C (PLC) isoforms have been found in male and female mammalian gametes and splicing isoforms of PLC δ 4 are predominantly expressed in testis. To understand a physiological function of PLC δ 4, we generated *PLC δ 4* gene-deficient mice. PLC δ 4 gene-disrupted male mice either produced few small litters or were sterile. In vivo and in vitro fertilization studies showed that PLC δ 4 has a functional role in sperm at the early step of fertilization. We also observed that the calcium transients in eggs associated with fertilization were absent or delayed when we used PLC δ 4^{-/-} sperm. PLC δ 4^{-/-} sperm were unable to initiate the acrosome reaction, an exocytotic event required for fertilization and induced by interaction with the egg coat, the zona pellucida (ZP). Next we have monitored Ca²⁺ responses in single sperm, and we found that the [Ca²⁺]_i increase in response to ZP is absent in PLC δ 4^{-/-} sperm. Progesterone, another physiological inducer of the acrosome reaction, failed to induce sustained [Ca²⁺]_i increases in PLC δ 4^{-/-} sperm and consequently the acrosome reaction was partially inhibited. Calcium imaging studies revealed that the [Ca²⁺]_i increases induced by exposure to ZP and progesterone started at different sites within the sperm head, indicating that these agonists induce the acrosome reaction via different Ca²⁺ mechanisms. Furthermore, store-operated channel (SOC) activity was severely impaired in PLC δ 4^{-/-} sperm. These results support that PLC δ 4 is an essential protein for calcium mobilization in sperm that drives acrosome reactions.

はじめに

卵と精子の融合を起点とする受精時には、カルシウムオシレーションという周期的なカルシウムの上昇が生じることが古くから知られている^{1,2)}。またそれに先立ち、精子が卵のまわりの透明帯を通過するための先体反応時にも、精子内のカルシウムの上昇が不可欠であることが報告されている^{3~5)}が、その分子機構はほとんどわかっていない。

一方、イノシトールリン脂質代謝系は、ホルモン分泌、細胞増殖時等の細胞内のカルシウム動員を司る伝

達系であり、こうした受精時においても重要な役割を担うことが従来よりわかっていたが、最近種々の遺伝子欠損マウスの作製によりどのようなタンパク質がどのステップに介在するのか分子レベルでの解析から明らかになってきている。我々は、イノシトールリン脂質代謝系の要の酵素の一つホスフォリパーゼC (PLC) の中でも一番構造が簡単で、進化的にも保存されている PLC δ 4 の遺伝子欠損マウスを作製したところ、PLC δ 4 遺伝子欠損オスマウスは不妊であることが判明した⁶⁾。本稿では、PLC δ 4 遺伝子欠損マウ

Fig. 1. A, Expression of PLC δ 4 by evaluating with Western-blot analysis; B, brain; Te, testis; Th, thymus; H, heart; Lu, lung; S, spleen; Li, liver; K, kidney; I, intestine. B, Immunohistochemical detection of PLC δ 4 was performed on testicular sections of wild-type males at 10-weeks of age using an anti-PLC δ 4 polyclonal antibody. C, Localization of PLC δ 4 in sperm. Sperm were incubated with anti-PLC δ 4 polyclonal antibody, and then treated with FITC-conjugated anti-rabbit antibody. Bar; 10 μ m.

スの不妊に至るメカニズムを概説し、PLC δ 4の生理的機能を探ってみたい。

PLC δ 4の組織での局在

PLC δ 4はウェスタンブロットおよびザンブロットにより、脳と精巣に発現していることが判明し (Fig. 1A), こうした組織において何らかの機能をもつことが推測された⁷⁻⁹⁾。次に精巣の免疫組織染色を行ったところ、精巣の精細管の一番外側の精子幹細胞である精粗細胞に局限していた (Fig. 1B)。精粗細胞から分化し成熟するに従い、精子は中央の精細管に移動していくが、PLC δ 4は精子にも特異的に発現し、とくに頭部に三日月型に染色されたことから、先体に発現していることが明らかになった (Fig. 1C)。精子における種々の PLC アイソザイムの存在をそれぞれに対する抗体で検討してみると、PLC β 1, PLC β 3, PLC γ 1, PLC γ 2, PLC δ 1, PLC δ 4が存在していることが判明した。こうしたことから、各アイソザイム

が機能を相補している可能性は考えられたが、PLC δ 4の生殖における機能を解析するため、遺伝子欠損マウスを作製することにした。

PLC δ 4 遺伝子欠損オスマウスは不妊である

ATG 開始コドンをネオマイシン耐性遺伝子に置き換えたターゲティングベクターを用いることにより、PLC δ 4 遺伝子欠損マウスを作製した。得られた遺伝子欠損マウスは、一見健康で何の異常がないかに見られたが、オスマウスに強い不妊傾向があることが、自然交配および体外受精により明らかになった。自然交配では、妊娠までの時間が非常に長いこと、生まれる仔数がヘテロ同士の交配では7~10匹に対し、1~3匹と少ないことから、受精率はコントロールの15%程度であった (Table 1)。また PLC δ 4 遺伝子欠損マウスからの精子を用いた体外受精では、精子数、精子の運動性には異常が見られなかったが、受精後6時間までの第二極体の放出がほとんど起こらず、またこの

Table 1. Reduced fertility in PLC $\delta 4^{-/-}$ male mice

	Homo (♀) Homo (♂)	Hetero (♀) Hetero (♂)	Homo (♀) Hetero (♀)	Hetero (♀) Hetero (♀)
Number of mating	17	11	9	20
Pregnant females (%)	35.2	45.5	77.8	90.0
Average litter size	1.2	2.6	5.8	7.6
Fertility rate (%)	15.7	34.2	76.3	100.0

Fig. 2. A and B, Representative images of calcium increase in wild-type eggs inseminated with wild sperm (+/+) or PLC $\delta 4^{-/-}$ (-/-) sperm. C, Representative patterns of calcium oscillations in eggs inseminated with PLC $\delta 4^{+/+}$ (+/+) or PLC $\delta 4^{-/-}$ sperm (-/-) are shown. Calcium oscillations are abolished or delayed after insemination with PLC $\delta 4^{-/-}$ sperm. The arrow denotes the time of sperm addition. Scale bar: 0.5 $\Delta F/F$. D, The latency to the initiation of the calcium response in in vitro fertilization is summarized in a histogram. Numbers of eggs for each time window (5-min duration) were counted.

時の卵でのカルシウムの上昇も観察されなかった (Fig. 2). このことは PLC $\delta 4$ 遺伝子欠損マウスからの精子を用いた場合には、受精のごく初期に異常が生じることを示している。

PLC $\delta 4$ は精子先体反応において重要な役割を担う

次に PLC $\delta 4$ 遺伝子欠損マウスでは、受精時のどの段階で異常があるのかを検討した。体外受精時に卵でカルシウムの上昇が観察されなかったため、第一に PLC $\delta 4$ が卵でのカルシウム誘導因子である可能性を考えた。PLC $\delta 4$ 遺伝子欠損マウスの精子の頭部を直接卵に注入し (ICSI)、カルシウムの上昇を観察したが、野生型のマウス精子と同様なカルシウムオシレーションが生じ、PLC $\delta 4$ がカルシウム誘導因子ではないことが明らかになった。

精子は頭部と尾から成る非常に特徴のある構造を持ち、動き回ることができるが、重要な機能の一つは精子先体反応である。精子先体反応に先立ち、capacita-

tion と呼ばれる精子先体反応が起きやすい条件を整えるための準備段階がある。これは精子が卵管を通過する間に生じるが、まず精子細胞膜からコレステロールが取り除かれ脂質組成が変化することによる膜の不安定化が生じ、 HCO_3^- とカルシウムの細胞外からの流入を引き起こす¹⁰⁾。同時にチロシンリン酸化が起こることが報告されている。そこでコレステロールの減少量、チロシンリン酸化を調べたが野生型マウスと PLC $\delta 4$ 遺伝子欠損マウス間に有意な差は見られなかったことから、PLC $\delta 4$ は capacitation にはおそらく関与しないと考えられた。さらに卵を DAPI でロードし、精子と卵の融合を卵に入った精子の DNA を染色することで検討したところ、PLC $\delta 4$ 遺伝子欠損マウスの精子を用いた場合には精子が卵と融合しないことが明らかになった⁶⁾。このことは、PLC $\delta 4$ 遺伝子欠損マウスでは、精子と卵の融合の段階または、それに至るまでの段階で異常のあることが推測された。

Fig. 3. Requirement of PLC $\delta 4$ in ZP- and progesterone-induced acrosome reaction. (A) Fluorescence and phase images of sperm treated with several acrosome reaction inducing reagents. PLC $\delta 4^{+/+}$ (+/+) and PLC $\delta 4^{-/-}$ (-/-) sperm capacitated for 1 h were treated with 1.0% dimethyl sulfoxide (DMSO), 3 Zp/ μ l solubilized mouse ZP (ZP), 100 μ M progesterone (PG), or 5 μ M thapsigargin (TG) for 15 min at 32°C in the presence of 2 μ M Alexa Fluor 594-conjugated SBTI to monitor the occurrence of the acrosome reaction. The same microscopic fields are shown for acrosome reaction (AR) and bright field images. The bar indicates 10 μ m. (B) Percent of sperm that underwent the acrosome reaction. The numbers above each column represent the number of sperm examined. Data were obtained from total amount of sperm by four independent experiments for progesterone and ZP, and three independent experiments for thapsigargin.

Fig. 4. $[Ca^{2+}]_i$ mobilization is impaired in $PLC\delta 4^{-/-}$ sperm during acrosome reaction. Capacitated sperm were loaded with $4 \mu M$ fluo4-AM for 15 min and Ca^{2+} responses were monitored every 2 sec. (A) Ca^{2+} images of $PLC\delta 4^{+/+}$ (+/+) and $PLC\delta 4^{-/-}$ (-/-) sperm before and after (10–30 sec) treatment with $3 Zp/\mu l$ solubilized mouse ZP (ZP), $100 \mu M$ progesterone (PG), $5 \mu M$ thapsigargin (TG) or $5 \mu M$ ionomycin (Iono). The same microscopic fields are shown before and after the stimulus. The experiments were done at $32^\circ C$. The bar indicates $10 \mu m$. (B) Ca^{2+} patterns of 5 sperm representative of the responses induced by the agonists utilized here. Levels of $[Ca^{2+}]_i$ are expressed as F/F_0 ratios. The data is the representative from five (ZP), nine (PG), eight (TG), and three (Iono) independent experiments. Progesterone induced repetitive $[Ca^{2+}]_i$ increases.

精子先体反応が生じたかの判定には、先体が色素で染まりやすい性質を利用したクマシー染色法が一般に用いられるが、先体が残っても染まらないなど技術的な問題があった。我々は精子先体反応が生じたさいに先体の内側に存在するタンパク質であるアクロシンが露出することを利用した新しい検出法を開発した。この方法を用いて透明帯 (ZP) の他、プロゲステロン (PG) やタプシガルギン (TG) などによる精子先体反応の誘導を、 $PLC\delta 4$ 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの精子で比較した所、ZP および PG による精子先体反応が $PLC\delta 4$ 遺伝子欠損マウスでは著しく阻害されていた¹¹⁾ (Fig. 3)。これらのことから、 $PLC\delta 4$ 遺伝子欠損マウスのオスの不妊は、精子先体反応の異常に起因することが判明した。すなわち $PLC\delta 4$ が卵の透明帯通過に必須な精子先体反応に重要な役割をもつことが明らかになった。

$PLC\delta 4$ は精子内のカルシウム動員に重要である

先体反応誘導時の精子内のカルシウム上昇を検討したところ、 $PLC\delta 4$ 遺伝子欠損マウスでは、ZP によるカルシウム上昇がほとんど起らないこと、また PG によるカルシウム上昇は野生型マウスでは、カルシウムオシレーションが観察されるのに対し、 $PLC\delta 4$ 遺伝子欠損マウスの精子では、きわめて弱く一過性であることが判明した¹¹⁾ (Fig. 4)。こうした結果は、 $PLC\delta 4$ が精子内のカルシウム動員に重要な役割を持ち、 $PLC\delta 4$ が精子先体反応および受精に不可欠なタンパク質であることを示している。また精子内のカルシウム上昇の起点は ZP と PG で異なっており、カルシウム上昇のメカニズムが異なることが推測された (Fig. 5)。さらに $PLC\delta 4$ は、精子先体反応時に細胞内のカルシウム上昇のみならず、細胞内ストアの枯渇を受けて開くチャネル (SOC) を介した細胞外からのカル

Fig. 5. Spatiotemporal $[Ca^{2+}]_i$ dynamics in a single sperm treated with acrosome reaction inducers. Capacitated sperm were loaded with $4 \mu M$ fluo4-AM for 15 min, and $[Ca^{2+}]_i$ mobilization at the single sperm level was monitored. Sperm from $PLC\delta4^{+/+}$ (A, C and E) or $PLC\delta4^{-/-}$ (B, D and F) were treated with $3 \mu l/\mu l$ solubilized mouse ZP (A and B), $100 \mu M$ progesterone (C and D), or $5 \mu M$ thapsigargin (E and F). Images were collected every 2 sec. The relative $[Ca^{2+}]_i$ change is calculated as ratio to F_0 images and shown in pseudo color. The bar indicates $10 \mu m$. Figures show time (sec) after treatment of the reagents.

シウム流入にも関与していることが判明した。このことは、細胞内のカルシウム動員を主な目的とするイノシトールリン脂質代謝であるが、細胞外からのカルシウムの流入にも関与していることを示したもので注目される。

おわりに

本稿では、 $PLC\delta4$ 遺伝子欠損オスマウスが不妊であること、さらにそれは、精子内のカルシウムの上昇が生じないため、精子先体反応が誘導されないことに起因していることを報告した。また $PLC\delta4$ は、精子先体反応時のカルシウムの上昇において、細胞内のカルシウムストアからのカルシウム動員に関与するとともに、カルシウムチャンネルを介したカルシウムの流入

にも関わっていることを示した。最近抗体を用いた実験で、Transient receptor potential (Trp) チャンネルのひとつである $TrpC2$ が精子先体反応に強く関与していることが報告された¹²⁾。またこの $TrpC$ ファミリーは PLC または基質であるリン脂質等依存的に制御されることが判明しており、 $PLC\delta4$ によってどのようなカルシウムチャンネルがどう制御されているかを解析することが今後の課題であると考えられる。

文 献

- 1) Melissa K, Jungnickel K, Sutton KA, Florman HM. In the Beginning: Lessons from fertilization in mice and worms. *Cell*. **114**, 401-404, 2003.

- 2) Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol.* **3**, E59-64, 2001.
- 3) Breitbart H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol.* **187**, 139-144, 2002.
- 4) Oda S, Deguchi R, Mohri T, Shikano T, Nakanishi S, Miyazaki S. Spatiotemporal dynamics of the $[Ca^{2+}]_i$ rise induced by microinjection of sperm extract into mouse eggs: referential induction of Ca^{2+} wave from the cortex mediated by the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Dev Biol.* **209**, 172-185, 1999.
- 5) Wassarman PM. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell.* **96**, 175-183, 1999.
- 6) Fukami K, Nakao K, Inoue T, Kataoka Y, Kurokawa M, Fissore RA, Nakamura K, Katsuki M, Mikoshiba K, Yoshida N, Takenawa T. Requirement of phospholipase Cdelta4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Science.* **292**, 920-923, 2001.
- 7) Liu N, Fukami K, Yu H, Takenawa T. A new phospholipase C delta 4 is induced at S-phase of the cell cycle and appears in the nucleus. *J Biol Chem.* **271**, 355-360, 1996.
- 8) Lee SB, Rhee SG. Molecular cloning, splice variants, expression, and purification of phospholipase C-delta 4. *J Biol Chem.* **271**, 25-31, 1996.
- 9) Nagano K, Fukami K, Minagawa T, Watanabe Y, Ozaki C, Takenawa T. A novel phospholipase C delta 4 (PLCdelta4) splice variant as a negative regulator of PLC. *J Biol Chem.* **274**, 2872-2879, 1999.
- 10) Darszon A, Beltran C, Felix R, Nishigaki T, Trevino CL. Ion transport in sperm signaling. *Dev Biol.* **240**, 1-14, 2001.
- 11) Fukami K, Yoshida M, Inoue T, Kurokawa M, Fissore RA, Yoshida N, Mikoshiba K, Takenawa T. Phospholipase C δ 4 is required for $[Ca^{2+}]_i$ mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J Cell Biol.* **161**, 79-88, 2003.
- 12) Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, Florman HM. Trp2 regulates entry of Ca^{2+} into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol.* **3**, 499-502, 2001.