

## AMPK 活性化剤によるマウス精子の ATP 量の変化<sup>1</sup> Changes in ATP Levels in Mouse Sperm with AMPK Activators

平松優一	摂南大学大学院理工学研究科 生命科学専攻
宮本敦希	摂南大学理工学部 生命科学科
井尻貴之 <sup>2</sup>	摂南大学理工学部 生命科学科
HIRAMATSU, Yuichi	Division of Life Science, Graduate School of Science and Engineering, Setsunan University
MIYAMOTO, Atsuki	Department of Life Science, Faculty of Science and Engineering, Setsunan University
IJIRI, Takashi W.	Department of Life Science, Faculty of Science and Engineering, Setsunan University

### Abstract

Mammalian sperm are produced in the testis and undergo biochemical and physiological modifications during passage through the epididymis and female reproductive organs, resulting in the acquisition of motility and the ability to fertilize an egg. These changes include hyperactivation that is characterized by asymmetric flagellar movement with a high amplitude, increasing in the fluidity of the sperm cell membrane, tyrosine phosphorylation of sperm proteins, and exocytosis that occurs in the acrosome. Adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) is a sensor of cellular energy. When AMPK is activated by phosphorylation, it switches on the pathways that produce ATP and also switches off the pathways that consume ATP. Therefore, to understand the mechanisms of energy metabolism in sperm, we examined the effects of two AMPK activators, metformin and AICAR, on mouse sperm. In this study, the phosphorylation of AMPK was confirmed by immunoblot analysis, and then the total ATP level was measured using the CellTiter-Glo<sup>®</sup> assay. Our results suggest that the net amount of ATP was increased by adding the AMPK activators to non-capacitated, capacitated, and acrosome-reacted sperm in the mouse. Especially, activation of AMPK by the treatment with AICAR in mouse sperm, not only promoted the induction rate of acrosome reaction and increase in the amount of ATP, but also improved the motility. On

<sup>1</sup> 【原稿受付】 2020 年 10 月 31 日, 【掲載決定】 2021 年 3 月 8 日

<sup>2</sup> 【主著者連絡先】 井尻 貴之 摂南大学, 講師 e-mail: takashi.ijiri@lif.setsunan.ac.jp  
〒572-8508 大阪府寝屋川市池田中町 17-8, 摂南大学理工学部 生命科学科

the other hand, the activation of AMPK with metformin treatment promoted an increase in acrosome reaction and the ATP amount, but weakened sperm motility. Therefore, AICAR is more suitable than metformin as an AMPK activator for recovery of sperm function in fertility treatment.

**キーワード:** アカデシン, AMPK, ATP, メトホルミン, マウス, 精子

**Keywords:** AICAR, AMPK, ATP, metformin, mouse, sperm

## 1. はじめに

先進国では晩婚化や環境の変化などが原因で 6 組に 1 組のカップルが不妊といわれており、我が国も例外ではない。この少子化の影響から、日本では 2004 年をピークに人口は減少傾向となっており、2050 年には総人口が 1 億人を下回ると予想されている<sup>(1)</sup>。不妊症の原因は多様であるが、約半分は男性側で、精子を産生する機能の障害が主な要因となっている<sup>(2)</sup>。その結果、運動能を持たない精子の数が増え、卵に到達することができず不妊症となる例もあり、精子の運動能を改善することで不妊治療の成功率を上げることが期待できる。

哺乳類の精子は精巣で産生され、精巣上体や雌性生殖器官を通過する間に様々な変化を受け、卵と受精できるようになる。受精能を獲得した精子では、振動幅が大きく非対称な鞭毛運動を示すハイパーアクチベーション、コレステロールの流出による精子細胞膜の流動性の増加、精子タンパク質のチロシンリン酸化、エキソサイトーシスにより先体の内容物が放出される先体反応が起こる。これら一連の現象はキャパシテーションとよばれている<sup>(3)</sup>。精子はアデノシン三リン酸 (ATP) のエネルギーを利用して鞭毛運動を行っているが<sup>(4)</sup>、先体反応も含むキャパシテーションの過程での ATP の代謝機構については明らかにされていない。そこで本研究では、ATP を増加させる作用のある、アデノシン一リン酸活性化プロテインキナーゼ (AMPK) に着目した<sup>(5)</sup>。AMPK はアデノシン一リン酸 (AMP) 及びアデノシン二リン酸 (ADP) の増加を感知すると活性化され、ATP 生成の促進と ATP 消費の阻害により ATP 量を増やす方向に働きかける<sup>(6)</sup>。本研究では、AMPK を活性化させる試薬としてメトホルミン (Met) とアカデシン (AICAR)、AMPK を阻害する試薬として Compound C (CC) を使用し、これら AMPK の活性化剤及び阻害剤の存在下でのマウス精子の ATP 量の変化を精子の生理状態の違いも含めて調査した。

## 2. 実験材料及び方法

### 2-1 動物

C57BL/6J (B6) 系統のマウスは日本 SLC から購入した。飼育条件は、室温  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 10\%$ 、12 時間の明暗サイクルで、餌と水を制限なく与えた。マウスを扱ったすべての操作は、摂南大学動物実験に関する規定に則り行った。

### 2-2 試薬

以下に示す試薬以外はすべてナカライテスクから購入した。TYH 培地は LSI メディエンズ、Metformin Hydrochloride (Met) と 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1- $\beta$ -D-Ribofuranoside

(AICAR), Compound C (CC) は東京化成工業, A23187 は Sigma-Aldrich, CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay は Promega から購入した. また一次抗体については, p-Tyr 抗体 (PY99) は Santa Cruz Biotechnology, Anti-AMPK alpha 1 抗体 Mouse mAb [2B7] は Abcam, phospho-AMPK-alpha (Thr172) Rabbit mAb [40H9] は Cell Signaling Technology から購入した. さらに二次抗体に関しては, Anti-IgG (H+L), Rabbit, Goat-Poly, HRP 及び Anti-IgG (H+L), Mouse, Horse-Poly, HRP は Vector Laboratories から購入した.

## 2-3 培地の作製

TYH 培地をガラスボトムディッシュに滴下し, 流動パラフィンを重ね, 蓋をした. その後 37°C, CO<sub>2</sub> 5% に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーターで 12 時間以上の平衡化処理を行った.

## 2-4 精子の形態の確認

各生理状態の精子 (受精能未獲得精子, 受精能獲得精子, 先体反応誘導精子) を 1.5mL チューブに移し, 600×g で遠心し, 上清を取り除き 1×PBS を加えることで洗浄した. その後, 新しいチューブに 50μL ずつ分注し, 150μL の 1×PBS 及びエオシン Y 染色液 (1%) を 50μL 添加し, 転倒混和した. 20 分後, スライドグラスに滴下し, 風乾させ, dH<sub>2</sub>O で軽く洗い流した. 参考文献 (6) の方法を参考に, 正常精子と中片部・頸部・頭部に異常を示す精子を分類し, 倒立顕微鏡下で 400 倍の倍率で 200 匹の精子の形態を観察した上で異常精子率 (%) を算出した.

## 2-5 マウス精子の受精能獲得状態の誘導処理

性成熟した 8 週齢以上の雄の B6 マウスを使用した. 事前に 37°C に加温した 1×PBS 中に精巣上体尾部から精子を絞り出し, 37°C の恒温槽に 10 分間放置した溶液を精子原液とした. また, ズーム式実体顕微鏡で精子の動きを観察することにより, 精子の運動状態を確認した. その後, 精子原液と TYH 培地を 1:1 になるように調製し, 120 分間培養 (37°C, CO<sub>2</sub> 5%) することで精子の受精能獲得を誘導した. 受精能獲得を誘導していない精子は精子原液をさらに恒温槽に 10 分間放置することで調製した. 精子原液を TYH 培地に移す直前に各サンプルに dH<sub>2</sub>O, Met (最終濃度 0.20 mM), AICAR (最終濃度 5.0 mM), CC (最終濃度 0.020 mM) を溶解した. 以下, Met と AICAR, CC は最終濃度で示すが, これらの最終濃度は参考文献 (7) の方法を参考に決定した. その際には血球計算盤を使用し, 鞭毛が動いている精子 (運動精子) と 10 秒間で細胞計数室の 1/16 (0.25 mm) を移動する精子 (移動精子) のそれぞれ 200 匹における割合 (%) を算出することで, マウス精子の生存率には影響を与えず, 運動能を最も変化させる各試薬の適正な濃度を決定した.

## 2-6 免疫ブロッティング

チロシンリン酸化の際の免疫ブロッティングでは  $1.0 \times 10^6$  匹に調製した各精子を, AMPK の量とそのリン酸化状態を調べるための免疫ブロッティングでは  $2.0 \times 10^8$  匹に調製した各精子をサンプルバッファー (50 mM Tris-HCl, pH6.8, 5% ドデシルラウリル酸ナトリウム

[SDS], 15%グリセロール) に溶解し, 精子タンパク質を抽出して $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した. そして, 使用直前に  $98^{\circ}\text{C}$  で 10 分間の熱処理を行い, 精子タンパク質溶液にジチオトレイトール (最終濃度 100 mM), ブロモフェノールブルー (最終濃度 0.05%) を加えた. 続いて, 10%のゲルを用いて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い, PVDF メンブレンに転写した. メンブレンの洗浄には Tween 20-Tris Buffered Saline (T-TBS: 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH7.5, 0.05% Tween 20), ブロッキングには Bullet Blocking One を使用した. メンブレンは一次抗体 (それぞれ T-TBS で, 1,000 倍に希釈した p-Tyr 抗体 [PY99], 2,000 倍に希釈した Anti-AMPK alpha 1 抗体 Mouse mAb [2B7]及び 2,000 倍に希釈した phospho-AMPK-alpha (Thr172) Rabbit mAb [40H9]) と  $4^{\circ}\text{C}$  で 12 時間以上反応させた. そしてメンブレンを洗浄後, 適切な二次抗体 (チロシンリン酸化については 50,000 倍に希釈した Anti-IgG (H+L), Mouse, Horse-Poly, HRP, AMPK (64 kDa) の検出には 20,000 倍に希釈した Anti-IgG (H+L), Rabbit, Goat-Poly, HRP, AMPK のリン酸化 (62 kDa) の検出には 20,000 倍に希釈した Anti-IgG (H+L), Mouse, Horse-Poly, HRP) と室温で 1 時間反応させた. さらに十分にメンブレンを洗浄後, 化学発光 (チロシンリン酸化と AMPK の検出には Chemi-Lumi One L, AMPK のリン酸化の検出には Chemi-Lumi One Super) によりシグナルを検出した. その後, NIH ImageJ ソフトウェア (<https://imagej.nih.gov/ij/>) で画像解析を行い, 対象とするバンドの輝度を数値化した.

## 2-7 マウス精子の先体反応の誘導処理

精子原液と TYH 培地が 1: 1 になるように調製し, 90 分間培養 ( $37^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  5%) した. その後カルシウムイオノフォアである A23187 (最終濃度 0.010 mM) を添加した<sup>(8)</sup>. さらに, 10 分間培養後, 1.5mL チューブに移し  $500\times g$  で 1 分間遠心し, 上清を取り除き新たな TYH 培地を加えることで洗浄した. 培養は開始してから 2 時間経過するまでに行い, 先体反応を誘導した. 精子原液を TYH 培地に移す直前に各サンプルに  $\text{dH}_2\text{O}$ , Met (0.20 mM), AICAR (5.0 mM) 及び CC (0.020 mM) を溶解した.

## 2-8 先体の状態の確認

先体反応の誘導処理を行った精子溶液を,  $600\times g$  で遠心し, 上清を取り除き  $\text{dH}_2\text{O}$  を加えることで洗浄した. この溶液をスライドグラスに滴下し, 風乾させた. その後, 最終濃度を 0.04%に調製した Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) で 15 分間染色し,  $\text{dH}_2\text{O}$  で軽く洗い流した. マウス精子の先体の状態を倒立顕微鏡下で 400 倍の倍率で観察した上で, 200 匹の精子についての先体反応の誘導率 (%) を算出した.

## 2-9 マウス精子の ATP 量の測定

調製後の各精子を 1.5mL チューブに移し,  $600\times g$  で遠心し, 上清を取り除き  $1\times\text{PBS}$  を加えることで洗浄した. 続いて血球計算盤を用いて精子数を計測し,  $5.0\times 10^4$  匹になるように希釈した. そして,  $98^{\circ}\text{C}$  で熱処理し, 氷上で冷やした後に超音波処理を行った. さらに,  $600\times g$  で遠心した後, 上清を ATP 抽出液とし, ルシフェラーゼ発光法を応用した CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay を加え, ルミノメーターによりサンプルと ATP 標準溶

液の発光量を測定した。そして、ATP 量と発光量に関する検量線を作成し、各サンプルの  $5.0 \times 10^4$  匹の精子に含まれる ATP 量を算出した。

## 2-10 統計解析

マウス精子の形態の確認、精子の運動能の評価、精子のタンパク質を用いた免疫ブロッティング、精子の先体反応の誘導状態の確認及び ATP 量の測定に関しては IBM SPSS ソフトウェア (SPSS-Statistics Base+Categories 26) による一元分散分析の後、Turkey 検定を行った。以下の結果における数値は平均値±標準偏差とし、 $P < 0.05$  で統計的に有意な差があると判断し、各図において  $P < 0.05$  を (\*) で、 $P < 0.005$  を (\*\*) で示した。

## 3. 結果

### 3-1 各試薬の精子形態に対する安全性の確認

本実験で使用する各試薬がマウス精子の形態に影響を及ぼさないことを確認するために、エオシン Y による染色後、頭部・頸部・中片部の形態に異常を示す精子の割合を算出した (表 1)。受精能未獲得精子、受精能獲得精子、先体反応誘導精子のいずれの場合においても、Met, AICAR, CC のそれぞれを添加した時は、これらの試薬の溶媒である  $dH_2O$  を添加した時と統計的に有意な差はなかった。さらに、先体反応を誘導する際に A23187 を添加した時も、溶媒である DMSO を添加した時と統計的に有意な差はなかった。以上により、各試薬が精子の形態に大きな影響を及ぼさないことが確認できた。

表 1. AMPK 活性化剤または AMPK 阻害剤の添加による精子形態の異常率 (%) ( $n = 3$ )

	$dH_2O$	Met	AICAR	CC	DMSO	A23187
受精能未獲得精子	$18 \pm 5.0$	$22 \pm 10$	$23 \pm 8.0$	$21 \pm 4.0$	-	-
受精能獲得精子	$15 \pm 4.0$	$18 \pm 6.0$	$19 \pm 9.0$	$23 \pm 4.0$	-	-
先体反応誘導精子	$16 \pm 5.0$	$21 \pm 3.0$	$23 \pm 8.0$	$19 \pm 2.0$	$19 \pm 3.0$	$18 \pm 2.0$

### 3-2 AMPK 活性化剤または AMPK 阻害剤の存在下での精子運動能の測定

AMPK 活性化剤 (AICAR, Met) または AMPK 阻害剤 (CC) を添加し、運動精子率 (鞭毛が動いている精子数/全精子数) と移動精子率 (鞭毛による移動を行う精子数/鞭毛が動いている精子数) を算出した ( $n = 3$ )。  $dH_2O$  の添加においては、受精能未獲得精子では運動精子率は  $50 \pm 5.0\%$ 、移動精子率は  $43 \pm 5.0\%$  となり；受精能獲得精子では運動精子率は  $72 \pm 4.0\%$ 、移動精子率は  $65 \pm 4.0\%$  となり；先体反応誘導精子では運動精子率は  $68 \pm 5.0\%$ 、移動精子率は  $74 \pm 5.0\%$  となった。Met の添加においては、受精能未獲得精子では運動精子率は  $27 \pm 10\%$ 、移動精子率は  $11 \pm 2.0\%$  となり；受精能獲得精子では運動精子率は  $45 \pm 4.0\%$ 、移動精子率は  $35 \pm 6.0\%$  となり；先体反応誘導精子では運動精子率は  $41 \pm 3.0\%$ 、移動精子率は  $29 \pm 3.0\%$  となった。AICAR の添加においては、受精能未獲得精子では運動精子率は  $43 \pm 8.0\%$ 、移動精子率は  $67 \pm 4.0\%$  となり；受精能獲得精子では運動精子率は  $73 \pm 9.0\%$ 、移動精

子率は  $81 \pm 4.0\%$  となり；先体反応誘導精子では運動精子率は  $68 \pm 5.0\%$ ，移動精子率は  $87 \pm 5.0\%$  となった．Compound C の添加においては，受精能獲得精子では運動精子率は  $64 \pm 4.0\%$ ，移動精子率は  $28 \pm 4.0\%$  となり；先体反応誘導精子では運動精子率は  $65 \pm 2.0\%$ ，移動精子率は  $22 \pm 2.0\%$  となった．以上の結果において，AMPK 活性化剤の AICAR は精子の運動能を統計的に有意に促進したが，Met は精子の運動能を促進しなかった．また，AMPK 阻害剤の CC は精子の運動能を統計的に有意に弱めた．

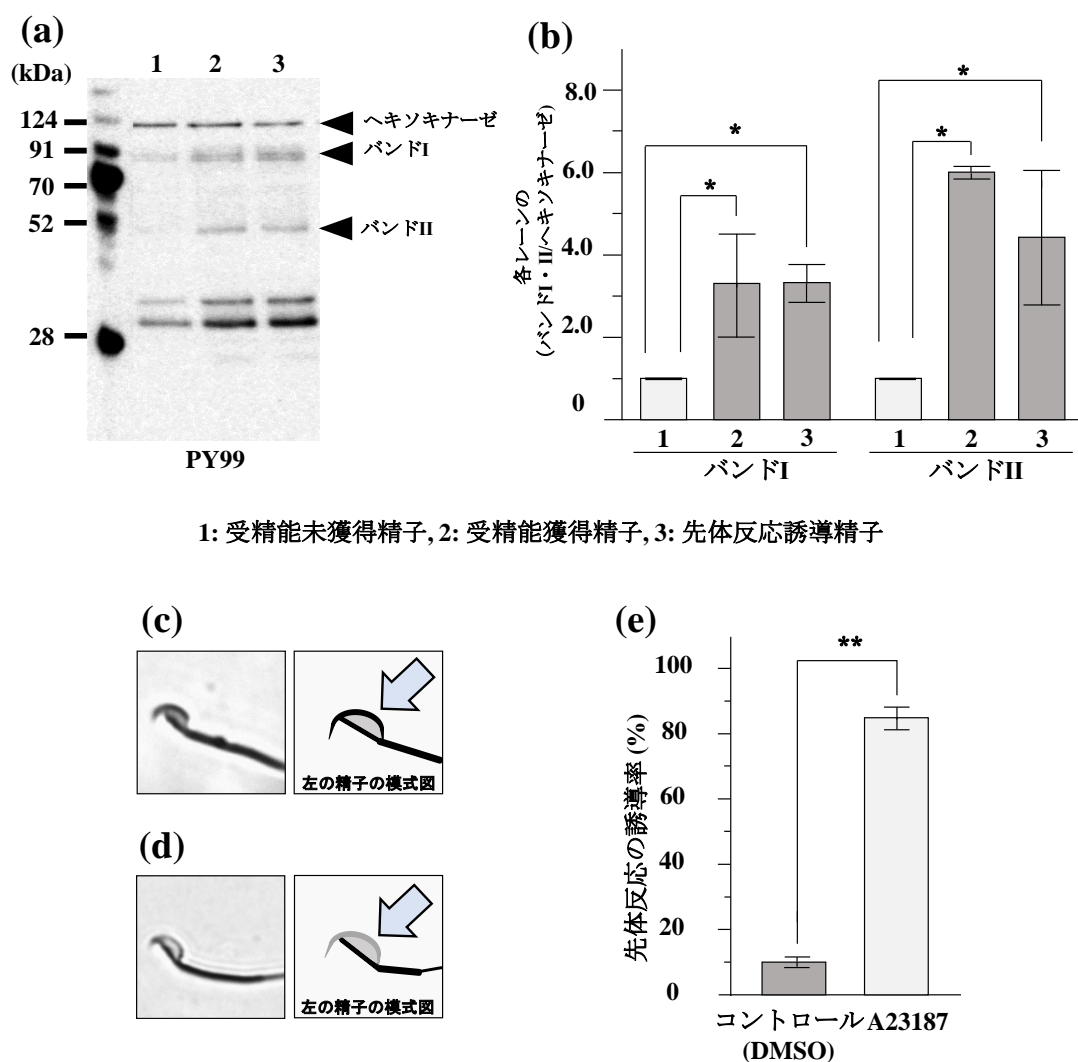


図 1. マウス精子タンパク質におけるチロシンリン酸化の検出  
及び CBB 染色による先体反応の誘導状態の確認 ( $n = 5$ )

### 3-3 精子タンパク質のチロシンリン酸化の検出及び精子の先体反応の誘導状態の確認

精子タンパク質のチロシンリン酸化が受精能獲得の指標の一つとされており，タンパク質のチロシンリン酸化を検出する抗 PY99 抗体を用いた免疫ブロッティングにより受精能

獲得の状態を調べた (図 1a)<sup>(3)</sup>. 受精能未獲得処理の精子タンパク質 (レーン 1), 受精能獲得処理の精子タンパク質 (レーン 2) 及び先体反応誘導処理の精子タンパク質 (レーン 3) を比較すると 91 kDa 付近のバンドが受精能獲得前と比べて強くなっており, 52 kDa 付近には受精能獲得前には見られなかったバンドが受精能獲得後と先体反応誘導後に検出された. また, 124 kDa 付近のバンド (図 1a) は恒常的にリン酸化されている精子における解糖系のヘキソキナーゼ (116 kDa 付近) で, 受精能の獲得状態に関わらず検出されるため<sup>(9),(10)</sup>, これをローディングコントロールとした. そして, 対象とするバンドの輝度/ヘキソキナーゼのバンドの輝度として算出した数値を比較し, レーン 1 (コントロール) を 1.0 とした結果, バンド I (91 kDa 付近) においては, レーン 2 では  $3.2 \pm 1.3$ , レーン 3 では  $3.2 \pm 0.28$  となり, バンド II (52 kDa 付近) においては, レーン 2 では  $6.0 \pm 0.11$ , レーン 3 では  $4.5 \pm 1.4$  となった. いずれの数値もコントロールとは有意な差があり (図 1b), 本実験の受精能獲得処理により, マウス精子に受精能獲得の状態を誘導することができたと判断した<sup>(3),(11)</sup>.

カルシウムイオノフォア (A23187) で精子の先体反応を誘導後に CBB 染色を行い, 先体反応の状態を確認した (図 1c, d, e). 図 1c は先体反応が誘導されていない精子 (矢印: 先体頭部が染まっている), 図 1d は先体反応を誘導された精子 (矢印: 先体頭部が染まっていない) を示しており, 各グループごとに 200 匹の正常精子における先体反応の誘導率を算出した (図 1e). コントロール (DMSO) では  $10 \pm 2.0\%$ , A23187 では  $85 \pm 4.0\%$  の精子が先体反応を誘導された. これらの結果から, 本実験の先体反応の誘導処理により, マウス精子に先体反応を誘導することができたと判断した.

### 3-4 精子の AMPK のリン酸化状態の比較

AMPK の活性化剤及び阻害剤によるマウス精子に含まれる AMPK のリン酸化状態について調べるために, 抗 p-AMPK $\alpha$  抗体を用いた免疫ブロッティングを行った (図 2). 図 2a, d では抗 AMPK $\alpha$ 1 抗体で各レーン (レーン C はコントロールの dH<sub>2</sub>O を, レーン M は Met を, レーン A は AICAR を, レーン M+CC は Met と Compound C を, レーン A+CC は AICAR と Compound C を, レーン CC は Compound C を添加した精子のタンパク質) での AMPK の検出を行った. また, p-AMPK $\alpha$  抗体で AMPK のリン酸化状態を比較すると, 図 2b ではいずれの生理状態の精子においても AMPK 活性化剤を添加することで AMPK のリン酸化を示すバンドが強くなった. そして, 図 2e では受精能獲得精子, 先体反応誘導精子において AMPK 阻害剤を添加することで, AMPK 活性化剤でリン酸化状態が強くなったバンドは弱くなった. さらに, 図 2c では p-AMPK (図 2b) /AMPK (図 2a), 図 2f では p-AMPK (図 2e) /AMPK (図 2d) の輝度の割合を算出した上で, 比較を行った. また, 泳動パターンの乱れにより, 画像処理の過程で正確に輝度を数値化できない場合は対象外とした. 図 2c ではコントロールのレーン C の数値を 1.0 として標準化した結果, 受精能未獲得精子においては, レーン M では  $2.0 \pm 0.50$ , レーン A では  $4.8 \pm 0.30$  となり; 受精能獲得精子においては, レーン M では  $2.1 \pm 1.0$ , レーン A では  $3.3 \pm 0.10$  となり; 先体反応誘導精子においては, レーン M では  $3.0 \pm 0.60$ , レーン A では  $3.6 \pm 0.30$  となった. 以上の結果から, いずれの生理状態のマウス精子においても AMPK 活性化剤は AMPK を有意にリン酸化させることがわかった. さらに, 図 2f ではコン

トロールのレーン CC の数値を 1.0 として標準化した結果、受精能獲得精子においては、レーン M では  $2.1 \pm 0.50$ 、レーン A では  $3.3 \pm 0.10$ 、レーン M+CC では  $1.2 \pm 0.14$ 、レーン A+CC では  $1.5 \pm 0.27$  となり；先体反応誘導精子においては、レーン M では  $4.0 \pm 0.80$ 、レーン A では  $3.8 \pm 0.32$ 、レーン M+CC では  $1.7 \pm 0.14$ 、レーン A+CC では  $1.6 \pm 0.51$  となった。以上の結果から、受精能獲得精子、先体反応誘導精子において、AMPK 阻害剤は活性化したマウス精子タンパク質の AMPK を有意に阻害することがわかった。また、AMPK 阻害剤は受精能未獲得精子の運動能を急速に抑制するため、ATP 測定が正確に行えず、対象から除外した。

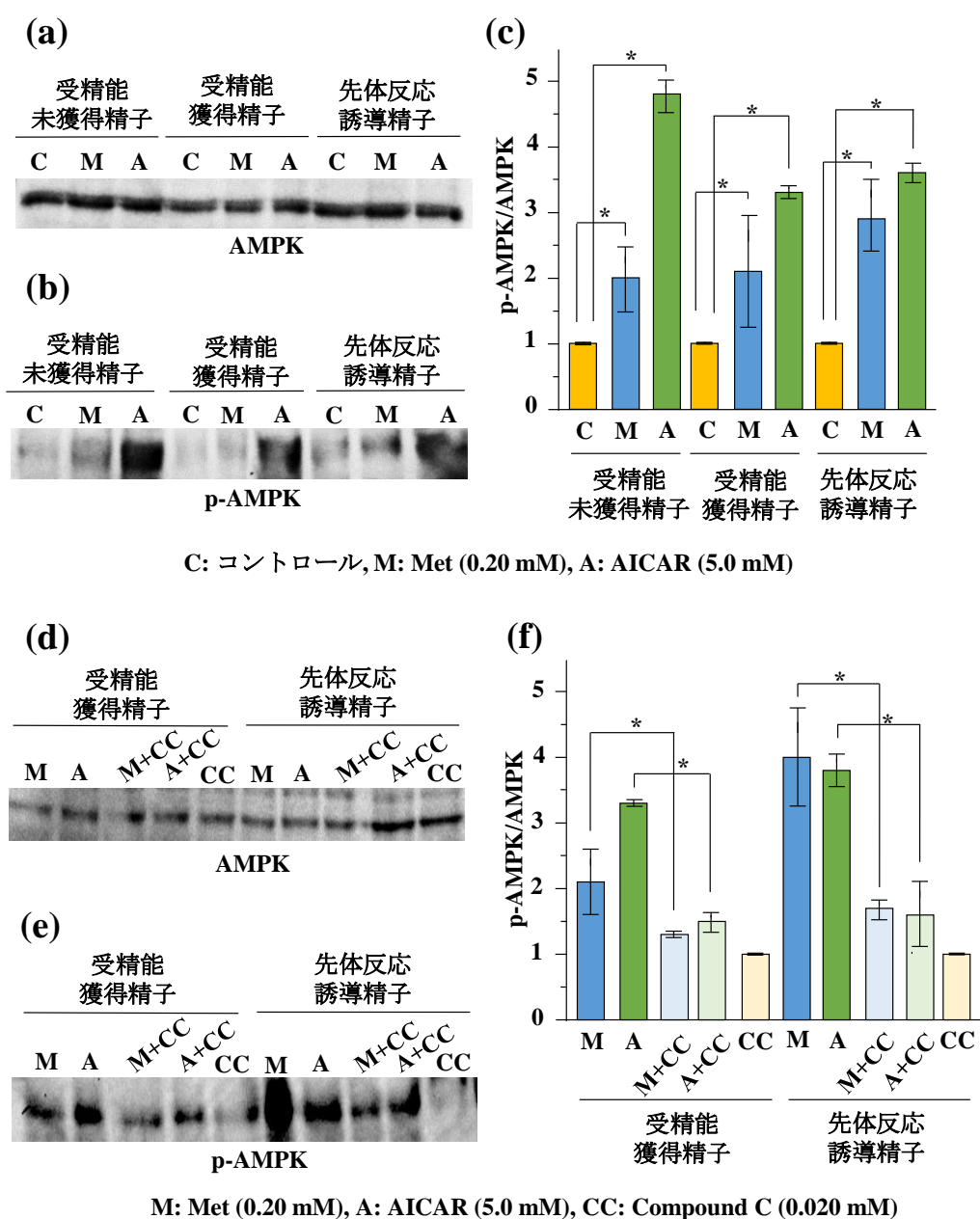


図 2. マウス精子のタンパク質における AMPK とリン酸化 AMPK の検出 ( $n = 3$ )



### 3-5 AMPK の活性化剤及び阻害剤の存在下における先体反応の誘導率の比較

カルシウムイオノフォア (A23187) で先体反応を誘導する過程での精子に対する AMPK の活性化剤及び阻害剤の影響を調べた (図 3). A23187 を添加した精子の先体反応の誘導率は  $83 \pm 3.0\%$ , A23187 と Met を添加した精子の先体反応の誘導率は  $94 \pm 1.0\%$ , A23187 と AICAR を添加した精子の先体反応の誘導率は  $95 \pm 1.0\%$  となった. また, A23187 と CC を添加した精子の先体反応の誘導率は  $24 \pm 3.0\%$ , A23187 と Met 及び CC を添加した精子の先体反応の誘導率は  $43 \pm 5.0\%$ , A23187 と AICAR 及び CC を添加した精子の先体反応の誘導率は  $45 \pm 2.0\%$  となった. これらの結果から, AMPK の活性化はマウス精子の先体反応の誘導率を有意に増加させ, AMPK の活性状態の阻害はマウス精子の先体反応の誘導率を有意に減少させた.

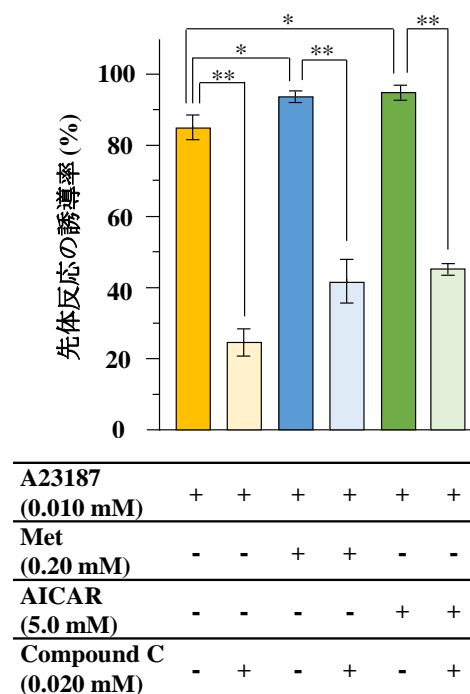


図 3. AMPK 活性化剤及び阻害剤の精子の先体反応に対する影響 ( $n = 4$ )

### 3-6 AMPK の活性化剤及び阻害剤の存在下における精子 ATP 量の比較

上述の生理状態の異なる 3 種類の精子を AMPK 活性化剤で処理した後に,  $5.0 \times 10^4$  匹に含まれる ATP 量を測定した (図 4). この項目では, ATP 量の単位 (mol) は精子  $5.0 \times 10^4$  匹中の値である. 受精能未獲得精子においては,  $\text{dH}_2\text{O}$  のみのコントロールでは  $0.043 \pm 0.0025$  mol, Met を添加した場合には  $0.046 \pm 0.0012$  mol, AICAR を添加した場合には  $0.051 \pm 0.0033$  mol であった. そして, 受精能獲得精子においては,  $\text{dH}_2\text{O}$  で

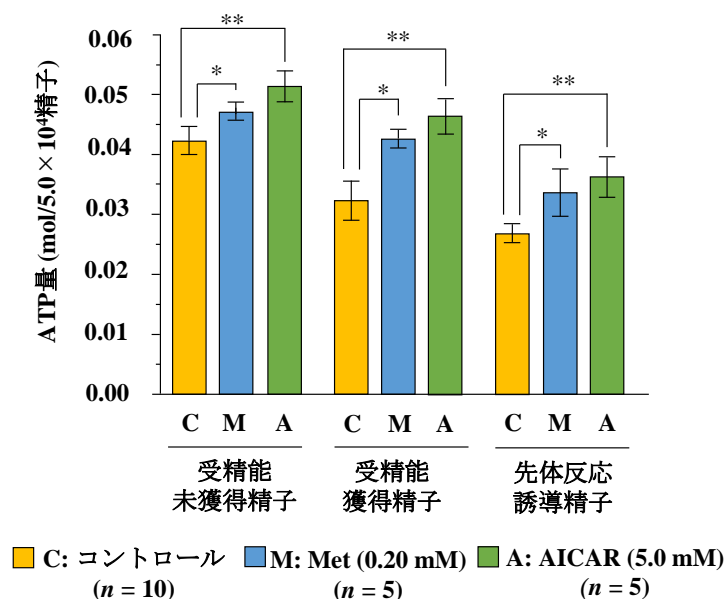


図 4. AMPK 活性化剤の精子 ATP 量に対する影響

は  $0.032 \pm 0.0031$  mol, Met では  $0.042 \pm 0.0013$  mol, AICAR では  $0.046 \pm 0.0034$  mol で, 先体反応誘導精子においては, dH<sub>2</sub>O では  $0.027 \pm 0.0012$  mol, Met では  $0.034 \pm 0.0041$  mol, AICAR では  $0.036 \pm 0.0038$  mol であった. これにより, AMPK 活性化剤ではマウス精子の ATP 量が有意に増加することが示唆された.

次に, 受精能獲得精子と先体反応誘導精子に含まれる ATP 量を, AMPK の活性化剤及び阻害剤で処理した後に測定した (図 5). この項目でも, ATP 量の単位 (mol) は精子  $5.0 \times 10^4$  匹中の値である. 受精能獲得精子 (図 5a) においては, dH<sub>2</sub>O と CC では  $0.012 \pm 0.0020$  mol, Met と CC では  $0.021 \pm 0.0042$  mol, AICAR と CC では  $0.022 \pm 0.00039$  mol となり, 先体反応誘導精子 (図 5b) においては, dH<sub>2</sub>O と CC では  $0.0081 \pm 0.0023$  mol, Met と CC では  $0.015 \pm 0.0034$  mol, AICAR と CC では  $0.020 \pm 0.0027$  mol となった. これにより, 受精能獲得精子, 先体反応誘導精子において, AMPK 活性化剤に加えて AMPK 阻害剤も添加することで, マウス精子の ATP 量が有意に減少することが示唆された.

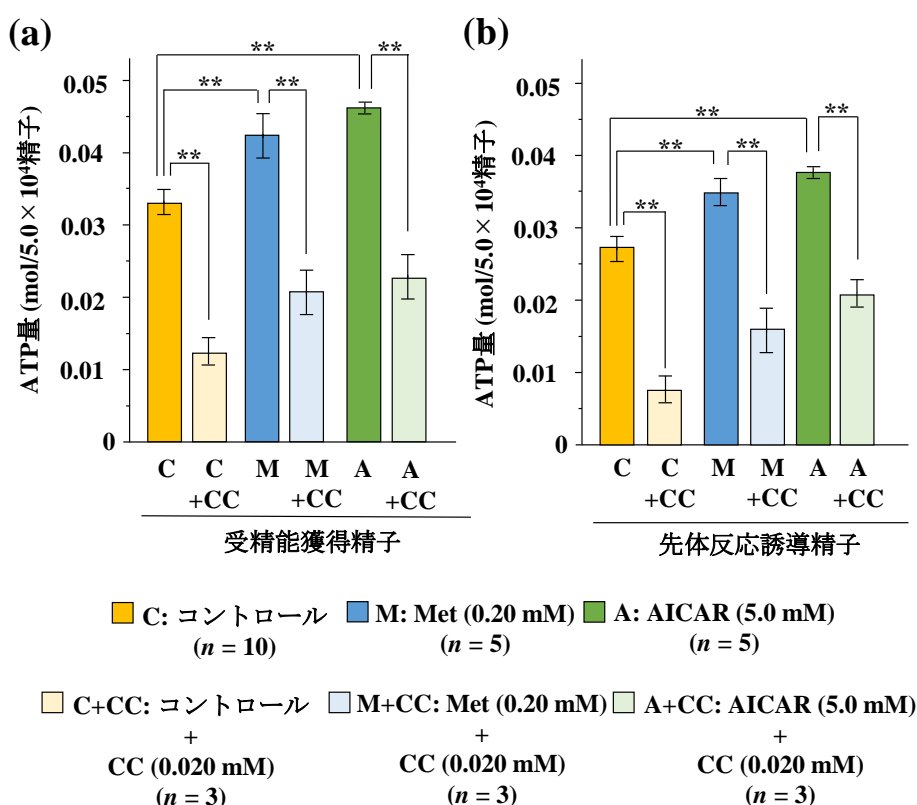


図 5. AMPK 阻害剤の精子 ATP 量に対する影響

#### 4. 考察

##### 4-1 AMPK の活性化剤及び阻害剤によるマウス精子への影響

本研究では, 生理状態の異なる 3 種類のマウス精子 (受精能未獲得精子, 受精能獲得精子,

先体反応誘導精子)を対象に AMPK 活性化剤が精子の ATP 量に与える影響を調べた。また、AMPK 阻害剤については受精能獲得精子、先体反応誘導精子を対象として精子の ATP 量に与える影響を調べた。

AMPK 活性化剤の Met, AICAR により、いずれの状態の精子においても ATP 量は増加し、さらに AMPK 阻害剤の CC を添加することで ATP 量は減少した。Met は主に酸化的リン酸化における ATP 産生を阻害することを発端として AMPK を活性化させ<sup>(12)</sup>、AICAR は自身が AMP の類似体となり直接 AMPK を活性化させることから<sup>(13),(14)</sup>、精子の ATP 量が増加したと考えられる。受精能を獲得した精子では、ハイパーアクチベーションを起こすためのエネルギーとして ATP が利用されたり、可溶性アデニル酸シクラーゼが ATP を cAMP に変換するため<sup>(15)</sup>、精子の全体的な ATP 量は減少する。ハイパーアクチベーションを誘導する過程で精子タンパク質のチロシンリン酸化が亢進するため、今後は AICAR の添加によってマウス精子の運動能が向上する原因が受精能の獲得によるものかを判断するために、抗 PY99 抗体で精子タンパク質のチロシンリン酸化の状態を確認する必要がある。先体反応誘導精子においては、カルシウムイオノフォア (A23187) と同時に AMPK 活性化剤を添加すると、A23187 のみを添加した精子よりも先体反応の誘導率は増加した。また、A23187 と同時に AMPK 阻害剤を添加すると、A23187 のみを添加した精子よりも先体反応の誘導率は急激な減少を示した。これらの結果から、A23187 の効果が AMPK 阻害剤でほぼ遮断されることに加え、免疫ブロッティングで確認された結果も踏まえて、AMPK の活性化の状態が先体反応の誘導率に影響を与えている可能性が示唆された。また、本研究では受精能獲得精子、先体反応誘導精子は TYH 培地で処理を行ったが、これは一般的な人工授精用培地であることから、グルコースなどの糖を含むとされている。AMPK の活性化は体細胞においてグルコースの取り込みを促進するため<sup>(6)</sup>、本実験の TYH 培地を用いた AICAR, Met 処理においては、マウス精子の ATP 量が増加したと考えられる。しかし、受精能未獲得精子に関しては糖を含まない PBS で処理を行ったため、今後は HTF 培地を使用するなど、培地条件の検討が必要である。

#### 4-2 他の動物の精子における AMPK の活性化や阻害の実験結果との比較

本実験における Met 処理に関して、いずれの生理状態の精子においても AMPK の活性化を促進することが免疫ブロッティングの結果から示唆された。それにより、マウス精子の運動能は弱められるが、先体反応の誘導率及び ATP 量の増加は促進されることがわかった。ヤギ精子においては、Met 処理により、先体反応の誘導率及び ATP 量の増加の促進に加えて、運動能も向上していた<sup>(16)</sup>。また、Met 処理後に凍結保存を行ったマウス精子及びイヌ精子では運動能は向上したが、先体反応の誘導率及び ATP 量の増加の促進は見られなかった<sup>(17),(18)</sup>。さらに、Met 処理を行ったニワトリ精子では ATP 量が増加せず<sup>(19)</sup>、Met 処理後に凍結保存を行っていないマウス精子では先体反応の誘導率の増加は促進されなかった<sup>(17)</sup>。また、本実験の AICAR 処理では、いずれの状態の精子においても AMPK の活性化を促進することが免疫ブロッティングの結果から示唆された。それにより、先体反応の誘導率及び ATP 量の増加が促進され、運動能も向上することがわかった。ヤギ精子とニワトリ精子では、

AICAR 処理により、運動能の向上、先体反応の誘導率及び ATP 量の増加が促進されることが報告されている<sup>(16),(19)</sup>。さらに、本実験の CC 処理では、いずれの状態の精子においても AMPK の活性が弱まることで免疫ブロッティングの結果から示唆された。それにより、マウス精子の運動能が弱まり、先体反応の誘導率及び ATP 量が減少することがわかった。一方で、CC 処理により、ヒト精子とブタ精子では運動能が弱まり<sup>(20),(21)</sup>、ヤギ精子とニワトリ精子では運動能が弱まることに加えて、先体反応の誘導率及び ATP 量がともに減少することが報告されている<sup>(16),(19)</sup>。

以上のように、本研究と同様の多くの結果がいくつかの動物種の精子で示されているが、その中には一部で異なる結果も見られた<sup>(16)-(21)</sup>。このことは、生物種によって精子の形態や性質が多様であることが理由と考えられる。

## 5. おわりに

本研究では、AICAR 処理による AMPK の活性化が精子の運動能の向上、先体反応の誘導率及び ATP 量の増加を促進し、CC 処理による AMPK の阻害がこれらの変化を弱めることが示唆された。一方、Met 処理では、AMPK の活性化では、AICAR と同様の結果を示したにも関わらず、運動能は弱められた。さらに、Met 処理に関して、マウス精子を含むいくつかの動物種の精子において違いが見られた<sup>(16)-(19)</sup>。マウス精子及びイヌ精子では凍結保存の前の Met 処理が、融解後に復活させた精子の機能の回復に有用であると発表されているが<sup>(17),(18)</sup>、AICAR を用いた人工授精を目的とした研究はほとんど報告されていない。本研究では Met がマウス精子の運動能を弱めた一方で、AICAR は精子の運動能を向上させたことから、将来的に AICAR が不妊治療の場で活用されることが期待される。

## 謝辞

本研究は、JSPS 科研費 JP15K07036 の支援を受けて実施したものである。

## 参考文献

- (1) 「我が国における総人口の長期的推移」,  
[https://www.soumu.go.jp/main\\_content/000273900.pdf](https://www.soumu.go.jp/main_content/000273900.pdf), (2020 年 10 月 5 日閲覧).
- (2) 「一般財団法人日本生殖医学会不妊症 Q&A」,  
[http://www.jsrm.or.jp/document/funinshou\\_qa.pdf](http://www.jsrm.or.jp/document/funinshou_qa.pdf), (2020 年 10 月 5 日閲覧).
- (3) Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., Pan, D., Olds-Clarke, P., and Kopf, G.S., “Capacitation of mouse spermatozoa. I Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation”, *Development*, 121-4 (1995), pp.1129-1137.
- (4) Mukai, C., and Okuno, M., “Function of glycolysis in sperm motility”, *Journal of Mammalian Ova Research*, 27-4 (2010), pp.176-182.
- (5) Hardie, D.G., Hawley, S.A., and Scott, J.W., “AMP-activated protein kinase-development of the energy sensor concept”, *The Journal of Physiology*, 574-1 (2006), pp.7-15.
- (6) Ijiri, T.W., Kondoh, G., Horie, K., Takeda, J., and Matsuda, Y., “The *Mroh4* (maestro heat-like

- repeat family member 4) gene affects spermatogenesis and sperm morphogenesis in mice”, *Bulletin of the Transdisciplinary Science Research Institute, Setsunan University*, 5-1 (2019), pp.41-56.
- (7) Kimura, A., Matsui, H., and Takahash, T., “Expression and localization of prolyl oligopeptidase in mouse testis and its possible involvement in sperm motility”, *Zoological Science*, 19-1 (2002), pp.93-102.
  - (8) Tateno, H., Krapf, D., Hino, T., Sánchez-Cárdenasc, C., Darszon, A., Yanagimachi, R., and Visconti, P.E., “Ca<sup>2+</sup> ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing in vitro without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110-46 (2013), pp.18543-18548.
  - (9) Kalab, P., Visconti, P., Lecler, P., and Kopf, G.S., “p95, the major phosphotyrosine-containing protein in mouse spermatozoa, is a hexokinase with unique properties”, *Journal of Biological Chemistry* 269-5 (1994), pp. 3810-3817.
  - (10) Nakamura, N., Miranda-Vizuet, A., Miki, K., Mori, C., and Eddy, E.M., “Cleavage of disulfide bonds in mouse spermatogenic cell-specific type 1 hexokinase isozyme is associated with increased hexokinase activity and initiation of sperm motility”, *Biology of Reproduction*, 79-3 (2008), pp.537-545.
  - (11) Arcelay, E., Salicioni, A.M., Wertheimer, E., and Visconti, P.E., “Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation”, *The International Journal of Developmental Biology*, 52-5-6 (2008), pp.463-472.
  - (12) Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, Y., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doeber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., and Moller, D.E., “Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action”, *The Journal of Clinical Investigation*, 108-8 (2001), pp.1167-1174.
  - (13) Sullivan, J.E., Brocklehurst, K.J., Marley, A.E., Carey, F., Carling, D., and Beri, R.K., “Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase”, *FEBS Letters*, 353 (1994), pp.33-36.
  - (14) Corton, J.M., Gillespie, J.G., Hawley, S.A., and Hardie, D.G., “5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?”, *European Journal of Biochemistry*, 229-2 (1995), pp.558-565.
  - (15) Zippin, J.H., Levin, L.R., and Buck, J., “CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-responsive soluble adenylyl cyclase as a putative metabolic sensor”, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 12-8 (2001), pp.366-370.
  - (16) Zhu, Z., Li, R., Ma, G., Bai, W., Fan, X., Lv, Y., Luo, J., and Zeng, W., “5'-AMP-activated protein kinase regulates goat sperm functions via energy metabolism *in vitro*”, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47-6 (2018), pp.2420-2431.
  - (17) Bertoldo, M.J., Guibert, E., Tartarin, P., Guillory, V., and Froment, P., “Effect of metformin on the fertilizing ability of mouse spermatozoa”, *Cryobiology*, 68-2 (2014), pp.262-268.
  - (18) Granhhaye, J., Partyka, A., Ligočka, Z., Dudek, A., Nizański, W., Jeanpierre, E., Estienne, A., and Froment, P., “Metformin improves quality of post-thaw canine semen”, *Animals*, 10-2 (2020),

pp.E287.

- (19) Nguyen, T.M.D., Alve, S., Grasseau, I., Métayer-Coustard, S., Praud, C., Froment, P., and Blesbois, E., “Central role of 5’-AMP-activated protein kinase in chicken sperm functions”, *Biology of Reproduction*, 91-5 (2014), pp.E121.
- (20) Calle-Guisado, V., Hurtado de Llera, A., Martin-Hidalgo, D., Mijares, J., Gil, M.C., Alvarez, I.S. , Bragado, M.J., and Garcia-Marin , L.J., “AMP-activated kinase in human spermatozoa: Identification, intracellular localization, and key function in the regulation of sperm motility”, *Asian Journal of Andrology*, 19-6 (2017), pp.707-714.
- (21) Hurtado de Llera, A., Martin-Hidalgo, D., Gil, M.C., Garcia-Marin, L.J., and Bragado, M.J., “AMP-activated kinase AMPK is expressed in boar spermatozoa and regulates motility”, *PloS One*, 7-6 (2012), pp.E38840.