

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06690

研究課題名(和文)電気的多精拒否による単精受精機構の解明

研究課題名(英文)A study of mechanisms of monospermy by electrical block to polyspermy

研究代表者

岩尾 康宏 (Iwao, Yasuhiro)

山口大学・その他部局等 ・名誉教授

研究者番号：10144916

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)：受精は有性生殖に必須であり、ほとんどの脊椎動物卵は一つの精子のみを受け入れて余分な精子は卵細胞外で排除する多精受精を拒否するしくみをもち、単精での発生を保証する。受精の実験が容易な両生類を用いて、正の受精電位による受精制御の機構を解明した。最初の精子が受精すると卵の膜電位が正になる(受精電位)。正の受精電位は2番目以降の精子との膜融合を阻止するため、複数の精子の侵入を防ぐ(早い電気的多精拒否)。精子膜上には正に荷電したマトリクスメタロプロテアーゼ 2(MMP-2)が分布している。MMP-2欠失精子を用いて、MMP-2が正の受精電位を検知するセンサーであり、多精拒否に必須であることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

受精はすべての動物の有性生殖に必須であり、次世代個体の維持とともに進化における種分化に重要な役割をもっている。今回の研究では、脊椎動物での受精機構のモデルである両生類を用いて早い電気的多精拒否の分子メカニズムを明らかにした。これは動物界全般に共通な受精における普遍的な機能分子の解明に繋がると考えられる。さらに今後、ヒトを含む哺乳類における受精機構の解明や不妊治療の開発等での基盤研究に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Fertilization is essential for sexual reproduction in all animals. The eggs of most vertebrates accept only one sperm to eliminate the extra sperm outside the egg. The egg has a mechanism that prevents polyspermy at the time of fertilization, ensuring monospermic development. In this study, we elucidated the molecular mechanism of monospermic fertilization controlled by positive fertilization potential using amphibians, which are easy to experiment in fertilization. When the first sperm fertilizes and enters the egg, the egg's membrane potential becomes positive (fertilization potential). A positive fertilization potential prevents membrane fusion with the subsequent sperm, preventing entry of multiple sperm into the fertilized egg. We have proved with matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) deficient sperm that positively charged MMP-2 is distributed on the sperm membrane and is essential for the polyspermy block as a sensor for detecting the positive fertilization potential.

研究分野：発生生物学

キーワード：多精拒否

1. 研究開始当初の背景

受精は生物の有性生殖に必須であり、雌雄ゲノムが融合して発生が開始される。ほとんどの脊椎動物（魚類・無尾両生類・哺乳類（真獣類））は、余分な精子を卵細胞外で排除する「単精受精」であり、有尾両生類、爬虫類、鳥類などは複数の精子を受容後に一つの精子核のみを選択する「生理的多精受精」である（Iwao 2012）。卵は受精時の卵賦活により多精拒否機構を駆動して単精発生を保証しているが、その分子機構は未解明の点が多い。

単精受精では、受精時の卵内 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_i$)の上昇により「卵と精子の膜接着・融合」を制御する多精拒否が起き、ツメガエル(*Xenopus laevis*, *X. tropicalis*)では卵での正の膜電位（受精電位）が、他の精子の融合を妨げる電気的多精拒否をおこなう（Iwao et al 2014; Iwao & Izaki 2018）。我々は、精子表面の正に荷電したMatrix metalloproteinase-2 (MMP-2)のhemopexin domain (HPX) が、卵上の負に荷電したガングリオシドGM1と特異的に結合して膜接着・融合を電気的に制御している可能性を示した（Iwao et al 2014）。さらに、MMP-2 HPXを欠失したネットイツメガエルの作成に成功し、この精子が野生型卵と受精すると、多精となる卵が生じる（渡部ら、日本動物学会、2018）。

本研究では、電気的多精拒否に精子膜上のMMP-2 HPXが必要であることを証明し、卵側のリセプターと考えられるGM1とともに卵と精子の膜接着・融合をどのように制御しているかを解明することを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、受精の実験が容易な両生類を「脊椎動物での受精機構のモデル」として用いて、単精受精での卵・精子の膜接着・融合の制御による「早い電気的多精拒否」の分子機構を詳細に解明することを目的とした。早い電気的多精拒否は多くの動物で知られているが、その分子機構は長らく不明であった（Iwao & Izaki 2018）。我々は精子膜上に正に荷電したMMP-2が分布し、電気的多精拒否に重要であることを始めて発見した（Iwao et al 2014）。哺乳類精子にもMMP-2とGM1が分布しており、これらが受精時の膜融合を調節している可能性がある。両生類での電気的多精拒否の分子メカニズムを明らかにすることで、脊椎動物の受精における普遍的な機能分子の解明が期待された。

3. 研究の方法

ツメガエルでは、卵細胞膜に到着した精子が $[Ca^{2+}]_i$ 上昇のシグナルを伝える。卵細胞膜上のCl⁻チャネルの開放による正の受精電位が生じ、第二の精子の進入を阻止する。精子表面の正電荷をもつMMP-2 HPXと卵細胞上の負電荷をもつGM1との結合が電位感受性に重要である。MMP-2とGM1の結合が電位感受的な精子・卵の膜融合に必須であると証明するため、MMP-2を改変した精子を用いてその分子機構を明らかにした。

(1) MMP-2 欠失精子の電位依存性と卵賦活の解析

我々は、MMP-2 HXP 遺伝子の14塩基対を欠失し、MMP-2をもたないネットイツメガエル(*X. tropicalis*)をゲノム編集により作成した（渡部ら、日本動物学会 2017; 2018）。欠失精子の受精では正常精子と同様に+10mVの正の受精電位が発生したが、一部の卵は多精となる。欠失精子では正常精子の受精が阻害される10mVでも受精できることが明らかになっている。今回、受精時の電位感受性がMMP-2の欠失によりどのように変化するかを、膜電位固定法により未受精卵の膜電位を変化させることで詳細に検討した。これにより、MMP-2の電位感受性受精で

の機能を解明した。

(2) MMP-2 欠失精子の細胞膜または核を生体蛍光染色し、Ca²⁺感受性蛍光色素を注入した卵を受精させる。卵への精子接着と[Ca²⁺]_i上昇を同時に測定し、MMP-2 の[Ca²⁺]_i上昇（卵賦活）での役割を明らかにした。

(3) MMP-2 HPX の発現量の異なる精子の電位感受性の解析

電位感受性の異なる種（イモリなど）の精子を用いて MMP-2 の発現と電位感受性との相関を明らかにした。また、受精が起きない *X. laevis* 卵と *X. tropicalis* の交雑受精において、MMP-2 HPX の膜融合と卵賦活での機能を明らかにした。

(4) MMP-2 以外の機能分子の関与の検討

MMP-2 欠失精子は受精できるため、冗長性によるバックアップ分子が存在している可能性がある。精子に他の MMP が発現しているかを欠失精子の受精能を検討した。

(5) MMP-2 の膜融合活性（fusogen 活性）の解明

未受精卵に DNA 結合蛍光色素を注入し、Ca²⁺キレート剤で賦活反応を阻害する。この卵の受精時に融合精子核への蛍光色素の移行により、精子の膜融合能を調べた。MMP-2 HPX 欠失精子などを用いて膜融合過程での電位感受性を詳しく調べた。さらに、卵細胞膜から調整したリポソーム膜を消光性蛍光色素（R-18）で標識し、精子膜リポソームとの膜融合時の消光解消により膜融合活性を調べた。

4. 研究成果

(1) MMP-2 HXP 遺伝子を欠失し、ゲノム編集により作成した MMP-2 HPX 遺伝子を改変したネッタイツメガエル (*X. tropicalis*) では、精子は野生型 MMP-2 タンパク質を発現していないことを、抗 MMP-2 抗体を用いたイムノプロット法と免疫沈降法、およびゼラチンザイモグラフィを用いた酵素活性の検討から明らかにした。さらに、免疫蛍光抗体法により、精子細胞表面に MMP-2 タンパク質が分布していないことを確かめた。この MMP-2 欠失精子を用いて野生型雌から得られた未受精卵を媒精して、受精時の伝変化と卵の膜電位に対する感受性を膜電位固定法により未受精卵の膜電位を変化させることで詳細に検討した。MMP-2 欠失精子は受精でき、+10 mV に達する受精電位を発生し、野生型精子ではすべての卵が単精受精であったが、MMP-2 欠失精子では約 25% の卵が多精受精であり、多極分裂した。受精卵内部を蛍光顕微鏡で観察して複数個の精子が侵入していることを確かめた。さらに、未受精卵の膜電位を受精電位の値と同じ+10 mV に電位固定して媒精すると、野生型精子では全く受精できないが電位を下げると受精できた。一方、MMP-2 欠失精子は+10mV でも約 25%の卵が受精し、複数の精子の侵入が確認できた。MMP-2 欠失精子の受精時には、卵活性（発生開始）および受精膜形成による遅い多精拒否は野生型精子の受精時と変わりなかった。以上により、MMP-2 欠失精子の受精時には、精子の電位感受性が低下して正の受精電位を掻い潜ることで多精受精となったことが分かった。すなわち、精子 MMP-2 タンパク質は早い電氣的多精拒否において必須の分子であることを証明した。(Watabe et al., 2021)。

(2) 卵への精子接着と[Ca²⁺]_i上昇を同時に測定し、MMP-2 の[Ca²⁺]_i上昇（卵賦活）での役割を検討した。卵の受精時に融合精子核への蛍光色素の移行により、精子の膜融合能を調べると、精子は卵表面に接着後数十秒で[Ca²⁺]_i上昇を引き起こした。しかし、卵から精子への蛍光色素の移動は[Ca²⁺]_i開始後数十秒に確認できた。これは、受精時[Ca²⁺]_i上昇は膜融合後に精子ファクターが卵内へ移行して起きるのではなく、精子上の分子と卵細胞膜上の分子との相互作用によっていることがわかった。膜電位は[Ca²⁺]_i上昇の分子間相互作用を制御している。MMP-2 HPX 欠失精子においても[Ca²⁺]_i上昇が生じるので、他の MMP による補完やこれまでに知られている

トリプシン様酵素が $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に関わっている可能性がある。

(3) イモリ精子はツメガエル卵との交雑受精においても電位感受性をもたず、多精受精が起きる。イモリ精子には MMP-2 タンパク質が検出されていないので、MMP-2 が電位感受性を担っていることを裏付けた。また、イモリ精子はゆっくりとした $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こすため、初期の早い $[Ca^{2+}]_i$ 上昇には MMP-2 が必要であると考えられる。さらに、*X. laevis* 卵と *X. tropicalis* の交雑受精では膜融合は起きるが $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は起きないことが分かった。種間での MMP-2 の性質や量などの違いが交雑受精を防いでいる可能性がある。

(4) MMP-2 欠失精子でも、膜融合と $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が起きた。これは MMP-2 が上位の電位感受性センサーとして機能して可能性が高い。一方、MMP-2 欠失精子では、MMP-2 以外の MMP の高いことが分かった。MMP ファミリーは冗長性が高い分子であるので、この分子が MMP-2 の機能を補完している可能性がある。

(5) 今回、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇だけではなく、卵への精子の侵入、すなわち膜融合も卵の膜電位に依存していることを初めて明らかにした。MMP-2 欠失精子での受精では、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の電位感受性が失われただけで膜融合での電位感受性も失われた。MMP-2 は膜融合において膜融合活性 (fusogen 活性)として機能していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mami Watabe, Azusa Hiraiwa, Mami Sakai, Tomoyo Ueno, Shuichi Ueno, Keisuke Nakajima, Yoshio Yaoita, Yasuhiro Iwao	4. 巻 88
2. 論文標題 Sperm MMP-2 is indispensable for fast electrical block to polyspermy at fertilization in <i>Xenopus tropicalis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 744-757
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mrd.23540	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwao Y, Kimoto C, Fujimoto A, Suda A, Hara Y	4. 巻 87
2. 論文標題 Physiological polyspermy: Selection of a sperm nucleus for the development of diploid genomes in amphibians	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction & Development	6. 最初と最後の頁 358-369
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mrd.23235	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 Yasuhiro Iwao, Shuichi Ueno	4. 巻 164
2. 論文標題 SPERM FACTORS AND EGG ACTIVATION: Divergent sperm factors for egg activation in amphibian fertilization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 F29-F37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/REP-21-0480	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10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩尾 康宏・上野 秀一
2. 発表標題 両生類の卵活性化と多精拒否のメカニズム
3. 学会等名 第93回日本動物学会早稲田大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 境 眞実・渡部茉美・中島圭介・矢尾板芳郎・岩尾康宏・上野秀一
2. 発表標題 ネッタイツメガエル受精における電位依存的な精子侵入のしくみ
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 越智洋登・上野秀一・岩尾康宏
2. 発表標題 ツメガエル受精における卵内 Ca ²⁺ 濃度上昇および精子と卵の膜融合の解析
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下将平・岩尾康宏・上野秀一
2. 発表標題 ツメガエル交雑受精を用いた膜接着・融合のしくみの解明
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 境 眞実・渡部茉美・中島圭介・矢尾板芳郎・岩尾康宏・上野秀一
2. 発表標題 ネッタイツメガエル受精における電位依存的な卵賦活と精子侵入のしくみ
3. 学会等名 日本分生生物学会第44回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 越智洋登・上野秀一・岩尾康宏
2. 発表標題 ツメガエル受精における精子と卵の膜融合と卵内 Ca ²⁺ 濃度上昇との関係
3. 学会等名 日本分生生物学会第44回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下将平・岩尾康宏・上野秀一
2. 発表標題 ツメガエル交雑受精における Ca ²⁺ 濃度上昇の役割の解明
3. 学会等名 日本分生生物学会第44回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩尾康宏
2. 発表標題 両生類の多精拒否機構
3. 学会等名 第7回 生殖若手の会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡部菜美, 平岩 梓, 上野秀一, 上野智代, 中島圭介, 矢尾板芳郎, 岩尾康宏
2. 発表標題 精子MMP-2 HPXはツメガエル受精での電氣的多精拒否に必要である
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野隆道, 渡部茉美, 岩尾康宏
2. 発表標題 ツメガエル受精時の卵・精子接着/融合と卵内Ca ²⁺ 濃度上昇の関係
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yasuhiro Iwao and Mami Watabe (M. Yoshida & J.F.Asturiano eds.)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Nature Singapore Pte Ltd.	5. 総ページ数 379
3. 書名 Reproduction in Aquatic Animals From Basic Biology to Aquaculture Technology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	上野 秀一 (Ueno Shuichi) (80363092)	山口大学・大学院創成科学研究科 ・准教授 (15501)	

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
---------	---------