

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 15日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590213

研究課題名（和文）卵保護膜糖鎖制御を介した受精調節機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of the regulation of oligosaccharides within egg-coating envelope during fertilization

研究代表者

三輪 尚史 (MIWA NAOFUMI)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：40255427

研究成果の概要（和文）：

受精成立には、卵を取り囲む保護膜内糖鎖と精子との適切な相互作用が必要である。アフリカツメガエル卵保護膜に存在するダイカルシンは、保護膜を構成する糖蛋白質に結合し保護膜内糖鎖分布を変化させることで、*in vitro*受精を阻害することが分かった。また、マウスダイカルシンが卵管内卵・卵丘細胞複合体の卵丘細胞膜上に存在し、用量依存的に *in vitro*受精を阻害することが分かった。以上より、ダイカルシンは、カエルおよびマウスにおいて精子-卵保護膜相互作用を調節し、受精成立に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Fertilization comprises oligosaccharide-mediated sperm-egg interactions, beginning with sperm-recognition of egg-coating extracellular envelope. We identified a novel mediator of fertilization, dicalcin, in the egg envelope of *Xenopus laevis*. Inactivation of native dicalcin by specific antibody increased the fertilization rate, while addition of dicalcin inhibits fertilization as well as sperm-recognition. Dicalcin binds to a constitutive glycoprotein of the egg envelope, inducing its conformational change, and simultaneously affects the structure of the envelope. We also identified the mouse counterpart of *Xenopus* dicalcin, and found that mouse dicalcin, present in the cumulus cells of cumulus-oocyte complex, also inhibits *in vitro* fertilization. Thus, dicalcin regulates sperm-egg interaction during fertilization both in frogs and mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生理学、受精、糖鎖

## 1. 研究開始当初の背景

受精のプロセスは、卵を取り囲む細胞外の保護膜（アフリカツメガエルでは vitelline envelope (VE)、ヒト、マウスなどでは透明帯

(ZP)) に精子が結合することから始まる。生化学的アプローチにより、保護膜 ZP 蛋白質の糖鎖を介した精子と卵の相互作用の重要性が示唆され、相互作用に必要な糖鎖構造

が精力的に解析されてきた。また、遺伝学的アプローチにおいても、ZP3 欠損マウスを用いて ZP 蛋白質の糖鎖が受精の種特異性を制御することが示唆され、受精成立に保護膜内糖鎖が関与することはコンセンサスを得ている。しかしながら、どのような保護膜糖鎖がどのように精子に働くかについては未だ不明な部分が多く、新しい知見が期待されている。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、アフリカツメガエル卵保護膜に新規蛋白質 dicalcin(ダイカルシン)を見出していた。予備的実験により、過剰量のダイカルシンが卵保護膜に存在すると受精は成立しないことを示唆する結果を得ており、卵保護膜内ダイカルシンが恒常的に受精成立を阻害している可能性がある。このように内因性蛋白質が用量依存的に受精成立を制御する例は知られておらず、ダイカルシンの機能解明は生殖科学に多大に貢献すると考えられる。また、マウスダイカルシンの存在を示唆する結果も得ており、過剰量存在下において機能受精効率が低下することを示唆する結果を得ている。そこで、本研究ではツメガエルおよびマウスにおいてダイカルシンの糖鎖を介した受精阻害作用の分子機構を解析し広く脊椎動物の受精の分子メカニズムの解明に資することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 受精プロセスの解析

#### ①未受精卵への精子結合実験

ツメガエル未受精卵を用い、*in vitro* 受精実験を行った。ツメガエル未受精卵のゼリー層を除いた後、組換えダイカルシンまたは抗ダイカルシン抗体をあらかじめ反応させた後、精子と反応させた。未受精卵を固定し核染色した後、卵保護膜の精子核染色強度を共焦点顕微鏡にて定量した。同時に、保護膜に結合している精子核数を目視にて計測した。

#### ②*in vitro* 卵保護膜貫通実験

精子の保護膜貫通能を解析するために、*in vitro* penetration アッセイを開発した。このアッセイでは、ツメガエル未受精卵から卵保護膜糖蛋白質フィラメントを抽出し、ダイカルシンを添加した後、ポリエステルメッシュ上に置いた。この卵保護糖蛋白質レイヤー上に精子を静置し、一定時間後にメッシュを通過した精子の数を計測した。

#### ③*in vitro* 受精実験

ツメガエル未受精卵を用い、*in vitro* 受精実験を行った。ツメガエル未受精卵に組換えダイカルシンまたは抗ダイカルシン抗体をあらかじめ反応させ媒精した後、分裂した卵の比率を受精率とした。

## (2) 卵保護膜の糖鎖解析

### ①レクチン染色

ツメガエル未受精卵保護膜に組換えダイカルシンまたはコントロールとして BSA をあらかじめ反応させた後、蛍光標識レクチン (RCAI) を反応後、共焦点顕微鏡にて解析した。

### ②卵保護膜フィラメント蛋白質の蛍光標識

ツメガエル未受精卵保護膜に組換えダイカルシンまたはコントロールとして BSA をあらかじめ反応させた後、Cy5 と反応させ卵保護膜を *in vivo* 標識した。卵保護膜糖蛋白質フィラメントを抽出し電機泳動後、蛍光スキャナータイプ画像解析装置により保護膜糖蛋白質の蛍光強度を解析した。

## (3) マウスダイカルシンホモログの解析

### ①マウスダイカルシンの免疫染色

卵巣および卵管切片を作製し、マウスダイカルシンホモログ抗体と反応させ共焦点顕微鏡にて解析した。

### ②*in vitro* 受精実験

マウス卵・卵丘細胞複合体を排卵後卵管から採取し、組換えマウスダイカルシンまたは抗マウスダイカルシン抗体をあらかじめ反応させ媒精した後、分裂した卵の比率を受精率とした。

## 4. 研究成果

(1) ツメガエル未受精卵を用いた *in vitro* 精子結合実験により、外因性ダイカルシンは用量依存的に精子の卵保護膜への結合を阻害した。また、*in vitro* penetration アッセイを開発し、ダイカルシンが精子の卵保護膜貫通能に影響を及ぼすかについて解析したところ、外因性ダイカルシンが保護膜レイヤーに存在すると、精子の保護膜貫通能が低下した。したがって、ダイカルシンは精子の卵保護膜への結合および精子先体反応を阻害することが示唆された。

(2) 未受精卵を用いた *in vitro* 受精実験により、外因性ダイカルシンは用量依存的に *in vitro* 受精を阻害し、さらに特異的抗体により内因性ダイカルシンを中和不活化すると受精効率が正常に比べて顕著に増加した。したがって、卵保護膜内ダイカルシンが恒常的に受精成立を阻害している可能性が示唆された。

(3) 卵保護膜は数種の糖蛋白質が会合したフィラメントから構成される。その中で gp41 と gp37 の蛋白質部分にツメガエルダイカルシンが結合することが明らかになった。また、ツメガエルダイカルシンが gp41 に結合することにより、gp41 は RCAI (ヒマ豆レクチン) との結合能が増強することが分かった。

(4)未受精卵において、卵保護膜内糖鎖分布を RCAI の染色性により解析したところ、ダイカルシンが存在すると、保護膜 RCAI 染色性が増強した。また、卵保護膜が蛍光標識されるレベルを解析したところ、ダイカルシンが存在すると、保護膜の標識レベルが増加した。したがって、ダイカルシンは、gp41 に結合することで保護膜フィラメントの高次構造を変化させ、保護膜内糖鎖分布に影響を及ぼすことが示唆された。

(5)マウスダイカルシン抗体を用いた免疫染色実験において、マウスダイカルシンホモログが卵管内の卵・卵丘細胞複合体において、卵丘細胞膜上に存在することが明らかとなった。

(6)マウス卵・卵丘細胞複合体を用い *in vitro* 受精実験を行ったところ、マウスダイカルシンは用量依存的に *in vitro* 受精を阻害した。したがって、マウスダイカルシンは、卵・卵丘細胞複合体の卵丘細胞を介し受精阻害作用を持つ可能性が示唆された。

## 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 4 件)

① Miwa N, Ogawa M, Shinmyo Y, Hiraoka Y, Takamatsu K, Kawamura S. Dicalcin inhibits fertilization through its binding to a glycoprotein in the egg envelope in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem.*, 査読有, 285, 2010, 15627-36

DOI: 10.1074/jbc.M109.079483

② Hanaue M, Miwa N, Uebi T, Fukuda Y, Katagiri Y, Takamatsu K. Characterization of S100A11, a suppressive factor of fertilization, in the mouse female reproductive tract. *Mol Reprod Dev*, 査読有, 78, 2011, 91-103

DOI: 10.1002/mrd.21273

③ Hanaue M, Miwa N, Takamatsu K. Immunohistochemical Characterization of S100A6 in the murine ovary. *Acta Histochem Cytochem*, 査読有, 45, 2011, 9-14

DOI: 10.1267/ahc.11035

④ Hanaue M, Miwa N. Aging of Egg-Coating Structures and Dicalcin. *J Mamm Ova Res*, 査読有, 28, 2011, 110-117

DOI: 10.1274/jmor.28.110

[学会発表] (計 10 件)

① 三輪尚史、花上まゆ、高松研, Identification of binding regions on *Xenopus dicalcin* for its target glycoprotein in the egg-coating envelope, 2013年3月27日, タワーホール船堀 (東京都)

② 三輪尚史、花上まゆ、高松研, Characterization of Mouse Dicalcin in the Female Reproductive Tissue, 第45回日本発生物学会大会, 2012年5月31日, 神戸国際会議場 (兵庫県)

③ 三輪尚史、花上まゆ、高松研, Characterization of the mouse counterpart of frog dicalcin in the female reproductive tissue, 第89回日本生理学会大会, 2012年3月31日, 松本市総合体育館 (長野県)

④ Miwa N, Hanaue M, Takamatsu K, Characterization of Mouse Dicalcin, a Potential Suppressive Factor of Fertilization, in the Mouse Female Reproductive Tract, 45th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, 2011年7月31日, Portland(アメリカ)

⑤ 三輪尚史、花上まゆ、高松研, 受精阻害因子ダイカルシンによる卵保護膜内糖鎖分布制御機構の解析, 第43回日本結合組織学会学術大会, 2011年6月10日, 別府ビーコンプラザ (大分県)

⑥ 三輪尚史、花上まゆ、高松研, Identification of the counterpart of *Xenopus dicalcin* in the mouse female reproductive tract, 第88回日本生理学会大会, 2011年3月29日, JPS誌上開催

⑦ Miwa N, Ogawa M, Hiraoka Y, Takamatsu K, Kawamura S, Inhibitory action of *Xenopus dicalcin* on sperm-egg interaction during fertilization, 69th annual meeting of Society for Developmental Biology, 2010年7月31日, New Mexico(アメリカ)

⑧ Miwa N, Ogawa M, Hiraoka Y, Takamatsu K, Kawamura S., *Xenopus dicalcin*, an intrinsic and suppressive mediator of sperm-egg interaction and subsequent fertilization, 43rd annual meeting of Society for the study of Reproduction, 2010年7月31日, Milwaukee(アメリカ)

⑨ 三輪尚史、小川元之、平岡芳樹、高松研、

河村悟, Molecular analysis of Xenopus dicalcin during fertilization,  
第43回日本発生生物学会, 2010年6月22日,  
京都国際会館 (京都府)

⑩三輪尚史、小川元之、平岡芳樹、高松研、  
河村悟, Molecular analysis of inhibitory  
effects of Xenopus dicalcin on the  
fertilization process, 第87回日本生理学  
会大会, 2010年5月19日, 盛岡市民文化ホ  
ール (岩手県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三輪 尚史 (MIWA NAOFUMI)  
東邦大学・医学部・准教授  
研究者番号: 40255427

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

高松 研 (TAKAMATSU KEN)  
東邦大学・医学部・教授  
研究者番号: 90154898