

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 4 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18862

研究課題名(和文)精子頭部タンパク質による卵外被の認識・通過の分子基盤の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms for sperm recognition of and penetration through the egg coat by sperm head proteins

研究代表者

中澤 志織 (Nakazawa, Shiori)

名古屋大学・理学研究科・特任助教

研究者番号：40748414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：受精とは単純な現象のようだが、卵と精子の間の遠い道や、卵を守る膜(卵外被)によって遮られた、容易ならぬ道である。本研究では、受精実験に使いやすい動物であるカタユレイボヤを用いて、精子が卵外被という障壁を突破する仕組みの解明を目指した。まず、精子の表面にあるタンパク質を調べ上げ、精子と卵外被の相互作用に関わりそうな因子の目録を作り、今後の研究の礎とした。その中でも特に量と数の多かった、メタロプロテアーゼという種類の酵素が、受精に、とりわけ卵外被の分解に、必要であることを発見した。

研究成果の概要(英文)：Sperm should overcome barriers, including the long distance to the egg and the hard membrane protecting the egg (egg coat), to achieve fertilization. We attempted to reveal how sperm penetrate through the prohibiting egg coat through the ascidian *Ciona robusta* (kata yurei boya), a handy model animal for fertilization assays. First we inventoried the sperm surface proteins, that could participate in interaction with the egg coat, to acquire the basic knowledge for further analyses. Among those proteins, metalloproteases, a kind of enzymes, were abundant. We found that metalloproteases were requisite for fertilization, especially for degradation of the egg coat.

研究分野：生化学

キーワード：受精 精子 ホヤ タンパク質 生化学

1. 研究開始当初の背景

受精とは他個体由来の細胞が融合し、運命を共にするという、極めて特殊な現象である。それゆえ、精子と卵には、受精を可能にする特殊な機構が備わっている。特に精子には、卵細胞を守る糖タンパク質の固い膜「卵外被」に、結合し、受精すべき相手の判定(認識)を行い、固い卵外被に穴を開けて通過する機構が必要である。

ホヤは、精子と卵の大量入手が可能で、受精実験が容易なことから、受精研究に古くから用いられてきた。

卵外被は、異種間交配を防ぐとともに、同種精子に対しても強固な障壁として働く。それゆえ、精子が卵外被を突破する仕組みは、受精を理解するうえで解明する必要がある課題である。ホヤの一種マボヤや脊椎動物の一部では、精子の卵外被通過において、精子ユビキチン-プロテアソーム系が卵外被を分解し精子通過を助けると報告されているが、精子プロテアソーム系の局在や、ユビキチン化酵素の実体は不明であった。また、そもそもユビキチン-プロテアソーム系の寄与の程度や、他種における普遍性も、判明してはいない。

ホヤは雌雄同体で精子と卵を同時に海水中に放出するが、自家受精しない性質(自家不和合性)を持ち、自他認識の場合は卵外被であることが、知られている。獲得免疫系をもたないホヤが、自他の細胞を識別する機構には、長年興味を持たれてきた。カタユウレイボヤの自他認識因子の候補として、精子側因子 *s-Themis* および卵側因子 *v-Themis* という対をなす遺伝子が、遺伝学的実験により同定されている。しかし、主に *s-Themis* タンパク質の検出・単離や *s-Themis* のクローニングに技術的困難が多いことが原因で、タンパク質レベルでの機能の検証に誰も成功していない。

2. 研究の目的

ホヤの受精に必要な分子機構を理解すること、特に卵外被への穿孔形成に関わる精子酵素とその性質、および自家不和合性に関わる因子の局在とタンパク質間相互作用を明らかにすることを目標に、本研究に着手した。

3. 研究の方法

精子頭部タンパク質の検出は、質量分析とカタユウレイボヤデータベース(NCBI, Aniseed)に対する検索を中心に、抗体が確立されている分子に関しては免疫学的手法も一部併用した。

卵外被の分解に寄与する因子の候補に対しては、プロテアーゼ阻害薬や阻害タンパク質を用いて、受精実験、卵外被消化実験を行った。特に着目した分子については、クローニングののちリコンビナントに対する抗体と、推定活性ドメインのリコンビナントを複製、また TALEN によるノックアウトを行った。

詳細は次項および雑誌論文1~3に記載した。

4. 研究成果

・卵外被との結合または卵外被への穿孔形成に直接関与しうる精子タンパク質の候補をリストアップする目的で、精子が放出するタンパク質と精子表面タンパク質のプロテオーム解析を行った。カルシウムイオノフォアにより誘起された精子反応の前後で、精子から放出された分子と、細胞膜不透透性標識で標識された分子を、質量分析により網羅的に同定した。ドメイン構成から配偶子間相互作用への関与が見込まれる分子も多数同定され、今後の受精機構解明において基盤となる情報を得た。(雑誌論文3)

・精子表面タンパク質濃縮画分を大量調製し、SDS-PAGE と LC による分離ののち、質量分析を行い、*s-Themis* の一部とみられるペプチドの検出に成功した。これは *s-Themis* のタンパク質レベルでの存在を支持する初めての証拠である。

・カタユウレイボヤにおいて、細胞膜透過性のプロテアソーム阻害薬 MG-132 と bortezomib の存在下で媒精を行うと、卵割達成率が減少することを確認した(澤田ら 1998 の再現)。しかし、卵だけまたは精子だけを阻害薬で前処理して媒精すると、非共有結合性の MG-132 では効果が見られず、共有結合性の bortezomib では卵を前処理した場合のみ卵割達成率減少が見られた。また、薬剤無しで媒精後、阻害薬に曝露した場合も、卵割達成率減少が見られた。また、ポリユビキチン鎖に取り込まれプロテアソームを阻害するユビキチン類似体 UBB⁺ の存在下で媒精を行っても、受精阻害は確認されなかった。以上より、カタユウレイボヤにおいては、プロテアソーム阻害薬による卵割達成率減少は受精阻害ではなく卵割阻害に過ぎず、また受精に精子による卵外被ユビキチン化は必要無いことを明らかにした。カタユウレイボヤにおける卵外被消化機構は、マボヤのそれとは異なるようである。

・精子表面タンパク質濃縮画分に *astacin* 様メタロプロテアーゼ群が多いことを見出した。広域メタロプロテアーゼ阻害薬 GM6001 が受精を阻害したことから、これらの分子はユビキチン-プロテアソーム系に代わる新たな候補因子として有力である。GM6001 による受精阻害は、卵外被を持つ卵でのみ見られ、卵外被除去卵は GM6001 存在下でも受精したことから、メタロプロテアーゼが必要なのは、精子の卵外被への結合・認識・穿孔形成のいずれかの過程である。精子には、SDS-PAGE における卵外被のバンドパターンを変える、すなわち卵外被を消化する能力があることを、我々は確認している。このとき、GM6001 の存在下では精子による卵外被消化が見られなかったことから、精子メタロプロテアーゼは卵外被消化に必要である。精子メタロプロテアーゼが卵外被消化酵素であるか、また

は真の卵外被消化酵素を精子メタロプロテアーゼが活性化しているかの、いずれかだろう。

• Astacin 様メタロプロテアーゼ群のタンパク質レベルでの機能解析のために、抗体およびリコンビナントを作製した。しかし、作製した抗体は、非変性状態の内在性 astacin 様メタロプロテアーゼを検出することができなかった。また、メタロプロテアーゼドメインと推測される領域の、大腸菌発現リコンビナントと昆虫細胞発現リコンビナントの、いずれも、プロテアーゼ活性を示さなかった。カタコウレイボヤ astacin 様メタロプロテアーゼには疎水性が高い領域が多く、精子の内在性分子においては表面に露出している部分に限られ、リコンビナントにおいては適切な折り畳みがなされなかったものと推測している。

• Astacin 様メタロプロテアーゼ群の受精における機能を検証する目的で、TALEN によるノックアウトを行った。合計 8 種類の TALEN 対を設計し、高いノックアウト効率で尾芽胚を得たが、ノックアウト個体は変態の段階で死亡し、受精実験に使用可能な成熟個体にはならなかった。しかし、GM6001 存在下で育成した野生型ホヤでも同様の変態異常が見られたこと、同時期に少なくとも 3 分子の astacin 様メタロプロテアーゼの mRNA が発現していたこととあわせると、astacin 様メタロプロテアーゼ群は、カタコウレイボヤの後期発生(変態)にも必須であると推測される。

• 当初の計画には無かったが、当研究を実施する中で、カタコウレイボヤ精子頭部に、未知の細胞内領域があることを発見した。この新奇領域は、哺乳類精子では先体に結合する落花生凝集素 (peanut agglutinin, PNA) により標識されたので、はじめ先体様オルガネラであると想定した。しかし、この領域は核とミトコンドリアの間という、先体としては機能しえない部位に位置し、またカルシウムイオンフォア処理時にはミトコンドリアと共に精子から脱落するという、先体とは全く異なる挙動を示した。核とミトコンドリアの間の PNA 結合領域は、脊索動物門ではホヤ綱のユウレイボヤ・マボヤと、オタマボヤ綱のワカレオタマボヤ、そして棘皮動物門ではキササンショウウニ・ムラサキウニでも見られた。この新奇精子細胞内 PNA 結合領域について、細胞生物学的性質と生化学的性質を調べ、ある範囲の新口動物において生殖に必要な重要構造である可能性を提唱した。(雑誌論文 1)

以上をまとめると、カタコウレイボヤにおいて、

• 精子が放出するタンパク質および精子表面タンパク質を網羅的に同定した
• 精子表面タンパク質濃縮画分において、自家不和合性因子の最有力候補である s-Themis が、精子表面にタンパク質レベルで存在する

ことを示唆した

• (マボヤではユビキチン-プロテアソーム系が、卵外被分解機構として有力視されているが、)カタコウレイボヤにおけるユビキチン-プロテアソーム系の卵外被消化への寄与は、マボヤとは異なることを示した

• Astacin ファミリーのメタロプロテアーゼ群が精子表面に多く存在し、またメタロプロテアーゼが卵外被の消化に必要なであることを明らかにした

• Astacin 様メタロプロテアーゼ群が、後期発生にも必要であることを見出した

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 3 件)

1. Peanut agglutinin specifically binds to a sperm region between the nucleus and mitochondria in tunicates and sea urchins.

Shiori Nakazawa, Maki Shirae-Kurabayashi, Hitoshi Sawada

Mol Reprod Dev. 2018 Mar 25. (査読あり)

doi: 10.1002/mrd.22982.

[Epub ahead of print] PMID: [29575225](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29575225/)

2. Haemorrhagic snake venom metalloproteases and human ADAMs cleave LRP5/6, which disrupts cell-cell adhesions in vitro and induces haemorrhage *in vivo*.

Tadahiko Seo, Taketo Sakon, Shiori Nakazawa, Asuka Nishioka, Kohei Watanabe, Kaori Matsumoto, Mari Akasaka, Narumi Shioi, Hitoshi Sawada, and Satohiko Araki

FEBS J. 2017 Jun; **284**(11):1657-1671. (査読あり)

doi: 10.1111/febs.14066.

Epub 2017 Apr 20., PMID: [28425175](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28425175/)

3. Proteomics of ionomycin-induced ascidian sperm reaction: Released and exposed sperm proteins in the ascidian *Ciona intestinalis*.

Shiori Nakazawa, Maki Shirae-Kurabayashi, Kei Otsuka, Hitoshi Sawada

Proteomics. 2015 Dec; **15**(23-24):4064-4079. (査読あり)

doi: 10.1002/pmic.201500162.

Epub 2015 Sep 25., PMID: [26223815](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26223815/)

[学会発表](計 4 件)

1. Gordon Research Conference: Fertilization & Activation of Development (July, 2017, Holderness)

“Ascidian sperm metalloproteases in fertilization of the free-spawning marine invertebrate *Ciona robusta*”

Shiori Nakazawa, Maki Shirae-Kurabayashi, Hitoshi Sawada

2. The 22nd International Congress of Zoology (Nov. 2016, Okinawa)

“Functions of sperm astacin-like metalloproteases in fertilization of the ascidian *Ciona robusta*”

Shiori Nakazawa, Maki Shirae-Kurabayashi, Hitoshi Sawada

3. Gordon Research Conference: Fertilization & Activation of Development (July, 2015, Holderness)

“A novel acrosome-like region in ascidian sperm”

Shiori Nakazawa, Kei Otsuka, Maki Shirae-Kurabayashi, Hitoshi Sawada

4. 8th International Tunicate Meeting (July, 2015, Aomori)

“Metalloproteases are necessary for sperm binding to or penetration through the vitelline coat in *Ciona intestinalis*”

Shiori Nakazawa, Kei Otsuka, Maki Shirae-Kurabayashi, Hitoshi Sawada

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中澤 志織 (Shiori Nakazawa)

研究者番号: 40748414

(2)研究分担者

該当なし ()

研究者番号:

(3)連携研究者
該当なし ()

研究者番号:

(4)研究協力者

澤田 均 (Hitoshi Sawada)

名古屋大学・大学院理学研究科附属臨海実験
所・所長・教授

白江-倉林 麻貴 (Maki Shirae-Kurabayashi)

名古屋大学・大学院理学研究科附属臨海実験
所・技術職員