

令和元年6月13日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07373

研究課題名(和文)両生類における単精受精機構の解明

研究課題名(英文)A study of mechanism of monospermic fertilization in amphibians

研究代表者

岩尾 康宏 (IWAO, Yasuhiro)

山口大学・大学院創成科学研究科・教授

研究者番号：10144916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：受精は有性生殖に必須で、その成立には卵と精子の特異的な融合が必要である。本研究では、脊椎動物における雌雄の核による2倍体ゲノムでの単精発生を保證する分子機構のしくみについて両生類を中心に解明した。単精受精のカエルにおける精子と卵の膜融合と卵賦活を制御している電位感受性の分子と考えられているMMP-2 (HPX)を欠失した変異個体の作成に成功し、多精が起こることを明らかにした。また、イモリ生理的多精卵での遅い細胞内多精拒否において、雌雄前核の結合には微小管モータータンパク質が必要であることを明らかにし、余分な付属精子核の選択的な分解機構ではオートファジーやユビキチン分解経路が関わると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、脊椎動物の受精において卵が1つの精子のみを受け入れるしくみ：多精拒否の機構を明らかにすることができた。これらの知見は、受精のしくみが大きく異なる無羊膜類(両生類)から羊膜類(爬虫類)への進化に重要な生殖機構の解明にも役立つ。さらに多精拒否の分子機構に関する詳細な知見は、多数の精子が必要とされる哺乳類の人工授精下で、多精を防止してより有効な受精をおこなう技術への基礎研究としても期待される。

研究成果の概要(英文)：Fertilization is indispensable for sexual reproduction and specific fusion between sperm and egg is necessary for successful fertilization. In this study, we clarified "the molecular mechanisms of establishment of monospermy" which ensures diploid development with male and female genomes in amphibians. Since MMP-2 is known as a candidate of voltage-sensor for sperm-egg fusion and egg activation, MMP-2 deficient frogs were established and then we found that polyspermy occurred during fertilization with MMP-2-deficient sperm. Furthermore, for a slow intracellular block to polyspermy in physiologically polyspermic newt eggs, the union between sperm- and egg pronuclei is dependent on mortar proteins for microtubules. Autophagy and ubiquitination are probably involved in the selective degeneration of accessory sperm nuclei.

研究分野：生殖発生生物学

キーワード：受精 精子 卵賦活 多精拒否

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

受精は生物の有性生殖に欠くことができず、受精卵では雌雄ゲノムが融合して胚発生が開始する。魚類・無尾両生類(カエル)・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(イモリ)や羊膜類(爬虫類、鳥類)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。受精時の卵内 Ca^{2+} 濃度の上昇により卵が賦活され、多精を防ぐしくみ(多精拒否)が起動されるが、その分子機構は未解明の点が多かった。我々は、精子表面の正に荷電した Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) の hemopexin domain (HPX) が受精時の膜接着・融合の電気的な制御に重要であることを明らかにしていた。しかし、電位依存的な活性分子は未解明であり、普遍的な機能分子の解明が望まれていた。また、生理的多精受精卵では、一つの精子核のみが卵核と接合核となり、他の余分な付属精子核(中心体)は退化する。この時の精子核選択と付属精子核での分解・吸収の分子機構は知られていなかった。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、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と生理的多精受精での遅い細胞内での多精拒否の分子機構を解明することを目指した。

2. 研究の目的

単精受精における膜融合と卵賦活を電気的に制御する分子の解明：ツメガエルでの卵と精子の接着(融合)には精子表面糖タンパク質(SGP)が必要であり、正荷電をもつ精子 MMP-2 (HPX)と卵細胞膜マイクロドメイン(MD)上の負荷をもつ GM1 との結合が必要であると考えられた。これを証明するために MMP-2 (HPX)を欠失させた精子を作成し、その受精能を詳しく検討することにより、MMP-2 (HPX)の電気的な多精拒否での役割を検討した。

生理的多精卵での付属精子核の分解機構：イモリ卵での遅い細胞内多精拒否について、雌雄前核の結合における微小管結合分子の役割を明らかにし、精子核と卵核の移動と接着の分子機構を明らかにすること、さらに、余分な付属精子核の選択的な分解機構におけるユビキチン化・オートファジー経路の役割を検討した。

本研究では、受精における細胞膜接着・融合、卵核認識の分子機構の解明を通じて、脊椎動物の受精に普遍的な分子機能を明らかにすることを目的とした。両生類の受精に必須な分子の構造と機能を脊椎動物間で比較して種を越えた普遍的で基盤的な分子メカニズムを追求し、哺乳類の実験系では発見が難しい新規の多精拒否機構(分子)の解明を目指した。また、多精拒否機構に関する詳細な知見は、多数の精子が必要とされる哺乳類の体外受精における多精拒否による効果的な人工授精技術への基礎研究として期待されている。

3. 研究の方法

(1) 単精受精における電気的多精拒否の分子機構の解明：アフリカツメガエル(*X. laevis*)では精子が卵細胞膜に接着し、卵内 Ca^{2+} 濃度上昇のシグナルを伝えると卵細胞膜上の Cl^- チャンネルが開き、正の受精電位が生じて第二の精子の進入を阻止する。単精種の受精では MMP-2 (HPX)/GM1 の結合が受精成立に必須であることを証明するため、MMP-2 遺伝子欠失の雄の精子の受精能を解析した。遺伝子欠失個体の作出に適したネットイツメガエル(*X. tropicalis*)の受精時の Ca^{2+} イオン濃度変化や電位感受性を詳しく調べた。*X. tropicalis* 精子での MMP-2 タンパク質の発現・分布を抗 MMP-2 抗体でのイムノプロット法と免疫蛍光抗体法により調べた。MMP-2 の HPX 部分の遺伝子配列を特異的に破壊するように設計した TALEN ヌクレアーゼを受精卵に注入することで、生殖系細胞において MMP-2 遺伝子を選択的に欠失させ、F0 個体を作成した。これらから欠失 F1 ヘテロ個体をスクリーニングし、継代飼育により F2、F3 ホモ個体を多数作成し、それらの受精能を詳しく解析した。

(2) 生理的多精受精卵で一つの精子核のみが選択されるしくみの解明：微小管モータータンパク質(ダイニン、キネシンなど)が前核の移動と接着に関与しているかをそれらの特異的抗体での阻害により調べた。受精卵から Cell-free 系を作成してリアルタイムで接合核形成を観察できる実験系の確立をおこなった。余分な付属精子核における DNA と中心体分解におけるユビキチン-プロテアソーム系とオートファジー-リソソーム系の役割を検討した。ユビキチン化タンパク質の分布、オートファゴソーム(LC3)とリソソーム(LAMP1)の形成を蛍光抗体法で観察し、特異的阻害剤を用いて核退化での機能を解析した。

4. 研究成果

動物の単精受精における電気的多精拒否の分子機構の解明を目指して研究を進めた。MMP-2 遺伝子を欠失した精子の受精能と電位感受性を担う分子機構を明らかにするための実験をおこなった。遺伝子変異個体の作出に適している 2 倍体ネットイツメガエル(*X. tropicalis*) の受精時には、精子進入点から Ca^{2+} イオン濃度の上昇が起き、 Ca^{2+} 波となって卵全体に伝播した。このとき、+10 mV に達する正の受精電位が数秒以内に発生し、受精電位は卵表面の Ca^{2+} -activated Cl^- channel (CACC) の開放によって生じた。未受精卵の膜電位を 0 mV 以上に固定すると受精が阻害され、*X. tropicalis* 精子は電位感受性をもつことがわかった。さらに、精子上に MMP-2 タンパク質が発現・分布していることを抗 MMP-2 (HPX) 抗体による精子細胞質のイムノプロットと蛍光抗体法により明らかにした。

次に、MMP-2 の HPX 部分の遺伝子配列を特異的に破壊するように設計した TALEN ヌクレ

アーゼを受精卵に注入し、生殖系列細胞に MMP-2 遺伝子（とくに HPX ドメイン）を選択的に欠失させたネッタイツメガエルを作出した。MMP-2 遺伝子を欠失した F1 ホモ個体は得られなかったが、F1 ヘテロ個体の作成に成功し、F1 個体の交雑から F2 ホモ個体をスクリーニングした。さらに、継代飼育により F3 ホモ個体を多数作成した。MMP-2 HPX 欠失個体でも精子形成には異常がなく、受精能を保持していた。欠失ホモ精子と野生型卵との受精では、野生型精子での受精と同様の正の受精電位が発生したが、一部の卵で多精受精が見られた。欠失精子では電位感受性が低下したために第二以降の精子の進入を阻止できなかった可能性が高い。

生理的多精受精のイモリ卵における細胞質内多精拒否の分子機構を明らかにするため、一つの精子核のみが選択されるしくみに関して *In vivo* での解明をおこなった。一つの精子前核のみが卵前核に接近して接着・融合するしくみについて、単精受精をおこなうアフリカツメガエル卵と比較して詳細に解析した。前核の移動には、微小管モーター（ダイニン、キネシン）が関与していることを各種の阻害剤と特異的な抗体を用いて調べた。とくに、新規のキネシン Eg5 の関与を始めて明らかにすることができた。さらに、多精受精したイモリ受精卵を用いて、余分な付属精子核における DNA と中心体分解におけるユビキチン - プロテアソーム系とオートファジー - リソソーム系の役割を明らかにした。ユビキチン化タンパク質の分布、オートファゴソーム (LC3) とリソソーム (LAMP1) の形成を蛍光抗体法で観察し、特異的阻害剤を用いて核退化での機能を解析した。精子ミトコンドリアの分解と付属精子核の退化にはユビキチン化と特異的なオートファジー誘導機構が関わる可能性が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1) Watabe M, Izaki K, Fujino S, Maruyama M, Kojima C, Hiraiwa A, Ueno S, Iwao Y. The electrical block to polyspermy induced by an intracellular Ca^{2+} increase at fertilization of the clawed frogs, *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*.

Molecular Reproduction & Development 86:387–403 (2019). (査読有)

<https://doi.org/10.1002/mrd.23115>

〔学会発表〕(計 19 件)

(1) 藤本 純佳、角田 明日香、渡辺 安理沙、岩尾 康宏

イモリ生理的多精における細胞内多精防止

第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年

(2) 平岩 梓、渡部 菜美、上野 智代、上野 秀一、中島 圭介、矢尾板 芳郎、岩尾 康宏

ネッタイツメガエルにおける MMP-2 HPX の受精での役割

第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年

(3) 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

ツメガエルの卵賦活と電気的多精拒否における精子 MMP- HPX の役割

第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年

(4) 平岩梓、渡部菜美、上野秀一、上野智代、中島圭介、矢尾板芳郎、岩尾康宏

ネッタイツメガエルにおける MMP-2 HPX の欠失個体の作成と受精での役割

日本動物学会第 89 回大会 2018 年

(5) 藤本純佳、角田明日香、渡辺安理沙、岩尾康宏

イモリ生理的多精での細胞内多精防止におけるユビキチン化の役割

日本動物学会第 89 回大会 2018 年

(6) 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

ツメガエル MMP-2 HPX 欠失精子の受精時の卵賦活と電気的多精拒否

日本動物学会第 89 回大会 2018 年

(7) 岩尾康宏

早い多精防止と卵付活のしくみ

第 6 回生殖若手の会 2018 年

(8) 木本 ちひろ、原 裕貴、岩尾 康宏

両生類の受精における接合核形成のしくみ

日本動物学会第 88 回富山大会 2017 年

(9) 渡部 菜美、井崎 顕太、小島 千帆、岩尾 康宏

ツメガエル受精時の卵内 Ca イオン濃度上昇と早い電気的多精拒否の関係

日本動物学会第88回富山大会 2017年

(10) 平岩 梓, 渡部 菜美, 上野 智代, 上野 秀一, 中島 圭介, 矢尾板 芳郎, 岩尾 康宏
ツメガエル受精時の多精拒否における精子 MMP-2 の役割

日本動物学会第88回富山大会 2017年

(11) 藤本 純佳, 角田 明日香, 渡辺 安理沙, 岩尾 康宏
イモリ生理的多精卵での付属精子核退化におけるコビキチン化の役割

日本動物学会第88回富山大会 2017年

(12) 渡部 菜美, 井崎 顕太, 小島 千帆, 岩尾 康宏
ツメガエル受精時の卵内 Ca²⁺イオン濃度上昇における精子シグナル伝達機構

2017年度生命科学系学会合同年次大会 2017年

(13) 木本 ちひろ, 原 裕貴, 岩尾 康宏
両生類における雌雄前核の接合のしくみ

2017年度生命科学系学会合同年次大会 2017年

(14) 平岩 梓, 渡部 菜美, 上野 智代, 上野 秀一, 中島 圭介, 矢尾板 芳郎, 岩尾 康宏
ツメガエル精子 MMP-2 による早い多精防止

2017年度生命科学系学会合同年次大会 2017年

(15) 藤本 純佳, 角田 明日香, 渡辺 安理沙, 岩尾 康宏
生理的多精のイモリ卵における付属精子核とミトコンドリアの退化 2017

2017年度生命科学系学会合同年次大会 2017年

(16) 岩尾康宏

多精子拒否における MMP-2 の役割

第94回日本生理学会大会シンポジウム(受精プロセスにおける免疫応答の仕組みと働き)
アクトシティ浜松(静岡県・浜松市) 2017年 招待講演

(17) 岩尾康宏, 小島千帆, 丸山萌

ネットイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) の電位依存的受精のしくみ

第39回日本分子生物学会年会

パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 2016年

(18) Yasuhiro Iwao, Chiho Kojima, Mei Maruyama

The comparison of voltage-dependent fertilization in the frogs of *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*

日本動物学会第87回沖縄大会

沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市) 2016年

(19) Chihiro Kimoto, Takehiro Ohgami, Yuki Hara, Yasuhiro Iwao

The mechanism of the formation of the zygote nucleus in the fertilized amphibian eggs

日本動物学会第87回沖縄大会

沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市) 2016年

[図書](計 2件)

(1) 岩尾康宏

丸善出版、動物学の百科事典(公益社団法人日本動物学会編集)「単精受精と多精受精」
2018年、全800頁(348-349頁)(共著)

(2) Y. Iwao and K. Izaki

Springer Japan

Reproductive and Developmental Strategies. Diversity and Commonality in Animals),
Chapter 24, "Universality and Diversity of a Fast, Electrical Block to Polyspermy During
Fertilization in Animals"

2018年、全789頁(499-533頁)(共著)

[その他]

ホームページ等

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~suenoscb/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：上野 秀一

ローマ字氏名：Ueno Shuichi

所属研究機関名：山口大学

部局名：大学院創成科学研究科

職名：准教授

研究者番号 (8 桁): 80363092