

令和元年6月12日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08530

研究課題名(和文)配偶子受精能の相互補完的な共役機構とその制御メカニズムの解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of the regulatory mechanisms for the fertilization competence of zygotes

研究代表者

三輪 尚史 (Miwa, Naofumi)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：40255427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：受精の成立には、卵を取り囲む構造物(卵保護膜と呼ばれる)と精子が適切に作用することが必要である。アフリカツメガエル卵保護膜に存在するタンパク質(ダイカルシンと呼ばれる)は、保護膜を形づくる別のタンパク質(gp41と呼ばれる)に結合し保護膜の性質を制御することにより受精を調節する。本研究では、ダイカルシン作用が過剰な場合(低受精能保護膜)または欠失した場合(高受精能保護膜)における保護膜超微細構造の相違を電子顕微鏡により詳細に解析し、保護膜の構造変化の動的メカニズムを考察した。また、マウスダイカルシン配列に基づき作製した合成ペプチドを利用し受精阻害作用領域を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

受精成立には、卵を取り囲む構造物(卵保護膜と呼ばれる)と精子が適切に作用することが必要である。本研究では、アフリカツメガエル卵保護膜に存在するタンパク質(ダイカルシンと呼ばれる)の作用を応用することにより、受精「しやすい」または「しにくい」未受精卵を人為的に作製し、電子顕微鏡等による解析を行った。その結果、ダイカルシンが保護膜を作る構成タンパク質に結合し、卵保護膜の超微細構造および粘弾性を制御することにより、精子と卵保護膜の相互作用およびそれに引き続く受精を調節することを明らかにした。本研究成果を応用することで体外受精用培地または避妊薬の開発に進展を促す可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Fertilization begins with species-restricted interaction of sperm and the egg coat: an extracellular meshwork of filaments constituted by glycoproteins (called ZP protein). Dicalcin, a novel ZP protein-binding protein in *Xenopus* egg coat, suppresses the fertilization rate through its binding to gp41. We analyzed nanoscale-structural properties of the egg coat using transmission electron microscopy, following clamp of the egg coat under either excess of dicalcin's action (low fertilization competence) or lack of the action (high competence), and discussed concerning the mechanism for the dynamic remodeling of the architecture of the egg coat. Additionally, we identified the amino acid region responsible for the action of mouse dicalcin using synthesized partial peptides based upon the sequence of dicalcin. These results indicated that dicalcin affects fertilization efficiency through regulating fertilization competence of the egg coat in frogs and mice.

研究分野：生殖生理学

キーワード：受精 卵保護膜

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

### 1. 研究開始当初の背景

受精成立には、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))と精子が適切に相互作用することが必要である。精子と卵保護膜の結合においては透明帯内糖タンパク質および糖鎖が重要な役割をもつことが示唆されている。一方で、精子先体反応が卵丘細胞塊を通過した後(透明帯到達前)に完了することも報告され、卵丘細胞と精子の相互作用の重要性も示唆されている。以上、精子と卵周囲構造の受精能特性の一端は示されているものの未だその詳細は不明であり、特に各配偶子の受精能特性を相互補完的に関連づけられる実験根拠はないことから、新しい発想が期待されている領域である。

### 2. 研究の目的

受精は生殖の基本的現象であり、その分子メカニズムの解明は生殖生理学のみならず社会的な貢献も大きい。最近研究代表者は、アフリカツメガエル卵保護膜に存在する新規蛋白質 dicalcin(ダイカルシン)が保護膜糖タンパク質に作用し、卵保護膜のフィラメント配向性および糖鎖分布を制御することにより、精子と卵保護膜の相互作用およびそれに引き続く受精を調節することを明らかにした。卵外因子が用量依存的に保護膜の受精能特性を変化させ受精成立を調節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。そこで本研究では、卵周囲細胞外基質の微細構造特性と精子先体反応の相互補完的な共役機構およびダイカルシンによるその制御メカニズムを多面的に解析し、脊椎動物の受精成立の機序の解明に迫ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) ダイカルシンの透明帯フィラメントに及ぼす影響の超微細構造解析

##### ツメガエルダイカルシンの卵保護膜超微細構造に及ぼす影響の解析

ダイカルシン作用部位に該当する合成ペプチド(受精阻害作用を有する)を卵保護膜と反応させ、ツメガエル卵保護膜フィラメントの超微細構造への作用を透過型電子顕微鏡により解析した。

##### ツメガエル卵保護膜 gp41 の卵保護膜超微細構造に及ぼす影響の解析

卵保護膜 gp41 は保護膜フィラメントを構成し、ツメガエルダイカルシン標的タンパク質である。gp41 に由来する合成ペプチド(受精促進作用を有する)を卵保護膜と反応させ、ツメガエル卵保護膜フィラメントの超微細構造への作用を透過型電子顕微鏡により解析した。

#### (2) ダイカルシンの透明帯フィラメント物性への影響の解析

上記の卵保護膜フィラメントの配向性もたらす物性の相違について明らかにするため、卵保護膜の粘弾性を Quartz crystal microbalance(QCM)法により解析した。

#### (3) マウスダイカルシンの受精に及ぼす作用の解析

マウス卵・卵丘細胞複合体を正常マウスおよび欠損マウスの排卵後卵管から採取し、組換えマウスダイカルシンをあらかじめ反応させ媒精した後、雌性前核が形成した卵の比率を指標として、体外受精率を解析した。

##### マウスダイカルシンの受精阻害作用領域の同定

マウスダイカルシンのアミノ酸配列をもとに複数のペプチドを合成し、マウス卵・卵丘細胞複合体との結合能を解析した。

##### マウスダイカルシン遺伝子欠損マウスの妊孕性の解析

ダイカルシン欠損マウスにおける妊娠率および胎仔数を測定し、ダイカルシンの in vivo における作用を解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) ダイカルシンの卵保護膜フィラメントに及ぼす影響の超微細構造解析

##### ツメガエルダイカルシンの卵保護膜超微細構造に及ぼす影響の解析

ダイカルシン作用部位に該当する合成ペプチド(受精阻害作用を有する)を卵保護膜と反応させ、ツメガエル卵保護膜フィラメントの超微細構造への作用を透過型電子顕微鏡により解析した。ダイカルシン由来合成ペプチドの作用により、卵保護膜フィラメントは卵形質膜に平行な位置に配向する傾向が認められた。その結果、異なるフィラメント間の交叉数は少なくなり、フィラメント間隙の「フリー」スペースが増大することが明らかとなった。また、交叉間隔を定量解析したところ、単位長さの整数倍にピークをもつヒストグラムを示したことから、ダイカルシン作用下では、単位長さのフィラメントが連結しより長いフィラメントが形成される可能性が示唆された。一方、ダイカルシン作用によりフィラメントの太さに変化はないことから、フィラメントを構成する ZP タンパク質群の組成に変化はないことが示唆された。

##### ツメガエル卵保護膜 gp41 の卵保護膜超微細構造に及ぼす影響の解析

gp41 に由来する合成ペプチド(受精促進作用を有する)を反応させた場合、卵保護膜フィラメントはランダムな配向をとる傾向が認められた。そこで、この顕著な構造変化を定量的に解析するために、交叉形状(5種類)の分布頻度およびフィラメント交叉角を定量解析した。その結果、gp41 由来ペプチドの作用により、交叉形状および交叉角の分布いずれも最頻値は低下し、データの散らばりは大きくなり、高受精能状態でのランダムな配向性を裏打ちする定量的結果

を得た。

(2) ダイカルシンの透明帯フィラメント物性への影響の解析

上記の卵保護膜フィラメントの配向性の相違がもたらす物性の相違について明らかにするため、卵保護膜の粘弾性を QCM 法により解析した。ダイカルシン由来ペプチド処理により、卵保護膜は粘弾性が高くなることが明らかとなり、受精成立には卵保護膜の粘弾性が適切な範囲内であることが必要である可能性が示唆された。

(3) マウスダイカルシンの受精に及ぼす作用の解析

外因性マウスダイカルシンは用量依存的に *in vitro* 受精率を低下させ、さらにダイカルシン欠損マウスからの卵・卵丘細胞複合体では受精率が増加した。これまでの分割胚率(分割胚数/全卵数)を受精率の指標とした場合と同様の結果を得られたことにより、マウスダイカルシンが恒常的に一定程度受精成立を阻害している可能性が示唆された。次に、マウスダイカルシンの受精阻害作用領域の同定するために、マウスダイカルシンのアミノ酸配列をもとに複数のペプチドを合成し、マウス卵・卵丘細胞複合体との結合能を解析したところ、顕著な結合を示すペプチドが存在した。この領域はマウスダイカルシンの受精阻害作用を有する領域である可能性が示唆された。また、ダイカルシンの受精成立に及ぼす生理機能を解析するために、マウスダイカルシン遺伝子欠損マウスの妊孕性を解析したところ、雌ノックアウトマウスからの胎仔数がコントロールよりも多いことが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hanaue M, Miwa N

Structural and rheological properties conferring fertilization competence to *Xenopus* egg-coating envelope. *Sci Rep* 査読有 7, 2017, 5651  
DOI: 10.1038/s41598-017-06093-3.

〔学会発表〕(計 5 件)

三輪尚史、花上まゆ、高松研. Remodeling of the ZP-filament meshwork in the mature frog egg-coating envelope. 第 90 回日本生化学大会. 2017 年 12 月 6 日, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

三輪尚史、花上まゆ、高松研. Identification of the counterpart of *Xenopus* dicalcin in the mouse reproductive tract. 第 50 回日本発生生物学学会大会, 2017 年 5 月 11 日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)

三輪尚史、花上まゆ、高松研. Structural plasticity of the mature egg-coating envelope induced by extrinsic manipulation of the interaction between dicalcin and gp41. 第 94 回日本生理学会大会, 2017 年 3 月 29 日, アクトシティ浜松(静岡県浜松市)

三輪尚史、花上まゆ、高松研. Identification of the counterpart of *Xenopus* dicalcin in the mouse cumulus-oocyte complex. 第 89 回日本生化学大会, 2016 年 9 月 26 日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

Miwa N, Hanaue M, Takamatsu K. Structural basis of the mature egg-coating envelope meshwork accompanied by dicalcin-dependent control of fertilization efficiency in *Xenopus laevis*. 49th Society for the Study of Reproduction, 2016 年 7 月 17 日, San Diego (USA)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2) 研究協力者  
連携研究者氏名：高松 研  
ローマ字氏名：TAKAMATSU, ken

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。