

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07305

研究課題名(和文) 卵周囲構造制御を介する受精調節機構の分子解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of fertilization competence of egg-coating structures

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：受精成立には、卵を取り囲む構造(卵丘細胞、卵保護膜(透明帯))が精子先体反応を誘起できる構造・物性を備えることが必要である。ダイカルシンは、卵保護膜の糖タンパク質に結合し保護膜の物性を変化させることで、受精率を調節することを明らかにしてきた。本研究で、マウスダイカルシン遺伝子欠損マウスの妊孕性の解析したところ、欠損マウス(雌)からの胎仔数が野生型よりも多いことが分かった。また、ダイカルシンの卵保護膜糖タンパク質以外の標的分子を検索したところ、複数のタンパク質に加え、糖鎖に結合することが示唆された。以上より、ダイカルシンは、標的分子との結合を介し受精成立の生理機能を調節することが明らかとなった。

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。これまでに、卵保護膜に存在するタンパク質(ダイカルシンと名称)が、卵保護膜の糖タンパク質に結合し、卵保護膜の物性を調節し受精成立に関与することを明らかにしてきた。本研究では、ダイカルシンの受精制御の分子基盤と生理機能を検証し、標的タンパク質の存在を明らかにし、またダイカルシン遺伝子欠損マウスの妊孕性が野生型よりも増強することを示唆する結果を得た。本研究成果を応用することで、ヒトを含む様々な動物における生殖補助技術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 proper interaction between fertilization-competent egg-coating structure and sperm. The molecular properties conferring fertilization competence to egg-coating structure remain largely unknown. We identified a novel mediator of fertilization, dicalcin, in the egg-coating envelope of *Xenopus laevis*. We have also found that mouse dicalcin is present in the cumulus cell-oocyte complex prepared from the oviduct lumen following ovulation. Here, we investigated the mechanism for suppressive action of dicalcin as well as its *in vivo* function. We found the presence of a soluble protein that bound to fluorescently-labeled dicalcin in two-dimensional electrophoresis experiment. The number of naturally born pups from DC(-/-) female mice was significantly greater than those of wild type throughout the ages examined. Thus, dicalcin physiologically regulates the fertilization success *in vivo* via binding to several target molecules.

研究分野：生理学

キーワード：受精 卵保護膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物において、排卵された成熟卵は卵周囲構造（卵保護膜 [透明帯] および卵丘細胞）によって被われ、卵・卵丘細胞塊を形成する。精子は卵管内通過時に受精能を獲得し、卵周囲構造に結合し先体反応が生じる。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ており、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唆されているものの未だその詳細は不明であり、新しい発想が期待されている領域である。

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カルシウム結合タンパク質 dicalcin(ダイカルシン)を同定し、ダイカルシンが受精成立に関与することを見出していた(Miwa et al.2007)。これまでの実験において、過剰量のダイカルシン存在下では完全に受精は阻害され、特異的抗体により内因性ダイカルシンを中和すると受精効率は約 2 倍に増加することを明らかにした。さらに、ダイカルシンが卵保護膜フィラメントを形成する糖蛋白質(gp41 とよばれる)に結合し、卵保護膜における糖鎖分布が変化することを見出した(Miwa et al. 2010)。さらに、ダイカルシンと gp41 の相互作用に関与するアミノ酸領域をそれぞれにおいて同定した(Miwa et al. 2015)。これらの成果により、ダイカルシンと gp41 に由来する合成ペプチドを未受精卵と反応させることにより、卵保護膜の受精能を人為的に「低下」または「増加」させることが可能となった。そこで、本研究では、卵保護膜の受精能を人為的に調節することを利用し、未受精卵の受精能を決定する卵保護膜の構造・物性基盤を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 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(雌)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した。また、雌週齢と胎仔数の相関解析を行った。

(2) ダイカルシンの卵周囲構造フィラメントに及ぼす影響の解析

ダイカルシン側相互作用領域に相当する合成ペプチドまたは gp41 側相互作用領域に対応する合成ペプチドを、未受精卵に数分間反応させ、未受精卵周囲構造の透過型電子顕微鏡観察を行い、フィラメントの配向性の定量的形態解析を行った。

(3) ダイカルシンの受精阻害作用の分子メカニズムの解析

ダイカルシンの標的分子を同定するために、マウス卵巣腫瘍細胞の水溶性画分を調製し、二次元電気泳動後メンブレンに転写し、蛍光標識ダイカルシン由来ペプチドと反応させ、ダイカルシン結合分子を分離した。また、ダイカルシンは、タンパク質以外にも糖鎖や脂質に結合する可能性が考えられたので、複数種類の糖鎖・脂質についてアレイ解析を行った。

(4) 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受精阻害作用の責任領域を同定するために、マウスダイカルシン全長アミノ酸配列を7つの領域に分け、各々の領域に対応するペプチドを合成し、卵・卵丘細胞塊への結合能を解析した。

4. 研究成果

(1) 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。また、加齢による変化を解析するために、雌週齢と胎仔数の相関解析をおこなった。その結果、すべての週齢において、マウスダイカルシン遺伝子欠損マウスの胎仔数は多く、ダイカルシンの妊孕性増強効果は、加齢により効果の減衰がないことが示唆された。自然受精での受精率増強を示す遺伝子組み換えマウスの例はこれまでのところ知られておらず、非常に重要な結果であると考えている。

(2) ダイカルシンの卵周囲構造フィラメントに及ぼす影響の解析

ダイカルシンと gp41 の相互作用に関与するアミノ酸領域をすでに同定している。ダイカルシン側の相互作用領域に対応した合成ペプチドをあらかじめ未受精卵と数分間反応させた後媒精した場合、受精率は低下した。一方で、gp41 側の相互作用領域に対応した合成ペプチドを数分間反応させた後媒精した場合、受精率は増加した。そこで、どちらかの合成ペプチドを未受精卵と反応させ、低受精能または高受精能の卵保護膜を調製し、保護膜フィラメントの超微細構造

を透過型電子顕微鏡により観察した。ダイカルシン由来ペプチドを反応させた低受精能保護膜フィラメントは、卵形質膜に平行に配置する一方で、gp41 由来ペプチドを反応させた高受精能保護膜フィラメントはランダムに錯綜した配置をとることがわかった。さらに、透過型顕微鏡画像の定量的形態解析をおこなったところ、低受精能または高受精能保護膜において、各フィラメントの太さに変化はなかった一方で、フィラメントの交叉角やフィラメントの長径は顕著に変化がみられた。高受精能フィラメントの長径の分布は 10nm-20nm にピークがあるガウス分布様のパターンを示したが、低受精能フィラメントの長径の分布は 10nm-20nm の他に、30-40nm, 50-60nm に複数のピークが認められた。以上より、卵保護膜フィラメントの配向は、短時間（数分間）でダイナミックなモデリングが可能であり、受精能に共役することが示唆された。これらの結果は、卵保護膜の受精能の分子構造基盤を考察する上で、非常に重要な知見であると考えている。

(3)ダイカルシンの受精阻害作用の分子メカニズムの解析

ダイカルシンの gp41 以外の標的分子の同定

ダイカルシンの gp41 以外の標的分子を同定するために、初代培養された卵丘細胞から水溶性および膜画分を調製し、二次元電気泳動後メンブレンに転写し、蛍光標識ペプチドと反応させたものの、蛍光シグナルが弱いことがわかった。そこで、マウス卵巣腫瘍細胞を利用し、標的分子を含んだ試料の量を増やし、同様の実験を行ったところ、強い蛍光シグナルとなるスポットが分離できた。このスポットについて質量分析を行い、候補分子を推定できた。今後、この分子について同定を試みる予定である。また、ダイカルシンは、卵丘細胞の細胞膜に強く結合した。そこで、ダイカルシンは、タンパク質以外にも糖鎖や脂質に結合する可能性が考えられた。そこで、ダイカルシンの標的分子を同定するために、複数種類の糖鎖・脂質のアレイ解析をおこなったところ、蛍光標識ダイカルシンと強く反応する糖鎖が同定できた。今後、ダイカルシンがこの糖鎖に結合することにより卵・卵丘細胞複合体に及ぼす影響について解析する予定である。

(4)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受精阻害作用の責任領域を同定するために、マウスダイカルシン全長アミノ酸配列を7つの領域に分け、各々の領域に対応するペプチドを合成し、卵・卵丘細胞塊への結合能を解析した。その結果、いくつかのペプチドが結合を示し、その中でも最大の結合能を示す領域を同定した。今後、これらのペプチドの受精阻害作用を解析し、ダイカルシンの受精阻害作用部位を同定することを予定している。

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 3件）

1. 著者名 Saito Ryohei, Satoh Hiromasa, Aoba Kayo, Hirasawa Hajime, Miwa Naofumi	4. 巻 570
2. 論文標題 Dicalcin suppresses in?vitro trophoblast attachment in human cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 206 ~ 213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.07.030	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 Hirasawa Hajime, Miwa Naofumi, Watanabe Shu Ichi	4. 巻 53
2. 論文標題 GABAergic and glycinergic systems regulate ON?OFF electroretinogram by cooperatively modulating cone pathways in the amphibian retina	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1428 ~ 1440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ejn.15054	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 Nagashima Masaru, Miwa Naofumi, Hirasawa Hajime, Katagiri Yukiko, Takamatsu Ken, Morita Mineto	4. 巻 9
2. 論文標題 Genome-wide DNA methylation analysis in obese women predicts an epigenetic signature for future endometrial cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-42840-4	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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 髙藤良平、三輪尚史
2. 発表標題 Suppressive action of dicalcin on in vitro invasion of several cell lines representing human urogenital malignancies.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平沢統, 三輪尚史, 渡辺修一
2. 発表標題 GABAergic and glycinergic systems regulate ON-OFF electroretinogram by cooperatively modulating cone pathways in the amphibian retina.
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長根光男, 小山義徳, 佐藤寛栄, 渡辺修一, 三輪尚史
2. 発表標題 Relationship between coping styles and saliva components in the first-year university students.
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田丸文信, 柴崎貢志, 椎橋実智男, 渡辺修一, 三輪尚史
2. 発表標題 Body temperature increases TRPM1 channel-mediated glutamate release frequency from retinal rod bipolar cells.
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三輪尚史, 佐藤寛栄, 斎藤良平, 花上まゆ
2. 発表標題 Identification of a novel inhibitory factor for metastasis of mouse ovarian tumor cells
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤寛栄、花上まゆ、高松研、三輪尚史
2. 発表標題 Suppressive action of dicalcin on female fertility via interaction with mouse cumulus cell-oocyte complex
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三輪尚史、斎藤良平
2. 発表標題 新規マウス卵巣癌転移阻害因子の解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三輪尚史、青葉香代、斎藤良平、花上まゆ
2. 発表標題 ダイカルシンによるErk活性調節による転移阻害作用
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤寛栄、斎藤良平、青葉香代、平沢統、三輪尚史
2. 発表標題 in vitro着床モデルにおけるダイカルシンの細胞間接着阻害作用
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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