

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440035

研究課題名(和文)新規受精調節タンパク質による卵保護膜制御機構の分子解析

研究課題名(英文)Molecular analysis of a novel fertilization-regulatory protein in the egg-coating envelope.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：受精のプロセスは、卵を取り囲む保護膜と精子との適切な相互作用から始まる。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-精子間相互作用を制御し受精を調節する。ダイカルシンおよびその標的となる保護膜糖蛋白質の一部欠失変異体の結合能を解析し、両蛋白質間の相互作用領域を同定した。つぎにダイカルシン作用が過剰な場合(低受精能保護膜)および欠失した場合(高受精能保護膜)において、保護膜フィラメントのレクチン染色像および電子顕微鏡解析における超微細構造が異なることが分かった。以上より、ダイカルシンは卵保護膜の受精能特性を制御し受精を調節することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Fertilization begins with species-restricted interaction of sperm and the egg-coating envelope that internalizes a three-dimensional meshwork of filaments constituted by glycoproteins (called ZP proteins). Dicalcin, a novel ZP protein-binding protein in *Xenopus* egg envelope, suppresses the fertilization rate through its binding to gp41, a frog counterpart of mammalian ZP3. We identified the interactive amino-acid regions between dicalcin and gp41 by using a series of truncated mutants. We next clamped the egg envelope at fertilization competent or incompetent status by extrinsic treatment with synthetic peptides corresponding to interactive regions, and found that there is a striking nanoscale-structural difference between two statuses of mature unfertilized eggs.

研究分野：生殖生理学

キーワード：受精 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

受精成立には、卵を取り囲む保護膜(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))と精子との適切な相互作用が必要である。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(または糖鎖群高次構造)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)に結合することを発見し、ダイカルシンの卵保護膜糖鎖への影響をレクチン染色性(レクチン:糖鎖結合蛋白質)により解析したところ、ダイカルシン存在下において未受精卵保護膜のレクチン染色強度が増加することを見出した(Miwa et al. 2010)。以上より、ダイカルシンは卵保護膜における存在量に応じて保護膜糖鎖への影響を増減させ、受精効率を調節する可能性が示唆された。しかしながら、その分子メカニズムさらに受精成立における生物学的意義は不明であり、本研究では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、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) ダイカルシンと gp41 の相互作用領域の同定

ダイカルシンおよび gp41 変異蛋白質の結合実験

変異蛋白質の作製においては、蛋白質の二次構造への影響をできるだけ少なくよう欠失領域を決定し、大腸菌を用いて発現した後精製した。gp41 または変異蛋白質を含む分画を電気泳動後、メンブレン上にトランスファーし、標識したダイカルシンまたは変異蛋白質と反応させ、結合能を解析した。

相互作用領域ペプチドの結合実験

gp41 および変異蛋白質を含む分画を電気泳動後メンブレン上にトランスファーし、標識

した合成ペプチドと反応させ、結合能を解析した。

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相互作用領域ペプチド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) 相互作用領域ペプチドによる卵保護膜フィラメントへの影響の解析

卵保護膜フィラメントのレクチン染色

ツメガエル未受精卵保護膜に組換えダイカルシン、作用領域ペプチド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。

卵保護膜フィラメントの電子顕微鏡解析

ツメガエル未受精卵保護膜に組換えダイカルシン、作用領域ペプチド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、走査型および透過型電子顕微鏡解析をおこなった。

(3) マウスダイカルシンホモログの解析

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。

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) ダイカルシンと gp41 の相互作用の解明のために、ダイカルシン側に存在する gp41 結合領域を解析した。まず、ダイカルシンの一部領域を欠失した変異蛋白質を作製し、変異蛋白質と gp41 との結合能を解析したところ、ダイカルシンの N 末端側に結合領域が存在することが推定された。結合領域をより狭く絞るために、推定結合領域内において複数の合成ペプチドを作製し、gp41 との結合能を解析したところ、2つのペプチドが最大結合能をもつことが分かった。これらに相当する領域がダイカルシンの受精阻害作用に必須であるとすると、合成ペプチドも同様に受精阻害作用をあらわすと想像できたので、あらかじめ未受精卵と合成ペプチドを反応させた後媒精したところ、ペプチドは用量依存的に受精を阻害することが分かった。また、合成ペプチドは、ダイカルシンと同様に、卵保護膜内糖鎖分布パターンを変化させることがわかった。以上より、これらのアミノ酸領域が

gp41 結合領域であり、ダイカルシンのもつ受精阻害作用の責任領域であることが示唆された。

(2)つぎに、gp41 側のダイカルシン相互作用領域を同定するために、まず gp41 の一部領域を欠失した変異蛋白質を作製し、変異蛋白質とダイカルシンとの結合能を解析したところ、gp41 の ZP-C ドメイン内に結合領域が存在することが推定された。結合領域をより狭く絞るために、推定結合領域内において複数の合成ペプチドを作製し、ダイカルシンとの結合能を解析し、最大結合能をもつアミノ酸領域を明らかにした。この領域に相当する合成ペプチドを、あらかじめ未受精卵と反応させた後媒精したところ、受精率は増加した。以上より、このアミノ酸領域が gp41 側のダイカルシン結合領域であり、gp41 を介する作用に必須領域であることが示唆された。

(3)ダイカルシン側と gp41 側双方の相互作用領域に相当する合成ペプチド反応後の卵保護膜フィラメントの微細構造を走査電子顕微鏡により解析した。gp41 側の相互作用領域に相当する合成ペプチドを反応させ、受精能を高くしたところ、保護膜表面は「凸凹」した形態をとることが明らかとなった。一方で、ダイカルシン側の相互作用領域に相当した合成ペプチドにより受精能を低くした場合、保護膜表面は「平坦」な形態をとることが明らかとなった。さらに、透過型電子顕微鏡により解析したところ、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、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明らかとなった。すでに、ダイカルシンの作用により精子先体反応が阻害されることが明らかになっていることから、保護膜フィラメントの3次元微細構造が先体反応に影響を与えることが示唆された。

(4)哺乳類におけるダイカルシンの受精調節作用を検討するため、過剰量のマウスダイカルシンホモログをあらかじめ未受精卵と反応させた後媒精させ前核形成率により受精率を評価したところ、マウスダイカルシンホモログが用量依存的に受精を阻害することがわかった。この結果は、ダイカルシンの作用の種を越えた普遍性を示唆する上で重要な知見である。

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)

Miwa N., Protein-Carbohydrate Interaction between Sperm and the Egg-Coating Envelope and Its Regulation by Dicalcin, a *Xenopus laevis* Zona Pellucida

Protein-Associated Protein. *Molecules*, 査読有, 20, 2015, 9468-9486
DOI: 10.3390/molecules20059468.

Miwa N., Ogawa M, Hanaue M, Takamatsu K. Fertilization competence of the egg-coating envelope is regulated by direct interaction of dicalcin and gp41, the *Xenopus laevis* ZP3. *Sci Rep.* 査読有, 5, 2015, 12672.
DOI: 10.1038/srep12672

Miwa N. Dicalcin, a zona pellucida protein that regulates fertilization competence of the egg coat in *Xenopus laevis*. *J Physiol Sci.* 査読有, 65, 2015, 507-514
DOI: 10.1007/s12576-015-0402-7.

[学会発表](計10件)

三輪尚史, 高松 研, Structural regulation of the extracellular egg-coating envelope by the interaction between *Xenopus* gp41 and dicalcin, 第88回日本生化学大会, 2015年12月1日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

三輪尚史, 花上まゆ, 高松 研, Structural plasticity of the mature egg-coating envelope accompanied by the extrinsic control of fertilization success in *Xenopus laevis*, 第48回日本発牛生物学会, 2015年6月3日, つくば国際会議場(茨城県つくば市)

三輪尚史, 花上まゆ, 高松 研, Reversible changes in the orientation pattern of ZP filaments in the extracellular coat of *Xenopus* egg by dicalcin, 第47回日本結合組織学会学術大会, 2015年5月16日, コクヨホール(東京都港区)

三輪尚史, ダイカルシンによる精子-卵保護膜間の相互作用調節, 第92回日本生理学学会大会, 2015年3月21日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Miwa N., Hanaue M, Takamatsu K. Identification of the interactive region on gp41, *Xenopus* orthologue of ZP3, for its target *Xenopus* dicalcin, 47th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, 2014年7月21日, Grand Rapids(アメリカ)

Miwa N., Hanaue M, Takamatsu K. Identification of dicalcin-binding region on gp41, a *Xenopus* orthologue of ZP3, 第47回日本発牛生物学会大会, 2014年

5月29日, ウィンク愛知(愛知県名古屋市)

三輪尚史、花上まゆ、高松研,
Identification of the interactive regions
between dicalcin and gp41; development of
compounds that control the fertilization
rate in frogs, 第91回日本生理学会大会,
2014年3月17日, 鹿児島大学郡元キ
ャンパス(鹿児島県鹿児島市)

三輪尚史、花上まゆ、高松研, Amino acid
regions responsible for the interaction
between dicalcin and gp41, a frog ZP
protein, 第32回日本糖質学会年会, 201
3年8月7日, 大阪国際交流センター(大阪
府大阪市)

Miwa, N, Hanaue M, Takamatsu K,
Molecular mechanism for the interaction
between Xenopus dicalcin and gp41, a
Xenopus orthologue of ZP3, 46th Annual
Meeting of Society for the Study of
Reproduction, 2013年7月23日,
Montreal(カナダ)

三輪尚史、花上まゆ、高松研,
Identification of interactive regions on
Xenopus dicalcin for its target
glycoprotein, gp41, 第46回日本発生生物
学会大会, 2013年5月31日, くにびき
メッセ(島根県松江市)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

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