

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861311

研究課題名(和文)受精における精子核周囲物質の解析

研究課題名(英文)Changes in sperm perinuclear substance during fertilization

研究代表者

大和屋 健二(Yamatoya, Kenji)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：80447309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、受精過程で堅牢な精子の頭部構造からDNAが解放される過程を明らかにすることを目的として、核周囲物質関連タンパク質の同定、精子頭部からDNAが解放される過程のイメージング解析、核周囲物質関連タンパク質の翻訳後修飾変化を解析した。その結果、精子頭部の骨格系と関わっているいくつかの膜タンパク質を同定した。また、受精能獲得過程のタンパク質修飾変化に関わる酵素の活性を指標に、その酵素を精製する条件を確立した。受精の際、核周囲物質は剥けるようにDNAを解放し、その過程にはタンパク質の修飾変化は必要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism that regulate the release of sperm DNA from the robust perinuclear structure during fertilization, we performed live imaging analysis of the process, and mass spectrometric analysis to identify perinuclear substance related proteins. We identified several membrane proteins other than cytoskeletal proteins. Those membrane proteins underwent post-translational modifications during capacitation. Live imaging analysis showed that perinuclear substance was peeled off from the sperm DNA and posttranslational modification of the perinuclear substance was needed for the process.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精子 受精 膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

受精における精子の透明帯通過、精子-卵子接着、精子-卵子膜融合、卵活性化についてはこれまで多くの研究がなされている。しかしながら、精子が卵子に取りこまれ前核に至る過程については、ほとんど研究がなされていない。精子頭部は非常に強固な構造であり、その堅牢さはプロタミンによる DNA の密な凝集だけでなく、核周囲物質が大きく関わっている。受精後の精子クロマチンの脱凝集には卵側の因子である Nucleoplasmin2 が関わっていることが明らかとなっている。また、骨格系タンパク質を主とする核周囲物質を構成するタンパク質についてもプロテオミクス解析の結果が報告されている。しかし、核周囲物質による堅牢な構造から DNA を解放する過程については明らかにされていない。予てから研究対象としている精子頭部に局在する膜タンパク質 Equatorin は、精子-卵子膜融合の際に卵細胞膜上を拡散するのではなく、核と共に卵細胞質へと取りこまれる。このことから、Equatorin タンパク質は膜の裏打ち構造を含む核周囲物質との相互作用が示唆された。

2. 研究の目的

核周囲物質との関わりが示唆されている Equatorin タンパク質を軸に受精に必要な核周囲物質の変化を追うことで核周囲物質による堅牢な精子の頭部構造から DNA を解放する過程の分子機構を明らかにすることを目的とした。

(1) Equatorin タンパク質と相互作用する分子の同定。

(2) Equatorin タンパク質を指標とした、受精卵における核周囲物質の挙動解析。

(3) 受精過程で起こる核周囲物質の翻訳後修飾変化の解析。

3. 研究の方法

(1) Equatorin タンパク質と相互作用する分子を抗 Equatorin 抗体のうち受精を阻害しないものを用いて免疫共沈降法により精製し、質量解析によって同定する。

(2) Equatorin タンパク質に緑色蛍光タンパク質タグをつけたタンパク質を発現する遺伝子改変マウスを用いて、核周囲物質による堅牢な精子の頭部構造から DNA が解放される過程のライブイメージングを行う。

(3) 精子が受精能を獲得するキャパシテーションと総称される過程の前後でのタンパク質の翻訳後修飾変化のうち、核周囲物質に関して起こるものを、精子の頭部構造から DNA が解放される過程に必要な分子機構と考え、質量解析によって同定した核周囲物質関連タンパク質の修飾変化を解析する。

4. 研究成果

(1) Equatorin と相互作用するタンパク質を質量解析にかけた結果、多くの骨格系タンパク質と共に幾つかの膜タンパク質を同定することができた。これらの膜タンパク質には、精子頭部の膜と核周囲の骨格系とを繋ぐ機能が期待される。

(2) Equatorin タンパク質に緑色蛍光タンパク質タグをつけたタンパク質を発現するマウスを用いて受精卵のライブイメージングを行った結果、精子核周囲物質が剥けるような形で DNA から離れていく様子が認められた。一方、キャパシテーション前の精子に DNA の脱凝縮のみを強制的に起こさせると、核周囲物質は引き裂かれるような現象が認められた。このことから、受精卵において精子核周囲物質が剥けるような形で DNA から離れていく過程には核周囲物質の変化が重要であることが明らかとなった。

(3) キャパシテーション過程の前後で起こる精子頭部膜タンパク質の解析を行った結果、いくつかの膜タンパク質においてキャパシテーション前後で分子量変化が認められ

た。それらの分子量変化の機構を解析した結果、修飾変化に関わる酵素の酵素活性を指標にそれら酵素を精製する条件を確立した。

本研究によって、堅牢な精子の頭部構造から DNA を解放する過程には、核周囲物質の分子量変化を伴うことが明らかとなった。また、それに関わる分子を精製する条件などを確立することができた。

今後、それら翻訳後修飾箇所と分子機構を明らかとすることで、卵子内で精子頭部から DNA が解放される過程に異常が認められる場合の不妊原因の解明と治療法開発に結びつけられると考える。

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)

1. Nakamura A, Miyado K, Yamatoya K, Kawano N, Umezawa A. Breast milk stimulates growth hormone secretion in infant mice, and phosphorus insufficiency disables this ability and causes dwarfism-like symptoms. *Regenerative Therapy* (2015) 2:49-56.
2. Ito C, Yamatoya K, Toshimori K. Analysis of the complexity of the sperm acrosomal membrane by super-resolution stimulated emission depletion microscopy compared with transmission electron microscopy. *Microscopy (Oxf)* (2015) 64:279-287.
3. Chen C, Maekawa M, Yamatoya K, Nozaki M, Ito C, Iwanaga T, Toshimori K. Interaction between basigin and monocarboxylate transporter 2 in the mouse testes and spermatozoa. *Asian J Androl* (2015) 17:1-7.

[学会発表](計 7 件)

1. Yamatoya K, Miyado K, Kawano N. 「哺乳類の配偶子融合におけるテトラスパニンの分子機構」『第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会』神戸国際会議場 神戸ポートピアホテル(兵庫県)2015 年 12 月 2 日
2. Yamatoya K, Miyado K, Kawano N. 「哺乳類における配偶子融合の分子機構」『日本動物学会第 86 回新潟大会』朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター(新潟)2015 年 9 月 19 日
3. Miyado K, Yamatoya K, Kawano N. 「テトラスパニン/エキソソームによる膜融合の制御機構」『日本動物学会第 86 回新潟大会』朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター(新潟)2015 年 9 月 19 日
4. 大和屋健二、伊藤千鶴、年森清隆 「SPESP1 ノックアウトマウスの先体反応に伴う先体タンパク質の局在と分子量変化」『第 59 回日本生殖医学会学術講演会』京王プラザホテル(東京都)2014 年 12 月 4-5 日
5. Yamatoya K, Ito C, Hatano M, Toshimori K. 「Analyses of sialylation status of sperm acrosomal protein Equatorin and enzyme responsible for molecular weight shift during acrosome reaction.」『第 37 回日本分子生物学会年会』パシフィコ横浜(神奈川県)2014 年 11 月 27 日
6. Toshimori K., Ito C., Yamatoya K. 「Sperm ODF2: analysis using ODF2-EGFP transgenic mice」『18th International Microscopy Congress (IMC 2014)』Prague Congress Center. Prague (Czech Republic) September 2014.
7. 年森清隆、伊藤千鶴、大和屋健二 精子頭部のキャパシテーションと先体反応 日本アンドロロジー学会第 33 回学術大

会 第 20 回精子形成・精巢毒性研究会
(シンポジウム) 軽井沢プリンスホテル
ウエスト(長野県) 2014年6月12
日

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大和屋 健二 (Yamatoya, Kenji)
国立研究開発法人国立成育医療研究センター・研究員
研究者番号：80447309