

哺乳類の精子と卵子の結合機構を解明

本学附属生命医学研究所ゲノム編集部門 徳弘学長特命准教授らの研究チーム

【本件のポイント】

- 受精条件と、受精後の精子の透明帯通過制御機構を発見
- 透明帯構成タンパク質 ZP2 の 115 塩基が受精条件であると証明
- 亜鉛イオンの放出が精子の通過を制御している可能性

学校法人関西医科大学（大阪府枚方市 理事長・山下敏夫、学長・友田幸一）附属生命医学研究所（所長・木梨達雄）ゲノム編集部門の徳弘圭造学長特命准教授らの研究チームは、哺乳類の受精前後における精子の卵子透明帯への結合・通過制御メカニズムの一端を解明しました。

哺乳類の精子は、透明帯*と呼ばれる卵子の周りを覆う殻のような構造物に結合し、その透明帯を通過したのちに卵子と膜融合して受精が完了します。この中で種特異的な受精*や一つの精子に一つの卵子が融合する単精子受精が行われますが、透明帯と結合して通過するメカニズムについては、これまで十分に明らかになっていませんでした。本研究では、透明帯を構成するタンパク質特有の塩基が透明帯通過の必要十分条件であること、そして受精後の精子の通過を阻害する新たな分子メカニズムが存在することを明らかにしました。

本研究は、受精メカニズムの全容解明のみならず、受精しやすい環境を作りだせる新しい治療・診断薬や人為的に受精を抑制できる避妊薬の開発に繋がることが期待されています。

なお、本研究は徳弘学長特命准教授が、前任地である米国立衛生研究所（National Institutes of Health、以下 NIH）在籍中に研究を行ったもので、研究結果をまとめた論文が米国学術雑誌「Developmental Cell」（インパクトファクター：9.616）のオンライン版に、8月16日（木）午前11時（※日本時間8月17日（金）午前0時）付で掲載されました。

※...各専門用語の詳細は、文末「用語解説」をご参照ください

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室（岡田・畑森）

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

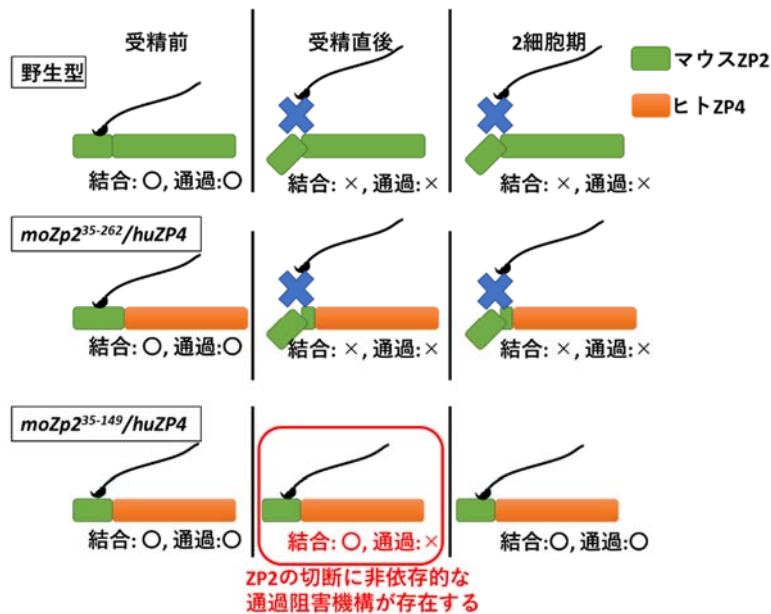
電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2344 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

PRESS RELEASE

< 本研究の概要 >

哺乳類の受精はいくつかのステップを経て完了します。まず、精子は卵子の外側にある体細胞である卵丘細胞層を通過したのちに、透明帯と呼ばれる卵子の周りを覆っている殻のような構造物に結合します。そして透明帯を通過したのちに卵子と膜融合し、受精が完了します。哺乳類において透明帯は種特異的な受精や一つの精子に一つの卵子が融合する単精子受精を担保するために重要な役割を果たしています。これまでの研究で精子の透明帯結合には透明帯構成タンパク質である ZP2 の N 末端領域が必要であると考えられていましたが、いずれも loss of function 実験により証明されたものであり透明帯結合と次の段階である通過のために十分であるのかは明らかになっていませんでした。本研究により、ZP2 の N 末端領域 115 塩基が精子の透明帯通過の必要十分条件であること、また受精後の精子の通過阻害メカニズムには、すでに明らかになっていた酵素による ZP2 の切断以外にも、別の分子メカニズムが存在することを解明しました。本研究は受精メカニズムの解明のみならず、受精しやすい環境を作り出せる新たな治療・診断薬や人為的に受精を抑制できる避妊薬の開発に繋がる先駆的な研究成果と考えています。

図 1.



野生型 ZP2 の場合、受精直後に Ovastacin という酵素が放出され N 末端領域が切断されるため、受精後は精子が透明帯に結合・通過できません。マウスの ZP2 35-262 アミノ酸配列を含んだキメラタンパク質 (moZP2³⁵⁻²⁶²/huZP4) を発現する場合、受精前は精子が結合・通過することができますが、受精後は野生型同様に切断されるため結合・通過できません。マウスの ZP2 35-149 アミノ酸配列を含んだキメラタンパク質 (moZP2³⁵⁻¹⁴⁹/huZP4) を発現する場合も、受精前は精子が結合・通過することができます。しかし、受精直後は酵素による切断部位がないので精子は透明帯に結合できるが通過することはできませんでした。2細胞期においては結合・通過可能であることから、ZP2 切断非依存的な一時的な通過阻害機構が存在すると考えられます。

【本件取材についてのお問合せ】

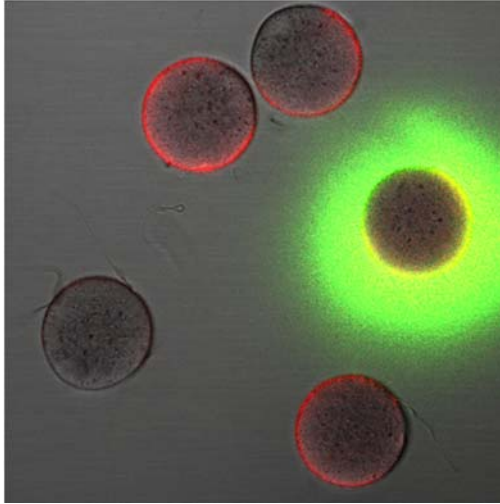
学校法人 関西医科大学 広報戦略室 (岡田・畑森)

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2344 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

PRESS RELEASE

図 2



ZP2 切断酵素である Ovastacin に赤色蛍光標識を付けたタンパク質を発現する卵子を使用して、受精直後に大量の亜鉛イオン(緑色蛍光)が放出される現象を共焦点顕微鏡を用いて観察しました。左下の卵子は、Ovastacin を放出して、赤色の蛍光を失った受精卵。

< 本研究の背景・意義 >

研究の背景

マウスの透明帯は ZP1、ZP2、ZP3 の 3 種類、ヒトではさらに ZP4 を加えた 4 種類のタンパク質で構成されます。マウスにおいて精子の透明帯結合メカニズムを調べる方法として遺伝子欠損マウスの解析が行なわれ、ZP1 欠損マウスの透明帯には精子が結合・通過できることがわかっています。しかしながら、ZP2 欠損マウスと ZP3 欠損マウスは透明帯を形成できないことから、欠損マウスを用いた方法では分子メカニズムの解明は困難でした。そこで、ZP2 欠損マウスにヒト ZP4 タンパク質を発現させた human ZP4 レスキューマウス* を作製したところ、透明帯形成不全の表現型はレスキューされるものの、マウスの精子はこの透明帯に結合することができず、受精できないことがわかりました。すなわち human ZP4 レスキューマウスの透明帯を構成するタンパク質、mouse ZP1、 mouse ZP3、human ZP4 はマウス精子の結合パートナーではなく、mouse ZP2 が重要であることがわかってきました。また、N 末端領域の 51 番から 149 番までのアミノ酸配列を欠損した ZP2 を発現する truncated ZP2 レスキューマウスでは同様に精子が結合できないことから、ZP2 の N 末端領域が精子の結合に必要なということが明らかとなりました。

しかしながら、ZP2 以外の結合メカニズムが重要であるという論文が他の研究グループから依然として報告されているため議論の余地があることや、ZP2 の N 末端部位への詳細な結合メカニズムは明らかとなっておらず、別のアプローチによりその分子メカニズムの証明を行うことが必要であると考えて研究を行いました。この研究により、受精における透明帯と精子の分子メカニズムの詳細がさらに解明され、未解明のままである精子側の ZP2 レセプターの同定など基礎的な分子メカニズムの解明のみならず、不妊症患者の原因を明らかにすることによる治療法の開発・改善そして新たな避妊方法の開発などに繋げることが可能になります。

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室 (岡田・畑森)

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2344 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

研究の手法・内容

本研究では mouse ZP2 の 3 種類の N 末端領域と human ZP4 のキメラタンパク質*を発現する transgenic マウス*を作製・解析して、mouse ZP2 のどの領域が発現していれば精子は透明帯に結合、通過し受精することができるのかを検証しました。その結果、mouse ZP2 の 35-149 塩基の領域を発現させると、精子は透明帯に結合して通過可能であることがわかりました。また、先行研究で精子の透明帯結合には糖鎖が重要であるという報告がされていますが、35-149 塩基の領域に一つだけ存在する N 結合型糖鎖修飾*部位に変異を入れても精子の結合に変化はないことから、精子の結合に糖鎖が必要ないことを明らかにしました。さらに、これまで受精後に別の精子の透明帯通過を阻害する機構は、ZP2 の N 末端領域が酵素により切断されることで起こると考えられていました。しかしながら、ZP2 の切断部位に変異を入れたタンパク質や切断部位を含まない ZP2 の 35-149 塩基を含むキメラタンパク質を持つ透明帯で受精後の精子の通過阻害を見ると受精直後には透明帯通過が阻害されるにもかかわらず、受精後 9 時間経過すると多くの精子が通過することがわかりました。すなわち、ZP2 の切断に依存しない通過阻害メカニズムが存在することを初めて解明したといえます。加えて、その分子メカニズムの一端として、受精後に卵子から大量に亜鉛イオンが放出される Zinc sparks*という現象に着目し、高濃度の亜鉛イオンにより精子の運動性に影響が出て (p3 図 2 参照)、透明帯通過を阻害する可能性を報告しました。

<研究チーム>

徳弘 圭造、関西医科大学附属生命医学研究所ゲノム編集部門、学長特命准教授
Jurrien Dean、米国国立衛生研究所 (NIH)、Senior Investigator

■ 「Developmental Cell」 掲載概要	
掲 載 誌	Developmental Cell DOI:10.1016/j.devcel.2018.07.020
論文タイトル	Glycan-independent gamete recognition triggers egg zinc sparks and ZP2 cleavage to prevent polyspermy
筆 者	Keizo Tokuhira, Jurrien Dean

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室 (岡田・畑森)

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2344 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

用語解説

「透明帯」

哺乳類の卵子を取り囲む細胞外マトリックス。マウスでは ZP1、ZP2、ZP3 の 3 種類、ヒトでは ZP4 を加えた 4 種類の糖タンパク質で構成される。受精の際に精子はこの透明帯に結合・通過し、卵子と融合する。先体反応と呼ばれる精子の頭部にある先体内のタンパク質の放出を行った精子（先体反応後精子）のみが透明帯を通過し、卵子と細胞膜融合することができる。また、透明帯は受精卵が子宮に着床するために、卵管に異所的に付着することを防ぐことなど受精後も正常な胚発生のために機能している。

「Zinc sparks」

受精直後に起こる卵子から高濃度の亜鉛イオンが繰り返し放出される現象。これまで、卵子内の亜鉛濃度を化合物を用いて低下させると細胞周期が進むことから、高濃度の亜鉛を維持することにより未受精卵の細胞周期の進行を抑える機構が存在していると考えられていた。受精後の Zinc sparks は、細胞内の亜鉛濃度を減少させることにより受精卵の細胞周期を進めるために重要であると報告されている。

「Transgenic マウス」

蛍光タンパク質や既存の抗体が反応する短いペプチド鎖などを付加した遺伝子をマウスの受精卵などに導入し、genomic DNA に取り込ませたマウス。タンパク質の遺伝情報の前に組み込んだプロモーターと呼ばれる DNA 配列を工夫することにより、すべての細胞もしくは組織や時期特異的に標的タンパク質を発現させることができる。標的タンパク質の局在や機能などを生体内で解析する際に使用される。

「N 末端」

タンパク質の一端でアミノ基(-NH₂)が遊離している側を N 末端、カルボキシル基(-COOH)が遊離している側を C 末端と呼ぶ。

「キメラタンパク質」

遺伝子工学を用いて 2 種類以上のタンパク質を融合させたもの。本研究ではマウスの ZP2 タンパク質とヒトの ZP4 タンパク質の融合タンパク質をマウスに発現させて解析した。

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室（岡田・畑森）

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2344 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

用語解説

「種特異的な受精」

マウスの精子はヒトの卵子の透明帯を通過することや卵子に融合すなわち受精することはできない。また、同様にヒトの精子はマウスの卵子に受精することはできない。異なる動物種で受精が起こらないように、種特異的な受精を制御するメカニズムが存在する。

「loss of function 実験」

機能欠損実験。ゲノム上から DNA 配列を削除したり変異を入れることによって標的とするタンパク質の発現を止めたり、構造の一部を欠損させたタンパク質を発現させることで機能を調べる実験。

「レスキューマウス」

標的となる遺伝子を欠損したマウスを用いて目的とするタンパク質を発現するような遺伝子組み換え DNA をゲノム上に組み込ませることにより、遺伝子欠損による表現型の一部あるいはすべてをレスキュー（回復）させたマウス。

「N 結合型糖鎖修飾」

アスパラギンの側鎖の中のアミド窒素に結合する糖鎖のこと。

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室（岡田・畑森）

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2344 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp