

2020年度（第45回）学術研究振興資金 学術研究報告

学校名	摂南大学	研究所名等	共同研究
研究課題	男性不妊薬を指向した精子の受精能獲得を惹起する薬剤の創生	研究分野	理学
キーワード	①精子 ②先体反応 ③マウス ④線虫 ⑤ケミカルバイオロジー ⑥男性不妊薬		

### ○研究代表者

氏名	所属	職名	役割分担
西 村 仁	理 工 学 部 生 命 科 学 科	教 授	線虫を使った実験および研究の統括

○研究分担者

# 男性不妊薬を指向した精子の受精能獲得を惹起する薬剤の創生

## 1. 研究の目的

DDI-4 は、当研究室によるスクリーニングで見出された線虫精細胞の活性化化合物である。本研究では、マウス精子の雄性生殖における DDI-4 の効果を検討すると共に、DDI-4 の標的タンパク質あるいはその関連因子を上述の線虫変異体を使って明らかにする。また、生化学的にオス線虫やマウス精子から標的タンパク質を精製してアミノ酸配列を調べる。さらに、線虫やマウスの精子に存在する DDI-4 の標的タンパク質について、DDI-4 との結合をコンピューターでシミュレーションし、標的タンパク質との結合に最適な化合物の構造を予測する（ドラッグデザイン）。構造が予測された化合物は実際に合成して、それらの活性を検証する。

## 2. 研究の計画

- (1) マウス精子の活性化およびマウスの体外受精における DDI-4 の添加効果の検討(担当:井尻)
- (2) DDI-4 の標的タンパク質（線虫とマウス）の同定（担当：西村、井尻）
- (3) DDI-4 の標的タンパク質（線虫とマウス）をコードしている遺伝子を破壊した変異体の作製・解析（担当：西村、井尻）
- (4) DDI-4 とその標的タンパク質との結合シミュレーションによる最適化合物の予測（担当：河合、表）

## 3. 研究の成果

- (1) まず、マウスの精巢上体尾部から採取した精子を使い、ジメチルスルホキシド（溶媒コントロール）、カルシウムイオノフォア A23187（陽性コントロール）、DDI-4 を添加して先体反応が惹起されるか否かを調べたところ、DDI-4 は A23187 と同等かそれ以上の活性を示した。さらに、マウス精子の先体反応について、DDI-4 の濃度およびインキュベーション時間依存性を調べた結果、DDI-4 の濃度が 100  $\mu\text{M}$ 、インキュベーション時間が 30 分で反応速度が最大に達した。さらに、マウス精子の capacitation（精子活性化反応の一つ）を精子タンパク質のチロシンリン酸化を指標に調べると、DDI-4 は capacitation を惹起することが明らかとなった。一方、マウスの体外受精における DDI-4 の影響も調べたが、この実験では陽性コントロール実験でも長時間のインキュベートを必要とすることから、陰性コントロールとの差が明確にはわかりづらい結果となった（陰性コントロール実験でも、体外受精がある程度起こってしまう）。
- (2) まず、DDI-4 により活性化されない精細胞を産生する線虫変異体について、SNP マッピングおよび次世代シークエンス解析によって原因遺伝子を調べたところ、RNA メチル基転移酵素をコードしている nsun-2 が変異していることがわかった。一方、標的タンパク質を生化学的に同定するため、DDI-4 の活性に影響を与えない官能基を導入した化合物の合成をいくつか試みたが、成功には至っていない。
- (3) (2)で同定された線虫の nsun-2 遺伝子について、CRISPR/Cas9 法でも変異体を作製した。その結果、エチルメタンスルホン酸を使って作製した線虫変異体と類似した表現型が示された。
- (4) DDI-4 の構造類似体を 6 種類合成したが、いずれも活性が大きく低下した。基本的に、DDI-4 は分子量が約 200 の低分子化合物であるため、改変が難しい可能性が高い。

## 4. 研究の反省・考察

- (1) マウス精子の活性化反応における DDI-4 の影響については、capacitation を含めて、期待どおりの結果を得ることができた。現在、横浜市立大学医学部との共同研究により、DDI-4 がヒト精子を活性化するか否かについても検討中である。体外受精の実験については、標準の条件下では、陰性コントロール実験でも比較的高い受精率を示してしまうことがわかった。今後は、透明帯除去卵子を使った受精実験など、精子と卵子のインキュベート時間が短時間で済む実験系も検討予定である。
- (2) すでに得られていた線虫変異体の原因遺伝子の同定は順調であったが、生化学的な手法による標的タンパク質の同定については、ビーズとの結合に使用する DDI-4 誘導体の合成に成功

- しておらず、今後も合成を継続する。
- (3)順遺伝学的な方法と逆遺伝学的方法で作製した線虫 nsun-2 遺伝子の変異体が類似した表現型を示した。ただ、この遺伝子がコードしているタンパク質の機能を考えると、NUSUN-2 タンパクが DDI-4 の標的である可能性は低く、NSUN-2 により転写後調節を受けている遺伝子が、真の標的タンパク質をコードしている可能性が考えられた。今後は、nsun-2 変異体を使った RNA シークエンス解析を行い、精細胞で発現している遺伝子から DDI-4 の標的タンパク質を絞り込んでいく予定である。
- (4)今の所、オリジナルの DDI-4 の活性を上回る誘導体の合成には成功していないが、今後も継続していく予定である。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ①Identification and Synthesis of DDI-6, a Quinolinol Analog Capable of Activating Both *Caenorhabditis elegans* and Mouse Spermatozoa.  
Yukiko Karuo, Riona Shiraki, Ayaka Yoshida, Ryo Tsunokawa, Mayuko Nakahara-Yamada, Atsushi Tarui, Kazuyuki Sato, Kentaro Kawai, Masaaki Omote, Hitoshi Nishimura  
Chemical & pharmaceutical bulletin 69(6) 557 – 563 2021年

### (2) 口頭発表

- ①「DDI-4は線虫精子とマウス精子を活性化する化合物である」  
白木梨央奈、島田幸拡、山中美貴子、金子眞弓、大倉光平、橋場優喜、橋本正陽、輕尾友紀子、表 雅章、西村 仁  
第43回日本分子生物学会年会 2020年12月
- ②「化合物DDI-4は線虫およびマウス精子を活性化する」  
白木梨央奈、島田幸拡、金子眞弓、山中美貴子、大倉光平、橋場優喜、橋本正陽、輕尾友紀子、表 雅章、西村 仁  
2021年度日本動物学会近畿支部研究発表会 2021年5月
- ③「線虫精子を活性化する化合物DDI-4は マウス精子における先体反応を惹起する」  
白木梨央奈、島田幸拡、金子眞弓、山中美貴子、大倉光平、橋場優喜、橋本正陽、輕尾友紀子、表 雅章、西村 仁  
第67回日本化学会近畿支部例会 2021年5月

### (3) 出版物

なし