

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：11601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02949

研究課題名（和文）卵細胞外マトリクスと精子プロテアーゼの相互作用機構の解明と生殖工学への応用

研究課題名（英文）Interaction of sperm protease with egg extracellular matrix and its application to reproduction technology

研究代表者

松田 幹（Matsuda, Tsukasa）

福島大学・食農学類・教授

研究者番号：20144131

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,500,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類卵細胞は卵固有の細胞外マトリクス（透明帯、ZP）で被覆され、ZPは受精の際の精子・卵相互作用に重要な役割を持つ。精子アクロシン（ACR）はZP構成タンパク質を特異的に分解するプロテアーゼとして機能する。異なるZP構成タンパク質を持つヒトおよびブタを研究対象として、活性型組換えACRによる組換えZPタンパク質の分解を調べた。ブタ、ヒトのいずれにおいても、ACRはZPタンパク質を特定の部位で切断して断片化することが明らかとなった。また、ヒトACRはブタZPタンパク質を断片化する活性は低く、精子ACRの卵膜ZPタンパク質の分解には種特異性が存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

受精の研究は顕微鏡下で形態観察や電子顕微鏡などによる微細構造解析を中心に進められてきた。配偶子間相互作用に関与する分子に的を絞った化学、生化学的な研究は鳥類、両生類ZP糖タンパク質に関する研究が散見されるものの、哺乳類に関する研究は極めて限定的である。本研究で得られたACRによるZPタンパク質の特異的かつ限定的な分解は、精子が卵膜を溶解させて貫通する分子機構を理解するための重要な知見を提出しており、学術的意義を持つ。また、家畜の人工授精や試験管内受精（IVF）での受精率向上技術の開発や、野生動物の繁殖制御に用いられる免疫避妊の標的抗原開発などの生殖工学の学術基盤となることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Mammalian egg cells are coated with an egg-specific extracellular matrix (zona pellucida, ZP), and ZP plays an important role in sperm-egg interactions during fertilization. Sperm acrosin (ACR) functions as a protease that specifically degrades ZP component proteins. The degradation of recombinant ZP proteins by active recombinant ACR was investigated in human and pigs with different ZP constituent proteins. In both pig and human, ACR was found to cleave and fragment ZP proteins at specific sites. Human ACR was less active in fragmenting porcine ZP protein, suggesting the existence of species specificity in the degradation of oocyte membrane ZP protein by sperm ACR.

研究分野：応用分子細胞生物学

キーワード：受精 卵透明帯 精子プロテアーゼ アクロシン

1. 研究開始当初の背景

・受精における卵細胞学マトリクス ZP の構造と機能

脊椎動物の卵子は卵外被とよばれる特殊な細胞外マトリクスで覆われており、哺乳類では顕微鏡下で卵細胞周囲の透明な層として観察できるため (図 1 A) 透明帯 (zona pellucida: ZP) と命名されている。鳥類、爬虫類および多くの哺乳類では ZP 固有の 4 種類の糖タンパク質 (ZP1-ZP4) で構成され網目状のマトリクスが構築されている (図 1 B, C)。ZP1-ZP4 は遺伝子重複によって生じたパラログ (paralogue) 遺伝子であり、ZP ドメインを介した自己会合・線維化という ZP マトリクス構造形成における共通の機能とともに、精子や精子プロテアーゼ ACR との相互作用においてそれぞれが分岐した機能を持つと推定される。ZP1~4 の中で ZP1 のみが分子間で SS 結合を形成し二量体架橋構造をとる。ZP1 と ZP4 は 4 種類の ZP タンパク質パラログの中でも配列の類似性が高く (この 2 つは ZP domain に加えて Trefoil domain を持つ)、進化の過程の一番最近の遺伝子重複によって生じたとも推定される (図 1 C)。

近年のヒト ZP 遺伝子の研究により女性不妊と ZP1 遺伝子の変異との関連が示唆されており、また、鳥類の受精において、精子が ZP を溶解しつつ貫通する際に ZP1 が精子プロテアーゼによる分解を受けるため、ZP1 はマトリクス構築と溶解に重要な役割を持つと考えられる。一方、哺乳類の中でもウシ (*Bos taurus*) とブタ (*Sus scrofa*) では、この ZP1 が欠失し、マウスでは ZP4 が偽遺伝子となり、脊椎動物の中でも例外的に 3 種類の ZP タンパク質のみで ZP の網目構造が形成されている (図 1 C)。

・受精における精子プロテアーゼの役割：前駆型の ZP への結合と成熟型による ZP の分解

精子の先体部に局在するセリンプロテアーゼとして同定されたアクロシン (ACR, EC 3.4.21.10) は、受精時の精子の卵細胞外マトリクス (卵透明帯: zona pellucida, ZP) への結合により誘導される精子先体反応により精子から放出され、限定分解により軽鎖と重鎖に切断されて成熟型となる (図 1 D)。成熟型 ACR は卵透明体、ZP、に特異的に存在する ZP タンパク質を分解して局所的にマトリクスを溶解 (lysis) し、精子が ZP を貫通して卵子と融合するための通路を形成する役割を持つと考えられている。一方、ACR は他のプロテアーゼと同様に先体胞中に非成熟型 (前駆型 ACR) として蓄積されており、前駆型 ACR が先体反応後も一部は先体胞マトリクスに残存し、ZP の糖鎖に高い親和性 (~10 nM) で結合することが示され、精子が ZP に結合する際の精子側結合分子の一つと考えられている (図 1 D)。

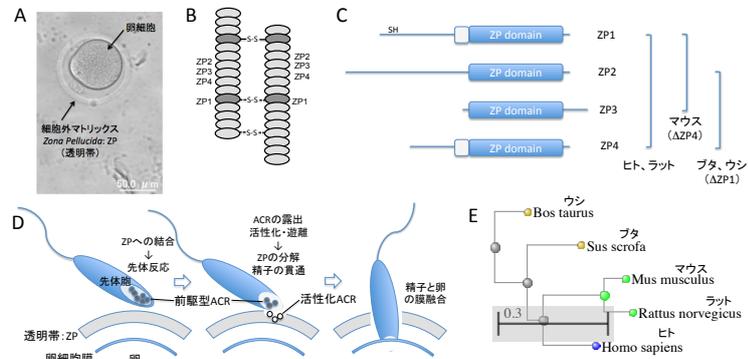


図 1: 哺乳類卵細胞外マトリクス (透明帯) と精子プロテアーゼ ACR と ZP の相互作用 (結合と分解) A-C: 卵透明帯、推定架橋繊維構造と構成 ZP タンパク質 D: 精子 ACR の ZP への結合と分解 E: ACR の分子系統樹

精子が ZP に結合する際の精子側結合分子の一つと考えられている (図 1 D)。

・精子プロテアーゼ ACR と卵細胞外マトリクス ZP タンパク質の構造・機能と進化

精子プロテアーゼ ACR (アクロシン) も卵外皮構成タンパク質 (ZP タンパク質: ZP1-ZP4) も進化の過程での変異 (分子進化) の速度が速い分子で、哺乳類の間でも配列の相同性が低い。いずれも受精・繁殖に直接関与する遺伝子であり、機能が劣る変異は淘汰され、優れた変異は正の選抜により残ったためと考えられる。ACR のアミノ酸配列を分子系統樹 (近隣結合法 neighbor joining method) で比較すると、ラットとマウスの ACR はヒト ACR とは相同性が高くウシとブタの ACR (ZP1 を消失) とは相同性が低い (図 1 E)。マウスの ACR (ZP4 を消失) の活性はラット ACR と比べて顕著に低く、その原因が Gly から Cys への点変異によることが判明している (第 13 回国際精子学会で口頭発表、2018)。ACR の配列相同性と ZP タンパク質の構成 (ZP1 の消失) との関連性に興味を持たれる。

2. 研究の目的

多様な ZP 構成タンパク質と ACR を持つように進化した異なる動物種を研究材料として、構成 ZP タンパク質とアクロシンとの結合および ZP タンパク質のアクロシンによる分解とマトリクスの溶解の分子機構を明確にして、精子が卵 ZP に結合しその後貫通するという生殖細胞特異的な細胞・細胞外マトリクス間相互作用の一端を明らかにすることを目的とする。ブタやウシなど家畜の繁殖技術として用いられる人工授精や試験管内受精 (IVF) での受精率向上技術の開発や、野生動物の繁殖制御に用いられる免疫避妊 (immuno-contraception) の標的抗原開発などの生殖工学の学術基盤となる成果の達成を目指す。

### 3. 研究の方法

#### 1) 組換えタンパク質の分泌発現

アクロシン前駆体の cDNA 配列を元に、開始コドンから終始コドンまでを同じ短い配列を末端に共有する 2 つの DNA 断片として化学合成し、In-fusion クローニング法を用いて連結して昆虫細胞発現ベクター (pMT-Bip) に挿入した。得られたプラスミド DNA をトランスフェクション法によりショウジョウバエ S2 細胞に導入し一過性に分泌発現させた。また、アクロシンの基質となる ZP タンパク質は、疎水性タンパク質の発現に用いられるマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質として溶解性を高めて、同様に S2 細胞で分泌発現させた。

培養上清のタンパク質を濃縮し、SDS-PAGE および Tag 特異的抗体を用いた免疫ブロット法により組換えタンパク質の分泌発現を確認した。

#### 2) アクロシン酵素活性の測定

SDS-電気泳動—ザイモグラフィでの活性染色によりプロテアーゼ活性を測定した。電気泳動ゲル中に基質タンパク質を混ぜ込み、活性を測定するタンパク質サンプルを非還元下で穏やかな条件下で SDS 処理した。電気泳動で分離した後、ゲルシートを Triton X-100 で処理することでタンパク質をリフォールドさせ、6~12 時間インキュベートすることでゲル内の基質タンパク質を酵素分解させた。ゲルシートを CBB でタンパク質染色することで、基質タンパク質が分解され消失した領域 (青地に染色されない透明なバンド) を検出した。また、培養上清に含まれる分泌タンパク質を限外ろ過により濃縮して、生 (native) のタンパク質の酵素活性を、アクロシンと同じセリンプロテアーゼであるトリプシンに用いられる合成基質 (BAPA) を用いて比色定量した。

### 4. 研究成果

#### 1) 組換えタンパク質の分泌発現

免疫ブロット法により成熟型アクロシンのアミノ酸配列から推定される分子量の位置に明確なバンドが検出され、培養上清にブタアクロシンが分泌発現されたことが示唆された。ブタアクロシンの分泌発現が確認されたので、哺乳類の種間での比較解析をするために、ヒト、マウス、ラット、ウシのアクロシンについて、ブタで用いた方法と手順で S2 細胞での一過性分泌発現を試みた。いくつかの工夫と実験の結果、ブタを加えて 5 種の哺乳類のアクロシンを S2 細胞の発現系で分泌発現させることができることを確認できた。さらに、アクロシンの基質となるブタ ZP タンパク質についても同様に S2 細胞での分泌発現を試みたが、成功には至らなかった。分泌発現が難しい理由として ZP タンパク質は細胞外マトリクス構成成分であり、疎水性、難溶性であることが推測された。そこで、疎水性タンパク質の発現に用いられるマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質として発現させることを試みた。その結果、ZP2, ZP3 および ZP4 のいずれも MBP-融合タンパク質として S2 細胞で分泌発現させることに成功した。

#### 2) 組換えプロテアーゼの酵素活性と基質特異性

5 種類の哺乳類 (ヒト、マウス、ラット、ブタ、ウシ) の精子プロテアーゼについて、還元条件と非還元条件の SDS 電気泳動のバンドの数と泳動位置から、分泌発現させた前駆体タンパク質が自己プロセッシングによる前駆体型から成熟型に変換されていると判断した。SDS-電気泳動—ザイモグラフィでの活性染色を行った結果、動物種によって活性強度が大きく異なるが、ゼラチン基質に対するプロテアーゼ活性が明確に検出された (図 2)。前駆体として分泌されたプロテアーゼが自己消化等により成熟学 (活性型) に変換していることが示唆された。

調製された組換えプロテアーゼが活性型であると考えられたため、次に、生 (native) の状態での組換え体タンパク質のプロテアーゼ活性を、合成基質を用いて比色定量した。哺乳類のアクロシンの比較対象として鳥類のアクロシンも同様に分泌発現させ活性を測定した。トランスフェクションによりアクロシンを分泌発現させた S2 細胞の培養上清を濃縮し、合成基質 (BAPA) を用いて比色定量した。その結果、5 種類の哺乳類アクロシンを分泌発現させた S2 細胞培養上清では、いずれも BAPA 分解活性が検出され、二種類の動物の活性が顕著に高く検出された。これはザイモグラフィで測定したゼラチン消化 (溶解) 活性とは必ずしも一致しておらず、基質に依存して動物種での酵素活性に差異があることが明らかとなった。

#### 3) 組換えプロテアーゼによる ZP タンパク質の限定分解

卵膜 ZP 糖タンパク質の組換えタンパク質として、ブタの卵膜を構成する ZP2, ZP3 および ZP4 を MBP との融合タンパク質として分泌発現させた。同様にヒト ZP1, ZP2, ZP3 および ZP4 も分泌発現させることができた。これらの ZP 糖タンパク質がブタの組換え方アクロシンで切断、

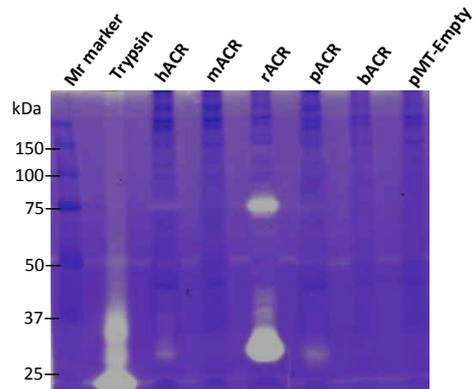


図 2 : 哺乳類 ACR 組換えタンパク質のプロテアーゼ活性  
非還元 SDS-PAGE の後のゼラチンザイモグラフィ

分解されるかを調べた結果、別個に調製した組換えプロテアーゼと ZP 糖タンパク質を混合しても、MBP-ZP 融合タンパク質の分解・断片化は確認できなかった。組換えプロテアーゼはゼラチン・ザイモグラフィーでは明確なプロテアーゼ活性が検出されることから、基質濃度が低すぎることも考えられた。そこで S2 細胞で発現させる際に、アクロシンと ZP の発現コンストラクト DNA を混合して同時に S2 細胞に添加して形質転換することで、同一細胞内でアクロシンと ZP タンパク質と一緒に発現させ、ゴルジや分泌小胞などの細胞内小胞の内部でアクロシンと ZP タンパク質を遭遇させて高濃度の状態で酵素反応をさせるモデル実験系を試みた。ブタ ZPs を単独で発現させると、それぞれの融合タンパク質に相当する 75 kDa 前後の分子量の MBP-ZP2、MBP-ZP3 および MBP-ZP4 のバンドが明確に検出でき、S2 培養細胞での分泌発現では内因性のプロテアーゼで分解されることなくインタクトな状態で分泌発現することが明らかとなった。そこで、MBP-ZPs のそれぞれの発現コンストラクトとブタアクロシンの発現コンストラクトを混合して S2 細胞に導入して分泌発現させた。培養上清の MBP-ZPs を MBP に対する抗体で検出する SDS-PAGE・免疫ブロットで解析した結果、MBP-ZP2 では約 50 kDa の、また MBP-ZP3 と MBP-ZP4 では約 57 kDa の分解断片が検出された。MBP 単体では約 40kDa で全く分解されていないことから、それぞれの ZP タンパク質を構成するドメイン (ZPN および ZPC ドメイン) を繋ぐリンカー領域が選択的に切断されている可能性が考えられた。

これまでに確立した哺乳類アクロシンと ZP タンパク質の動物細胞分泌発現システムを使って、「精子アクロシンは卵透明帯 ZP タンパク質を種特異的に断片化するか？」という基本的な問いに対する答えを得ることを目指して研究進めた。まず、ヒトのアクロシンを同様に S2 細胞で分泌発現させて分泌発現させたヒトアクロシンとヒト ZP タンパク質を用いて解析すると、ヒトアクロシンがヒト ZP タンパク質の特定の部位で切断することを明らかになった。ZP タンパク質断片化はブタの系での断片化よりも顕著であった。合成基質を用いた際のプロテアーゼ活性とは必ずしも一致しない、という興味深い結果となった。さらに、ヒトアクロシンでブタ ZP タンパク質が分解されるかを同様に調べた結果、ヒト ZP タンパク質では顕著な断片化が確認されるのに対して、ブタ ZP タンパク質は一部の ZP を除いて、ほとんど分解されないことが示された。

ブタとヒトのアクロシンと ZP タンパク質の組換えタンパク質を研究材料として、卵膜構成 ZP タンパク質のアクロシンによる分解とマトリクスの溶解の分子機構を明確することを目指して研究を進め、ブタ、ヒトのいずれにおいても、アクロシンは ZP タンパク質を特定の部位で切断して断片化することが明らかとなった。このような断片化により ZP タンパク質間の結合が低下・消失して繊維・マトリクス構造が崩壊して卵膜の溶解に繋がり、その間隙を精子が貫通して受精が成立するものと推測された。また、少なくともヒトアクロシンはブタ ZP タンパク質を断片化する活性は低く、精子プロテアーゼと卵膜 ZP タンパク質の相互作用には種特異性が存在することが示唆された。脊椎動物において種間の交雑は稀に存在するが、*in vitro* の実験ではあるが、ヒトアクロシンがブタ ZP タンパク質を分解する活性を弱いながらも持っていることは、異種間の交雑現象の一つの説明となりうるかもしれない。

精子が卵 ZP に結合しその後貫通するという生殖細胞特異的な細胞・細胞外マトリクス間相互作用の一端を明らかにすることを目的としたが、前半の精子の卵膜への結合における精子プロテアーゼと卵膜 ZP タンパク質との相互作用については、今後の大きな研究課題として残された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nishio S, Emori C, Wiseman B, Fahrenkamp D, Dioguardi D, Zamora-Caballero S, Bokhove M, Han L, Stsiapanava A, Lu Y, Kodani M, Matsuda T, Bainbridge RE, Komondor KM, Carlson AE, Landreh M, de Sanctis D, Yasumasu S, Ikawa M and Luca Jovine L
2. 発表標題 3D architecture of the vertebrate egg coat and structural basis of the ZP2 block to polyspermy
3. 学会等名 the Gordon Research Conference on Fertilization and Activation of Developmen (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究分担者	西尾 俊亮  (Nishio Shunsuke)  (20825880)	福島大学・食農学類附属発酵醸造研究所・特任助教   (11601)	
研究分担者	宮田 真路  (Miyata Sinji)  (60533792)	東京農工大学・農学部・准教授   (12605)	
研究分担者	大島 健司  (Oshima Kenzi)  (90391888)	名古屋大学・生命農学研究科・助教   (13901)	

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