

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：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450520

研究課題名(和文) 配偶子間認識に関与する卵膜マトリクスの形成機構と精子側分子との相互作用機構の解明

研究課題名(英文) Investigations of molecular mechanisms of the egg-coat formation and egg-sperm interaction involved in gamete recognition

研究代表者

奥村 裕紀 (Okumura, Hiroki)

名城大学・農学部・准教授

研究者番号：60513661

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)：哺乳類の透明帯に代表される脊椎動物の卵膜は、卵細胞に特徴的な細胞外マトリックスであり、2 から 6 種類の ZP 糖タンパク質から構成されている。卵膜は受精において、種特異的に精子と反応して精子頭部の内容物を放出させ、また多精子受精を防ぐなどの重要な機能を有する。本研究の結果、ニワトリ卵膜を構成する 3 種類の ZP 糖タンパク質 ZP1, ZP3, ZPD が分子内のどの領域の間で相互作用することによって繊維状のマトリックスを形成しているかを解明した。この結果より、鳥類以外の脊椎動物にも適用することができる卵膜の分子構造モデルを構築することができた。

研究成果の概要(英文)：The vertebrate egg coat, including mammalian zona pellucida, is an oocyte-specific extracellular matrix comprising two to six zona pellucida (ZP) glycoproteins. The egg coat plays important roles in fertilization, especially in species-specific interactions with sperm to induce the sperm acrosome reaction and to form the block to polyspermy. In this study, we identified the domains of three ZP-glycoprotein components of chicken egg coat, ZP1, ZP3 and ZPD involved in the egg-coat matrix formation. Based on these results, we proposed a structural model of chicken egg coat that is applicable for all other vertebrates.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：受精 透明帯 細胞外マトリックス zona pellucida ZP domain

1. 研究開始当初の背景

(1) 脊椎動物の卵細胞を覆う特殊な細胞外マトリックスである卵膜は、受精または卵-精子相互作用機構において重要な役割を果たす [Dean, *Bioessays* **26**, 29-38 (2004), Jovine *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 83-114 (2005)]. まず、精子は卵の近傍に到達すると活性化され、先体胞 (acrosome) から acrosin などの加水分解酵素群を精子外へ分泌する (精子先体反応, acrosome reaction)。そして卵膜を分解しながら貫通して卵細胞の細胞膜に接触し、卵細胞と融合する。その際、卵膜は精子頭部表面に存在が示唆されている複数の分子群と種特異的に相互作用することによって、精子の活性化と卵への接着に大きく関わっている。卵膜はまた、1 個の卵細胞に 2 個以上の精子が侵入すること (多精子受精) を防ぐ機能も担っており、その他にも正常な初期発生において重要な役割をもつと考えられている。卵膜の構造と受精における機能の分子メカニズムを解明する試みは、1980 年に哺乳類 (マウス) の卵膜 (透明帯; zona pellucida) を構成するタンパク質成分として ZP 糖タンパク質が初めて同定されて以来 [Bleil and Wassarman, *Dev. Biol.* **76**, 185-202 (1980)] 現在も続けられている。そして近年、本研究者が主要な推進メンバーの 1 人として参加した研究により、ZP 糖タンパク質の詳細な 3 次元構造が解明された [Han*, Monné*, Okumura* *et al.* (*: equally contributed), *Cell* **143**, 404-415 (2010)]. これにより、卵膜の形成機構や精子表面分子群との相互作用を分子レベルで研究する基盤が整った。

(2) 本研究者は鳥類 (ニワトリ) の卵膜 (卵黄膜内層; inner perivitelline layer) を研究対象としている。哺乳類の卵膜は、ZP1, ZP2, ZP3, ZP4 の 4 種の ZP 糖タンパク質のうち 3 あるいは 4 種で構成されている [Spargo *et al.*, *Biol. Reprod.* **68**, 358-362, (2003)]. これに対し、ニワトリ卵膜を構成する主要な ZP 糖タンパク質は、ZP1, ZP3 および鳥類に特徴的な ZPD である。鳥類では、ZP1 は肝臓で合成されて血液中に分泌される一方、ZP3 と ZPD は卵巣内で合成・分泌されることが知られている。本研究者はこれまでの研究で、鳥類の卵膜に ZPD が存在することを発見し、ニワトリ卵膜においては ZPD が ZP1 の 2 量体と共に精子先体反応を引き起こすことを示した [Okumura *et al.*, *Biochem. J.* **384**, 191-199, (2004)]. また、卵細胞の成熟過程において、ZP1 と ZP3 から自己集合的に可溶性の ZP1-ZP3 複合体および不溶性の ZP1-ZP3 繊維状構造が形成され、それらが足場となって卵膜が形成されることを示した。この ZP1 と ZP3 の重合は、ZP1 分子間におけるジスルフィド結合の形成を含め、分子構造の大きな変化を伴うものであった [Okumura *et al.*, *Biol.*

Reprod. **76**, 9-18, (2007a), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **364**, 682-688, (2007b)]. さらに、本研究者は 2006 年から 2008 年にかけて、カロリンスカ研究所 (スウェーデン) の Luca Jovine 博士の研究室に博士研究員として在籍し、卵膜構成糖タンパク質の構造生物学的研究プロジェクトに深く携わった。本研究者は現在の所属機関 (名城大学) の教員に就任した後もこのプロジェクトに対する共同研究を継続し、上記 (1) に述べたように大きな成果を上げ、共同筆頭著者の 1 人として論文執筆に携わった [Han*, Monné*, Okumura* *et al.* (*: equally contributed), *Cell* **143**, 404-415 (2010)]. 本研究者はその後も独自に研究を継続し、二次元電気泳動によって異なるスポットとして検出され特徴的なレクチン反応性を示す複数のアイソフォームがニワトリ ZP3 に存在することを見出した [Okumura *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **424**, 586-592, (2012)].

2. 研究の目的

本研究では、鳥類 (ニワトリ) の卵膜およびその構成成分である ZP 糖タンパク質について、それらの構造と受精における機能の分子メカニズムを解明することを目的としている。鳥類と哺乳類は共に体内受精を行うが、鳥類は卵生、またヒトやマウスを含む有胎盤類の哺乳類は胎生であり、それぞれ独自に生殖機構を進化させてきた。従って、鳥類の卵膜および ZP 糖タンパク質に対する研究成果をより研究の進展している哺乳類の卵膜および ZP 糖タンパク質に対する研究成果と比較することによって、鳥類に特徴的な受精機構のみならず、進化の過程で脊椎動物に普遍的に保存されてきた受精機構を解明することができると考えられる。本研究では将来的に、脊椎動物の受精または卵-精子相互作用の分子メカニズムを解明し、そこから得られる知識を応用することによって、家畜や家禽の受精率や生産性の向上、有用品種の作出技術の開発、希少動物の系統維持や有害鳥獣の駆除に貢献することを目指す。すなわち、卵膜の精子活性化能や卵・精子間認識の種特異性などの受精における緻密な制御機構を自在にコントロールできるようになれば、家畜・家禽の受精率や生産性を向上させる技術の開発、有用品種の作出、希少動物の系統維持、および有害鳥獣の個体数管理に直接的に貢献できるようになる。具体例としては、交雑が困難である品種同士の交雑を容易にし、遺伝子操作によらない伝統的な交雑による育種方法でより柔軟な品種改良を行うことや、卵と精子の相互作用を動物種特異的に補強、促進、あるいは抑制する薬品の開発などに発展させることが可能になる。以上のように、卵・精子相互作用の分子メカニズムの研究は、食や生殖といった私たちの生活の改善に直結した様々な応用の可能性を秘

めた魅力的な研究領域である。

本研究期間内には、卵-精子相互作用において中心的な役割をもつことが示されているにも関わらずその分子基盤が未解明な卵膜について、卵膜を構成する ZP 糖タンパク質の機能、構造と卵膜形成機構の解析、および卵-精子相互作用に関与することが示唆されている精子側の分子群との相互作用機構の解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

卵膜から新たに天然型 ZP 糖タンパク質を分離・精製し、以下の実験に用いた。研究開始当初は、卵膜マトリックスに取り込まれる前の血液中の ZP1 を産卵鶏血清中から分離・精製する予定であったが、本研究期間中に分離・精製の条件検討を完了する見込みが立たなかったため、以下の実験では ZP1 を含む血清を直接用いることができるように方法を変更した。これらの天然型 ZP 糖タンパク質に加え、平成 22～24 年度の研究で調製した構造ドメインまたは機能ドメイン特異的な組換え ZP 糖タンパク質、および各 ZP 糖タンパク質に対するドメイン特異抗体も以下の実験に用いた。以上をプローブとして用い、ファウエスタンプロッチング、プルダウンアッセイ、免疫沈降や免疫蛍光染色を利用した方法など種々の分子間相互作用解析法を駆使して、卵膜マトリックス内の ZP 糖タンパク質によるネットワーク構造および卵膜マトリックス形成機構を解析した。なお、研究開始当初は、近年までにくっつかの研究グループで同定されている精子側の卵膜と相互作用するタンパク質群についても、同様の研究手法で ZP 糖タンパク質との相互作用機構の解析を行う予定であったが、上述の通り血液中に含まれる ZP1 の分離・精製の条件検討に予定外の時間を費やしたため、精子側タンパク質との相互作用機構の解析は今後の研究で行うこととした。

具体的な研究方法を以下に述べる。

(1) 本研究者はこれまでの研究で、ニワトリ卵巣内の卵胞からカミソリとピンセットを用いて物理的に卵膜を剥離して採取する技術を修得しており、採取した卵膜を可溶化して ZP1, ZP3 および ZPD を分離・精製する手法を確立している [Okumura *et al.*, *Biochem. J.* **384**, 191-199, (2004)]。本研究ではまず、本手法に従い、採取した大量の卵膜を緩衝液中で超音波破碎し、上清中に遊離する ZPD を分離した。次に ZPD 除去後の不溶性 ZP1-ZP3 複合体を 6~8 M の尿素を含む弱酸性の緩衝液に溶解し、ゲル濾過クロマトグラフィーによって ZP1 と ZP3 を分離した。本研究では、生化学的解析に必要な大量の天然型卵膜構成糖タンパク質を変性や修飾、プロテアーゼによる分解などを可能な限り受けけない高品質な状態で分離・精製するため、イソシアン酸を除去した高純度の

尿素を含む緩衝液中で ZP1-ZP3 複合体を可溶化した。本研究では新たに低圧クロマトグラフィーシステムを導入して精製作業の効率化を試みた。

(2) 非還元条件の SDS-PAGE によって分離した卵膜をニトロセルロース膜上に転写し、ZP1 を含む血清をリガンド溶液として反応させた後、抗 ZP1 抗体を用いて抗体染色を行うと、ニトロセルロース膜上の ZP3 に結合した ZP1 を検出することができる (ファウエスタンプロッチング) [Okumura *et al.*, *Biol. Reprod.* **76**, 9-18, (2007a), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **424**, 586-592, (2012)]。本研究では、リガンドとして平成 22~24 年度の研究で作製した種々のドメイン特異的組換え ZP1 を用いた。また、同じく組換え ZP3 をあらかじめ血清に添加して同様の実験を行い、ZP1-ZP3 相互作用に対する阻害効果の有無を解析した。これらにより、ZP1 と ZP3 の重合に関与する各分子上の領域を特定した。

(3) 上述の通り、ZP1 と ZP3 が重合する際、各分子の構造は大きく変化すると考えられている。本研究では、免疫共沈降法やアフィニティークロマトグラフィー用担体を固定相としたプルダウンアッセイを利用して、上述のドメイン特異抗体の ZP1 または ZP3 に対する反応性が ZP1 と ZP3 の会合前後でどう変化するかを詳細に解析した。生体内で発現した直後は可溶性である ZP 糖タンパク質が不溶性の卵膜マトリックスを形成するメカニズムを分子構造の変化の観点から解析した。

(4) 卵膜に対して上述のドメイン特異抗体をプローブとして用いた免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて卵膜マトリックスの 3 次元構造を直接観察した。染色パターンより、各 ZP 糖タンパク質が卵膜マトリックス内でどのように配置しているかを推定した。

4. 研究成果

前項目で述べた研究方法に従って得られた実験結果、および本研究者のこれまでの研究成果 [Okumura *et al.*, *Biochem. J.* **384**, 191-199, (2004), *Biol. Reprod.* **76**, 9-18, (2007a), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **364**, 682-688, (2007b)] から、ニワトリ卵膜マトリックスの分子構造モデルを構築することに成功した [Okumura *et al.*, *FEBS Open Bio* **5**, 454-465, (2015)]。このモデルによると、ニワトリ卵膜にみられる繊維状構造は、ZP1 分子と ZP3 分子が各々の ZP-N ドメインで ZP-C ドメインを覆い隠すような位置関係で共重合した微細繊維が密に束ねられた内部構造をとっており、ZPD は自己重合してこの ZP1-ZP3 繊維の表面に非

共有結合によって弱く結合していると考えられた(下図)。また、ZP1 と ZP3 からなる微細繊維は、ZP1 の N-terminal ドメインどうしの間で形成された分子間ジスルフィド結合または repeat ドメインどうしの間で形成された非共有結合によって束ねられていると考えられた。

ニワトリ卵膜は ZP1, ZP3 および ZPD を主要な構成成分としている一方、哺乳類であるマウスの卵膜は ZP1, ZP2 および ZP3 から構成されている。マウスの各 ZP 糖タンパク質のドメイン間相互作用は未だ完全には解明されていないが、マウス卵膜マトリックス内では ZP2 と ZP3 からなる共重合体を ZP1 が架橋していると考えられており [Monné and Jovine, *Biol. Reprod.* **85**, 661–669, (2011)], 本研究によって推定されたニワトリ卵膜の ZP1–ZP3 繊維の分子構造モデルと矛盾しない。従って、本研究によって推定されたニワトリ卵膜マトリックスの分子構造モデルは、ZP 糖タンパク質の種類を置き換えることによって、全脊椎動物の卵膜に適用することができると考えられた。

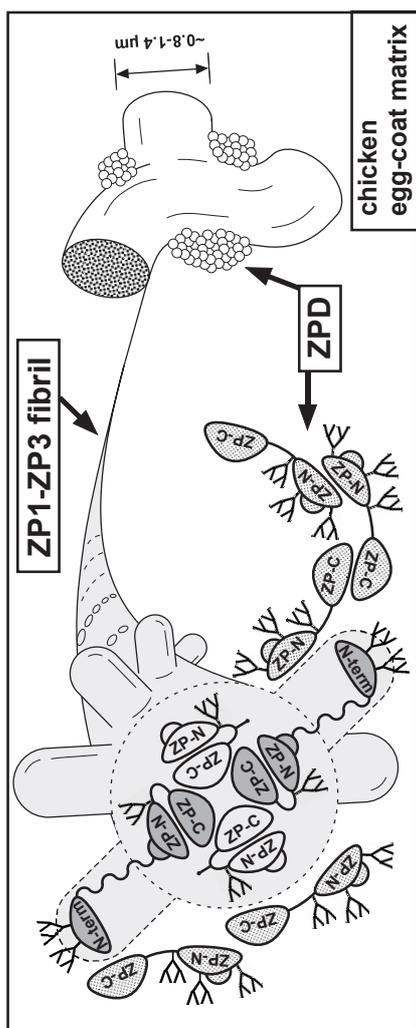


図 ニワトリ卵膜マトリックスの分子構造モデル

[Okumura et al., *FEBS Open Bio* **5**, 454–465, (2015), Graphic Abstract]

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 Hiroki Okumura, Takahiro Sato, Rio Sakuma, Hideaki Fukushima, Tsukasa Matsuda and Minoru Ujita, Identification of distinctive interdomain interactions among ZP-N, ZP-C and other domains of zona pellucida glycoproteins underlying association of chicken egg-coat matrix, *FEBS Open Bio* **5**, 454–465, (2015)
DOI: 10.1016/j.fob.2015.05.005

② Shunsuke Nishio, Yoshinori Kohno, Yuki Iwata, Mayumi Arai, Hiroki Okumura, Kenzi Oshima, Daita Nadano and Tsukasa Matsuda, Glycosylated Chicken ZP2 Accumulates in the Egg Coat of Immature Oocytes and Remains Localized to the Germinal Disc Region of Mature Eggs, *Biol. Reprod.*, **91**, 1–10, (2014)
DOI: 10.1095/biolreprod.114.119826

③ Minoru Ujita, Shota Koike, Yosuke Yamauchi, Noburo Kiochi, Hiroki Yura, Mayumi Yamanaka and Hiroki Okumura, Functional expression of recombinant human macrophage β -glucan receptor dectin-1 using baculovirus–silkworm expression system, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **78**, 1203–1205, (2014)
DOI: 10.1080/09168451.2014.915734

[学会発表] (計 8 件)

① Hiroki Okumura, Takahiro Sato, Rio Sakuma, Hideaki Fukushima, Tsukasa Mtsuda and Minoru Ujita. ニワトリ ZP 糖タンパク質のドメイン間相互作用の解明と卵膜構造モデルの構築 The Joint Meeting of the Japanese Biochemical Society & the Molecular Biology Society of Japan; BMB2015 (Poster and Oral; Dec. 1-4, 2015, Kobe Portisland, Kobe, Japan)

② Rio Sakuma, Eri Iwamoto, Wataru Kuriyama, Shunsuke Nishio, Tsukasa Mtsuda, Minoru Ujita and Hiroki Okumura. 単一遺伝子にコードされたニワトリ ZP3 の各アイソフォームにおける多様なアミノ酸置換の同定

The Joint Meeting of the Japanese Biochemical Society & the Molecular Biology Society of Japan; BMB2015

(Poster; Dec. 1-4, 2015, Kobe Portisland, Kobe, Japan)

- ③ Wataru Kuriyama, Rio Sakuma, Eri Iwamoto, Tsukasa Mstsuda, Minoru Ujita and Hiroki Okumura.

ニワトリ卵膜を構成する糖タンパク質 ZP1 の血液中における存在状態の解析
The Joint Meeting of the Japanese Biochemical Society & the Molecular Biology Society of Japan; BMB2015 (Poster; Dec. 1-4, 2015, Kobe Portisland, Kobe, Japan)

- ④ Eri Iwamoto, Rio Sakuma, Wataru Kuriyama, Tsukasa Mstsuda, Minoru Ujita and Hiroki Okumura.

ZP3 アイソフォームが卵膜マトリックスの分子構造へ及ぼす影響の研究
The Joint Meeting of the Japanese Biochemical Society & the Molecular Biology Society of Japan; BMB2015 (Poster; Dec. 1-4, 2015, Kobe Portisland, Kobe, Japan)

- ⑤ Rio Sakuma, Takahiro Sato, Shunsuke Nishio, Tsukasa Mstsuda, Minoru Ujita and Hiroki Okumura.

脊椎動物卵膜形成機構の解明に向けたニワトリ ZP 糖タンパク質の存在形態に関する研究
The 2015 Annual Meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry (Oral presentation; 2015 Mar. 27-30, Okayama University, Okayama, Japan)

- ⑥ Takahiro Sato, Rio Sakuma, Tsukasa Matsuda, Minoru Ujita and Hiroki Okumura.

鳥類卵膜マトリックスにおける ZP 糖タンパク質のドメイン間相互作用と卵膜形成機構の研究
The 87th Meeting of the Japanese Biochemical Society (Poster and Oral presentations; 2014 Oct. 15-18, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan)

- ⑦ Takahiro Sato, Hideaki Fukushima, Minoru Ujita and Hiroki Okumura.

組換えタンパク質を利用したニワトリ卵膜マトリックス形成機構の解析
The 2014 Annual Meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry (Oral presentation; 2014 Mar. 27-30, Meiji University, Kawasaki, Japan)

- ⑧ Hideaki Fukushima, Takahiro Sato,

Yurie Ima, Minoru Ujita and Hiroki Okumura.

ZP1-ZP3 のドメイン間相互作用解析に基づくニワトリ卵膜形成機構の研究

The 86th Meeting of the Japanese Biochemical Society (Poster; 2013 Sep. 11-13, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 裕紀 (OKUMURA, Hiroki)

名城大学農学部・准教授

研究者番号：60513661

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

氏田 稔 (UJITA, Minoru)

名城大学農学部・教授

研究者番号：50340295

(4) 研究協力者

松田 幹 (MATSUDA, Tsukasa)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

Luca Jovine

カロリンスカ研究所 (スウェーデン)・教授