

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06961

研究課題名(和文)哺乳類卵外被マトリックスの精子認識ドメイン

研究課題名(英文)Sperm recognition domain in mammalian egg coat matrix

研究代表者

米沢 直人 (Yonezawa, Naoto)

千葉大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：80212314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ウシ卵外被は3種類の糖タンパク質ZP2、ZP3、ZP4から成るスポンジ状物体である。ZP3の中央付近ヒンジ領域内Trp-156からArg-160の領域がZP4との複合体形成に関わることを見出した。さらに、その近傍のAsn-146に付加するN結合型糖鎖が複合体の精子結合能に関わることを見出した。競合阻害法では各糖タンパク質単独では阻害活性を示さず、ZP3/ZP4複合体のみが阻害活性を示すが、新しく開発した直接結合法によりZP4が単独で精子結合活性を示すことが判明した。この活性には糖鎖は必要なく、ウシ卵外被の精子結合部位は糖鎖だけではなくタンパク質骨格にも存在することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bovine egg coat is a sponge-like matrix consisting of three glycoproteins called ZP2, ZP3 and ZP4. In a competitive inhibition assay, each of the three glycoproteins does not inhibit the binding of sperm to the egg coat but only ZP3/ZP4 complex inhibits the binding. We found that the region from Trp-156 to Arg-160 existing in the flexible hinge region of ZP3 is involved in the complex formation with ZP4 and moreover that an N-glycan linked to Asn-146 of ZP3 is involved in sperm-binding activity of ZP3/ZP4 complex. We established a new sperm-binding assay technique by which we can detect sperm-binding activity of each single component. By utilizing this technique, we found that among the three components only ZP4 has sperm-binding activity and moreover that glycans linked to ZP4 are not necessary for the activity. Thus, it is suggested that not only glycans but also polypeptide moieties of egg coat glycoproteins are involved in sperm-binding activity in bovine.

研究分野：構造生物化学

キーワード：糖タンパク質 受精 透明帯 Sf9細胞 タンパク質複合体

1. 研究開始当初の背景

哺乳類卵子は卵外被で覆われており、この卵外被は透明帯(zona pellucida)と呼ばれる。透明帯の主要成分は3ないし4種類の糖タンパク質である。透明帯では、これらの糖タンパク質が重合することにより繊維を形成し、この繊維が更に三次元的な網目状構造を形成している。透明帯は卵巣内での卵子成長および成熟に必要である。哺乳類精子は卵管内で卵子に出会い、透明帯に種選択的に結合する。先体反応を完了した精子が透明帯を貫通し卵母細胞の細胞膜と融合することで受精が成立する。受精成立後は透明帯の構造変化(透明帯反応)により多精を防ぐ。受精後も透明帯は着床まで胚を保護する。受精は種の保存に欠かせない生命現象であり、分子機構が長年にわたり研究されてきたが、未解決の課題が多い。本研究は受精機構の中でも透明帯が関わる機構の解明を目指している。

透明帯研究において先行していたWassarmanグループは、1980年代にマウス透明帯糖タンパク質 ZP3 の糖鎖がマウス精子結合部位であると報告した。それ以来、糖鎖非還元末端糖残基が精子結合部位であるとの糖鎖説が主流となった。糖転移酵素遺伝子のノックアウトマウスや質量分析による糖鎖機能構造解析の結果はそれまでに報告されていた精子結合部位候補糖残基を必ずしも支持せず、透明帯の精子認識機構について再検討する必要が生じた。2003年にはDeanグループのレスキューマウスを用いた研究により、糖鎖ではなくタンパク質骨格の高次構造を認識して精子が結合するとの超分子複合体説が提出された。2011年にはClarkにより糖鎖とタンパク質骨格から形成される機能ドメインが精子結合部位であるとの精子認識ドメイン説が提出された。2012年から2014年にかけて、Deanグループはレスキューマウスを用いた研究により、透明帯糖タンパク質 ZP2 の N 末端付近がマウスおよびヒト精子結合部位であると報告した。

このように、マウス透明帯の精子結合部位の研究は紆余曲折を経て、ZP2 が現在最も有力である。また、ヒトについても糖鎖説が唱えられていたが、現在は ZP2 が精子結合部位であるとの説が最も有力である。

一方、トランスジェニック動物の作製が困難な動物種においても、精子認識に糖鎖が関わることを示す報告が相次いだ。我々が対象とする大型家畜のブタとウシは大量に透明帯糖タンパク質が得られる点で生化学解析に適している。我々はマウスに先駆けてブタとウシ透明帯の糖鎖構造を決定し、精子結合糖残基は N 結合型糖鎖の β -ガラクトース(ブタ)と β -マンノース(ウシ)であることを示してきた。我々は 2005 年にブタ透明帯糖タンパク質をバキュロウイルス-Sf9 細胞発現系で発現させることに成功し、タンパク質骨格はブタの構造であるが糖鎖構造はウシ透明帯のものに近い組換え糖タンパク質を

作製することに成功した。この組換え糖タンパク質はブタ精子には結合せずウシ精子に結合した。糖鎖単独での精子結合活性は非常に低いため、透明帯糖タンパク質 ZP3 と ZP4 とからなる高分子複合体の状態では糖鎖が精子結合活性を示すと考えられた。これは上記のマウスでの精子認識ドメイン説に近いと思われる。

ブタとウシ透明帯は ZP2, ZP3, ZP4 の 3 種類の糖タンパク質で構成される点が共通しており、ZP3/ZP4 複合体が精子結合能を有し、各成分単独では結合能を示さない点も共通している。マウス透明帯は ZP1, ZP2, ZP3 の 3 種類からなり、ZP2 が単独で精子結合能を有する。よってブタとウシは、両者で共通の精子認識機構を有する可能性が考えられる。さらにこの機構はマウスのものとは異なる可能性が考えられる。ブタについては ZP3/ZP4 複合体のうち ZP4 の糖鎖が精子結合部位であることを我々は見出し 2012 年に報告した。しかし、ウシについては全くわかっていない。

透明帯糖タンパク質は比較的保存性の高い 260 アミノ酸残基から成る領域を共通して有しており、この領域は ZP ドメインと呼ばれる。Jovine らにより、ZP ドメインが重合能を有すること、更にはマウス ZP3 の ZP ドメインの N 末端側サブドメイン(ZP-N サブドメイン)が重合能を有し繊維を形成することがあきらかになった。しかしながら、複数種類の透明帯糖タンパク質においてどの部分とどの部分とが相互作用し網目状マトリクスを形成するのか、という透明帯形成機構は不明のままである。

受精成立に伴い卵母細胞の表層顆粒崩壊が起こり種々の酵素を含む内容物が放出され透明帯に作用する。この中に ZP2 プロセシング酵素のオバスタシンが含まれており、ZP2 を特異的に一カ所切断する。この切断と透明帯の精子結合能消失とをつなぐ分子機構は全くわかっていない。

2. 研究の目的

哺乳類卵子を包む透明帯は受精時に精子と種選択的に結合する。研究の先行しているマウスにおいて、この結合に糖鎖が必要かどうかという点を含め、透明帯の精子結合部位について複数の説が唱えられており混沌としている。動物種によって精子結合部位が異なる可能性もある。我々はブタおよびウシを研究対象とし、マウスに先駆けて精子認識ドメイン説を唱えてきた。本研究では、透明帯の精子認識ドメインを同定し、ドメイン内の糖鎖が精子認識に必要なかどうかをあきらかにする。さらに、受精成立に伴い精子認識ドメインの精子結合能が消失する機構もあきらかにする。マウスでの論争解決に貢献するとともに、より普遍的な精子認識機構の解明に貢献する。

3. 研究の方法

(1) 「ウシ透明帯の精子認識ドメインの同定と糖鎖の機能の解明」

ウシ ZP2, ZP3, ZP4 組換え糖タンパク質の発現と精製

各糖タンパク質成熟体の N 末端に 6×His タグと S タグを付加させた組換え体を、我々が 2007 年に報告した方法 (Kanai et al. FEBS J, 274, 5390-5405 (2007)) に基づいて、Sf9 昆虫細胞を用いて発現させ培地に分泌させた。各組換え糖タンパク質を、6×His タグを利用し、TALON 樹脂 (Takara) によるアフィニティー精製により培地から部分精製した。

ウシ ZP3, ZP4 組換え変異糖タンパク質の発現

ウシ ZP3 並びに ZP4 をコードする cDNA を各鑄型とし、PrimeStar Mutagenesis kit (Takara) を用いて、N 末端領域あるいは C 末端領域の欠失変異の導入、また各糖鎖付加部位の変異導入を行った。目的のプラスミドが得られたことは塩基配列決定 (Macrogen) により確認した。flashBAC DNA (Oxford Expression Technologies) によるトランスフェクションで各組換えバキュロウイルスを作製した。Sf9 細胞にウイルスを感染させ 48 時間培養することにより目的組換えタンパク質を培地に分泌させた。複数の組換えタンパク質を共発現させる場合は、対応するウイルスを共感染させた。

ZP3 と ZP4 との間の相互作用検出

例えば ZP3 には 6×His タグを ZP4 には FLAG タグを付加し、TALON ピーズにより ZP3 をプルダウンさせたときに ZP4 が共沈するかどうかを調べた。His タグ融合タンパク質と FLAG タグ融合タンパク質の特異的検出のためには抗 His タグ抗体、抗 FLAG タグ抗体によるウエスタンブロットを行った。

競合阻害法

可溶化透明帯をプラスチックプレートに吸着させておき、各組換えタンパク質と前培養しておいた精子をウェルに入れ反応させた。各ウェルへの精子結合数をカウントし、精子の透明帯結合に対する各組換えタンパク質の阻害効果を調べた。

直接結合法

各組換え糖タンパク質をプラスチックプレートに吸着させておき、精子をウェルに入れ反応させた。各ウェルへの精子結合数をカウントし、各組換え糖タンパク質の精子結合能を調べた。

(2) 「受精成立に伴う精子結合能の消失機構の解明」

ウシ ZP2 断片の発現、精製並びに構造解析
ウシ ZP2 をコードする cDNA を鑄型とし、C 末端領域の欠失変異を導入した。Sf9 細胞で発現させ、N 末端に付加した 6×His タグを用いて部分精製した。リン酸緩衝液に透析した後、結晶化条件検討へ供した。また、高工

ネルギー加速器研究機構の Photon Factory において小角 X 線散乱測定を行った。

4. 研究成果

(1) 「ウシ透明帯の精子認識ドメインの同定と糖鎖の機能の解明」

ウシ透明帯構成糖タンパク質は ZP2, ZP3, ZP4 の 3 種類であるが、ZP3 と ZP4 との複合体が精子結合能を有する。ZP3 は N 末端から ZP-N サブドメイン、ヒンジ領域、ZP-C サブドメインの 3 領域からなる。ZP3 の N 末端からヒンジ領域までを含む断片が ZP4 と共沈し、かつ精子と透明帯との結合に対する競合阻害活性を示すことを以前に見出している。今回、この ZP3 断片の ZP4 相互部位を更に限定するため、ZP3 断片を C 末端から更に欠失させ ZP4 との共沈への影響を調べた。翻訳開始 Met を 1 番としたときの Trp-156 から Arg-160 の 5 残基の欠失により ZP4 との共沈が有意に低下した。この領域が ZP4 との相互作用に直接関与しているか、あるいは ZP3 断片の立体構造形成に必要である可能性が考えられた。この点は今後の課題である。この相互作用領域近傍の Asn-146 に付加する N 結合型糖鎖を、Asn から Asp あるいは Gln への変異により、欠失させたところ ZP4 との複合体の精子結合能が有意に低下した。しかし、糖鎖が直接精子と結合するのか、それとも構造安定化などタンパク質の機能に影響を与えるのか、など糖鎖の機能についても不明であり今後の課題である。

精子結合活性測定にはこれまで競合阻害法を用いてきた。今回新しく直接結合法を開発した。競合阻害法の場合、ZP3 と ZP4 はそれぞれ単独では阻害活性を示さず ZP3/ZP4 複合体が活性を示す。よって精子認識ドメインの同定のためには ZP3/ZP4 複合体形成が前提条件であり、各成分上の精子結合部位の同定は困難である。今回、ZP2, ZP3, ZP4 をそれぞれ単独でプラスチックプレートに吸着させ精子結合活性を調べたところ ZP4 が最も高い活性を示し、他の 2 成分の活性は無視できる程度であった。ZP3/ZP4 複合体の精子結合部位は ZP4 にあり、多価高分子化により活性発現するという可能性が考えられた。ZP3 単独では精子結合活性を示さなかったものの、ZP3/ZP4 複合体形成により初めて形成される精子認識ドメインもあるかもしれない。この点は今後の課題である。直接結合法では ZP4 が単独で精子結合活性を示すことから、ZP4 の種々の断片および糖鎖付加部位変異体を作製し、精子結合活性を調べた。N 末端の ZP-N 様ドメインとヒンジ領域に精子結合部位があることが示唆された。N 結合型糖鎖付加部位の変異では有意の低下は見られなかった。O 結合型糖鎖付加部位と予想される Ser, Thr の変異でも有意の低下は見られなかった。よって、ZP4 の精子結合部位に関しては糖鎖は関与していないことが示唆された。マウスとヒトでは ZP2 の N 末端付近が精子結合部位で

あるのに対し、今回ウシでは ZP2 は精子結合活性をほとんど示さず、ZP4 の N 末端付近が主に活性を示した。哺乳類の中でも種間で精子認識機構が異なるのかもしれない。ブタ ZP4 成熟体では N 末端の ZP-N 様ドメインがプロセッシングにより除かれている。よって今回、ウシとブタの間でも精子認識機構が異なる可能性が示された。

ZP4 を他の方法で多量体化した場合、精子結合活性を示すかどうかをあきらかにするため、Cartilage oligomeric matrix protein の 5 量体形成ドメインとの融合タンパク質を Sf9 細胞を用いて発現させた。ブルーネイティブゲル電気泳動で高分子化を確認したが、競合阻害法では阻害活性を示さなかった。ZP4 をピオチン標識しストレプトアビジンに結合させたとこ所高分子化し競合阻害活性も示した。ZP4 が単独で精子結合活性を示すためには多量体化による精子結合部位の多価化が必要であることが示唆された。

(2) 「受精成立に伴う精子結合能の消失機構の解明」

ZP2 は受精成立に伴い一箇所特異的切断を受ける。以前、この切断箇所を Factor Xa 等市販酵素の切断配列に置換し、透明帯反応の試験管内再構成を試みた。しかし、組換えタンパク質の収量が低いことと切断効率が低いことから精子結合活性を調べる段階には進んでいなかった。今回、ZP2 プロセッシング酵素であることが最近報告されたオバスタシンの組換えタンパク質発現を試みた。Sf9 細胞を用いて分泌タンパク質として発現させることに成功したが、ZP2 切断活性は見られなかった。

ZP2 の N 末端領域の立体構造は不明である。受精成立に伴う ZP2 の立体構造変化をあきらかにする第一歩として、ZP2 の N 末端断片の結晶化条件検討ならびに小角 X 線散乱測定を行った。結晶はまだ得られていない。また、凝集しやすい性質を有することがわかり、凝集を抑えるための条件検討が必要であると考えられた。

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 1 件)

Suzuki Kaori, Tatebe Nanami, Kojima Saori, Hamano Ayumi, Orita Masaki, Yonezawa Naoto. The Hinge Region of Bovine Zona Pellucida Glycoprotein ZP3 Is Involved in the Formation of the Sperm-Binding Active ZP3/ZP4 Complex. *Biomolecules*, 査読有, 5, 2015, 3339-3353, doi: 10.3390/biom5043339

[学会発表](計 5 件)

吹田希、ウシ卵子透明帯タンパク質 ZP4 の

精子結合部位に関する研究、第 90 回日本生化学会大会、2017 年

太田賢志、ブタ PDI-P5 の Ca²⁺ 結合能および多量体形成能の解析、第 90 回日本生化学会大会、2017 年

太田賢志、Cys-Ala 変異体、ドメイン欠損体を用いたブタ PDI-P5 の蛍光プローブおよびゲルろ過クロマトグラフィーによる構造機能解析、第 89 回日本生化学会大会、2016 年

浅井奈穂、ウシ卵子透明帯糖タンパク質間の相互作用部位に関する研究、第 88 回日本生化学会大会、2015 年

織田美咲、ウシ透明帯糖タンパク質 ZP4 は多価化により精子結合活性を示す、第 88 回日本生化学会大会、2015 年

[その他]

ホームページ

<https://chibabiomacromolecularchem.weebly.com/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

米沢 直人 (YONEZAWA NAOTO)

千葉大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号：80212314

(2) 研究分担者

柳田 光昭 (YANAGIDA MITSUAKI)

順天堂大学・医学研究科・准教授
研究者番号：80365569

(3) 連携研究者

田之倉 優 (TANOKURA MASARU)

東京大学・農学生命科学研究科・特任教授
研究者番号：60136786