

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06076

研究課題名(和文) 哺乳類卵外被の精子結合機構ならびにマトリクス構築機構

研究課題名(英文) Sperm recognition mechanisms and matrix formation mechanisms of mammalian egg coats

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) 3,400,000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。受精の際に精子は卵外被に一時的に接着するが、どのタンパク質のどの部分に接着するかは十分に解明されていない。従来用いられてきた競合阻害法では各糖タンパク質単独の精子接着能を検出することができない。本研究では、新規に開発した検出法によりZP4が単独で精子接着能を示すことを見出した。この方法によりZP4のN末端ドメインと中央のヒンジを含む領域の2ヶ所が精子接着部位であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精子と卵外被との接着は種の保存に欠かせない反応であるが、仕組みはまだ十分解明されていない。マウスとヒトにおける研究が先行しており、ゴールに到達したと思われるが、他の哺乳類では解明されていないため、哺乳類に普遍的な仕組みがあるのか、種によって少しずつ異なるのかはわかっていない。本研究は、試験管内の実験結果ではあるが、ウシの仕組みはヒトやマウスとは異なることを示唆した。本研究の新規検出法は簡便であり、組換えタンパク質が利用できるため、精子の卵外被との接着能力をヒトを含めた様々な種で検査する目的で使うことができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Bovine egg coat looks like a sponge and consists of the glycoproteins ZP2, ZP3, and ZP4. In a competitive inhibition assay, ZP2, ZP3, and ZP4 do not exhibit sperm-binding activity. In this study, we established a new method using plastic plates to detect sperm-binding activity of single component of the egg coat. We found that ZP4 bound to sperm by itself, while neither ZP2 nor ZP3 bound to sperm significantly. By using this assay, we found that N-terminal domain and central region including hinge region are sperm-binding sites of ZP4. In mice and humans, N-terminal domain of ZP2 is the sperm-binding site. Then, it remains to be clarified whether sperm binding mechanisms of mammalian egg coats are conserved in mammals or not.

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。本研究は透明帯が関わる反応について機構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の結果や質量分析による糖鎖構造解析の結果は、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性が生じた。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 末端ドメインがマウスおよびヒトにおける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 説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  $\alpha$ -ガラクトース(ブタ)と  $\alpha$ -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。この認識機構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いる。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両者で共通している。それに対し、精子認識機構の研究が先行しているマウス透明帯は ZP1, ZP2, ZP3 の3種類からなり、ヒト透明帯は ZP1, ZP2, ZP3, ZP4 の4種類からなる。両者とも ZP2 が単独で精子結合能を有する。マウス、ヒトにおける ZP2 説が哺乳類に普遍的に当てはまるかどうかは不明である。ブタとウシは、両者とも ZP1 を持たないため、マウス、ヒトとは異なる精子認識機構を有する可能性は否定できない。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 ZP3/ZP4 複合体のどの部分が精子結合活性を示すのかはわかっていない。

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 モジュールと呼ばれる。Jovine らにより、ZP モジュール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 末端側ドメイン(ZP-N 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。マウス、ヒトでは透明帯の精子結合部位があきらかにされているものの、他の動物種ではまだ十分に解明されていない。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て、精子結合部位の解析を進めてきた。本研究では、透明帯の精子認識ドメインを同定し、さらにドメイン内の精子結合部位をアミノ酸残基レベルで同定することを目的とする。透明帯は構成タンパ

ク質からなる網目状構造であるが、構成タンパク質がどのように相互作用して形成されているのかは不明である。ZP3/ZP4 複合体の高次構造を解明し構成タンパク質間の相互作用機構を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 「ウシ透明帯の精子認識部位の同定」

##### 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タンパク質を、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 タグを利用した TALON 樹脂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 ZP2/ZP3, ZP2/ZP4, ZP3/ZP4, ZP2/ZP3/ZP4 混合物の発現と精製

各タンパク質に対する組換えバキュロウイルスを組合せて Sf9 昆虫細胞に共感染させることにより、各種混合物を発現させ培地に分泌させた。各混合物を、6×His タグを利用した TALON 樹脂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。ZP4 は単独で精子結合活性を示すことが判明したため、複合体を形成している ZP4 と形成していない ZP4 を分離することにした。ZP4 を含む混合物については N 末端に 6×His の代わりに FLAG タグを付加した ZP4 を発現させ、TALON 樹脂による精製の際に複合体を形成していない ZP4 を除去した。

##### ウシ ZP4 フラグメントの発現と精製

ウシ ZP4 をコードする cDNA を鋳型とし、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。と同様にアフィニティー精製した。

##### ブタ ZP4 の N 末端ドメインの発現と精製

ブタ ZP4 の N 末端ドメインをコードする cDNA を人工遺伝子として合成し(IDT)、トランスファープラスミドに挿入した。と同様に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。と同様にアフィニティー精製した。

##### 改良型緑色蛍光タンパク質(EGFP)とウシ ZP4(290-340)との融合タンパク質の発現と精製

ウシ ZP4 の 290 番目から 340 番目までのアミノ酸残基からなるフラグメントは分子量が小さく電気泳動での分析が困難である。そこで、EGFP との融合タンパク質を作製するため、EGFP をコードする cDNA をウシ ZP4 用トランスファクターの S タグと置き換えた。N 末端から 6×His タグ, EGFP, ZP4(290-340)の順で融合したタンパク質の組換えバキュロウイルスを作製し、およびと同様に目的タンパク質を発現させ、アフィニティー精製した。

##### 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) 「多量体化ウシ ZP4 の精子上結合部位」

##### ウシ ZP2, ZP3, ZP4 のビオチン標識

(1) のように精製したウシ ZP2, ZP3, ZP4 を生理的リン酸緩衝液に対し透析し、ビオチンアミドヘキサミン酸 3-スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル ナトリウム塩(B1022, Sigma)と反応させた。

##### 競合阻害法

ウシ ZP2/ZP3/ZP4 混合物をプラスチックプレートに吸着させておき、で作製したビオチン化タンパク質をストレプトアビジンと反応させ、前培養しておいた精子とビオチン化タンパク質を反応させたのちにプラスチックプレートの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、精子のウシ ZP2/ZP3/ZP4 との結合に対するビオチン化組換えタンパク質の阻害効果を調べた。

##### 間接蛍光抗体法

ビオチン化ウシ ZP4 をストレプトアビジン有あるいは無の条件で反応させ、ウシ精子と反応させた。スライドガラス上でホルムアルデヒド固定した後、3%ウシ血清アルブミンでブロッキングし、1 次抗体として抗ブタ ZP4 抗血清を、2 次抗体としてフルオレセイン標識抗ウサギ IgG を反応させた。カバーガラスを載せたのちに、蛍光顕微鏡下で精子のどの部分に ZP4 が結合しているのかを観察した。

#### (3) 「ウシ ZP3/ZP4 複合体の高次構造解析」

##### ウシ ZP3/ZP4 複合体の発現と精製

ウシ ZP3 の 32 番目から 168 番目までの断片とウシ ZP4 は複合体を形成する。6×His タグを N 末端に付加したウシ ZP3 断片と FLAG タグを N 末端に付加したウシ ZP4 断片を、各々に対応する組換えバキュロウイルスを Sf9 細胞に共感染させることにより、発現させた。複合体を形成していない ZP4 を TALON 樹脂を用いたアフィニティー精製で除去した。複合体を形成していない ZP3 断片を Superdex 200 を用いたゲルろ過クロマトグラフィ で除去した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 「ウシ透明帯の精子認識部位の同定」および(2) 「多量体化ウシ ZP4 の精子上結合部位」

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。これは、プラスチックプレートに吸着させた透明帯タンパク質と精子との結合に対する各組換え糖タンパク質の阻害活性を調べる方法である。今回新しく直接結合法を開発した。これは、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精子結合活性を直接調べる方法である。単独の各組換え糖タンパク質の場合、ZP4 が最も高い結合能を示し、ZP2, ZP3 の活性は格段に低かった。よって、今回初めて、ウシでは ZP4 が単独で精子結合活性を示すことが明らかになった。各混合物について精子結合活性を調べたところ、ZP4 を含むものが活性を示した。競合阻害法では ZP4 は溶液状態であるのに対し、直接結合法では ZP4 がプラスチックプレートに吸着しており固定されている。ZP4 が固定された状態で協同的に精子と結合することが精子結合活性を示すために必要であると考えられた。溶液状態で精子と ZP4 とを協同的に結合させるため、ZP4 をビオチン化し、ストレプトアビジンと反応させることにより ZP4 を多量体化した。対照としてストレプトアビジンと反応させないビオチン化 ZP4 を用いた。競合阻害法で、これらの試料がウシ精子のウシ ZP2/ZP3/ZP4 への結合に対し阻害活性を示すかどうかを調べた。ストレプトアビジンと反応させることによりビオチン化 ZP4 の阻害活性は有意に上昇した。ビオチン化 ZP2、ビオチン化 ZP3 についてはストレプトアビジンと反応させても阻害活性が有意に上昇することはなかった。多量体化した ZP4 は間接蛍光抗体法観察によりウシ精子の先体部に結合することがわかった。つまり、人工的に多量体化した ZP4 は天然の透明帯と同様の部位に結合することがわかった。これらの結果から ZP4 は透明帯マトリクスに組込まれている多量体の状態において精子結合活性を示し、固相に吸着させることにより、この透明帯上での多量体の状態を模倣できる、と考えられた。次に、ZP4 の種々のフラグメントを作製し、直接結合法で精子結合活性を調べた。N 末端ドメインを欠失させることにより有意に結合活性が低下した。N 末端ドメイン単独で結合活性を示した。また、290 番目から 340 番目までの領域を欠失させると有意に結合活性が低下した。この領域を EGFP と融合させた組換えタンパク質と EGFP 単独との間で精子結合活性を比較したところ、前者が有意に高い活性を示した。ZP4 の他の領域の欠失では有意の低下は見られなかった。よって、ZP4 上の精子結合部位はこれらの 2 ヶ所であることがわかった。ブタ ZP4 は透明帯に組込まれた成熟タンパク質の状態では N 末端ドメインを欠いている。おそらく翻訳後にプロテアーゼにより切り取られると思われるが、その生理的意義は研究されていない。ウシ精子のブタ ZP4 の N 末端ドメインに対する結合はウシ ZP4 のものに比べ有意に低かった。ZP4 のアミノ酸配列はウシとブタとの間で良く保存されている。しかし、ウシとブタとの間でアミノ酸配列が異なる領域がウシ精子結合部位である可能性がある。ウシ ZP4 のアミノ酸配列をブタのものに入れ換えた組換えタンパク質を作製し、ウシ精子結合活性を調べることにより、N 末端ドメイン内の精子結合部位をアミノ酸残基レベルで限定することが可能であると期待される。

##### (3) 「ウシ ZP3/ZP4 複合体の高次構造解析」

透明帯複合体を組換えタンパク質で得る場合、高次構造解析に十分な量を得ることが困難であり、濃縮作業により凝集しやすい。本研究では全長の ZP3 ではなく、ZP4 と複合体を形成する ZP3 断片を発現させることにより、収量と凝集性の改善を図った。しかしながら、ゲルろ過クロマトグラフィ 前の濃縮およびゲルろ過クロマトグラフィ 後の濃縮のいずれにおいても凝集する傾向が見られ、本研究期間内で、高次構造解析に適した高濃度の複合体溶液を得ることはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kamila Dilimulati, Undram Ganbat, Naoto Yonezawa
2. 発表標題 Two sites in the N-terminal region on bovine zona pellucida glycoprotein ZP4 are involved in sperm binding activity
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Undram Ganbat, Kamila Dilimulati, Naoto Yonezawa
2. 発表標題 溶液中で多価化された組換えウシZPタンパク質の精子結合活性
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 副島龍之介、佐藤祐透、太田賢志、宮川美保、米澤直人、赤間邦子
2. 発表標題 ブタプロテインジスルフィドイソメラーゼP5の四次構造解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 副島龍之介、佐藤祐透、太田賢志、宮川美保、米澤直人、赤間邦子
2. 発表標題 ブタプロテインジスルフィドイソメラーゼP5は弱い疎水性相互作用により二量体を形成する
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 カミラデリムラト、木村雄大、ガンバトウンドラム、米澤直人
2. 発表標題 Identification of sperm-binding sites on bovine zona pellucida glycoprotein ZP4
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤祐透、太田賢志、宮川美保、米澤直人、赤間邦子
2. 発表標題 ブタPDI-P5の四次構造解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村雄大、佐藤しのり、上田美冬、Kamila Dilimulati、米澤直人
2. 発表標題 ウシ卵外被糖タンパク質ZP3/ZP4複合体の相互作用部位
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018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	柳田 光昭 (Yanagida Mitsuaki) (80365569)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授  (32620)	

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