

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570101

研究課題名（和文）哺乳類卵子透明帯の構造と機能 - 糖鎖は本当に重要なのか？ -

研究課題名（英文）Structure and function of mammalian egg zona pellucida: are the sugar chains really essential for zona functions？

研究代表者

氏名（ローマ字）：米沢 直人 (YONEZAWA NAOTO)

所属機関・部局・職：千葉大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：80212314

研究成果の概要：卵子透明帯の構成糖タンパク質は動物種によって異なる。マウス透明帯は ZP1, ZP2, ZP3 の 3 成分からなり，ZP3 が単独で精子結合活性を示す。ウシ卵子透明帯はブタと同じく ZP2, ZP3, ZP4 の 3 成分からなる。本研究でバキュロウイルス-Sf9 細胞発現系を構築することにより，ウシの場合，ZP3 単独では精子結合活性を示さず ZP3/ZP4 複合体が活性を示すことをあきらかにした。よって，ウシとブタにおいて透明帯の精子認識機構は類似していることが示唆された。ブタの場合，ZP3/ZP4 複合体の ZP4 の糖鎖が精子結合に関わることがわかった。ブタ ZP3 ならびに ZP4 のジスルフィド結合パターンは先に報告されたマウスなど他の動物種のものとは異なっていた。このパターンの違いと精子認識機構との関連性解明は今後の課題である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：糖タンパク質，受精，細胞外マトリックス，透明帯

1. 研究開始当初の背景

卵子は卵外被で包まれており，哺乳類卵子ではこの卵外被は透明帯(zona pellucida)と呼ばれる。透明帯は 3 ないし 4 種類の糖タンパク質が網目状構造を形成した一種の細胞外マトリックスである。

(1)1980 年代から精子と透明帯との相互認識機構の研究が盛んになった。先行した Wassarman グループの研究が中心となり，マ

ウス透明帯糖タンパク質 ZP3 の糖鎖が精子リガンドであるという糖鎖説が提唱された。最近になって Dean グループのトランスジェニック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構造説が提出された。どちらが正しいのかは決着がついていない。この状況下，ノックアウトマウス解析により，精子タンパク質の ADAM3 が透明帯結合

因子の有力な候補として報告された。ブタおよびウシの透明帯については、我々がマウスに先駆けて糖鎖構造を決定し、精子リガンドはN結合型糖鎖の α -ガラクトース(ブタ)と α -マンノース(ウシ)であることを着実に証明してきた。また、我々は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より、タンパク質骨格はブタ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。このことは、ブタおよびウシにおいては糖鎖構造が種選択性の主体であることを示唆すると考えられた。

(2)透明帯糖タンパク質は ZP1, ZP2, ZP3, ZP4 の4種類が見出されており、ヒト透明帯が4種類全部からなるのに対し、ブタおよびウシは ZP2, ZP3, ZP4 の3種類、マウスは ZP1, ZP2, ZP3 の3種類からなる。マウスでは ZP3 が単独で精子結合活性を示すのに対し、ブタでは各成分単独では活性を示さず、ZP3 と ZP4 の複合体が活性を示す。ZP タンパク質は共通の ZP ドメインを持つが、少なくともマウスとブタとでは ZP ドメインの構造機能に違いがあると思われた。

2. 研究の目的

(1)精子認識における糖鎖の役割

ブタとウシの精子の単糖結合特異性を比較し、卵子透明帯の非還元末端糖鎖構造と一致するかどうかを検討する。

マウス ADAM3 の発現系を構築し透明帯との結合性の有無を調べる。結合性が見られた場合、透明帯の糖鎖の関与をあきらかにする。

ブタ卵巣から精製したネイティブ ZP3/ZP4 はブタ精子との結合性を示すのに対し、組換えブタ ZP3/ZP4 は糖鎖構造の違いのためブタ精子には結合せずウシ精子と結合する。この特異性の違いを利用し、ブタ ZP3/ZP4 複合体において ZP3 と ZP4 のどちらの糖鎖が精子結合に関わるのかをあきらかにする。

(2)ZP ドメインの構造と機能

ウシについて、マウスのように成分単独で精子結合活性を示すのか、あるいはブタのように複数の成分からなる複合体が活性を示すのかをあきらかにする。

マウスとブタとの間で ZP ドメインの構造を比較する。

ZP3 と ZP4 との間の相互作用部位をあきらかにする。

3. 研究の方法

(1) 糖脂質アナログ (α -マンノース, α -ガラクトース, α -グルコース, α -N-アセチルグルコサミン, α -N-アセチルガラクトサミン, α -N-アセチルノイラミン酸) でブ

ラスチックプレートにコーティングしブタ精子およびウシ精子の結合数を測定した。先体反応を起こす前の精子と起こした後の精子について糖結合特異性を調べた。

バキュロウイルス-Sf9 昆虫細胞による組換えタンパク質発現系を構築し、マウス ADAM3 とマウス ZP3 との間の相互作用を免疫共沈法で検出した。ADAM3 のN末端には FLAG タグを融合し、ZP3 のN末端には 6xヒスチジンタグを融合させた。抗 FLAG 抗体結合アガロースビーズで ADAM3 を免疫沈降させ、ヒスチジンタグを融合した ZP3 が共沈するかどうかを抗ヒスチジン抗体を用いたウエスタンブロットで調べた。

(2) ネイティブ ZP3 と組換え ZP4, 組換え ZP3 とネイティブ ZP4 の複合体をそれぞれ試験管内で作製した。以前確立した競合阻害法を用いて、ブタ精子およびウシ精子への結合性を調べた。すなわち、作製した各複合体とブタあるいはウシ精子とを反応させておき、可溶性透明帯でコーティングしたプラスチックプレートにその精子液を入れ精子と透明帯との結合活性を調べた。阻害剤を入れない場合の結合数を対照とし、各複合体を反応させたときの結合数を求め、結合数が下がった場合にその複合体に精子結合活性があると判断した。

ウシ卵巣から各成分を精製することは困難であるためバキュロウイルス-Sf9 昆虫細胞による組換えタンパク質発現系を構築し、純粋な ZP2, ZP3, ZP4 を得て各成分の精子結合活性を競合阻害法で調べた。また、ZP2/ZP3, ZP2/ZP4, ZP3/ZP4 の組合せで共感染し、得られた複合体の精子結合活性を調べた。さらに、ZP4 のN末端領域欠損変異体を作製し、精子結合活性への影響を競合阻害法で、また複合体形成への影響を免疫共沈法で調べた。

ネイティブ糖タンパク質が十分量得られるブタについて ZP3 および ZP4 を精製した。アミノ酸配列に基づいて、プロテアーゼあるいは化学的処理を組合せ、ZP3, ZP4 のシステインの間を特異的に切断し、断片を逆相 HPLC で分離した。ジスルフィド結合を有する断片のピークを蛍光修飾試薬で検出し、プロテインシーケンサーと MALDI-TOF MS を用いて、各断片の位置を同定することによりジスルフィド結合パターンを決定した。

ブタとウシの ZP3 ならびに ZP4 について、ZP ドメインのN末端側サブドメインおよび C 末端側サブドメインのバキュロウイルス-Sf9 細胞発現系を構築し、各々異なるタグを融合させることにより、免疫共沈法で相互作用の有無を調べた。

4. 研究成果

(1) ブタ精子は調べた糖脂質アナログの中で α -ガラクトースに最も高い親和性を示し、

ウシ精子は α -マンノースに最も高い親和性を示した。この結果から、ブタおよびウシ透明帯の中性N結合型糖鎖の非還元末端糖残基と各単糖特異性が一致することがわかった。先体反応後はブタ精子の特異性は α -マンノースへ変化した。ウシ精子の特異性は変らなかった。この特異性の変化の意味については今後更に検討する必要がある。

マウス ADAM3 の細胞外ドメインのパキキュロウイルス-Sf9 細胞発現系を構築した。ADAM3 は ADAM2 と複合体を形成している、との報告がされたため、ADAM2 の発現系も構築した。免疫共沈法により ADAM2 と ADAM3 は相互作用することがわかった。さらにマウス ZP3 の発現系も構築し ADAM2/ADAM3 複合体との相互作用の有無を免疫共沈法で調べたが、相互作用は見出されなかった。ADAM2/ADAM3 複合体と ZP2/ZP3 複合体との相互作用について今後検討する必要があると思われる。

(2) ブタのネイティブ ZP3/ネイティブ ZP4 の組合せは、以前の報告どおりブタ精子に対する競合阻害活性を示した。組換え ZP3/ネイティブ ZP4 の組合せが、ブタ精子に対し阻害活性を示したのに対し、ネイティブ ZP3/組換え ZP4 は示さなかった。後者の組合せはウシ精子に対して阻害活性を示したことから、活性を有する複合体が形成されたことがわかった。以上の結果から、ZP3/ZP4 複合体の中で ZP4 の糖鎖がブタ精子結合に関与することがわかった。

ウシ透明帯 3 成分のパキキュロウイルス-Sf9 細胞発現系を構築し、各成分の精子結合活性を調べたところ、各成分単独では活性を示さなかった。2 成分の組合せでパキキュロウイルスを共感染させ複合体を得たところ ZP3/ZP4 の組合せだけが精子結合活性を示し ZP2 の関与は見られなかった。ZP4 の N 結合型糖鎖をレクチンプロット法と質量分析法で調べたところ主な構造はフコシル化トリマンノシルコア構造であった。非還元末端に α -マンノース残基を有する点でネイティブのウシ透明帯と類似しており、このためウシ精子への結合活性を示したと推測された。ウシ ZP4 は 3 つのドメインから構成されているが、N 末端側の 2 つのドメインを欠失させても精子結合活性は変化しなかった。また、免疫共沈法で複合体形成を検出した結果、N 末端側の 2 つのドメインは複合体形成に必要ななかった。以上、ブタと同じくウシでも ZP3/ZP4 複合体が精子結合活性を示すことがあきらかになった。ブタおよびウシでは、ZP3/ZP4 の糖鎖構造が種選択的精子結合に関わるもののその活性発現には ZP3/ZP4 の複合体形成が必要であることが示唆された。

ネイティブのブタ ZP3 および ZP4 の ZP ドメインについてジスルフィド結合パターンを決定した。ZP3 の 12 システイン残基につい

ては、Cys1-Cys4, Cys2-Cys3, Cys5-Cys7, Cys6-Cys11, Cys8-Cys9, Cys10-Cys12 であった。ZP4 の ZP ドメイン以降の 10 システイン残基については、Cys1-Cys4, Cys2-Cys3, Cys5-Cys7, Cys6-Cys8, Cysa-Cysb であった。N 末端側サブドメインに 2 つあるジスルフィド結合のパターン (Cys1-Cys4, Cys2-Cys3) は ZP3 と ZP4 の間で同じであり、マウス ZP2 および ZP3 など他動物種の関連タンパク質のジスルフィド結合パターンとも同じであった。それに対し、C 末端側サブドメインのジスルフィド結合パターンは ZP3 と ZP4 の間で異なっており、さらに他動物種の対応するタンパク質のものとも異なっていた。マウス ZP3 など、以前に報告された ZP3 のパターンは、Cys5-Cys7, Cys6-Cys8, Cys9-Cys11, Cys10-Cys12 である。マウス ZP2 など以前に報告された ZP4 関連タンパク質のパターンは、Cys5-Cys6, Cys7-Cysa, Cysb-Cys8 である。C 末端側のジスルフィド結合パターンが成分間および動物種間で異なることの意味は不明で、今後の課題である。

ウシのサブドメイン発現系構築が先に進んだため、ウシについて相互作用部位解析を行った。ZP3 の N 末端側サブドメインと ZP4 の C 末端側サブドメインとが相互作用すること、また ZP3 の C 末端側サブドメインと ZP4 の N 末端側サブドメインとが相互作用することを見出した。ZP ドメインの N 末端側サブドメインと C 末端側サブドメインとの相互作用が繊維形成に関わる可能性が考えられた。

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5件)

Saeko Kanai, Tetsushi Kitayama, Naoto Yonezawa, Yoriko Sawano, Masaru Tanokura, Minoru Nakano, Disulfide linkage patterns of pig zona pellucida glycoproteins ZP3 and ZP4, Molecular Reproduction and Development, 75, 847-856, 2008、査読有
Natsuko Mizuno, Tetsushi Kitayama, Koji Fujii, Hiroaki Nakahara, Kanako Yoshida, Kazumasa Sekiguchi, Naoto Yonezawa, Minoru Nakano, Kentaro Kasai, A D19S433 primer binding site mutation and the frequency in Japanese of the silent allele it causes, Journal of Forensic Sciences, 53, 1068-1073, 2008、査読有
Fabiana Lica Imai, Koji Nagata, Naoto

Yonezawa, Minoru Nakano, Masaru Tanokura, Structure of calcium-bound human S100A13 at pH 7.5 at 1.8 resolution, Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun., 64, 70-76, 2008、査読有

Saeko Kanai, Naoto Yonezawa, Yuichiro Ishii, Masaru Tanokura, Minoru Nakano, Recombinant bovine zona pellucida glycoproteins ZP3 and ZP4 coexpressed in Sf9 cells form a sperm-binding active hetero-complex, FEBS Journal, 274, 5390-5405, 2007、査読有

Naoto Yonezawa, Saeko Kanai, Minoru Nakano, Structural significance of N-glycans of the zona pellucida on species-selective recognition of spermatozoa between pig and cattle, Society of Reproduction and Fertility supplement, 63, 217-228, 2007、査読無

[学会発表](計5件)

尾崎恵璃、ウシ妊娠関連糖タンパク質(PAG)1のN結合型糖鎖構造、第81回日本生化学会大会、2008年12月9日、神戸ポートアイランド

児島さゆり、ウシ卵子透明帯糖タンパク質ZP3とZP4の相互作用部位、第81回日本生化学会大会、2008年12月11日、神戸ポートアイランド

Ayumi Hamano, Carbohydrate chains linked to ZP4 are responsible for the sperm binding activity of ZP3/ZP4 complex in pig, 第60回日本細胞生物学会大会、2008年6月30日、パシフィコ横浜

Saeko Kanai, Studies on the interaction sites between ZP domains of zona pellucida glycoproteins, 第80回日本生化学会大会、2007年12月12日、パシフィコ横浜

金井咲園子、卵子透明帯糖タンパク質ZP3とZP4の複合体形成がウシ精子・卵子間の結合に重要である、第59回日本細胞生物学会大会、2007年5月28日、福岡国際会議場

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米沢 直人 (YONEZAWA NAOTO)

千葉大学・大学院理学研究科・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

(2008年度は連携研究者に変更)

(3) 連携研究者