

平成 21 年 6 月 22 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570159

研究課題名（和文）細胞一細胞融合としての受精膜融合、その分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular analysis of sperm-egg fusion as a model system of cell-cell fusion

研究代表者

萩原 義久 (HAGIHARA YOSHIHISA)

独立行政法人産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・主任研究員

研究者番号：50357761

研究成果の概要：

受精膜融合に関わる精子膜蛋白質 Izumo を標的とし、N 末端フラグメント (NDOM) の 1) 物理化学的性質、2) X 線結晶構造、3) 膜融合阻害機構の解明を目指した研究を行った。その結果、NDOM は卵子と相互作用し、伸びたヘリックスを有する 2 量体構造であることを明らかにした。この結果は細胞-細胞融合にもヘリックス多量体が関与していることを示し、生体膜融合における普遍的な機構の存在を示唆するものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
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・生物物理学

キーワード：タンパク質・核酸の構造・動態・機能、受精、膜融合

## 1. 研究開始当初の背景

生命現象に於ける生体膜融合はウイルス一細胞融合や細胞内ベシクル融合、細胞一細胞融合に分類される。前者 2 つの膜融合因子やその分子論的機構の研究は精力的に進められており、ウイルス及びベシクル膜融合の必須因子（例えばウイルスのエンベロープ蛋白質やエンドサイトーシスに関わる SNARE 蛋白質群）は一次構造上の相同性は全くないが、等しく  $\alpha$ -ヘリックスバンドルを形成することが示されている。一方、細胞一細胞融合に関しての研究は立ち後れており、ウイルス一細胞融合や細胞内ベシクル融合と同様なヘリックス形成を介した分子機構が働いているのかは不明である。その中で、2005 年、研

究分担者である井上らによって代表的な細胞一細胞融合である受精の膜融合に於ける精子側の必須因子が同定され、Izumo と名付けられた (Inoue et al., Nature, 434, 234-8, 2005)。申請者の研究チームは Izumo に特異的に存在しかつ種間の相同性が高い N-末端領域に着目した研究を行い、細胞一細胞の膜融合機構の解明を目指す。

Izumo は 1 回貫通型の膜蛋白質でありマウス、ラット、ヒト、ウシ、イヌでその配列が明らかになっている。これらの生物種の Izumo では、配列の中心部分に存在する免疫グロブリンフォールドドメイン (Ig ドメイン) が良く保存されている。一方、N-末端領域にも良く保存されている領域が存在する

が、この部分は Izumo に特異的な配列であり、既存の蛋白質とのホモロジーは無い。マウス Izumo のこの領域 (NDOM) のみを組換え体で発現、精製し、円偏光二色性 (CD) による測定を行った。得られたスペクトルを解析した結果、NDOM は二次構造中、40%程度の  $\alpha$ -ヘリックス含量を持つことが明らかとなった。さらに、この領域が受精の膜融合に直接関与するかを調べるために、*in vitro* 受精系に精製 NDOM を加え、受精の膜融合の阻害を調べた。その結果、NDOM は精子-卵子の膜融合を顕著に阻害し、NDOM 領域が受精膜融合に重要な役割を果たすことが示された。これら NDOM 用いた予備的な CD、及び *in vitro* 受精膜融合阻害実験の結果は、細胞-細胞融合に於いても  $\alpha$ -ヘリックス構造が重要な役割を果たしており、全ての生体膜融合において普遍的な機構が存在している可能性を示す。

## 2. 研究の目的

申請者の研究チームは様々な手法を組み合わせて、Izumo の N-末端領域フラグメントである NDOM の  $\alpha$ -ヘリックスバンドル形成の有無に着目し、受精の膜融合、即ち細胞-細胞融合機構の解明を目指す。

### (1) NDOM の物理化学的性質の解明

細胞-細胞融合に関わる因子の物理化学的性質は全く知られていない。そこで、Izumo の N-末端領域である NDOM に着目し、その溶液中での物理化学的性質を詳細に調べる。研究代表者は様々なアミノ酸変異が蛋白質に及ぼす影響について、溶液構造及び構造安定性の観点から研究を進めてきた (Hagihara et al., JBC, 280, 24752-8, 2005)。この経験を活かし、NDOM の物理化学的性質の検討を行う。

### (2) NDOM の X 線結晶構造解析

NDOM の詳細な立体構造を X 線結晶構造解析により明らかにする。既存の膜融合因子では数十残基からなる伸びた  $\alpha$ -ヘリックスがバンドル構造を形成することが知られている。

### (3) NDOM による膜融合阻害機構の解明

予備実験の結果から精製 NDOM が *in vitro* における精子-卵子の膜融合を阻害することが明らかとなっている。そこで、卵子、及び精子への NDOM の結合、さらに、卵子側の膜融合因子である CD9 (Miyado et al., Science, 287, 321-4, 2000) と NDOM の結合を調べる。これらによって阻害機構のモデルを構築する。

## 3. 研究の方法

### (1) NDOM の物理化学的性質

Izumo の N 末端領域 (NDOM) は配列的にいかなる既存の蛋白質とも相同性が低く、いったいどんな性質、構造を持っているのか謎である。そこで大腸菌で大量発現、精製した組換え NDOM を利用し、その基礎的な物性データの蓄積を図った。

①ヘリックスコアの探索：NDOM 中のヘリックス含有量の高いヘリックスコア領域が存在するかを調べために、プロテアーゼによる限定加水分解を行う。プロテアーゼにより切断されない部分は即ち強固な立体構造を保持している構造コアと考えられるため、まずプロテアーゼ耐性領域の有無を調べた。これにより発見したプロテアーゼ耐性領域について配列決定及び CD によるヘリックス含量の測定を行った。さらにヘリックス形成の分子機構を明らかにするため NDOM やプロテアーゼ処理により得られた断片について溶液中での  $\alpha$ -ヘリックス構造の安定性を測定した。

②溶液中での単分散一会合状態の確認：ウイルスやベシクル上の膜融合因子はオリゴマーを形成することが知られている。そこで既存の膜融合因子との共通性を探るために、NDOM についてもゲル濾過や超速心等の測定を行い、モノマーなのかオリゴマーなのか、オリゴマーであるなら何量体を形成しているのかを調べた。

③核磁気共鳴法による溶液中での構造研究：X 線結晶構造解析に加え、溶液中での立体構造を決定するため核磁気共鳴による構造決定研究を進めた。

### (2) NDOM の X 線結晶構造解析

ウイルスやベシクル輸送に関わる膜融合因子では、数十残基からなる伸びた  $\alpha$ -ヘリックスが多量体を形成しバンドル構造を形成する。NDOM は  $\alpha$ -ヘリックス構造を持つことが明らかになっているが、高次構造は不明であるため、X 線結晶構造解析により原子レベルでその立体構造を決定するための研究を進めた。

①結晶化条件の探索：精製した NDOM を用いて、クリスタルスクリーンや Topaz システムなどを活用し結晶化条件の探索を行った。また、MAD 法で解析するための SeMet 置換蛋白質の作製も併せて行った。

②X 線結晶構造解析：上記で得た結晶条件をもとに解析に用いるために大量の結晶を調製した。その際、SeMet 置換 NDOM の結晶も併せて作製し、構造解析に必要な X 線反射の測定を SPring8 で行った。

### (3) NDOM による受精膜融合阻害機構の解明

精製 NDOM を加えることで *in vitro* における精子-卵子の膜融合が阻害される。蛍光標

識、または免疫標識が可能な NDOM を作製し、卵子、及び精子への結合、さらに、卵子側の膜融合因子である CD9 との結合を調べた。

①蛍光、もしくは免疫標識が可能な NDOM の作製：FITC などの蛍光試薬で NDOM を修飾するために NDOM の C 末にリンカー領域を挿入しその末端にシステイン残基を導入した。また、抗体での可視化が可能となる様に、同じく C 末に His-tag、myc-tag、Flag-tag 配列を導入した蛋白質も作製して以下の研究に用いた。

②卵子、精子膜上への NDOM の結合の確認：上記で作製した NDOM と卵子、精子をインキュベーションし、蛍光試薬または蛍光標識抗体により NDOM を可視化、蛍光顕微鏡で観察した。さらに、卵子側の膜融合因子である CD9 のノックアウトマウス由来の卵子と NDOM との結合を調べ、NDOM と CD9 の結合の有無を調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) NDOM の物理化学的性質の解明

①プロテアーゼによる限定加水分解及び円二色性 (CD) 測定により NDOM は約 60 残基のヘリックスコアを持つことを示した。さらに分析用超遠心機を利用し、平衡法によって解析することで、NDOM は単分散で二量体を形成することを明らかにした。NDOM 及びヘリックスコアの安定性を CD を用いて調べた結果、その熱変性曲線は協同性が低く、おそらくこれらの分子では水素結合や疎水結合などの相互作用の少ない立体構造を形成しているものと考えられた。この結果は NDOM のヘリックス構造は典型的なコイルドコイルではないことを示唆している。NDOM 及びヘリックスコアの変性剤による変性曲線の比較から、ヘリックスコア以外の N 末端領域は変性しており、ヘリックス構造の安定化には寄与していないことが示された。

②X 線溶液散乱の測定を行い、そのデータを ab initio 構造解析法により解析することで NDOM のヘリックスコアは伸びた棒状の構造をしていることを明らかとした (図 1)。

③NMR 測定ではまず安定同位体  $^{15}\text{N}$  でシングルラベル、及び  $^{15}\text{N}$  と  $^{13}\text{C}$  でダブルラベルしたヘリックスコアを調製した。安定同位体を導入していないサンプルを利用して測定条件の探索を行い、低温で測定することで十分に解析可能なスペクトルを観測できることを明らかとした。また安定同位体ラベルを行ったサンプルを用いて、構造解析に必要なスペクトルの測定を終えた。

##### (2) NDOM の X 線結晶構造解析

X 線結晶構造解析を目指し、NDOM のヘリックスコアを用いて結晶化を試みた。数多くの変

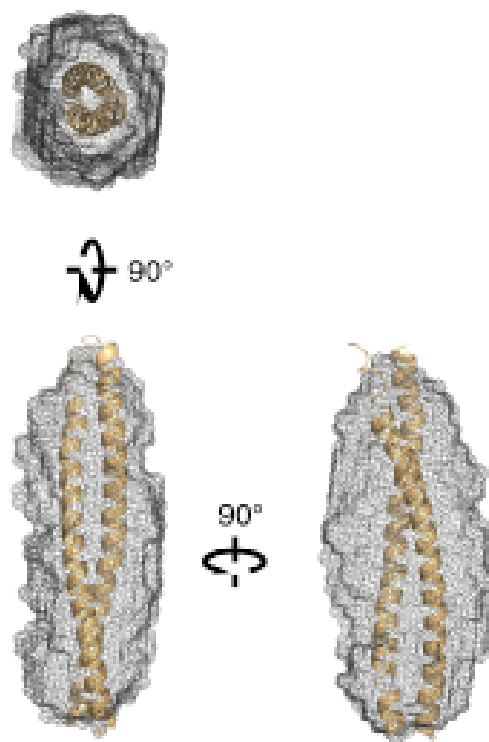


図 1：X 線溶液散乱の測定を行い、そのデータを ab initio モデル構造をメッシュで示す。比較のため、ヘリックスコアと同じアミノ酸数のペプチドが形成するコイルドコイルをメッシュ内の黄色の構造として示している。

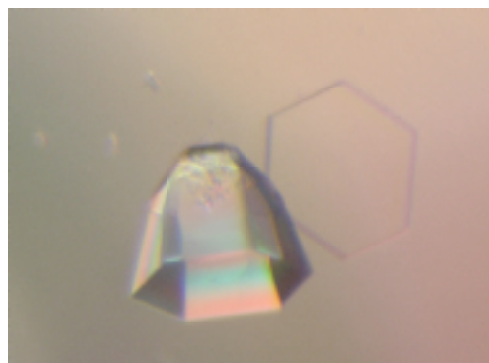


図 2：NDOM のヘリックスコアの結晶。長辺で 0.4mm 程度の結晶を得ることができた。

異体や結晶化条件を探索した結果、良好な大きさ、形状を持つ結晶が得られたが (図 2)、結晶構造を得ることが出来なかった。これは作成した結晶が双晶状態であることが原因であると考えられる。そのため、ヘリックスコアの結晶化には抗体等との共存による手法等、通常の結晶化方法以外の技術を要することが示唆された。

##### (3) NDOM による膜融合阻害機構の解明

①フルオロセインで蛍光標識を行った NDOM を用いる事で NDOM は卵子に特異的に結合す

る事を明らかにした(図3)。しかし、精子には顕著な結合は見られなかった。この事からNDOMが相互作用する蛋白質は卵子膜状に存在すると予想される。またCD9ノックアウトマウスの卵子にも結合が観察され、このことはIzumoの卵子側レセプターはCD9以外の蛋白質であることを明らかとした。

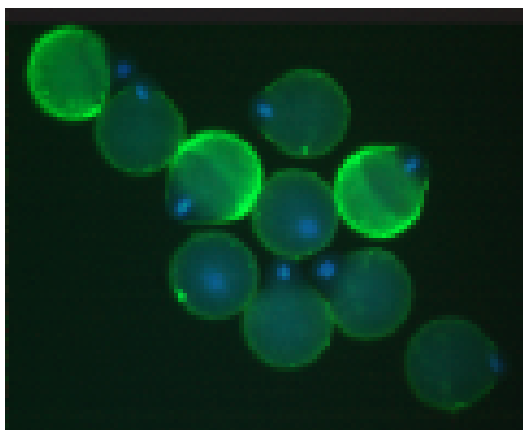


図3: FITCで標識したNDOMと精子との結合。

②60残基ヘリックスコアフラグメントにプロリンを導入してヘリックスを壊したものについてIzumo<sup>-/-</sup>のバックグラウンドのトランスジェニックマウスを作製した。しかし、導入した変異体では精子膜状の発現が見られず、それ以上の解析は断念した。NDOMの変性によって細胞の品質管理機構が働き、変異体が細胞膜上へ正常に移行しなかったものと考えられる。

#### 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 0件)

[学会発表] (計 2件)

発表者(代表)名、発表標題、学会等名、発表年月日、発表場所

①井上直和、萩原義久、岡部勝、受精の膜融合における免疫グロブリンスーパーファミリーIzumoの役割、第7回日本蛋白質科学会年会、2007年12月12日、横浜

②萩原義久、井上直和、平田邦生、浜田大三、上久保裕生、片岡幹雄、山本雅貴、岡部勝、受精膜融合も $\alpha$ ヘリックスを使うのか? Izumoフラグメントの構造機能解析、第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同年会、2007年12月12日、横浜

[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]

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

萩原 義久 (YOSHIHISA HAGIHARA)

独立行政法人産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・主任研究員

研究者番号: 50357761

##### (2) 研究分担者

峯 昇平 (SHOUHEI MINE)

独立行政法人産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・研究員

研究者番号: 70415751

##### (3) 連携研究者

井上 直和 (NAOKAZU INOUE)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号: 50379096

山本 雅貴 (MASAKI YAMAMOTO)

独立行政法人理化学研究所・研究技術開発室・室長

研究者番号: 60241254

平田 邦生 (KUNIO HIRATA)

独立行政法人理化学研究所・研究技術開発室・協力研究員

研究者番号: 20373524