

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570109

研究課題名（和文） 哺乳類卵外被マトリックスの精子認識機構ならびに三次元構築機構

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

研究代表者

米沢 直人（YONEZAWA NAOTO）

千葉大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：80212314

研究成果の概要（和文）：哺乳類卵外被を形成する糖タンパク質の種類は動物種によって異なり、よって精子認識機構も異なると考えられる。ブタとウシでは、卵外被は ZP2, ZP3, ZP4 の 3 成分からなり ZP3/ZP4 複合体が精子結合活性を示すため、精子認識機構は類似している可能性がある。ウシ ZP3, ZP4 の精子結合部位を調べた結果、ZP3 の前半部分と ZP4 の後半部分が結合に関与することが示唆された。一方、ブタでは ZP3 の後半部分と ZP4 の前半部分が関与することが示唆された。ブタとウシとで精子結合部位が異なることは卵外被の立体構造が異なることを示すのかもしれないが、この点については今後の課題である。

研究成果の概要（英文）：Protein compositions of mammalian egg coats are different among mammals, and therefore sperm recognition mechanism might be different among mammals. In pigs and cows, both egg coats are composed of ZP2, ZP3, and ZP4 glycoproteins and ZP3/ZP4 complex shows sperm-binding activity. Therefore, we speculated that sperm recognition mechanisms are similar between pigs and cows. In this project, we found that in cows N-terminal region of ZP3 and C-terminal region of ZP4 were involved in sperm-binding activity. On the other hand, in pigs C-terminal region of ZP3 and N-terminal region of ZP4 were involved in the binding activity. This difference in sperm-binding sites suggests difference in supramolecular structures between pig and bovine egg coats. This hypothesis is to be investigated.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

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クスである。哺乳類の受精時に精子は卵管内で卵子透明帯に種選択的に結合し、透明帯を貫通する過程で先体反応を完了した精子は卵細胞に侵入し受精が成立する。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。

1980年代にWassarmanグループが、マウスの精子は透明帯糖タンパク質 ZP3 の O 結合型糖鎖の非還元末端 α -ガラクトース残基に結合する、と報告して以来、精子と透明帯の相互認識機構の研究が盛んになった。マウスの精子リガンドとしては異論も続出し、O 結合型糖鎖の β -N-アセチルグルコサミン説と α -フコース説、N 結合型糖鎖の α -マンノース説などが提出された（糖鎖説）。その後の糖転移酵素遺伝子のノックアウトマウスの受精実験および質量分析によるマウス透明帯糖タンパク質糖鎖群の構造解析は Wassarman グループの主張した精子認識部位を支持しなかった。一方、2003年に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決着はついていない。

我々は大量に透明帯糖タンパク質が得られるブタとウシを対象に選び、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 β -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。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。このようにブタおよびウシでは糖鎖が精子認識の主体であると考えられる。

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 種類全部から成るのに対し、ブタおよびウシは ZP2, ZP3, ZP4 の 3 種類、マウスは ZP1, ZP2, ZP3 の 3 種類から成る。各成分の一次構造は動物種間でよく保存されている。マウスでは ZP3 が単独で精子結合活性を示す。これに対し我々は、ブタとウシ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ことをあきらかにした。このことから、ブタとウシにはマウスで唱えられた糖鎖説および超分子構造説の両方が当てはまる、と我々は考えている。つまり、ブタとウシでは糖鎖が精子認識には必須であるものの、糖鎖が活性を示すためには ZP3 と ZP4 のタンパク質骨格間の相互作用による複合体形成が必要である。しかし、透明帯の各成分がどのように相

互作用し精子結合活性を有する複合体を形成するのかわかっていない。4 種類の成分には約 260 アミノ酸残基からなる ZP ドメインが共通に存在し成分間の相互作用に関わっていると予想されている。ZP ドメインを持つタンパク質は他にも続々と発見されている。ショウジョウバエでは 18 種類、線虫では 40 種類ものタンパク質が ZP ドメインを持つ。高等動物では受精以外に聴覚、味覚、嗅覚、免疫抑制等に関わるタンパク質に ZP ドメインが存在する。ZP ドメインの三次構造の解明はこれら ZP ドメインタンパク質の構造機能解明に貢献する重要な課題であるが研究開始当初においては成功したグループはなかった。

2. 研究の目的

(1) 精子認識機構の解明

我々は、ブタ透明帯の精子リガンドとウシ透明帯の精子リガンドの糖鎖構造が異なることをあきらかにし、このことが精子認識の種選択性の分子基盤であると考えている。 β -ガラクトース依存的に透明帯に結合するブタ精子タンパク質および α -マンノース依存的に透明帯に結合するウシ精子タンパク質を同定し、糖鎖結合特異性や精子での局在性などの特性付けをすることにより糖鎖説の検証を進める。

糖鎖の活性発現には ZP3/ZP4 複合体の形成が必要であることがわかっている。ZP3/ZP4 複合体のどの糖鎖が精子認識に関わっているのか、また精子結合能を有する複合体を形成するためにはどの領域が必要なのかをあきらかにし、超分子構造説の具体的イメージを得る。

(2) ZP ドメインの三次構造

ZP ドメイン全長は重合能を有し結晶化には不向きである。卵巣からの精製が可能なブタ ZP3, ZP4 については天然糖タンパク質のサブドメインを作製する。精製できないブタ ZP2 ならびにウシ各成分については組換えタンパク質を用いる。それぞれ結晶化条件検討を行い、X 線結晶構造解析による三次構造解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 「ウシ ZP3/ZP4 複合体の精子結合部位」

① ウシ ZP3, ZP4 の組換え糖タンパク質の発現

ウシ ZP3 並びに ZP4 をコードする cDNA を各鋳型として、PCR により各 N 結合型糖鎖付加部位の Asn から Asp への変異、N 末端領域あるいは C 末端領域の欠失変異を導入した。目的のプラスミドが得られたことは塩基配列決定により確認した。各組換えバキュロウイルスを作製し Sf9 細胞に感染させ 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。ZP3/ZP4複合体を発現させる場合は、両者のウイルスを共感染させた。N末端に付加したベクター由来のヒスチジンタグを利用し、メタルキレートアフィニティークラムを用いて各組換えタンパク質を部分精製した。

②ZP3とZP4との間の相互作用検出

例えばZP4にはN末端にヒスチジンタグではなく代わりにFLAGタグを付加させ、メタルキレートアフィニティークラムでプルダウンし、FLAGタグの付加したZP4がヒスチジンタグの付加したZP3と共沈するかどうかで相互作用の有無を判定した。

③ZP3/ZP4の精子結合能検出

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。

(2) 「ブタ ZP3/ZP4 複合体の精子結合部位」

天然の透明帯をブタ卵巣から単離し、5 mM Tris/HCl (pH 7.0)中、70°Cで30分間可溶化した。可溶化透明帯を2M尿素存在下リシルエンドペプチダーゼ消化し、消化産物をSuperdex 200 ゲルろ過カラムにかけた。主なピークをSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析するとともに上記の阻害活性測定にかけた。阻害活性を示すピークについてエドマン分解によりN末端部分配列を決定した。

(3) 「精子 ADAM の透明帯結合解析」

ブタ ADAM2 のペプチドに対する特異抗体を作製した。ブタ射出精子を1% CHAPS で可溶化し、コンカナバリン A カラムにかけた。結合画分を DEAE カラム、ゲルろ過カラムにかけ ADAM2 の溶出位置を上記抗体により検出した。

マウス ADAM3 の細胞外ドメイン、ZP2 ならびに ZP3 の成熟部分の Sf9 細胞発現系を作製した。上記と同じく一方にはヒスチジンタグを他方には FLAG タグを付加させ、メタルキレートアフィニティークラムを使いヒスチジンタグの付加した方の組換えタンパク質をプルダウンした。

(4) 「ZPドメインの結晶化条件検討」

ウシ ZP4 については、PCR により目的の cDNA 断片を得、pBACgus6 ベクターに接続し塩基配列を確認した。組換えバキュロウイルスを作製し、Sf9 細胞に感染させ48時間培養することにより組換えタンパク質を培地に分泌させた。ヒスチジンタグを用いて部分精製し、Superdex 200 ゲルろ過により凝集度を調べた。モノマーなどメインのピークを回収した。ブタ ZP3 の ZP ドメイン後半フラグメントについては、次のように精製した。可溶

化透明帯をエンドβガラクトシダーゼ消化し、逆相 HPLC により ZP3 を精製した。ZP3 を臭化シアン処理した後、逆相 HPLC により ZP ドメイン後半部を単離し、さらに Superdex 75 ゲルろ過により精製した。

各精製タンパク質を限外濾過で濃縮し、シッピングドロップ法での結晶化条件検討に供した。

(5) 「ジスルフィド結合パターン」

ブタ ZP3 および ZP4 の成熟型ポリペプチドを Sf9 細胞で発現させヒスチジンタグを用いて部分精製した。リシルエンドペプチダーゼ消化断片を逆相 HPLC で分離し、天然 ZP3 および ZP4 の分離パターンと比較し、ZP ドメイン C 末端部フラグメントの溶出位置を予想した。エドマン分解で各ピークの部分アミノ酸配列を決定した。リシルエンドペプチダーゼの消化部位と Cys 残基の配置からジスルフィド結合パターンの組換えタンパク質と天然タンパク質との間での異同を調べた。

4. 研究成果

(1) 「ウシ ZP3/ZP4 複合体の精子結合部位」

ウシ ZP3, ZP4 の各 N 結合型糖鎖付加部位変異体やサブドメインをバキュロウイルス-Sf9 細胞系で発現させ、相互作用の有無と精子結合活性を調べた。その結果、ZP4 の ZP ドメイン前半部は ZP3 と相互作用したものの精子結合活性は低かった。それに対し、ZP4 の ZP ドメイン後半部は ZP3 との相互作用が弱いものの、調べた ZP4 サブドメインの中では最も強い精子結合活性を示した。ZP4 の ZP ドメイン後半部には N 結合型糖鎖付加部位が1カ所存在するが、この糖鎖の関与については今後の課題である。ZP3 の ZP ドメイン前半部と ZP4 は相互作用し精子結合活性を示した。ZP3 の ZP ドメイン後半部と ZP4 は相互作用したものの精子結合活性は弱かった。よって、ZP3 の ZP ドメイン前半部と ZP4 の ZP ドメイン後半部とからなる複合体が精子結合部位を形成する可能性が考えられた。

ZP3 の ZP ドメイン前半部には N 結合型糖鎖付加部位が2カ所存在する。N 末端から1番目の付加部位を変異させた場合、ZP4 との複合体の形成と精子結合活性は両方とも全く影響を受けなかった。それに対し、N 末端から2番目の付加部位を変異させた場合、ZP4 との相互作用は全く影響を受けなかったが、精子結合活性は有意に低下した。ブタの場合 ZP4 の N 結合型糖鎖が精子結合に関与することを以前にあきらかにしている。よって、ウシとブタとでは N 結合型糖鎖が精子結合に関与するものの、主に関与する糖鎖はウシでは ZP3 のもの、ブタでは ZP4 のものである可能性が考えられた。

ZP3 の ZP ドメイン内ヒンジ部について種々の欠失変異体を作製したところ0結合型糖鎖

付加部位を含む領域の欠失で ZP4 との相互作用が失われるとともに精子結合活性も失われた。よって、O 結合型糖鎖も精子結合へ関与する可能性は否定されず、今後は、欠失ではなく糖鎖付加部位の変異により O 結合型糖鎖の精子結合への関与を調べる必要がある。

(2) 「ブタ ZP3/ZP4 複合体の精子結合部位」

ブタ ZP3/ZP4 複合体については組換え体作製は進まなかったが、天然の透明帯をリシルエンドペプチダーゼ消化し、産物をゲルろ過クロマトグラフィーで分画したところ、ZP4 の N 末端領域と ZP3 の C 末端領域を含む分画が精子結合活性を示した。よってブタではこれらの領域が精子結合部位であることが示唆された。今後、組換え体による機能部位同定も進める必要がある。

(3) 「精子 ADAM の透明帯結合解析」

ブタ精子 ADAM2 が透明帯結合因子の一つであるという報告に基づき、結合機構の解明を目指した。特異抗体を作製しブタ精子からの部分精製法を見出した。ゲルろ過での溶出位置から高分子複合体を形成していることが示唆された。部分精製した ADAM2 は透明帯との結合機構の解明に利用できると期待される。

ADAM3 ノックアウトマウスの精子が透明帯に結合できないという報告に基づき、マウス ADAM3 とマウス ZP2, ZP3 とを Sf9 細胞で発現させ相互作用を調べた。その結果、ADAM3 は ZP2 とは相互作用を示したが ZP3 とはほとんど相互作用しなかった。このことから、ADAM3 は先体反応後の精子と透明帯との相互作用に係わる可能性が示唆された。

(4) 「ZP ドメインの結晶化条件検討」

ウシ ZP4 のトレフォイルドドメイン及び ZP ドメインの領域を Sf9 細胞で発現させたところ、モノマーであった。結晶化条件検討の結果、結晶は得られたが分解能は 10 数 Å であり構造決定には至らなかった。凝集性を下げるためにウシ ZP4 前駆体を Sf9 細胞で発現させ結晶化条件検討を行ったがタンパク質性結晶はまだ得られていない。ブタ ZP3 の ZP ドメイン後半部はダイマーであった。結晶化条件検討を開始したが結晶はまだ得られていない。

(5) 「ジスルフィド結合パターン」

組換えブタ ZP3 および ZP4 の ZP ドメイン後半部についてジスルフィド結合パターンを解析した。その結果、天然ブタ ZP3 および ZP4 と同じであることがわかった。このことから ZP3 と ZP4 とが複合体を形成することによりジスルフィド結合パターンが変化する可能性は低いと考えられた。

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 2 件)

- ① Naoto Yonezawa, Saeko Kanai-Kitayama, Tetsushi Kitayama, Ayumi Hamano, Minoru Nakano, Porcine zona pellucida glycoprotein ZP4 is responsible for the sperm-binding activity of the ZP3/ZP4 complex, *Zygote*, 査読有, on line published, 2011, 9 pages, DOI:10.1017/S0967199411000608
- ② Natsuko Mizuno, Tetsushi Kitayama, Koji Fujii, Hiroaki Nakahara, Kanako Yoshida, Kazumasa Sekiguchi, Naoto Yonezawa, Minoru Nakano, Kentaro Kasai, A forensic method for the simultaneous analysis of biallelic markers identifying Y chromosome haplogroups inferred as having originated in Asia and the Japanese archipelago, *Forensic Science International: Genetics*, 査読有, 4, 2010, 73-79, DOI:10.1016/j.fsigen.2009.06.001

[学会発表] (計 7 件)

- ① 鈴木香緒理, ウシ卵子透明帯糖タンパク質 ZP3/ZP4 の精子認識部位, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 23 日, 国立京都国際会館
- ② 関和也, ウシおよびブタ卵子透明帯糖タンパク質の発現系構築, 精製並びに結晶化条件検討, 第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月 8 日, 神戸ポートアイランド
- ③ 田中淳平, ブタ透明帯糖タンパク質のジスルフィド結合パターン, 第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月 8 日, 神戸ポートアイランド
- ④ Naoto Yonezawa, Sperm binding sites on oocyte zona pellucida are different between pig and cattle, 第 62 回日本細胞生物学会大会, 2010 年 5 月 19 日, 大阪国際会議場
- ⑤ 曲井詩乃, Sperm binding site on bovine zona pellucida glycoprotein ZP3/ZP4 complex, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 24 日, 神戸ポートアイランド
- ⑥ 鈴木七緒, Expression, purification and spectroscopic analyses of human reticulocalbin-1, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 22 日, 神戸ポートアイランド
- ⑦ Naoto Yonezawa, Studies on sperm binding sites of bovine zona pellucida glycoproteins ZP3 and ZP4 expressed by baculovirus-expression system, 第 61 回日本細胞生物学会大会, 2009 年 6 月 3 日, 名古屋国際会議場

[その他]

ホームページ

<http://wilkins.s.chiba-u.ac.jp/>

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

(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・教授

研究者番号：60136786

柳田 光昭 (YANAGIDA MITSUAKI)

順天堂大学・医学研究所・准教授

研究者番号：80365569