

機関番号：33919

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22780255

研究課題名(和文) 鳥類の卵・精子相互認識に関与する精子膜分子の同定および卵膜との相互作用機構の解明

研究課題名(英文) Identification and evaluation of sperm surface molecules involved in the molecular mechanisms of avian egg-sperm interactions

研究代表者

奥村 裕紀 (OKUMURA, Hiroki)

名城大学・農学部・准教授

研究者番号：60513661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の卵細胞は、卵膜や透明帯と呼ばれる膜に覆われている。卵膜は ZP 糖タンパク質と呼ばれる 3-5 種類のタンパク質から構成されているが、卵膜は精子が卵と出会い結合するための足場となり、卵との融合に向けて精子を活性化するなど、受精において重要な役割を果たしている。私達はニワトリの卵膜を研究対象としており、ZP 糖タンパク質の中でも精子との反応に大きく関わる ZP3 分子の立体構造の解明に貢献するとともに、ZP3 分子上の精子結合領域を解明した。また、ニワトリ卵膜には性質の少しずつ異なる ZP3 が複数存在するが、その違いが ZP3 分子に結合した糖の違いによるものであることを解明した。

研究成果の概要(英文)：Vertebrate egg cell is covered with a proteinous membrane called egg coat or zona pellucida. The egg coat being composed of 3-5 classes of ZP glycoproteins play important roles in fertilization to accept and activate sperm followed by the successful fusion with egg. We are studying on chicken egg coat and contributed to solve 3D structure of one of the ZP glycoproteins, ZP3, which is involved in the egg-sperm recognition. Furthermore, we revealed the sperm binding site on the ZP3 molecule using recombinant proteins based on the structural information of ZP3. In addition, we revealed that the isoforms of chicken ZP3 possess different types of sugar chains each other.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用動物科学

キーワード：受精 卵膜 透明帯 ZP 糖タンパク質 タンパク質間相互作用 マトリックス形成

1. 研究開始当初の背景

卵細胞表面を覆う非コラーゲン性の細胞外マトリックスである卵膜 (egg coat, egg envelope, zona pellucida) は、脊椎動物の受精において重要な生理機能を担っている [Dean, *Bioessays* 26, 29-38 (2004), Jovine *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.* 74, 83-114 (2005)]。まず、精子が卵と結合する際に、卵膜は精子頭部表面に存在が示唆されている未同定の受容体分子群と種特異的に相互作用して精子を活性化させる。活性化された精子は先体胞 (acrosome) から acrosin などの加水分解酵素群を分泌して (精子先体反応, acrosome reaction) 卵膜を分解しながら、卵細胞の細胞膜に達して卵細胞と融合する。卵膜はまた、1 個の卵細胞に 2 個以上の精子が侵入すること (多精子受精) を防ぐ機能も担っており、その他にも正常な初期発生において重要な役割をもつと考えられている。以上のように脊椎動物の初期発生において最初に通過しなければならない重要な関門である卵・精子相互作用は、卵膜を構成する ZP 糖タンパク質によって仲介されることが示唆されている。研究開始当初には、2008 年に卵膜構成糖タンパク質の 3 次元構造の一部が解明された [Monné *et al.*, *Nature* 456, 653-657 (2008)] ことにより、卵膜と精子表面受容体の相互作用を分子レベルで研究する基盤がととのいつつあった。

2. 研究の目的

脊椎動物の卵・精子相互作用の分子メカニズムを解明し、そこから得られる知識を応用して、家畜や家禽の受精率や生産性の向上、有用品種の作出技術の開発、希少動物の系統維持や害鳥獣の駆除に貢献することを目指す。また本研究は、未知の部分が多い脊椎動物の卵・精子相互作用の研究から得られる知識を、将来の医療やバイオ産業に応用することも視野に入れている。

以上の構想を実現するために、本研究では、授精の第一段階である卵・精子相互作用 (結合と活性化) に直接関与していると考えられる卵膜構成糖タンパク質の構造と機能の解析、および卵膜形成機構の解明を目標とした。具体的には、鳥類 (ニワトリ) の卵・精子相互作用に関して、卵膜構成糖タンパク質分子 (ZP1, ZP3, ZPD) に存在する精子活性化に必要な因子・構造の特定、卵母細胞表面で重合して卵膜を形成する ZP 糖タンパク質群について、分子間相互作用と重合に関与するドメイン・部位の同定、および卵膜形成時のプロセッシングと分子間ジスルフィド結合による ZP1 2 量体の形成機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) ZP3 の O-結合型糖鎖が精子との相互作用に重要であるかどうかを確認するため、哺乳類細胞発現系を用いて作製された O-結合型糖鎖をもつ組換え ZP3 またはもたない組換え ZP3 をニワトリ精子とインキュベートし、共焦点レーザー顕微鏡下で免疫蛍光顕微鏡観察して比較した。

(2) 大腸菌発現系を用い、ニワトリ卵膜構成糖タンパク質 ZP1, ZP3 および ZPD について、分子内の各機能ドメインあるいは構造ドメインごとに組換えタンパク質を作製した。各組換えタンパク質を精製後、それらを抗原としてマウスを免疫し、各卵膜構成糖タンパク質に対するドメイン特異抗血清を作製した。本研究助成期間終了後の平成 26 年度以降の研究では、これらの組換えタンパク質や抗体をプローブとして用い、far-Western blot 解析や pull-down assay などの実験手法により卵膜構成糖タンパク質各ドメイン間の相互作用解析を行う予定である。

(3) 本応募者がこれまでの研究で報告した卵膜形成前の ZP1 (産卵鶏血清中に存在) と ZP3 の間の相互作用および ZP3 との相互作用時における ZP1 の 2 量体化 [Okumura *et al.*, *Biol. Reprod.* 76, 9-18, (2007), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364, 682-688, (2007)] に関連して、血清中に存在する ZP1 では 2 量体化が抑えられている原因を解明するため、産卵鶏血清に含まれる ZP1 を液相等電点電気泳動によって分画し、ZP1 の分画パターンおよび ZP1 と共に分画されるタンパク質の有無を解析した。本研究助成期間終了後の平成 26 年度以降の研究では、分画された血清中の ZP1 に対して詳細な質量分析を行い、卵膜に組込まれた後の ZP1 と解析結果を比較する予定である。

(4) ニワトリ ZP3 には等電点の異なる少なくとも 9 種類の異性体が存在する。それらを二次元電気泳動によって分離し、lectin blot 解析を行うことによって、ZP3 の糖鎖構造を推定した。

4. 研究成果

(1) 本研究代表者は 2006 年から 2008 年にかけて、博士研究員としてスウェーデンのカロリンスカ研究所に在籍した (受入研究者: Luca Jovine 博士)。本研究代表者はそこでニワトリ ZP3 の構造生物学的研究に深く携わり、ZP 糖タンパク質分子の全長にわたる立体構造の世界初となる解明に大きく貢献した。研究代表者は現在の所属機関 (名城大学農学部) に赴任した後も Jovine 博士および名古屋大学大学院生命農学研究科の松田 幹 教授らと共同研究を

継続し、本研究助成期間の 1 年目である 2010 年には、上述のようにニワトリ精子を Jovine 博士の研究室で作製された組換え ZP3 とインキュベートした後で免疫蛍光染色し、共焦点レーザースキャン顕微鏡下で解析することによって、O-結合型糖鎖が ZP3 の精子との相互作用に深く関与していることを示した。研究成果は、2010 年 10 月 29 日発行の Cell に掲載された。[Han*, Monné*, Okumura* *et al.* (*: equally contributed), *Cell* **143**, 404-415 (2010)]

(2) ニワトリ卵膜に対して等電点/非還元 SDS-PAGE の二次元電気泳動を行うと、ZP3 は分子量がほぼ一定で等電点が 5.5-6.5 にわたる複数のスポットとして観察されることが報告されていた [Okumura *et al.*, *Biochem. J.* **384**, 191-199, (2004)]. 本研究代表者はニワトリ卵膜に対して改めて二次元電気泳動を行い、より鮮明に ZP3 のスポットを観察することに成功した。その結果、ZP3 には等電点の異なる少なくとも 9 個の異性体の存在することが確認された。さらに、二次元電気泳動によって分離された ZP3 のスポットに対して、異なる構造の糖鎖に特異的に結合する複数のレクチンを用いた lectin-blot 解析を行ったところ、9 個の ZP3 異性体は、用いたレクチンに対してそれぞれ異なる反応性を示した。ニワトリは ZP3 遺伝子を 2 コピーしかもたないことを考慮すると、二次元電気泳動で分離された少なくとも 9 個の ZP3 異性体は、それぞれ異なる構造の糖鎖を有していることが示唆された。研究成果は、2012 年 7 月 7 日発行の Biochemical and Biophysical Research Communications に掲載された。[Okumura *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **424**, 586-592 (2012)]

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 6 件)

Hiroki Okumura, Hideaki Fukushima, Masaki Momoda, Yurie Ima, Tsukasa Matsuda and Minoru Ujita. Diverse lectin-binding specificity of four ZP3 glycoprotein isoforms with a discrete isoelectric point in chicken egg coat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 424 巻, 2012, 586-592.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.06.157

Hiroki Okumura. Molecular Mechanisms of Egg-Sperm Interaction and Zona Pellucida Glycoproteins. *Journal of Research Institute of Meijo University*, 査読有, 10 巻, 2011,

11-18.

Hiroki Okumura. Commentary on the article "Insights into Egg Coat Assembly and Egg-Sperm Interaction from the X-Ray Structure of Full-Length ZP3 (*Cell*, **143**, 404-415. 2010)". *Scientific Reports of the Faculty of Agriculture, Meijo University*, 査読無, 47 巻, 2011, 35-40.

Minoru Ujita, Ryosuke Inoue, Yusuke Makino, Yosuke Katsuno and Hiroki Okumura. Binding specificity of the recombinant cytoplasmic domain of *Cordyceps militaris* -1,3-glucan synthase catalytic subunit. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 2011, 75 巻, 171-174.

DOI: 10.1271/bbb.100660

Minoru Ujita, Mayumi Yamanaka, Yumiko Maeno, Koki Yoshida, Wakana Ohshio, Yoshinori Ueno, Yutaka Banno, Hiroshi Fujii and Hiroki Okumura. Expression of active and inactive recombinant soluble trehalase using baculovirus-silkworm expression system and their glycan structures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有, 111 巻, 2011, 22-25.

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.08.020

Ling Han*, Magnus Monné*, Hiroki Okumura*, Thomas Schwend, Amy L. Cherry, David Flot, Tsukasa Matsuda, and Luca Jovine, (*equally contributed). Insights into Egg Coat Assembly and Egg-Sperm Interaction from the X-Ray Structure of Full-Length ZP3. *Cell*, 査読有, 143 巻, 2010, 404-415.

DOI: 10.1016/j.cell.2010.09.041

[学会発表](計 12 件)

Hiroki Okumura. Highly heterogeneous glycosylation profiles of chicken ZP3 – Biological meanings of the molecular heterogeneity of ZP glycoproteins remain unclear. International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants, Joint Meeting of the 2nd Allo-authentication Meeting and the 5th Egg-Coat Meeting (MCBEEC) (Poster and Oral presentation; Nov. 12-16, 2012, Nagoya, Japan)

°Shunsuke Nishio, Hiroki Okumura, Yuki Iwata, Kenzi Oshima, Daita Nadano, Tomohiro Sasanami, Luca Jovine and Tsukasa Matsuda. Protease-dependent sperm

penetration of the bird egg coat: Identification of peptide fragments proteolytically released from the ZP protein matrix and the involved sperm proteases. International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants, Joint Meeting of the 2nd Allo-authentication Meeting and the 5th Egg-Coat Meeting (MCBEEC) (Poster; Nov. 12-16, 2012, Nagoya, Japan)

°Yurie Ima, Hideaki Fukushima, Minoru Ujita and Hiroki Okumura. 組換え ZP タンパク質を用いたニワトリ卵膜形成機構の解明. The 85th Meeting of the Japanese Biochemical Society (Poster; 2012 Dec. 14-16, Fukuoka, Japan)

Ling Han, Magnus Monné, °Hiroki Okumura, Thomas Schwend, Amy L. Cherry, David Flot, Tsukasa Matsuda, and Luca Jovine. Insights into Egg Coat Assembly and Egg-Sperm Interaction from the X-Ray Structure of Full-Length ZP3. 科学研究費補助金 新学術領域研究 (研究領域提案型) 平成 21 年度～平成 25 年度 動植物に共通するアロ認証機構の解明 第 2 回領域会議 (Poster; Jan. 11-13, 2011, Gero, Japan)

Mayumi Arai, Shunsuke Nishio, °Tsukasa Matsuda and Hiroki Okumura. Oocyte-growth-dependent downregulation of minor ZP components (ZP2/ZPA and ZP4/ZPB2) and localization of ZP2/ZPA in egg-envelope near germinal disc of mature egg in chicken ovary. Gordon Research Conferences, Fertilization & Activation Of Development; GRC2011 (Poster; July 17-22, 2011, Holderness School, Holderness, NH)

°Msaki Momoda, Yurie Ima, Daishi Okada, Minoru Ujita and Hiroki Okumura. ニワトリ卵膜形成機構の解析 -血清 ZP1 の卵膜への組み込み機構-. The 84 th Meeting of the Japanese Biochemical Society (Poster; 2011 Sep. 21-24, Kyoto, Japan)

奥村裕紀. ZP3 の X 線結晶構造が開く, 卵皮膜 (透明帯) 組み立ての分子メカニズム解明への入口. 平成 23 年度日本結晶学会年会および総会 (Symposium; Nov. 24-25, 2011, Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Hiroki Okumura. Structure-based analyses of ZP glycoproteins provide new insights into investigation of egg coat. The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan; MBSJ2011 (Workshop; Dec. 13-16,

2011, Yokohama, Japan)

Ling Han, Magnus Monné, °Hiroki Okumura, Thomas Schwend, Amy L. Cherry, David Flot, Tsukasa Matsuda, and Luca Jovine. Insights into Egg Coat Assembly and Egg-Sperm Interaction from the X-Ray Structure of Full-Length ZP3. The Joint Meeting of the Japanese Biochemical Society & the Molecular Biology Society of Japan; BMB2010 (Poster; Dec. 7-10, 2010, Kobe, Japan)

°Daishi Okada, Masaki Momoda, Mayumi Arai, Minoru Ujita and Hiroki Okumura. 組換え ZP タンパク質を用いた鳥類卵膜の機能解析および構造解析. The Joint Meeting of the Japanese Biochemical Society & the Molecular Biology Society of Japan; BMB2010 (Poster; Dec. 7-10, 2010, Kobe, Japan)

°Yohsuke Yamauchi, Syota Koike, Takayo Funato, Satoko Kanie, Hiroki Okumura and Minoru Ujita. 組換えヒト Dectin-1 の β-グルカン結合特異性. The Joint Meeting of the Japanese Biochemical Society & the Molecular Biology Society of Japan; BMB2010 (Poster; Dec. 7-10, 2010, Kobe, Japan)

°Masahiro Yamada, Mayumi Yamanaka, Miyuki Haruta, Hiromi Umino, Yuka Itakura, Maika Mikuriya, Saori Kato, Hiroki Okumura and Minoru Ujita. 組換えヒトキチナーゼの結合活性. The Joint Meeting of the Japanese Biochemical Society & the Molecular Biology Society of Japan; BMB2010 (Poster; Dec. 7-10, 2010, Kobe, Japan)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

- ① 奥村裕紀 (2010). 完全長 ZP3 の X 線結晶構造からみえてきた卵被膜の組み立てと卵-精子相互作用の分子機構. ライフサイエンス新着論文レビュー, 2010 年 11 月 17 日, <http://first.lifesciencedb.jp/archives/1505#more-1505>
- ② Hiroki Okumura. X-ray structure of ZP3 provides clues to elucidate molecular mechanisms of egg coat (zona pellucida) assembly and egg-sperm interaction. Special Lecture Tokuron FY2010 (Mar. 4, 2011, Graduate School of Medicine, Nagoya University, Japan)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 裕紀 (OKUMURA, Hiroki)
名城大学・農学部・准教授
研究者番号：60513661

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：