

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570125

研究課題名(和文) 哺乳類卵外被マトリックスの精子認識ドメイン

研究課題名(英文) Sperm recognition domain in mammalian egg coat matrix

## 研究代表者

米沢 直人 (Yonezawa, Naoto)

千葉大学・理学(系)研究科(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) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類卵子を包む卵外被は受精の際に種選択的に精子を認識し、受精成立後は余分な精子の侵入を防ぐ。これらの分子機構解明を目指した。種々の糖について精子の結合性を調べ、ブタ精子はβ-ガラクトースにウシ精子はα-マンノースに選択的に結合することがわかった。ウシ卵外被は3種類のタンパク質ZP2, ZP3, ZP4から成るスポンジ状物体である。ZP3の中央付近に結合した糖鎖が精子結合に関わることを見出した。ブタ卵外被ではZP4の中央付近に結合した糖鎖が精子結合に関わることを以前見出しており、ウシとブタとでは各タンパク質の役割が異なる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mammalian egg coat recognizes sperm in a species selective manner on fertilization and blocks polyspermy after establishment of fertilization. Molecular mechanisms on these phenomena are to be clarified. We found that porcine sperm prefer beta-galactose and bovine sperm prefer alpha-mannose by using glycolipid analogues. Bovine egg coat is composed of three proteins called ZP2, ZP3 and ZP4. We found that an N-glycan linked to the middle region of ZP3 is involved in sperm recognition. On the other hand, we have previously found that in porcine egg coat an N-glycan linked to the middle region of ZP4 is involved in sperm recognition. Thus, the roles of ZP3 and ZP4 in sperm recognition might be different between cattle and pig.

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

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類卵子を包む卵外被は透明帯 (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重合し網目状マトリクスを形成した構造体である。哺乳類精子は卵管内で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。本研究は受精機構の中でも透明帯が関わる機構の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や質量分析による糖鎖機能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結合ドメイン説が提出された。このように、マウスでは透明帯の精子認識機構は結局のところ解明されてはならず糖鎖が結合に関わるのかどうかは決着していない。

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。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。糖鎖単独で精子結合活性を示すわけではなく、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。これは上記のマウスでの3つの説の中では精子結合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

ており、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共通している。マウス透明帯は ZP1, ZP2, ZP3 の3種類からなり、ZP3 が単独で精子結合能を有する。よってブタとウシは、両者で共通のブタとウシとは異なる精子認識機構を有する可能性が考えられる。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、ウシについては全くわかっていない。

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 ドメインと呼ばれる。Jovine らにより、ZP ドメイン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 末端側サブドメイン (ZP-N サブドメイン) 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 プロセッシング酵素が含まれており、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

ブタとウシ透明帯の精子認識機構をあきらかにすることで、哺乳類のより普遍的な受精機構を導くとともに糖鎖の関与の有無をあきらかにする。三次元的透明帯形成機構をあきらかにする。ZP2 切断と多精拒否をつなぐ分子機構をあきらかにする。

## 3. 研究の方法

(1)「ウシ透明帯の精子認識ドメインの同定と糖鎖の機能の解明」

ウシ ZP3, ZP4 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、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、また各糖鎖付加部位の変異導入を行った。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。各組換えバキュロウイルスを BacMagic DNA kit (Novagen) により作製し、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。

ZP3 と ZP4 との間の相互作用検出

例えば ZP3 には 6xHis タグを ZP4 には FLAG タグを付加し、TALON ピーズにより ZP3 をプルダウンさせたときに ZP4 が共沈するかどうかを調べた。His タグ融合タンパ

ク質と FLAG タグ融合タンパク質の特異的検出のためには抗 His タグ抗体、抗 FLAG タグ抗体によるウエスタンブロットを行った。

#### 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ておい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。

#### 間接蛍光抗体法

変異 ZP3/ZP4 複合体とウシ精子とを 30 分反応させ洗浄後、スライドガラス上での固定、ブロッキング、抗 ZP3 抗体と抗 ZP4 抗体との反応、蛍光標識二次抗体との反応により変異 ZP3/ZP4 複合体の精子上の結合部位を調べた。

#### 糖脂質アナログ

種々の糖脂質アナログをプラスチックプレートに吸着させ、ブタおよびウシ精子を反応させ結合数を調べるにより単糖への結合特異性を比較した。また、先体反応前後で特異性を比較した。

#### (2)「ブタ精子の透明帯結合因子の検索」

天然のブタ透明帯を単離し化学架橋剤 sulfo-SBED を用いてブタ精子の透明帯結合タンパク質をピオチン標識した。アビジンビーズを用いてピオチン標識タンパク質を濃縮し LC/MS によりピオチン標識タンパク質の同定を試みた。

#### (3)「受精成立に伴う精子結合能の消失機構の解明」

ZP2 プロセシング酵素は同定されていなかったが、プロセシング部位は同定されていたためプロセシング部位の配列をエンテロキナーゼ、TEV プロテアーゼ、Factor Xa の切断配列に置換した。上記同様 PrimeStar Mutagenesis kit を用いて変異導入し、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 細胞に感染させた後、48 時間培養し培地に分泌された目的タンパク質を TALON レジンで精製した。各タンパク質についてエンテロキナーゼ等市販酵素での切断を試みた。

## 4. 研究成果

#### (1)「ウシ透明帯の精子認識ドメインの同定と糖鎖の機能の解明」

ZP3 は N 末端から ZP-N サブドメイン、ヒンジ領域、ZP-C サブドメインの 3 領域からなる。ZP3 の N 末端からヒンジ領域までを含む断片が ZP4 と共沈し、かつ精子と透明帯との結合に対する競合阻害活性を示すことを以前に見出している。この ZP3 断片に計 3 カ所ある O 結合型糖鎖付加部位 Ser および Thr を Ala に変異させたところ、ZP4 との相互作用並びに複合体の競合阻害活性はどちらも影響を受けなかった。よって、O 結合型糖鎖は ZP4 との相互作用、精子結合のどちらにも関与しないことが示唆された。ZP4 に 1 カ所

ある O 結合型糖鎖付加部位を Ala に変異させたが影響はなかった。ZP3 断片には N 結合型糖鎖付加部位が 2 カ所存在する。以前の成果として、N 末端から 1 番目と 2 番目の付加部位を片方ずつあるいは両方とも Asp に変異させた場合、1 番目の部位の変異では競合阻害活性は低下しなかったが、2 番目の部位の変異では阻害活性が有意に低下した。ZP4 との相互作用はどちらの場合も影響を受けなかった。今回、間接蛍光抗体法で精子結合活性を調べたところ精子先体部への結合が 2 番目の部位の変異により低下した。N 結合型糖鎖付加部位を Gln に変異させたところ Asp への変異の場合と同じ結果であった。

ニワトリ ZP3 ホモログではヒンジ領域の O 結合型糖鎖付加部位変異により精子結合活性が低下したと報告されており、ニワトリとウシとでは両者とも ZP3 のヒンジ領域が精子結合に関わるという点で似ている。しかし、糖鎖付加部位の変異による活性低下が見られたのはウシでは O ではなく N 結合型糖鎖の場合であったため精子結合に関わる糖鎖の結合様式はニワトリとウシとで異なる。また、ニワトリ ZP3 が単独で精子結合活性を示す点もウシとは異なる。糖鎖が直接の精子結合部位であるのか、糖鎖の有無によりタンパク質部分の構造が影響を受けて活性が低下するのか、という点は今後の課題である。

糖脂質アナログを用いて、タンパク質骨格のない単糖に対する結合特異性をブタおよびウシ精子について比較した。ブタ精子は先体反応前後で特異性が変化し、反応前は -ガラクトースへの結合性が最も高く、反応後は -マンノースへの結合性が最も高くなった。ウシ精子は先体反応前後で特異性は変わらず -マンノースへの結合性が最も高かった。これは、我々が天然透明帯糖鎖の精子結合活性解析によりあきらかにしてきた糖結合特異性を支持するものである。ブタ精子の先体反応前後での特異性変化の意義については今後の課題である。

#### (2)「ブタ精子の透明帯結合因子の検索」

熱可溶化ブタ透明帯とブタ精子とを sulfo-SBED で架橋したところ分子量約 20,000 のピオチン化タンパク質が得られ透明帯結合因子の候補と思われた。しかし、再現性が不十分であり現在検索を続けているところである。

#### (3)「受精成立に伴う精子結合能の消失機構の解明」

エンテロキナーゼ、TEV プロテアーゼ、Factor Xa の切断配列に置換したウシ ZP2 成熟体全長、N 末端断片を作製した。Factor Xa での切断効率が最も高かったが、半分程度であることと収量が低いことから、構造変化の解析には進まなかった。TEV プロテアーゼは還元剤存在下で活性を示すという特徴があり、ジスルフィド結合を有する ZP2 の切断には適していないことがわかった。

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 4 件)

Suzuki N, Ban S, Itoh E, Chen S, Imai FL, Sawano Y, Miyakawa T, Tanokura M, Yonezawa N, Calcium-dependent structural changes in human reticulocalbin-1. Journal of Biochemistry (Tokyo), 査読有, 155(5), 2014, 281-293, doi: 10.1093/jb/mvu003.

Suzuki N, Imai LF, Kato Y, Nagata K, Ohashi Y, Kuchitsu K, Tanokura M, Sakamoto A, Nara M, Nakano M, Yonezawa N, Coordination structures of Mg(2+) and Ca(2+) in three types of tobacco calmodulins in solution: Fourier-transform infrared spectroscopic studies of side-chain COO(-) groups. Biopolymers, 査読有, 99(7), 2013, 472-483, doi: 10.1002/bip.22203.

Takahashi K, Kikuchi K, Uchida Y, Kanai-Kitayama S, Suzuki R, Sato R, Toma K, Geshi M, Akagi S, Nakano M, Yonezawa N, Binding of Sperm to the Zona Pellucida Mediated by Sperm Carbohydrate-Binding Proteins is not Species-Specific in Vitro between Pigs and Cattle. Biomolecules, 査読有, 3(1), 2013, 85-107, doi: 10.3390/biom3010085.

Kitayama T, Fujii K, Nakahara H, Mizuno N, Kasai K, Yonezawa N, Sekiguchi K, Estimation of the detection rate in STR analysis by determining the DNA degradation ratio using quantitative PCR. Leg Med (Tokyo), 査読有, 15(1), 2013, 1-6, doi: 10.1016/j.legalmed.2012.07.003.

[学会発表](計 12 件)

田中宏明、ウシ透明帯糖タンパク質 ZP3/ZP4 複合体の相互作用部位、第 14 回日本蛋白質科学会年会、2014 年 6 月 26 日、ワークピア横浜/横浜産貿ホール マリネリア

鈴木七緒、ヒト Reticulocalbin-1 のカルシウム依存的構造変化、第 14 回日本蛋白質科学会年会、2014 年 6 月 26 日、ワークピア横浜/横浜産貿ホール マリネリア

上田美冬、ウシ卵子透明帯糖タンパク質 ZP3/ZP4 複合体の精子結合部位、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 12 日、パシフィコ横浜

鈴木七緒、ヒト Reticulocalbin-1 のカルシウム依存的構造変化、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日、パシフィコ横浜

Suzuki N, Coordination structures of Mg(2+) and Ca(2+) in three types of tobacco calmodulins in solution: Fourier-transform infrared spectroscopic studies of side-chain COO- groups, 7th

International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, 2013 年 8 月 26 日、神戸コンベンションセンター

Suzuki N, Calcium-dependent structural changes in human reticulocalbin-1, The 27th Annual Symposium of the Protein Society, 2013 年 7 月 29 日、Boston (USA) 鈴木香緒理、ウシ卵子透明帯 N 結合型糖鎖の精子結合への関与、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場/マリンメッセ福岡

帯川侑也、ウシ卵子透明帯 O 結合型糖鎖は精子結合には不必要である、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場/マリンメッセ福岡

鈴木七緒、ヒト Reticulocalbin-1 のカルシウム依存的構造変化、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場/マリンメッセ福岡

高橋慧、XANES を用いたヒト COMMD タンパク質における銅周囲の局所構造解析、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡国際会議場/マリンメッセ福岡

Yonezawa N, Involvement of Carbohydrate Residues of the Zona Pellucida in In Vitro Sperm Recognition in Pigs and Cattle, 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, 2012 年 11 月 12 日 ~ 16 日、Hotel Nagoya Garden Palace

Takahashi K, Analysis of K-edge XAFS spectra of Cu bound to human COMMD proteins with multiple scattering theory, 15th International Conference on X-Ray Absorption Fine Structure, 2012 年 7 月 22 ~ 28 日、Beijing (China)

[図書](計 2 件)

Yonezawa N, Springer, Posttranslational Protein Modifications in the Reproductive System, 2014, 239 (111-140)

Yonezawa N, SpringerOpen, Sexual Reproduction in Animals and Plants, 2014, 473 (409-415)

[その他]

ホームページ

<http://pchem2.s.chiba-u.ac.jp/chem/lab/yonekenhp/index.htm>

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・医学研究所・准教授

研究者番号：80365569

(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