

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 鳥類の受精における精子の卵外被マトリクス貫通機構

氏名 西尾 俊亮

論文内容の要旨

受精は、卵と精子が融合し受精卵に至るまでの一連の現象であり、精子と卵外被の結合、精子の卵外被貫通、そして精子細胞膜と卵母細胞膜の融合が連続的に起こる。卵外被は、卵母細胞を被覆する卵特異的な非コラーゲン性の細胞外マトリクスであり、海産性無脊椎動物から哺乳類に至るすべての動物で見られる保存された構造である。卵外被を構成するタンパク質はZP糖タンパク質と呼ばれる一群のタンパク質であり、約260アミノ酸残基からなるZP domainを共通して持つ。鳥類の卵外被はZP1、ZP2、ZP3、ZP4およびZPDの5種類のZP糖タンパク質で構成されている。鳥類の卵は卵黄の蓄積により巨大化し、ニワトリでは排卵時に直径約30~40 mmになる。初期胚の栄養源となる卵黄の蓄積により極端な端黄卵となり、雌性前核や細胞小器官は胚盤と呼ばれる動物極側の領域に偏在することとなった。さらに、鳥類では初期発生のために多精子受精を行う必要があり、多数の精子が卵外被を貫通する。鳥類の受精において精子が胚盤近傍の卵外被に高頻度で結合し、孔を形成しながら卵外被を貫通することは*in vivo*および*in vitro*で明らかにされてきた。しかし、あくまで現象的、形態的な報告に留まっており、これらの詳細な分子機構については明らかになっていなかった。本学位論文では、鳥類の受精における重要な段階であると考えられる、精子が胚盤近傍に限定して卵外被を貫通する現象に着目した。卵外被の構成、精子プロテアーゼおよびその基質タンパク質の解析を通して、精子が卵外被を貫通する分子機構の解明を目的とした。

ニワトリZP糖タンパク質の卵胞発達段階における発現について解析したところ、ニワトリZP2およびZP4遺伝子は未成熟な白色卵胞の顆粒膜細胞で顕著に発現していることが示された。一方で、ZP3およびZPD遺伝子は成熟黄色卵胞の顆粒膜細胞層で顕著に発現していることが示された。また、未成熟な白色卵胞および成熟途中の黄色卵胞から卵外被を調製し、卵外被全体の構成成分を解析したところ、未成熟な白

色卵胞では ZP2 および ZP4 が主要な構成成分であるのに対して、ZP1 および ZP3 は成熟途中の黄色卵胞卵外被へ蓄積し始め、卵黄蓄積時に急速に増加して排卵直前の卵胞卵外被の主要構成成分になることが明らかになった。未成熟な白色卵胞卵外被の ZP2 は、分子量約 200 kDa のスミアなバンドとして検出されたが、酵素的に *N*-結合型糖鎖を除去すると 70 kDa にシフトした。このことから、ZP2 は高度に *N*-結合型糖鎖が付加した糖タンパク質であることが明らかになった。蛍光免疫染色および免疫ブロット解析の結果から、成熟黄色卵胞および排卵後の卵の胚盤近傍の卵外被に ZP2 が局在、集積していることが明らかになった。ZP2 は、卵胞発達の初期段階で未成熟白色卵胞の卵外被に蓄積するが、成熟卵胞では胚盤近傍を除き微量成分になることが示された。哺乳類で精子レセプターとして報告されている ZP2 の胚盤近傍への集積が、精子の胚盤近傍卵外被への優先的な結合に関与していることが示唆された。

精子と反応させた卵外被を電子顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡によって観察したところ、精子との反応によって卵外被マトリクスの網目構造を形成する太い繊維が消失し、ほぐれた細い繊維が形成されることが示された。質量分析の結果から、精子との反応によって卵外被から ZP 糖タンパク質の断片が遊離することが明らかになり、ZP1 の繰り返し配列領域が選択的に分解されることが明らかになった。精子の酵素による選択的な切断は、アルギニン-プロリン間のペプチド結合を標的としていた。調製した精子粗酵素溶液と卵外被の懸濁液を混合し静置すると、ZP1 の繰り返し配列に由来する断片の可溶化および経時的な低分子化が見られ、さらに ZP1 のアミノ末端に存在するシステインに富んだ領域と ZP3 も可溶化することが明らかになった。ZP1 の繰り返し配列の可溶化はトリプシンインヒビター SBTI によって完全に阻害されたが、プロテアソームインヒビター MG-132 では低分子化が遅延するものの阻害はされなかった。SBTI によって阻害される精子プロテアーゼが卵外被の溶解に重要であることが示唆されたので、SBTI によって阻害されるプロテアーゼを探索し、ニワトリ精子粗酵素溶液から 2 種類の哺乳類アクロシンのホモログタンパク質 (acrosin-a, ACRA および acrosin-b, ACRB) を同定した。ACRA および ACRB の完全長 cDNA をクローニングし、一次構造を決定した。ニワトリ精子に含まれている ACRA および ACRB はいずれも、これまでに哺乳類アクロシンで報告されていない部位でプロセッシングされていることを明らかにした。固相化した SBTI を用いて ACRB を分離し、卵外被 ZP 糖タンパク質の分解を解析したが、精子粗酵素溶液との反応で見られるような ZP1 の繰り返し配列領域に由来するラダー状のバンドは検出されなかった。ショウジョウバエ S2 細胞を用いて組換えプロ ACRA タンパク質を発現させ、精子粗酵素溶液およびトリプシンによって活性化させることに成功した。活性化した成熟型組換え ACRA タンパク質を用いて卵外被 ZP 糖タンパク質の分解を解析したところ、ZP1 の繰り返し配列に由来するラダー状のバンドが検出され、質量分析によってアルギニン-プロリン間のペプチド結合が切断されていることが明らかになった。以上の結果から、ニワトリ ACRA が鳥類の受精における卵外被の溶解に必須な分子であることが示唆された。