

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 西尾 俊亮

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

論文審査担当者

主 査	名古屋大学教授	松 田 幹
委 員	名古屋大学教授	牧 正 敏
委 員	名古屋大学教授	澤 田 均
委 員	名古屋大学准教授	灘 野 大 太
委 員	名古屋大学助教	大 島 健 司

脊椎動物の卵子および胚は成体体細胞とは異なり特徴的な細胞外マトリクスで被覆されている。この卵／胚特異的細胞外マトリクスには生物分類群によって多様な名称が付けられている。哺乳類では透明帯 (*Zona Pellucida*)、鳥類では卵黄膜内層 (*inner vitelline membrane*)、両生類では卵黄膜 (*vitelline membrane*)、魚類ではコリオン

(*chorion*) であり、膜 (*membrane*) と称されることもあるが、リン脂質の細胞膜ではなく、タンパク質性の細胞外マトリクスである。これらの卵／胚特異的細胞外マトリクスは、卵外被と総称され、類似の微細構造を持ち類似の糖タンパク質群で構成されている。すなわち、卵外被は、**ZP-domain** を共通に持つ糖タンパク質のみからなる繊維状複合体が絡み合った網目構造のシート状組織で卵子および初期胚を被覆して物理的に保護する役割を持つ。哺乳類および両性類の卵外被の構成成分として、3種あるいは4種の**ZP**糖タンパク質 (**ZP1~ZP4**) が同定されていたが、鳥類では**ZP1** および**ZP3** の2種類のみが検出、同定されており、分類群間での多様性の一つと考えられていた。卵外被は細胞外マトリクスとして卵を物理的に保護すると同時に、受精時の精子受容体としての機能も持つ。卵管を遡上してきた精子は卵子と遭遇すると卵外被に接着して結合し、卵外被の網目構造シート状組織を貫通して卵細胞膜に到達し両配偶子間の膜融合により受精が完了する。受精の際に精子が卵外被を貫通する現象は古くから研究され、体外受精時の観察により精子との相互作用により卵外被のシート状組織が溶解して消滅すること、さらにこの溶解現象がプロテアーゼ阻害剤によって阻止されることから、精子のプロテアーゼによる卵外被構成**ZP**糖タンパク質の分解によりマトリクスを壊してシート状組織を貫通するものと推定されていた。一方、マウスにおいては、精子の主要プロテアーゼ (アクロシン) の遺伝子を破壊したマウスが作製されて雄の受精能が調べられたが、野生型と同様に雌マウスを妊娠させて子孫を増やすことができた。この研究成果が公表された結果、精子プロテアーゼは受精に不要であるという議論もされるようになり、精子プロテアーゼおよび卵外被の酵素的分解に関する研究は停滞していた。精子プロテアーゼの分離・精製やそれを用いた酵素化学的研究は極めて少なく、また、アクロシンホモログ遺伝子の配列はデータベースに多く登録されているが組換えタンパク質として発現させ成熟型に変換して酵素活性を検出した研究例はなく、登録されているアクロシン遺伝子の翻訳産物が真に卵外被を分解するプロテアーゼであることも未だ実証されていなかった。さらに、精子プロテアーゼにより卵外被**ZP**糖タンパク質が切断、分解されてマトリクスの溶解に至る現象の分子機構も未解明のままであった。

以上のような研究背景の下、本学位論文研究においては、ニワトリ卵胞から分離した卵外被および射出精子を用いた体外受精モデル実験系を基盤にして、鳥類の受精における精子の卵外被マトリクス貫通機構の解明を目指した実験研究が行われ、その研

究成果が本博士学位論文としてまとめられている。研究成果の要点を以下に記す。

(1) ZP2 糖タンパク質の時期および組織特異的発現と胚盤近傍への局在

ニワトリ卵外被は ZP1 と ZP3 で構成されると考えられてきたが、精子が優先的に結合し卵外被を貫通する胚盤の近傍には ZP2 が局在することを明らかにし精子受容に役割を持つことを示唆した。未成熟卵胞で発現し卵母細胞外被の主要成分である ZP2 が卵黄の蓄積に伴う卵胞の急速成長後も胚盤近傍に集積し残存するものと考察した。

(2) 精子との相互作用による卵外被 ZP 糖タンパク質の分解と遊離断片の同定

卵外被と精子による体外受精モデル系において、ZP マトリクスでの構成タンパク質の切断部位を明らかにし、さらに遊離するペプチド断片を同定した。ZP1 の繰返し配列領域が特異的に分解され、さらに、既知のセリンプロテアーゼではほとんど切断されないと考えられている Arg-Pro の間が選択的に切断されることを明らかにした。

(3) 卵外被を溶解する精子プロテアーゼの同定と活性化プロセッシング様式

精子粗酵素溶液から親和性クロマト等を用いてプロテアーゼを分離精製し、質量分析によりニワトリアクロシンの2つのアイソザイム遺伝子の翻訳産物と同定した。さらに、活性型成熟酵素は予想された N-端近傍に加え、3D モデルで推定した活性中心近傍でも切断されていることを明らかにし、プロセッシングによる活性化を示唆した。

(4) 精子プロテアーゼの基質特異性と卵外被の酵素的溶解機構

ZP1 の繰返し配列領域を標的とし Arg-Pro を選択的に切断すると推定された精子プロテアーゼの cDNA を取得し、組換え型タンパク質として昆虫細胞で発現分泌させた。分離精製した組換え型タンパク質を精子粗酵素でプロセッシングして活性型に変換させることに成功し、この成熟型酵素が、ZP1 の繰返し配列領域に散在する Arg-Pro を選択的に切断する卵外被マトリクス溶解の鍵酵素であることを示唆した。

本学位論文研究で対象とした高等動物の受精に関する研究は長い歴史を持ち、精子と卵子が遭遇した際に卵外被が局所的に溶解して精子が貫通することは顕微鏡下での形態学および微細構造的な現象として古くから知られていた。しかし、精子プロテアーゼおよび卵外被構成成分の分子レベルでの理解は遅れており、精子が卵外被を溶解して貫通するダイナミックな現象の分子機構も長い間不明のままであった。本学位論文にまとめられた研究内容は、これらの疑問に対していくつかの解答を提出したもので、独創性と新規性が認められる。農学および関連専門分野における高度な学術的価値を持ち、今後の研究に大きく貢献する優れた研究成果であると評価し、博士（農学）に値すると判定した。