

主論文の要約

鳥類の受精における精子の卵外被マトリクス貫通機構

名古屋大学大学院生命農学研究科

西尾 俊亮

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。卵外被は、ZP 糖タンパク質同士が ZP domain を介して重合することで形成されるフィラメントを分子間ジスルフィド結合によって繋げて網目状の構造を形成する。卵外被は精子と卵の結合や、卵および初期胚の保護に機能する。そのため、ZP 糖タンパク質をロックアウトしたマウスは不妊となる。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。様々な領域の卵外被と精子を *in vitro* で反応させると、胚盤近傍の卵外被により多くの精子が結合し、精子の貫通に伴う孔の数も多い。また、受精卵を採取して精子の貫通に伴う孔の形成数を測定すると、胚盤近傍の卵外被で多くみられることから、*in vivo* でも胚盤近傍卵外被への優先的な結合、貫通が起こっていると考えられる。鳥類では初期発生の際に巨大な卵の活性化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。卵黄の蓄積により巨大化した卵を破裂させることなく、胚盤近傍の卵外被に高頻度に貫通するため、精子は局所的な卵外被の溶解を行う必要があると考えられる。精子が胚盤近傍に限定して卵外被を貫通することは受精を成功させるための理にかなった戦略であり、鳥類の受精における重要な段階の一つであると考えられる。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、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。そして、哺乳類で精子レセプターとしての機能が報告されている ZP2 が胚盤近傍の卵外被に集積していること、精子アクロシンが卵外被構成タンパク質を分解するプロテアーゼであり、卵外被 ZP 糖タンパク質のうち、ZP1 の繰り返し配列領域を選択的に切断することで卵外被マトリクス構造が溶解することが初めて明らかになった。以下に実験結果について述べる。

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。ほぐれた繊維は ZP1 に対するモノクローナル抗体で染色されたことから、網目構造を形成している ZP1 と ZP3 が重合した太い繊維に由来するものであると考えられる。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 *in vitro* で混合し静置すると、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 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。

本研究で明らかになった、胚盤近傍の卵外被への ZP2 の集積および精子アクロシンの卵外被 ZP1 の選択的分解による卵外被の溶解は、どちらも鳥類の受精を成功させるために必要な現象であると考えられる。そして、これらは卵成熟から受精に至る一連の現象の中で連続的に起こるものである。今後は、胚盤近傍卵外被に精子が優先的に結合する現象における ZP2 の役割、先体反応を起こしている精子を保持するためのレセプターとしての機能を明らかにする必要がある。また、先体反応で放出されるアクロシンによって ZP1 や ZP3 は分解されるが、胚盤近傍の ZP2 は分解されるのか、されないとしたらどのような構造的特徴によるものであるかを解析する必要がある。さらに、近年目覚ましい発展を遂げているゲノム編集技術によって、ZP2 やアクロシンをノックアウトしたニワトリを作出し、*in vivo* における機能が明らかになることが期待される。そして、将来的にはこれらの分子を制御することで食料資源として重要な家禽の育種や繁殖、野生鳥類の人為的な繁殖制御につながることが期待される