

哺乳動物の生殖反応マシーナリーの
構造機能解析

課題番号 13033004

平成13年度～平成14年度 科学研究費補助金
特定領域研究（A）（2）研究成果報告書

平成15年3月

研究代表者 中野 實

（千葉大学理学部教授）

はしがき

研究組織

研究代表者： 中野 實（千葉大学理学部教授）

研究分担者： 米澤 直人（千葉大学理学部助教授）

配分額

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	1,900	0	1,900
平成14年度	1,700	0	1,700
総計	3,600	0	3,600

研究発表

1) 学会誌等

(1) M. Nakano and N. Yonezawa. Localization of sperm ligand carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoproteins. *Cells Tissues Organs* 168(1,2) 2001.2.1

(2) N. Yonezawa, N. Fukui, M. Kuno, M. Shinoda, S. Goko, S. Mitsui and M. Nakano. Molecular cloning of bovine zona pellucida glycoproteins ZPA and ZPB and analysis for sperm-binding component of the zona. *European Journal of Biochemistry* 268(12) 2001.6.1

(3) S. Amari, N. Yonezawa, S. Mitsui, T. Katsumata, S. Hamano, M. Kuwayama, Y. Hashimoto, A. Suzuki, Y. Takeda and M. Nakano. Essential role of the nonreducing terminal α -mannosyl residues of the N-linked carbohydrate chain of bovine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Molecular Reproduction and Development* 59(2) 2001.6.1

- (4) A. Fukuzawa, M. Hiroshima, K. Maruyama, N. Yonezawa, N. Tokunaga and S. Kimura. Single molecule measurement of elasticity of serine- glutamate- and lysine-rich repeats of invertebrate connectin reveals that its elasticity is caused entropically by random coil structure. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 23(5-6) 2002.8.1
- (5) K. Ikeda, N. Yonezawa, K. Naoi, T. Katsumata, S. Hamano and M. Nakano. Localization of N-linked carbohydrate chains in glycoprotein ZPA of the bovine egg zona pellucida. *European Journal of Biochemistry* 269(17) 2002.9.1
- (6) M. Nakano, N. Yonezawa and T. Katsumata. Sperm binding activity of the recombinant pig zona pellucida glycoproteins expressed in a baculovirus/insect cell expression system. *Cloning and Stem Cells* 4(3) 2002.10.1

2) 口頭発表

- (1) 寺内弘知、米澤直人、工藤勝康、伊東孝祐、田之倉優、三浦謹一郎、勝又敏行、中野實：組換え体ブタ卵子透明帯糖タンパク質の精子結合活性 第54回日本細胞生物学会大会 2001年5月31日
- (2) N. Yonezawa, N. Fukui, M. Kuno, M. Shinoda, S. Goko, K. Naoi, S. Mitsui and M. Nakano: Molecular cloning of bovine zona pellucida glycoproteins ZPA and ZPB and analysis for sperm egg binding component of the zona. 14th International Congress of Developmental Biology. 2001.7.12
- (3) M. Nakano, N. Yonezawa & T. Katsumata. Sperm binding activity of porcine zona pellucida glycoproteins expressed in a baculovirus/insect cell system. International Workshop "Current Status and Perspectives in Cloning and Related Studies" (Tsukuba, Japan) 2001.10.15
- (4) 寺内弘知、米澤直人、工藤勝康、伊東孝祐、田之倉優、三浦謹一郎、勝又敏行、中野實：組換え体ブタ卵子透明帯糖タンパク質の精子結合活性 第74回日本生化学会大会 2001年10月25日
- (5) 米澤直人、中野實：ブタ透明帯糖タンパク質のC末端分析 第74回日本生化学会大会 2001年10月25日
- (6) 脇卓真、篠原宏文、野村晃司、米澤直人、中野實、赤間邦子：ブタ精子新

規プロテアーゼ（CSP）の基質特異性 第74回日本生化学会大会 2001年10月27日

- (7) F. L. Imai, T. Takahashi, M. Kondo, S. Kojima, M. Nakano and K. Akama: Boar transition protein 4-binding proteins from the late spermatide nuclei. 74th Annual Meeting of Japan Biochemical Society. 2001.10.27
- (8) 塚本未来、米澤直人、寺内弘知、嶋田武、勝又敏行、中野實：ブタおよびウシ卵子透明帯糖タンパク質の組換え体発現と精子結合活性 第55回日本細胞生物学会大会 2002年5月21日
- (9) 池田啓一、米澤直人、直井啓太、勝又敏行、浜野晴三、中野實：ウシ卵子透明帯糖タンパク質ZPA内の精子結合活性糖鎖の分布 第75回日本生化学会大会 2002年10月15日
- (10) 林雅浩、米澤直人、中野實：多精拒否におけるシアル酸およびシアリダーゼの役割 第75回日本生化学会大会 2002年10月16日
- (11) H. Kakuuchi, S. Usui, Y. Mizukami, M. Okazaki, M. Nakano, A. Sueshige, S. Mishima. Effect of lipoprotein particle size and lipid composition on serum LDL-cholesterol determination by homogeneous methods. The 18th International Congress of Clinical Chemistry 2002.10.23

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

臓器スライス方法及びその装置、

発明者：中野實、三井俊明

工業所有権の種類：特許

出願番号：特願2002-339973

出願年月日：平成14年11月22日

本研究は、平成11年度から本格的にスタートした特定領域研究「シンクロトロン放射光による生物マシーナリーの構造生物学」に応募し、平成13～14年度の2年間採択されたものである。

哺乳類の受精に際し精子は卵子表層の透明帯に種特異的に結合する。この配偶子間相互認識は、細胞間認識の代表的なもののひとつとして多くの研究者の研究対象になっているが、詳しい分子機構は未だ不明の点が多い¹⁾。哺乳類の卵子の採取できる数量が少ないのもその主因のひとつである。我々は比較的多数の卵子が得られるブタとウシの卵子透明帯を対象にし、その精子リガンドの研究を続けてきた。

透明帯は三成分の糖タンパク質のみで構築されている細胞外マトリックスである。これらの三成分は分子質量の大きさの順にZP1、ZP2、ZP3と、あるいはcDNAの大きさの順にZPA、ZPB、ZPCと呼ばれている^{2,3)}。ヒトとマウスでは前者の、ブタやウシでは後者の命名法を使うことが多い。これら三成分にはZPドメインと呼ばれる共通配列が存在する⁴⁾。ZPドメインは、ほぼ260残基のアミノ酸から成り、位置が保存された8つのシステインが4つのジスルヒド結合を形成しているため高次構造もよく似ていると考えられている。このドメインは、透明帯タンパク質だけでなく、TGFβレセプターIII型(βグリカン)、妊婦の尿に多くみられるウロモジュリン、膵臓の分泌顆粒膜の主要糖タンパク質GP-2、聴覚に関与するα-とβ-テクトリン、味蕾にあるエブネリンなど多くの糖タンパク質のC末端領域に存在し、細胞外マトリックスの形成や細胞接着に関与していると考えられている^{5,6)}。

我々は精子と透明帯の結合の阻害活性をみる競合法で、ブタの精子リガンドは主にZPBのN末端領域にある中性の3本鎖と4本鎖の複合型糖鎖であること⁷⁾、ウシの精子リガンドはマンノースを5残基持つ高マンノース型糖鎖であることを明らかにした⁸⁾。しかしながら、精子結合活性をもつ糖鎖をタンパク質から切り離したものは、元の糖タンパク質に比べ大幅に活性が弱くなるので、タンパク質骨格のコンフォメーションが結合活性の発現に寄与しているものと思われる。本研究では、ブタの精子結合活性を持つZPBおよびZPBの活性発現をサポートするとされているZPCを透明帯から大量に調製し高次構造の

解析をめざした。さらに、大腸菌や昆虫細胞で他成分が混在しない透明帯糖タンパク質の発現も行ない精子リガンド活性などの特性を調べた。

研究成果

平成13年度

1. ブタZPBおよびZPCの大量調製と結晶化

ブタ卵巣のホモゲネートからステンレスメッシュを使ってトラップした後、パーコール中での遠心法で精製した透明帯を加熱溶解後、エンド-β-ガラクトシダーゼ消化しN-アセチルラクトサミン領域を除去した糖タンパク質混合物を逆相HPLCで三成分に分別した。精製したZPCの結晶化をハンギングドロップ法により122条件下で試みたところ、2.0M NaCl/0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.6) 中で小さな結晶が得られたが、その成長は不十分であった。

2. ブタおよびウシ透明帯糖タンパク質の発現系の構築

大量に調製した透明帯からネイティブな糖タンパク質を単離する一方、cDNAを用いて、高次構造解析や機能解析に供し得る各糖タンパク質およびそれらに存在するドメイン領域の発現系の構築を行なった。大腸菌に発現させた場合不溶化することがわかったので、バキュロウィルス/Sf9細胞の系を用いた。発現させた組換え体タンパク質は以下のとおりである。

- i) ブタ透明帯糖タンパク質：ZPA、ZPB、ZPC、ZPAのN末端側半分 (ZPAに特有のドメイン)、ZPAのC末端側半分 (ZPドメイン)。
- ii) ウシ透明帯糖タンパク質：ZPA、ZPB、ZPC、ZPBのLys-27からPro-137 (ZPBに特有のドメイン)。

各組換え体はウェスタンブロッティングで発現を確認できたが、概して発現量が少なく、発現系をさらに検討すべきと結論した。

平成14年度

1. ブタZPBおよびZPCの三次構造解析

透明帯を調製する際、凍結した卵巣の固まりを低温室内でスライスする過程は重労働であるが、今回、これまで1時間かかっていた作業を5分で終了できる電動式スライサーを試作した（特許申請中）。また、これまでは精製した透明帯を水のなかで加熱し溶解していたが、透明帯糖タンパク質に僅かに存在するSH基が引き金になってSS交換反応が起こりポリマーが形成されることがゲル濾過クロマトグラフィーで判明した。そこで酢酸で可溶化後アンモニアで中和しSS交換反応とポリマー形成を抑える調製法を工夫した。これらの改良法で効率良く透明帯糖タンパク質を得ることが可能となった。

一般に糖タンパク質は糖鎖が不均一なこと、またそれらの糖鎖が運動性を持ち揺らぐことから結晶化しにくい。ブタZPBとZPCは糖含量が3分の1もあるので、不溶化しない程度に糖鎖を除去してから分別することにした。13年度に行なったエンド-β-ガラクトシダーゼ消化に加え、β-ガラクトシダーゼとβ-N-アセチルヘキソサミニダーゼを加え糖鎖のコア部分のみ残してから逆相HPLCにかけた。エンド-β-ガラクトシダーゼ消化のみの場合にくらべ、少しずつ溶出までにかかる時間が長くなったが、ZPBとZPCは良好に分別された。ZPBとZPC分画それぞれを酢酸アンモニウムと水に対して順次透析後、遠心濃縮機で濃度をほぼ10mg/mlにまで濃縮した。前年度同様ハンギングドロップ法で結晶化条件を検討している。

2. ブタおよびウシ透明帯糖タンパク質のバキュロウィルス/Sf9細胞系による発現と構造機能解析

13年度に引き続き、バキュロウィルス/Sf9細胞系により透明帯糖タンパク質の糖鎖付加部位変異体、ドメイン欠失部位変異体、および共感染による複数成分を組み合わせた組換え体を発現させた。高次構造解析に供するには発現量は少なかったが、ブタ透明帯タンパク質組換え体の精子結合活性を調べることができた。

精子結合活性は、アガロースビーズに結合させた組換え体への精子結合数をみる精子-ビーズ結合法および精子に結合した組換え体を蛍光抗体で検出する間接蛍光抗体法で測定した。両法により同様の結果（i および ii）が得られた。

i) ブタZPA、ZPB、ZPCいずれの組換え体にもブタ精子は結合せず、ブ

タZPB組換え体にウシ精子が結合する。

ii) 共発現させたブタZPB+ZPC組換え体にはZPB単独の組換え体よりもウシ精子はよく結合する。

透明帯からネイティブなZPBを調製する際に懸念されるZPCの混在の可能性は、組換え体には無い。従ってこれらの結果は、ブタZPB組換え体にはブタ精子は結合せずウシ精子が結合しブタZPCはその結合活性を高める、と解釈される。糖タンパク質をバキュロウィルス/Sf9細胞系で発現させた場合、付加する糖鎖は主に高マンノース型糖鎖であるとされている^{9,10)}。我々は、ネイティブなブタ透明帯糖タンパク質には有意量の高マンノース型糖鎖は存在しないこと^{11,12)}、ウシ透明帯にはウシ精子結合活性を持つ高マンノース型糖鎖が存在すること^{8,13)}を既に報告している。上記の結果は、今回発現させたブタ透明帯糖タンパク質組換え体には高マンノース型糖鎖が付いているため、ブタ精子は結合せずウシ精子が結合したと結論付けられる。実際、高マンノース型糖鎖に特異的なGNAレクチンによるプロットティングを行なったところ、ネイティブなブタ透明帯糖タンパク質にはGNAは結合せず、組換え体には結合することが確認できた。

本実験で透明帯への種特異的結合は透明帯糖タンパク質糖鎖を介することが実証されたが、はじめに述べたように、結合活性の発現にはタンパク質骨格のコンフォメーションが大いに寄与している。精子に直接結合するZPBと、ZPBの結合活性を高めるZPCそれぞれのタンパク骨格の高次構造、およびZPBとZPC複合体の高次構造の解析が待たれる。

謝辞

高次構造解析にまで研究を進めることができなかったものの、ネイティブな透明帯糖タンパク質の大量調製法の開発、組換え体タンパク質の発現系の構築、糖タンパク質の結晶化のための条件設定などに有効に予算を使えることができたことを深謝したい。

文献

- 1) Litscher, E. S., and Wassarman, P. M. (1993) Carbohydrate-mediated adhesion of eggs and sperm during mammalian fertilization. *Trend. Glycosci. Glycotechnol.* 5, 369-388.
- 2) Bleil, J. D., and Wassarman, P. M. (1980) Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev. Biol.* 76, 185-202.
- 3) Harris, J. D., Hibler, D. W., Fontenot, G. K., Hsu, K. T., Yurewicz, E. C., and Sacco, A. G. (1994) Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNA from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Seq.* 4, 361-393.
- 4) Bork, P., and Sander, C. (1992) A large domain common to sperm receptors (ZP2 and ZP3) and TGF- β type III receptor. *FEBS Letters* 300, 237-240.
- 5) Wassarman, P. M., Jovine, L., and Litscher, E. S. (2001) A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biol.* 3, E59-E64.
- 6) Jovine L., Qi, H., Eveline, Z. W., Litscher, E., and Wassarman, P. M. (2002) The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nature Cell Biol.* 4, 457-461.
- 7) Kudo, K., Yonezawa, N., Katsumata, T., Aoki, H., and Nakano, M. (1998) Localization of carbohydrate chains of pig sperm ligand in the glycoprotein ZPB of egg zona pellucida. *Eur. J. Biochem.* 252, 492-499.
- 8) Amari, S., Yonezawa, N., Mitsui, S., Katsumata, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Takeda, Y., and Nakano, M. (2001) Essential role of the nonreducing terminal α -mannosyl residues of the N-linked carbohydrate chain of bovine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Mol. Reprod. Develop.* 59, 221-226.
- 9) Buters, T. D., Yudkin, B., Jacob, G. S., and Jones, I. M. (1998) Structural characterization of the N-linked oligosaccharides derived from HIVgp120 expressed in lepidopteran cells. *Glycoconj. J.* 15, 83-88.

- 10) Voss, T., Ergulen, E., Ahorn, H., Kubelka, V., Sugiyama, K., Maurer-Fogy, I., and Glossl, J. (1993) Expression of human interferon omega 1 in Sf9 cells. No evidence for complex-type N-linked glycosylation or sialylation. *Eur. J. Biochem.* 217, 913-919.
- 11) Noguchi, S., Hatanaka, Y., Tobita, T., and Nakano, M. (1992) Structural analysis of the N-linked carbohydrate chains of the 55-kDa glycoprotein family (PZP3) from porcine zona pellucida. *Eur. J. biochem.* 204, 1089-1100.
- 12) Noguchi, S., and Nakano, M. (1992) Structure of the acidic N-linked carbohydrate chains of the 55-kDa glycoprotein family (PZP3) from porcine zona pellucida. *Eur. J. biochem.* 209, 883-894.
- 13) Katsumata, T., Noguchi, S., Yonezawa, N., Tanokura, M., and Nakano, M. (1996) Structural characterization of the N-linked carbohydrate chains of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Eur. J. Biochem.* 240, 448-453.