



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

ウズラ顆粒膜細胞による卵黄膜内層のZPC生合成に関する細胞生物学的研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 笹浪, 知宏 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2309

氏名(本国籍)	笹浪知宏(静岡県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博乙第64号
学位授与年月日	平成14年9月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	ウズラ顆粒膜細胞による卵黄膜内層のZPC生合成に関する細胞生物学的研究
審査委員会	主査 静岡大学 教授 森 誠 副査 信州大学 教授 大谷 元 副査 静岡大学 教授 高坂 哲也 副査 岐阜大学 教授 吉崎 範夫 副査 静岡大学 助教授 鳥山 優

論文の内容の要旨

本論文は、鳥類の卵黄膜内層を構成するタンパクのひとつであるZPCの生合成と分泌について、ウズラを実験材料としておこなった細胞生物学的研究を取りまとめたものである。

提出された論文は、第一章「序論」、第二章「顆粒膜細胞によるZPC合成におけるホルモン制御機構とそのシグナル伝達様式」、第三章「顆粒膜細胞によるZPC分泌におよぼすFSHの効果」、第四章「顆粒膜細胞におけるZPCの翻訳後修飾」、第五章「総括」の五章で構成されており、得られた成果は次のように要約される。

第一章「序論」では、本研究の背景およびさまざまな動物種で得られている研究成果を広く比較細胞生物学的に概説し、本研究の意義を論じている。

第二章「顆粒膜細胞によるZPC合成におけるホルモン制御機構とそのシグナル伝達様式」では、ウズラのZPC生合成のホルモン支配を調べるために、顆粒膜細胞を培養し、ZPCの合成量を特異的抗体を用いた免疫沈降法で定量した。その結果、顆粒膜細胞をFSHの存在下で培養することによってZPCの合成量が増加することを示した。次にZPC生合成におけるプロテインキナーゼの役割を調べるために、顆粒膜細胞をFSH、dbcAMP、プロテインキナーゼCの賦活剤、ホスホジエステラーゼの阻害剤を含む培養液で培養し、ZPCの合成量を定量した。その結果、顆粒膜細胞をFSHやdbcAMPの存在下で培養すると顆粒膜細胞によるZPCの合成能が上昇することや、FSHによる顆粒膜細胞のZPC合成促進効果はホスホジエステラーゼ阻害剤の添加によって増強されることを示した。このように、ウズラ顆粒膜細胞によるZPC生合成には細胞内でアデニル酸シクラーゼとcAMPを介した情報伝達系が関与していることを明らかにした。

第三章「顆粒膜細胞によるZPC分泌におよぼすFSHの効果」では、ウズラ顆粒膜細胞によるZPCの分泌様式を調べるために、転写阻害剤、翻訳阻害剤および糖鎖伸長阻害剤

を添加した培養液で、顆粒膜細胞を培養し、培養液中に分泌される ZPC の量的変化を調べた。単離直後の細胞を転写阻害剤であるアクチノマイシン D または翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドを添加して培養したところ、ZPC の分泌量が減少し、短時間のうちに培養液に分泌される ZPC が、細胞に蓄積していたものではなく、新しく合成されて分泌されたものであることを明らかにした。また糖鎖伸長阻害剤であるツニカマイシンを添加して培養したところ、培養液に分子量の小さな ZPC が分泌され、このバンドは N-結合型オリゴ糖鎖を認識するレクチンに反応しないことから、ZPC の分泌には、N-結合型オリゴ糖鎖の付加が不要であることを示した。

第四章「顆粒膜細胞における ZPC の翻訳後修飾」では、顆粒膜細胞における ZPC の翻訳後修飾機構を調べるために、顆粒膜細胞からの分泌にともなう ZPC の構造変化を解析するとともに、ZPC の分泌におよぼすモネンシン、プレフェルジン A および RVKR の影響を調べた。細胞可溶化物のウェスタンブロットティングによる解析結果から、分子量 43 kDa のタンパクが ZPC の前駆体 (proZPC) であることを明らかにし、proZPC は分泌される前に C 末端のペプチド鎖の切断を受けることを示した。また、モネンシンの存在下で proZPC のプロセッシングが起り、プレフェルジン A の存在下ではプロセッシングが起らないことから、この過程はゴルジ体で起こることを示した。さらに 35 kDa の ZPC のアミノ酸配列を調べ、C 末端のアミノ酸が Phe360 であること、また proZPC から切り取られた 12 kDa ペプチドの N 末端が Asp363 で始まることを明らかにした。これらのことから細胞内で新しく合成された proZPC は、フェーリンの認識配列である Arg-Phe-Arg-Arg の C 末端側で切断を受け、その後、卵黄膜内層を形成するまでの間に二つの Arg 残基が除去されて 35 kDa に変化することを解明した。また、ZPC は proZPC のままでは細胞外に分泌されないことから、ZPC の分泌および卵黄膜内層への取り込み過程には、このプロセッシング過程が必要である可能性を指摘した。

最終章である第五章「総括」では、これらの研究成果を総合的に考察するとともに、ZPC をはじめとする繊維状タンパクの分泌に関する内外の最新データをもとに本提出者自身の考えを提示している。

以上のように本論文は、多岐にわたる実験手法と知識を駆使し、鳥類の卵黄膜内層の構成成分のひとつである ZPC の生合成から分泌にいたるまでを明らかにした内容となっている。

審 査 結 果 の 要 旨

ZPC はウズラ卵黄膜内層の構成因子のひとつであり、本論文はその生合成と分泌機構に関する一連の細胞生物学的研究をとりまとめたものである。

本論文の公開学位論文発表会は、審査委員全員を含む関連教官や学生の出席のもと、平成 14 年 8 月 5 日 (月) 午後 2 時より静岡大学農学部 B 棟 206 教室において実施された。発表内容は充実しており、本申請者は質問に対して的確に回答した。終了後引き続き、論文内容を中心に審査委員会を開催した。

提出された学位論文の主な審査結果は以下の通りである。

- 1) ZPC の生合成におけるホルモン制御機構とそのシグナル伝達様式について
ウズラの ZPC 生合成のホルモン支配を調べた。その結果、ウズラの顆粒膜細胞の ZPC

生合成は FSH の刺激によって促進されることを明らかにし、FSH が ZPC 合成の調節因子のひとつであることを示した。さらに ZPC 生合成におけるプロテインキナーゼの役割を調べ、FSH の刺激には細胞内のアデニル酸シクラーゼとサイクリック AMP を介した情報伝達系が関与していることを明らかにした。

2) ZPC の分泌におよぼす FSH の効果について

各種転写阻害剤、翻訳阻害剤および糖鎖伸長阻害剤をもちいてウズラ顆粒膜細胞による ZPC の分泌様式を調べた。その結果、単離直後の細胞を転写阻害剤であるアクチノマイシン D または翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドを添加して培養したところ、ZPC の分泌量が減少し、短時間のうちに培養液に分泌される ZPC は細胞内に蓄積していたものではなく、新しく合成されて分泌されたものであることがわかった。また糖鎖伸長阻害剤であるツニカマイシンを添加して培養したところ、培養液に分子量の小さな ZPC が分泌されたことから、ZPC の分泌には、N-結合型オリゴ糖鎖の付加は不要であることを示した。

3) ZPC の翻訳後修飾について

顆粒膜細胞における ZPC の翻訳後修飾機構を調べた。細胞可溶化物のウェスタンブロットティングによる解析結果から、分子量 43 kDa のタンパクが ZPC の前駆体 (proZPC) であり、proZPC は分泌される前に C 末端のペプチド鎖の切断を受けることを明らかにした。またゴルジ体から細胞膜へのタンパクの移動を阻害するモネンシンの存在下で proZPC のプロセッシングが起り、小胞体からゴルジ体へのタンパクの輸送を阻害するプレフェルジン A の存在下では起こらないことから、この過程はゴルジ体で起こるものと結論した。さらに 35 kDa の ZPC のアミノ酸配列を調べたところ、C 末端のアミノ酸が Phe360 であること、また proZPC から切り取られた 12 kDa ペプチドの N 末端は Asp363 で始まることを示した。これらのことから、細胞内で新しく合成された proZPC は、フェーリンの認識配列である Arg-Phe-Arg-Arg の C 末端側で切断を受け、その後、卵黄膜内層を形成するまでの間に二つの Arg 残基が除去されて 35 kDa に変化することを示した。ZPC は proZPC のままでは細胞外に分泌されないことから、ZPC の分泌および卵黄膜内層への取り込み過程には、このプロセッシング過程が重要であると結論した。

以上のように本論文は、多岐にわたる知識と実験手法を駆使して ZPC の生合成から分泌に至るまでの機構を明らかにしたもので、得られた知見は学術的に高い価値があるものと判定された。また、論文の構成は論理的であり、内容は独創性に富み、結果に対する科学的考察も十分なされていると判断した。慎重に審議した結果、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の博士 (農学) の学位論文として十分価値があるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文は以下の通りである。

- 1) FSH Enhanced Production of ZPC Homologue of Inner Perivitelline Membrane by Quail Granulosa Cells
Tomohiro Sasanami, Jianzhi Pan, Makoto Mori
Japanese Poultry Science, 36 巻 6 号 343~353 頁 (1999 年)
- 2) Signal Transduction of Follicle-Stimulating Hormone in the Production of ZPC-Homologue in Cultured Quail Granulosa Cells
Tomohiro Sasanami, Jianzhi Pan, Yoshiki Fujikawa, Makoto Mori
Japanese Poultry Science, 37 巻 5 号 271~279 頁 (2000 年)
- 3) Secretion of Egg Envelope Protein ZPC after C-Terminal Proteolytic Processing in Quail Granulosa Cells
Tomohiro Sasanami, Jianzhi Pan, Yukio Doi, Miki Hisada, Tetsuya Kohsaka, Masaru Toriyama, Makoto Mori
European Journal of Biochemistry, 269 巻 8 号 2223~2231 頁 (2002 年)

その他の既発表学術論文は7編である。

- 1) Effect of Thyroid Stimulating Hormone and Thyroid Hormone on Progesterone Synthesis in Cultured Granulosa Cells of Japanese Quail
Mohamed E. -I. Mady, Maki Ikami, Tomohiro Sasanami, Makoto Mori
Japanese Poultry Science, 34 卷 3 号 189~194 頁 (1997 年)
- 2) Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase in Transforming Growth Factor α -Stimulated Cell Proliferation in the Cultured Granulosa Cells of the Japanese Quail
Tomohiro Sasanami, Maki Ikami, Makoto Mori
Comparative Biochemistry and Physiology, 124 卷 1 号 19~25 頁 (1999 年)
- 3) Effects of Oestradiol-17 β and Testosterone on Progesterone Production in the Cultured Granulosa Cells of the Japanese Quail
Tomohiro Sasanami, Makoto Mori
British Poultry Science, 40 卷 4 号 536~540 頁 (1999 年)
- 4) ウズラ卵黄膜内層と精子の結合に対する抗 ZPC 抗血清の影響
潘建治, 笹浪知宏, 森誠
日本家禽学会誌, 36 卷 6 号 364~370 頁 (1999 年)
- 5) Characterization of Progressive Changes in ZPC of the Vitelline Membrane of Quail Oocyte Following Oviductal Transport
Jianzhi Pan, Tomohiro Sasanami, Shizuka Nakajima, Shoko Kido, Yukio Doi, Makoto Mori
Molecular Reproduction and Development, 55 卷 2 号 175~181 頁 (2000 年)
- 6) Effects of Testosterone on Production of Perivitelline Membrane Glycoprotein ZPC by Granulosa Cells of Japanese Quail
Jianzhi Pan, Tomohiro Sasanami, Yoshinori Kono, Tsukasa Matsuda, Makoto Mori
Biology of Reproduction, 64 卷 1 号 310~316 頁 (2001 年)
- 7) 受精における卵黄膜の役割
森 誠, 笹浪 知宏
日本家禽学会誌, 受理済み (2002 年)