

ウズラ卵黄膜内層のZPC様タンパクに関する生化学的研究

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: 潘, 建治 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2513

氏 名 (国 籍)	潘 建 治 (中華人民共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 1 7 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 1 2 年 3 月 1 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学 位 論 文 題 目	ウズラ卵黄膜内層の Z P C 様タンパクに関する 生理化学的研究
審 査 委 員	主査 静 岡 大 学 教 授 森 誠 副査 静 岡 大 学 教 授 番 場 公 雄 副査 岐 阜 大 学 教 授 上 吉 道 治 副査 信 州 大 学 教 授 太 田 克 明 副査 岐 阜 大 学 教 授 吉 崎 範 夫

論 文 の 内 容 の 要 旨

本論文は、家禽の卵黄膜内層の構成成分のひとつである ZPC 様タンパクの生合成とそのホルモン調節、さらに排卵後の構造変化と生理的意義について、ウズラを実験材料としておこなった生理化学的研究をと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「生体内における ZPC 様タンパクとその mRNA の量的変動」、第三章「ZPC 様タンパクの生合成に対する各種ホルモンの効果」、第四章「ZPC 様タンパクの排卵後に受ける修飾」、第五章「ZPC 様タンパクの精子レセプターとしての可能性」、第六章「総括」の六つの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生化学的に概説し、本研究の意義を論じている。

第二章「生体内における ZPC 様タンパクとその mRNA の量的変動」では、生体内における ZPC 様タンパクとその mRNA の量の変動をウエスタンブロッティング法とノーザンブロッティング法を駆使して調べ、このタンパクが卵胞顆粒膜細胞でつくられていること、卵胞成熟の最終段階の 2 日間で急激に作られること、さらに排卵に近付くと最大卵胞でのみ合成を停止するように調節されていることを明らかにした。

第三章「ZPC 様タンパクの生合成に対する各種ホルモンの効果」では、第二章で得られたこのような ZPC 様タンパク合成の変動が何によって調節されているのかを明らかにするため、顆粒膜細胞をインビトロで培養し、タンパク合成および mRNA の発現に及ぼす各種ホルモンの効果を調べた。各種ペプチドホルモンやステロイドホルモンを試した結果、卵胞刺激ホルモンまたはテストステロンの添加によってこの ZPC 様タンパクの合成が濃度

依存的に促進され、同時に mRNA 量も増加することを明らかにした。さらにこのような効果は成熟段階の異なる卵胞から単離した顆粒膜細胞によって反応性が異なることも明らかにした。

第四章「ZPC 様タンパクの排卵後に受ける修飾」では、排卵前と産卵後の卵黄膜内層に存在する ZPC 様タンパクの分子量の違いに着目し、この変化の分子の実態および変化のおこる部位とその原因を調べた。その結果、このタンパクは排卵後から産卵されるまでの間に N 末端の 26 アミノ酸残基が除去されていることを明らかにした。外科的手術法による卵黄膜内層の挿入実験や卵管のさまざまな部位からの抽出液を用いたインビトロの実験から、この変化が卵管漏斗部から分泌される特殊なタンパク分解酵素によっておこることを明らかにした。

第五章「ZPC 様タンパクの精子レセプターとしての可能性」では、ZPC 様タンパクの受精における役割を明らかにするため、卵黄膜内層と精子をインキュベーションし、精子の先体酵素による卵黄膜内層の溶解および卵黄膜内層と精子の結合を解析した。その結果、卵黄膜内層への精子結合や引き続いておこる卵黄膜内層の溶解が、ZPC 様タンパクに対する抗体の添加によって特異的に阻害されることを示し、このタンパクが精子レセプターとして重要な機能を持っていることを明らかにした。

最終章である第六章「総括」では、これらの研究成果を総合的に総括するとともに、ZPC 様タンパクの重要性に関する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、生理学、生化学、細胞生物学、分子生物学といった多岐にわたる知識と実験手法を駆使し、家禽の卵黄膜内層の構成成分のひとつである ZPC 様タンパクの生合成から機能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様タンパクは、哺乳類で近年注目を集めている透明帯ZPCのホモログで、ウズラの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ホルモン調節、排卵後の構造変化、さらに生理的意義に関する一連の生理化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12年1月24日（月）午後2時より静岡大学農学部B棟203教室において実施された。発表の内容は充実しており、本申請者は質問に対してほぼ的確に応答した。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。

鳥類の卵子は、卵黄膜、卵白、卵殻膜、卵殻の4種類の卵膜に包まれているが、このうち卵黄膜はさらに内層、連続膜、外層の3層に分類することができる。排卵時には卵黄膜内層だけに覆われているので、受精は卵黄膜内層への精子の結合から始まると考えられてきた。ウズラの卵黄膜内層は2種類の糖タンパクが主な構成因子であるが、本論文ではそのひとつである分子量33,000のZPC様タンパクに着目し、次のような成果を得た。

(1) 生体内におけるZPC様タンパクとそのmRNAの量の変動を調べ、このタンパ

クが卵胞顆粒膜細胞でつくられていること、卵胞成熟の最終段階の2日間で急激に作られること、さらに排卵に近付くと最大卵胞でのみ合成を停止するように調節されていることを明らかにした。

(2) このようなZPC様タンパク合成の変動が何によって調節されているのかを明らかにするため、顆粒膜細胞を培養し、タンパク合成およびmRNAの発現に及ぼす各種ホルモンの効果を調べた。その結果、卵胞刺激ホルモンまたはテストステロンの添加によってこのZPC様タンパクの合成が濃度依存的に促進され、同時にmRNA量も増加することを明らかにした。このような効果は成熟段階の異なる卵胞から単離した顆粒膜細胞によって反応性が異なることも明らかにした。

(3) ZPC様タンパクは、排卵から産卵の間に26アミノ酸残基が除去されることを明らかにし、卵管漏斗部から分泌される特殊なタンパク分解酵素がこの変化に関与していることを明らかにした。

(4) ZPC様タンパクの受精における役割を明らかにするため、卵黄膜内層と精子をインキュベーションし、精子の先体酵素による卵黄膜内層の溶解および卵黄膜内層と精子の結合を解析し、卵黄膜内層への精子結合や卵黄膜内層の溶解が、ZPC様タンパクに対する抗体の添加によって阻害されることを示し、このタンパクが精子レセプターとして重要な機能を持っていることを明らかにした。

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様タンパクの生合成から機能までを明らかにしたもので、得られた知見はZPC様タンパクの生理的意義ばかりではなく、産卵雌鳥における雄性ホルモンの新たな役割を示したもので、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) 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 巻6号 364頁~370頁, 1999 年11 月

2) Characterization of progressive changes in ZPC of vitelline membrane of quail oocyte following oviductal transport

Pan, J., T. Sasanami, S. Nakajima, S. Kido, Y. Doi and M. Mori

Molecular Reproduction and Development, 55 巻2号 175頁~181頁,

2000 年2 月