

氏名(本国籍)	大槻 守 (京都府)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第465号
学位授与年月日	平成20年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3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	家禽の卵黄膜内層の形成に関する分子細胞生物学的研究
審査委員会	主査 静岡大学 教授 森 誠 副査 静岡大学 教授 鳥山 優 副査 岐阜大学 教授 吉崎 範夫 副査 信州大学 教授 小野 珠乙

### 論文の内容の要旨

脊椎動物の卵子は細胞外マトリクスである卵外被に被われている。鳥類では卵黄膜内層、連続膜、卵黄膜外層、卵白、卵殻膜および卵殻がこれに相当するが、このうち、卵黄膜内層のみが排卵前にすでに形成されており、排卵時に卵子の最外部を被っている。卵黄膜内層は体細胞に比べてきわめて巨大である卵子を排卵時に物理的に保護するほか、精子の先体反応の誘起や、精子との結合により受精に重要な役割を果たす。鳥類の卵黄膜内層は男性ホルモンの刺激で顆粒層細胞より分泌される ZPC と、女性ホルモンの刺激により肝臓より分泌される ZPB を主要な構成成分とすることが明らかとなっている。しかし、どのようにして卵黄膜内層が形成されるかについてはいまだ不明である。本論文は、鳥類の卵黄膜内層の形成機構の解明を目的としており、第一章「序論」、第二章「顆粒膜細胞が分泌した ZPC の卵黄膜内層への取り込み」、第三章「ZPC との結合に関わる ZPB1 上のアミノ酸配列の特定」、第四章「卵黄膜内層形成前後における ZPB1 の不可逆的変化の可能性」、第五章「七面鳥 ZPB1 遺伝子のクローニングおよび家禽 ZPB1 アミノ酸配列の比較」、第六章「総括」の6章で構成されており、その内容は次のように要約される。

第一章「序論」で本研究の背景を述べた後、第二章「顆粒膜細胞が分泌した ZPC の卵黄膜内層への取り込み」では、ウズラ卵黄膜内層の主要な構成成分のひとつである ZPC が卵黄膜内層へ取り込まれ不溶化するかを調べた。最大卵胞から顆粒層を単離しトリチウムロイシンを含む培養液によって培養し、標識された ZPC を含む培養上清を得た。培養上清と卵黄膜内層をインキュベートした後、卵黄膜内層を可溶化し、オートラジオグラフィによって検出した。その結果、顆粒層細胞が分泌した ZPC は卵黄膜内層に取り込まれることが明らかとなった。次いで卵黄膜内層の構成タンパクと ZPC との結合性を顆粒層細胞の培養上清を用いたリガンドプロットにより調べた。その結果、顆粒層細胞の分泌した ZPC は卵黄膜内層の ZPB と結合することが明らかとなった。さらにイオン強度および pH を段階的に変化した条件でリガンドプロットを行い ZPC と ZPB の結合性を比較した結果、結合性はイオン強度および pH に影響を受け、生理的な

条件で結合性が最大となることが明らかとなった。この結果から ZPC と ZPB の結合にはイオン結合が重要であることが考えられた。

第三章「ZPC との結合に関わる ZPB1 上のアミノ酸配列の特定」では、ZPB と ZPC との結合に関わるアミノ酸配列を調べるため、ブロムシアンで消化した ZPB と ZPC との結合性をリガンドプロットによって検出した。その結果、ZPC は ZP ドメインを含むと予想される 50kDa の ZPB 断片と結合性を示した。ZPC との結合におけるドメイン構造の関与をさらに詳しく調べるため、変異リコンビナント ZPB を CHO-K1 細胞に発現させ、ZPC との結合性を調べた。CHO-K1 細胞の培養上清と顆粒層細胞の培養上清をインキュベートした後、抗 ZPC 抗体により免疫沈降し ZPB の共沈降を抗 ZPB 抗体によるウェスタンブロッティングで検出することで ZPC とリコンビナント ZPB との結合性を調べた。その結果、野生型およびグルタミンリッチリピートを欠損した ZPB は ZPC との結合がみられたのに対し、ZP ドメインを欠損させた変異 ZPB は ZPC との結合性を示さなかった。ZP ドメインは前半部分と後半部分のサブドメインからなるとの報告があるため、ZP ドメインの前半部分または後半部分を欠損したリコンビナント ZPB を作成し ZPC との結合性を調べた。その結果、後半部分を欠損させた変異 ZPB のみ ZPC との結合性が損なわれていた。これらの結果から ZPB の ZP ドメイン、特に後半部分が ZPC との結合に重要であることが明らかとなった。

第四章「卵黄膜内層形成前後における ZPB1 の不可逆的変化の可能性」では、卵黄膜内層を形成する前後で ZPB に不可逆的な変化があるか調べる目的で、血清および卵黄膜内層から精製しジゴキシゲニン (DIG) で標識した ZPB をウズラに投与した際、卵黄膜内層への取り込みに違いがあるかを調べた。その結果、血清 ZPB は卵黄膜内層へ取り込まれるが、卵黄膜内層の ZPB は取り込みが見られないことが明らかとなった。DIG 標識 ZPB による卵黄膜内層可溶化物のリガンドプロットでは血清および卵黄膜内層由来の ZPB とともに卵黄膜内層の可溶化物への結合性を示したため、卵黄膜内層形成前後における ZPB の変化は ZPB の輸送過程に影響するものであると考えられた。

第五章「七面鳥 ZPB1 遺伝子のクローニングおよび家禽 ZPB1 アミノ酸配列の比較」では、七面鳥の肝臓より ZPB をクローニングした。その結果、七面鳥 ZPB はシグナルペプチド、グルタミンリッチリピート、トレフォイルドメイン、ZP ドメイン、フューリンの認識配列からなる 943 アミノ酸残基をコードすることが明らかとなった。ZPB のアミノ配列の相同性はウズラ、七面鳥、ニワトリ間で 93%–88%であった。ZP ドメインの相同性は全体のアミノ酸配列の相同性よりも高く、その重要性が示唆された。

最終章となる第六章「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、卵黄膜内層の形成に対する本提出者自身の考えを提示している。

## 審 査 結 果 の 要 旨

鳥類の卵黄膜内層は、哺乳類の受精過程に重要な役割をもつとして注目を集めている透明帯のホモログである。本論文はその形成に関する一連の分子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員や学生の出席のもとに、平成 20 年 1 月 24 日 (木) 午後 1 時より、静岡大学農学部 B 棟 205 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。

鳥類の卵黄膜内層は男性ホルモンの刺激で顆粒層細胞より分泌される ZPC と、女性ホルモンの刺激により肝臓より分泌される ZPB を主要な構成成分とすることが

明らかとなっている。しかし、両者が卵黄膜内層を形成する機構については不明である。そこで本論文では、おもにウズラを用いて独自の研究を組み立て、以下のような成果を得た。

まず、ZPCが卵黄膜内層へ取り込まれ、不溶化する過程を調べるために最大卵胞から顆粒膜細胞を単離しトリチウムロイシンを含む培養液で培養し、放射性標識されたZPCを得た。これを卵黄膜内層とインキュベートし、オートラジオグラフィーによって検出した結果、顆粒膜細胞が分泌したZPCは卵黄膜内層に取り込まれることが明らかとなった。そこで卵黄膜内層の構成タンパクとZPCとの結合性を顆粒膜細胞の培養上清を用いたリガンドブロットにより調べた。その結果、ZPCは卵黄膜内層のZPBと結合することが明らかとなった。

ZPBとZPCとの結合に関わるアミノ酸配列を調べるため、変異リコンビナントZPBを培養細胞に発現させ、ZPCとの結合性を調べた。顆粒膜細胞の培養上清とインキュベートした後、抗ZPC抗体により免疫沈降しZPBの共沈降を抗ZPB抗体によるウエスタンブロッティングで検出することでZPCとリコンビナントZPBとの結合性を調べた。その結果、ZPドメインを欠損させた変異ZPBはZPCとの結合性を示さなかった。さらに詳しく調べた結果、ZPドメインの後半部分がZPCとの結合に重要であることが明らかとなった。

次に血清および卵黄膜内層から精製したZPBをウズラに投与し、卵黄膜内層への取り込みに違いがあるかを調べた。その結果、血清ZPBは卵黄膜内層へ取り込まれるが、卵黄膜内層のZPBは取り込みが見られないことが明らかとなり、卵黄膜内層形成前後におけるZPBの変化が結合に重要であると考えられた。

最後に七面鳥の肝臓よりZPBをクローニングした結果、七面鳥ZPBもウズラと同様なドメイン構造を持つ943アミノ酸残基をコードすることが明らかとなった。アミノ配列の相同性はウズラ、七面鳥、ニワトリ間で88-93%であった。ZPドメインの相同性は全体のアミノ酸配列の相同性よりも高く、その重要性が示唆された。

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卵黄膜内層の形成過程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の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に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）の学位論文として充分価値あるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文は以下の通りである。

1. Mamoru Ohtsuki, Ahmed M. Hanafy, Makoto Mori & Tomohiro Sasanami: Involvement of Interaction of ZP1 and ZPC in the Formation of Quail Perivitelline Membrane. *Cell and Tissue Research*, 318:565-570, 2004
2. Mamoru Ohtsuki, Gen Hiyama, Norio Kansaku, Hiroshi Ogawa, Makoto Mori & Tomohiro Sasanami: Cloning of Perivitelline Membrane Protein; ZP1 in Turkey (*Meleagris gallopavo*). *Journal of Poultry Science*, 45:67-74, 2008