

不妊に関与するタンパク質についての新たな知見

名古屋大学大学院生命農学研究科の松田 幹 教授と西尾 俊亮 博士研究員（論文投稿時）は、スウェーデン王国カロリンスカ研究所のLuca JOVINE 教授の研究グループとの共同研究で、卵外被^{注1)}のZP1とよばれるタンパク質^{注2)}における変異がどのようにして女性不妊の原因となりうるかを明らかにしました。このZP1タンパク質は、今後、ホルモン剤ではない避妊薬^{注3)}の有望な標的になると思われます。

この研究では、卵子の周囲を覆う健全な外被の構築にはZP1タンパク質が必須であること、すなわち、ZP1タンパク質は2つの分子が結合して柔軟な架橋構造^{注4)}を作ることによって安定な卵外被の構造を保持していることを解明しました。女性不妊で見つかった2種類の遺伝子変異によって生じるZP1変異タンパク質^{注5)}では、いずれもこの架橋構造を作ることができませんでした。また、この架橋構造は、ZP1に結合する糖鎖^{注6)}や受精卵から放出される亜鉛イオン^{注7)}によって調節されうることを示唆しました。倫理的問題も含めヒトの卵子を用いることは難しいため、ZP1の架橋構造やその立体構造の解明は、鶏卵から分離した天然の卵外被とZP1タンパク質、さらに培養した細胞に作らせたニワトリZP1タンパク質を使って行いました。その後、ニワトリZP1での実験結果がヒトZP1にも当てはまることを実証しました。

この研究成果は、令和元年7月12日付英国科学雑誌Nature Communications オンライン版に掲載されました。この研究の一部は、文部科学省科学研究費助成事業（2212510、17380200）およびナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)「ニワトリ・ウズラ」の支援のもとで行われたものです。

※スウェーデン王国カロリンスカ研究所

https://news.ki.se/new-knowledge-about-a-key-protein-involved-in-infertility?_ga=2.37590816.1634609257.1562764171-1281637200.1557405373

【ポイント】

- ・ スウェーデン王国カロリンスカ研究所の Luca JOVINE 教授の研究グループとの共同研究により、卵外被¹⁾の ZP1 とよばれるタンパク質²⁾における変異がどのようにして女性不妊の原因となりうるかを明らかにしました。
- ・ 卵子の周囲を覆う健全な外被の構築には ZP1 タンパク質が必須であること、すなわち、ZP1 タンパク質は2つの分子が結合して柔軟な架橋構造^{注4)}を作ることによって、安定な卵外被の構造を保持していることを解明しました。
- ・ 女性不妊で見つかった2種類の変異 ZP1 タンパク質では、いずれもこの架橋構造をうまく作ることができないことを実証しました。
- ・ 柔軟な架橋構造^{注4)}は、ZP1 タンパク質に結合する糖鎖^{注6)}や受精卵から放出される亜鉛イオン^{注7)}によって調節されうることを示唆しました。
- ・ 倫理的な問題も含めヒトの卵子を用いることは難しいため、ZP1 タンパク質の架橋構造やその立体構造の解明にはニワトリの卵から調製した天然の卵外被と ZP1 タンパク質、さらに、培養した細胞に作らせたニワトリ ZP1 タンパク質とその変異体を使って行いました。
- ・ 得られた結果をもとに、ヒト ZP1 タンパク質や種々の変異体を用いてニワトリ ZP1 で発見したことがヒト ZP1 にも当てはまることを実証しました。

【研究背景と内容】

脊椎動物の卵子は卵外被^{注1)}とよばれる特殊な細胞外マトリクス^{注8)}で覆われています。哺乳類では透明帯 (*zona pellucida*: ZP)^{注9)}とよばれ、3-4 種類のタンパク質 (ZP1-4) で網目状のマトリクスが構築されています。近年の研究により、女性不妊と ZP1 遺伝子の変異との関連が示唆されていました。一方、鳥類の受精において、精子が卵外被マトリクスを溶解しつつ貫通する際に ZP1 が精子プロテアーゼ^{注10)}による分解を受けることから、ZP1 はマトリクス構築と溶解に重要な役割を持つと考えられてきました。

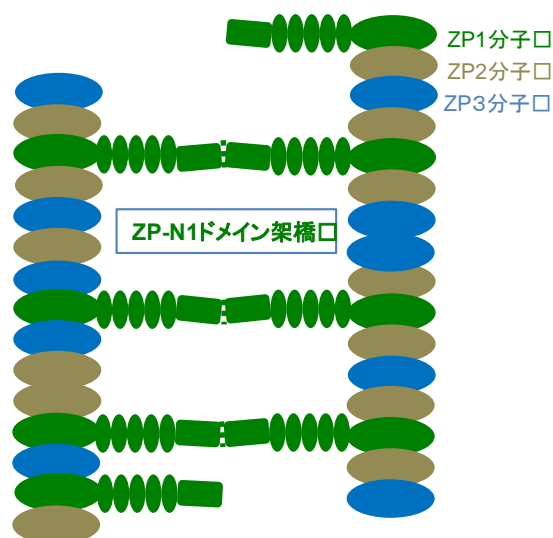


図1: 卵外被マトリクスの線状構造とZP1タンパク質による架橋構造の模式図
卵外被は網目状のマトリクスであり複数のZP分子で構成される線状構造がZP1分子間架橋構造により束ねられて太い繊維構造が構築されると考えられる。

本研究では、まず、不妊症の女性で見つかった ZP1 遺伝子の変異 (I390fs404X) により、ヒト ZP1 タンパク質は合成されるものの細胞からの分泌が損なわれること及び他の ZP2-4 タンパク質の合成と分泌には影響しないことを明らかにし、不妊と ZP1 との関連を示しました。また、鶏卵から調製した卵外被を用いてニワトリ ZP1 の ZP-N1 ドメイン^{注11)} が精子プロテアーゼによるマトリクス溶解に伴って遊離すること、ZP-N1 ドメインのシステイン残基^{注12)} を介して ZP1 分子間での架橋構造を形成していることを明らかにし、マトリクスの構築における ZP1 架橋構造の重要性を示しました (図 1, 図 2)。さらに、2つの分子の間で架橋構造を形成した状態のニワトリ ZP-N1 ドメインの結晶化^{注12)} に成功し、分子の立体構造を解明しました。驚いたことに、2つの ZP-N1 ドメインが架橋した ZP1 タンパク質への糖鎖^{注6)} の付加やその糖鎖構造の違い^{注13)} により、3種類の異なる立体配置をとることがわかりました (図 3)。この立体構造を精密に解析することにより、架橋構造を形成している2つの ZP-N1 ドメインが接する領域にジスルフィド結合^{注14)} による架橋を形成しているシステイン残基^{注15)} と糖鎖が結合しているアスパラギン残基^{注16)} が隣接して位置すること、もう一人の不妊症の女性で見つかった ZP1 遺伝子の変異 (W83R) に相当するトリプトファン残基^{注17)} もその近傍に位置すること、さらに、亜鉛イオンの介在により2つの ZP-N1 ドメイン間で結合しているヒスチジン残基^{注18)} も同様に近くに存在することがわかりました。加えて、細胞で合成させた ZP-N1 タンパク質変異体を用いた実験によって、ジスルフィド結合を形成するシステイン残基近傍に位置するこれらのアミノ酸残基を別のアミノ酸に置き換えると、2つの ZP-N1 ドメインの間のジスルフィド結合が形成されなくなることを証明しました。また、同様の実験によって、ヒト ZP1 でもこれらのアミノ酸残

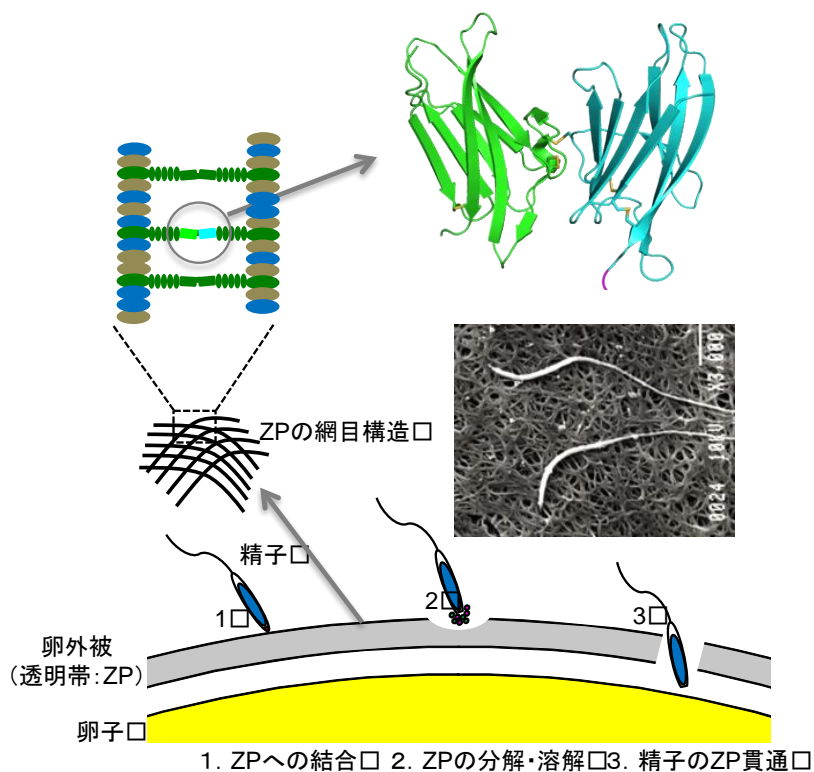


図2: 卵外被マトリクスにおけるZP1架橋構造と受精における卵外被・精子相互作用
卵外被は精子が結合する受容体でもあり精子のプロテアーゼにより分解される基質でもある。□

基が ZP-N1 ドメイン間のジスルフィド結合の形成に重要な役割を果たしていることを明らかにしました。以上の結果から、健全な卵外被の構築には ZP1 のジスルフィド結合による架橋構造が必須であり、その架橋構造の形成は2つの ZP-N1 ドメインが接する領域に結合する糖鎖や受精卵^{注19)} から放出される亜鉛イオンのヒスチジン残基への結合によって調節されている可能性を示しました。

このように ZP1 タンパク質がお互いに結合して架橋構造をとり、卵外被の構築に必須であることが明らかになったため、ZP1 タンパク質と同様に ZP-N1 ドメインを持ち類似の分子構造を持つ ZP4 タンパク質についても架橋構造を形成するのかに興味を持たれました。そこで、ニワトリ ZP4 及びヒト ZP4 を細胞で合成し分泌させて分子間で架橋構造を形成するかを調べました。その結果、ニワトリ ZP4 は架橋構造を形成しましたが、ヒト ZP4 は形成しませんでした。ZP1 と異なり、ZP4 は ZP-N1 ドメインが偶数個のシステイン残基を持ち、全てが分子内でジスルフィド結合を形成しているため、分子間でのジスルフィド結合は形成できません。したがって、ニワトリ ZP4 はシステイン以外での結合により、架橋構造を形成することがわかりました。以上の結果から、ZP4 の役割はニワトリとヒトとは異なることが考えられます。しかし、ニワトリ ZP4 は成熟した卵子の卵外被にはほとんど存在しないため、ニワトリとヒトの成熟卵子において、唯一、ZP1 のみがジスルフィド結合による架橋構造を形成する分子であり、その機能はニワトリとヒトの生物種を超えて普遍的に保存されていることが推測されます。

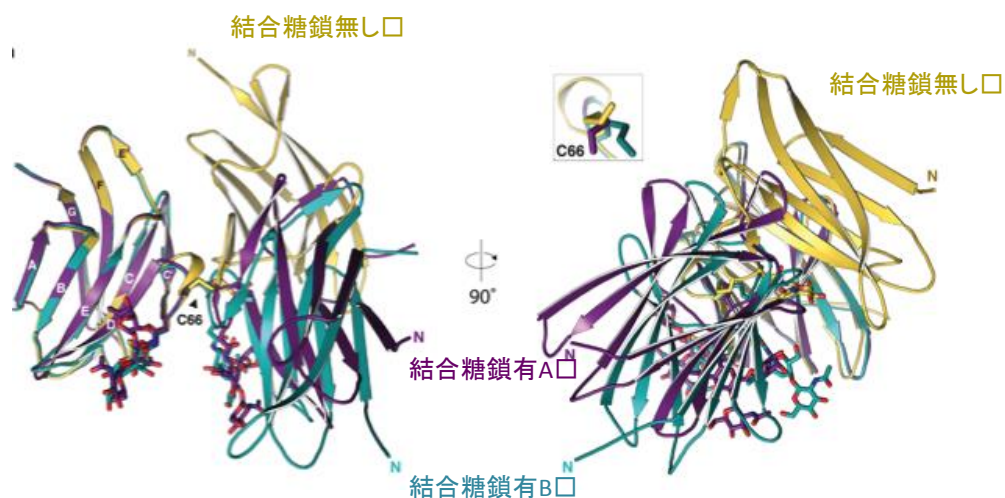


図3: 結合糖鎖の有無によるニワトリZP-N1ドメイン二量体の異なる立体配置²⁾
 結合糖鎖を持たないZP-N1の架橋二量体では1種類の立体構造(金色)が、一方、結合糖鎖を持つZP-N1の架橋二量体では金色とは異なる2種類の立体構造(紫色と青緑色)を取る事が明らかとなった。□

【成果の意義】

ZP タンパク質による卵外被の構築には、ZP1 の架橋構造形成が必要であることが示唆されていましたが、ZP1 遺伝子を破壊したマウスにおいても卵外被が形成され、さらに、受精も成立したことから、ZP1 タンパク質は卵外被構築と受精には必須ではないと考えられていました。しかし、我々の研究チームは、これはマウスでの研究結果であり、必ずしも他の哺乳類や鳥類などの全ての生物種に当てはまるとは限らないと考えていました。今回の研究成果は、ニワトリ及びヒト卵外被（透明帯）の構築には ZP1 は必須であり、女性不妊と関連する ZP1 遺伝子の変異は ZP1 タンパク質の分泌障害や架橋構造形成不全により、正常な外被（透明帯）の構築を損なうことを示唆した点で大きな意義をもちます。不妊の原因の一部が ZP1 の変異によると示されたことから、不妊治療への応用も考えられますが、もう少し基礎研究の積み上げが必要だと思われます。一方、ZP1 を標的分子とすることで、ピルとして広く用いられているホルモン剤とは異なる機構で避妊効果を示す薬剤の開発への応用が期待されます。

脊椎動物の卵外被を構成する ZP1-4 タンパク質の立体構造については、これまでに ZP3（マウスとニワトリ）及び ZP2（マウス）について報告されており、今回の ZP1 はそれに続くものですが、2つの ZP タンパク質が結合し架橋した状態での立体構造の解明は今回が最初の報告となります。ZP タンパク質同士が結合して繊維を形成し、その繊維が束ねられてより太い繊維となり、卵外被の網目構造が構築されていると考えられていますが、分子間での架橋を形成する ZP1 の立体構造の詳細が解明されたことは、卵外被の網目構造の構築機構の全容解明に向けて大きな意味を持つと考えられます。

【用語説明】

注1) 卵外被：卵子の周囲を被覆するタンパク質性の網目状の組織で、哺乳類では透明帯 (*zona pellucida*:ZP) とよばれる。卵子が成長する過程で3-4種類のタンパク質 (ZP 1-4 とよばれる) が卵子の周囲に集まって組織構造を構築する。

注2) ZP1 とよばれるタンパク質：卵外被を構成するタンパク質の一つで、分子の端に ZP-N1 とよばれる領域を持つ。

注3) ホルモン剤ではない避妊薬：ピルとして広く用いられている経口避妊薬とは異なりホルモンとしての作用を示さない避妊薬を指す。

注4) 架橋構造：2つの分子の間や1つの分子の内部で橋渡しをする化学構造を意味し、一般には共有結合とよばれる塩や界面活性剤（石鹼）などでは開裂しない化学構造を指す。

注5) 変異タンパク質：遺伝子の変異などにより正常のタンパク質とは部分的に異なる構造（これを変異とよぶ）を持つタンパク質を指す。ごく僅かな変異でもタンパク質分子の立体構造や機能に変化をもたらすことがある。

注6) 糖鎖：デンプンなどのブドウ糖のような糖が多数連結して長い鎖状の構造をとる分子を多糖とよぶ。一方、糖鎖は、同様に糖が連結して鎖錠の構造に対して用いられるが、一般的にはタンパク質や脂質に結合した状態の糖の鎖状構造に対して用いられる。

注7) 亜鉛イオン：一般には金属の原子が水に溶解できる形になったものをイオンとよぶ。亜鉛イオンは、タンパク質を構成するアミノ酸と結合してタンパク質の構造や機能に重要な役割を持つことがある。

注8) 細胞外マトリクス：細胞の周囲を覆う組織構造でタンパク質や多糖が集まって形成され、細胞が結合したり接着したりするための足場となる。

注9) 透明帯 (*zona pellucida*:ZP)：哺乳類卵の周囲を覆う卵外被のこと。顕微鏡下で卵子周囲の透明感のある層として見える。

注10) 精子プロテアーゼ：精子が持つタンパク質分解（消化）酵素で、精子が卵外被に結合すると精子から放出されて卵外被を分解（溶解）する役割と、精子に結合した状態で卵外被と精子との結合に関与する役割が想定されている。

注11) ZP-N1 ドメイン：一部の ZP タンパク質で共通に見られる ZP-N ドメインとよばれる領域の中で、ZP タンパク質のアミノ末端とよばれる側の一番端に位置する領域を指す。

注12) 結晶化：原子や分子が規則正しく配置された固体のことを結晶とよび液体から結晶を作らせることを指す。ここでは水に溶けたタンパク質を濃縮して立体構造の解析に使用できる結晶を作ることを指す。

注13) 糖鎖構造の違い：糖鎖では、一つの鎖に含まれる糖の種類や数、また鎖の長さや枝分かれの数、位置、などで多様な構造の違いができる。

注14) ジスルフィド結合：システインと呼ばれるアミノ酸が硫黄 (sulfur) を介してもう一つのシステインと結合した時の2つの硫黄 (di-sulfur) を含む結合様式を指す。

注15) システイン残基：タンパク質を構成するアミノ酸の中で硫黄 (sulfur) を含むものの一つで、タンパク質に組み込まれたアミノ酸には残基という語句が追加される。

注16) アスパラギン残基：アミノ酸の中で1分子の中に2つの窒素 (N) 原子を含むものの一つで、タンパク質の構成要素の場合には、一つの窒素を介して糖鎖が付加されることがある。

注17) トリプトファン残基：アミノ酸の中では水に溶解しにくい性質（疎水性）ものの一つで、タンパク質の構成要素の場合には、他の疎水性のアミノ酸と疎水結合とよばれる比較的強い結合を形成することがある。

注18) ヒスチジン残基：アミノ酸の中で亜鉛や銅などの金属イオンと結合する性質を持つものの一つで、タンパク質の構成要素の場合には金属イオンと結合することでタンパク質の構造や機能に重要な役割を持つことがある。

注19) 受精卵：受精により卵子と精子が融合して一つの細胞となった後の卵を指す。

【論文情報】

雑誌名：Nature Communications

論文タイトル：Molecular basis of egg coat cross-linking sheds light on ZP1-associated female infertility

著者：Kaoru Nishimura, Elisa Dioguardi, Shunsuke Nishio¹, Alessandra Villa, Ling Han, Tsukasa Matsuda² & Luca Jovine

¹ 西尾 俊亮（論文投稿時：名古屋大学大学院生命農学研究科博士研究員）

² 松田 幹（名古屋大学大学院生命農学研究科教授）

DOI: [10.1038/s41467-019-10931-5](https://doi.org/10.1038/s41467-019-10931-5)