

## 受精における卵黄膜の役割

森 誠・笹浪知宏

静岡大学農学部, 静岡市大谷 836, 422-8529

### はじめに

動物の卵子はタンパクでできた膜に被われて排卵される。この膜は哺乳類では透明帯、両生類では卵黄膜、魚類ではコリオン（卵殻）と呼ばれている。鳥類の卵子でこれらに相当する膜、すなわち排卵時に卵子を被っている膜は卵黄膜内層であり、卵黄と卵白の境をなす卵黄膜の一部である。

哺乳類の透明帯には同種の精子とのみ結合する分子が存在し、精子レセプターと呼ばれている (Wassarman *et al.*, 2001)。

マウスでは透明帯の3種類のタンパクのうちZP3と呼ばれている糖タンパクが精子レセプターの本体で、精子はレセプターと種特異的に結合し、先体に含まれる酵素によって透明帯のタンパクを溶解しながら卵卵腔へ侵入する、と考えられている。次に精子は卵子の原形質膜を通過するが、その刺激によって卵子の皮質粒の内容物が卵卵腔に放出され、透明帯タンパクの構造が変化して精子レセプターとしての機能が失われる。先体反応を起こした精子は、その表面に先体内膜を露出することになるが、透明帯の構成成分のひとつであるZP2と呼ばれる糖タンパクは先体内膜とのゆるい結合に関与している (Bleil *et al.*, 1988; Mortillo and Wassarman, 1991)。

このように哺乳類の卵子の外側を被っている透明帯は、受精にとって重要な機能をもっているが、鳥類の卵黄膜内層の生理機能については多くが未解明のまま残されていた。そこで10年ほど前にそれまでにわかっていることを整理し、本誌に「卵黄膜の科学」という総説としてまとめた (森, 1993)。

本稿はその続編にあたるもので、端黄卵である鳥類の卵子の特殊性に焦点をあてながら、この10年間の進歩を振り返り、今後の研究の方向が探れるようにまとめた。

### 1. 胚盤に集中する精子

#### 1-1. インビボの観察

鳥類の卵子の細胞としての部分は胚盤と呼ばれている。この部分は卵胞が成熟する間第一減数分裂前期の状態にあるが、排卵の約4.5時間前に卵核胞が崩壊して減数分裂の進行が再開される (Olsen and Fraps, 1950)。これは胚盤部分に存在する卵成熟促進因子が活性化されるためである (Mori *et al.*, 1991)。

排卵の2~4時間前に第一極体が放出される。この時、W染色体とZ染色体のどちらが卵子に留まるかによって、ヒナの性が決定されることになるが、これは単なる偶然ではなく、未知のメカニズムによってコントロールされているらしい (Badyaev *et al.*, 2002)。排卵時の胚盤は第二減数分裂中期の像を呈し (Perry, 1987)、透明な小腔、白色の卵黄球、ミトコンドリア、グリコーゲン顆粒など、他の部分にはない構造物を含んでいる (Bakst and Howarth, 1977 a)。

鳥類の受精には、精子が卵子の胚盤部分に侵入することが必須であるが、原形質膜に到達する前に精子はまず卵黄膜内層を通過しなければならない。

卵黄膜内層は太い繊維が三次元的に網目を形成した構造をしており、初期の研究では繊維の間には何も認められなかった (Bellairs *et al.*, 1963)、直径0.6 $\mu$ mの精子は2 $\mu$ mの間隙を容易に通過できると考えられていた。しかしその後、繊維の間隙は多孔性の顆粒で満たされていることが示され (Bakst and Howarth, 1977 a)、精子によって内層の繊維が加水分解されて、直径9 $\mu$ mの孔があくことが観察された (Okamura and Nishiyama, 1978)。なお多孔性の顆粒は卵黄膜内層の表面側だけに認められ、卵子側にはないと報告されている (Bain and Hall, 1969; Bakst and Howarth, 1977 a)。

鳥類は多精子受精がふつうにおこっている動物である。胚盤部分の精子数はニワトリで4~24 (Patterson, 1910)あるいは平均10 (Fofanova, 1965)などと報告されている。ところが実際に受精卵を調べてみると、胚盤部分を被っている卵黄膜内層にはそれよりもずっとたく

さんの孔があいている (Wishart, 1997)。胚盤内の精子数を過小評価しているのか (Perry, 1987), それとも卵黄膜内層の孔の一つづつが一匹の精子の通過の記録とはなっていないのか, 不明である。

受精卵の卵黄膜内層の孔の数を胚盤とそれ以外の部分で比較すると, 胚盤を被っている部分では 25 倍も多い (Bramwell *et al.*, 1995; Wishart, 1997)。つまり, 確かに精子は胚盤を被っている卵黄膜内層から集中して侵入することになる。しかし胚盤以外の部分にも孔はあいている。もしこの孔が精子の通過の記録だとすると, 胚盤以外の部分でも精子の侵入が認められるはずであるが, 我々の知る限り胚盤以外で卵子に侵入した精子を観察したという報告はない。

### 1-2. インビトロの観察

卵黄膜内層にあく孔は, 単離した卵黄膜内層と精子をインキュベーションすることによって, インビトロでも再現できる (Bramwell and Howarth, 1992; Steele *et al.*, 1994; Kuroki and Mori, 1997; 森・黒木, 1997)。インキュベーションの時間とともに孔の面積は大きくなる

が, 精子の濃度が高いと膜そのものが断片化されてしまう (Koyanagi *et al.*, 1988)。

インビボの観察と同様, 胚盤部分には他の部分と比較して多くの孔が生じるが, その孔は胚盤の中心部分を除いてドーナツ状に分布することが報告されている (Bramwell and Howarth, 1992)。同様の現象はウズラでも観察されている (図 1)。

胚盤部分の卵黄膜内層に孔が集中していたり, 孔が大きいということは, この部分に精子レセプターが局在しているということ必ずしも意味するものではない。

なぜなら卵黄膜内層に生じた孔は,

第 1 段階: 精子と内層の特異的結合

第 2 段階: 精子の先体反応の誘起

第 3 段階: 先体酵素による内層の加水分解

という 3 段階の反応の最終結果であり, この部分に結合した精子が先体反応をおこしやすいか, この部分の卵黄膜内層が加水分解を受けやすいことも考えられるためである。精子レセプターの局在を証明するためにはこれらの反応を区別して観察する必要がある。

## 2. 精子レセプターの局在

### 2-1. 局在するという証拠

そこで我々はウズラの卵黄膜内層と精子をインキュベーションする際に大豆トリプシンインヒビターを添加して, 先体酵素による加水分解を抑制することによって反応を第 1 段階で止め, 膜に結合している精子数を測定した (Kuroki and Mori, 1997)。その結果, 精子結合の頻度は, 排卵前の卵子の卵黄膜内層では, 胚盤を被っている部分が他の部分よりも高いことを見出した。精子レセプターが胚盤部分に集中しているという結果である。同じ実験を産卵された卵の卵黄膜内層でおこなったところ, 胚盤とそれ以外の部分の差はなくなっていた (Kuroki and Mori, 1997)。この原因についてはあきらかでないが, 排卵された卵子が卵管を通過する際に, 胚盤部分の精子レセプターになんらかの変化が生じた結果である, と考察している。

### 2-2. 化学的組成の違い

精子レセプターが胚盤に局在しているというのが事実なら, 胚盤を被っている卵黄膜内層は他の部分と化学的組成が異なっているに違いない。ところがこれまでの研究では, 胚盤とそれ以外で卵黄膜内層を構成するタンパクには量的にも質的にも違いを見出せていない (黒木, 1996; Steele *et al.*, 1994)。

ニワトリの卵黄膜内層は, GP-I, GP-II および GP-III という 3 種類の糖タンパクでできている (Kido *et al.*, 1975; 1976; 1977; Kido and Doi, 1988)。このうち GP-

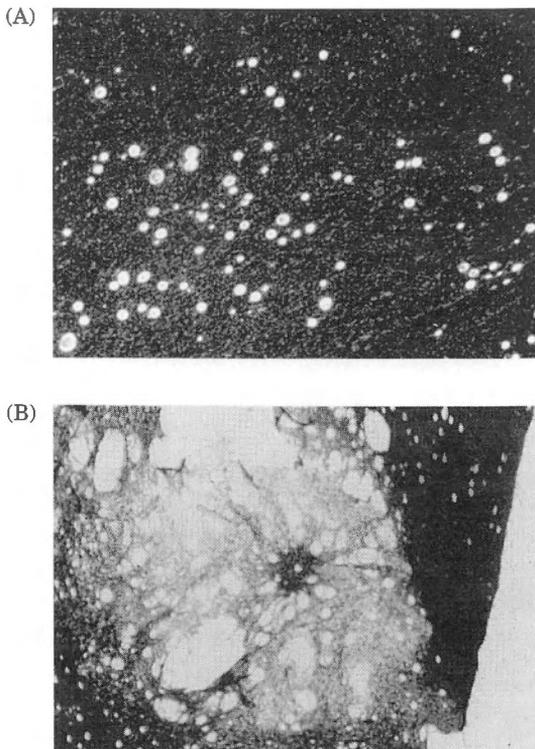


図 1. 精子によって形成されたウズラ卵黄膜内層の孔

(A) 胚盤以外の部分

(B) 胚盤部分

ⅢはGP-Ⅱのホモダイマーである。最近、ニワトリのGP-ⅠのcDNAがクローニングされ、chZPC (Waclawek *et al.*, 1998) またはgp42 (D89097: Takeuchi *et al.*, 1999) と名づけられた。ウズラのGP-Ⅰもクローニングされており (AB081506), ニワトリとはアミノ酸配列で90%のホモロジーを示している。一方、GP-Ⅱと思われる934アミノ酸残基からなるタンパクのcDNAもニワトリとウズラでクローニングされ、それぞれchkZP1 (AJ289697: Bausek *et al.*, 2000) とqZP1 (AB061520: Sasanami *et al.*, 2002) と名づけられた。

このように鳥類の卵黄膜内層は何種類かの糖タンパクで形成されているが、これらがどのようにして繊維を形成しているのか、また繊維の間隙を埋めている顆粒がどのタンパクに相当するのか、まだ分かっていない点である。

マウスの透明帯では、ZP2とZP3の2種類のタンパクが交互につながって長い繊維を形成し、ZP1のホモダイマーが繊維の間を架橋しているという構図が示されている (Greve and Wassarman, 1985)。マウスの精子はどの方向からでも透明帯に侵入するので、精子レセプターの役割を持つZP3が透明帯のすべての部分に均一に分布することは合理的に説明のつく現象である。鳥類のZPCやZP1が胚盤以外の部分にも存在するという事は、もしこれらのタンパクが単独で精子レセプターとしての機能を持っているとすると、合理的に説明しにくい現象である。

### 2-3. 構造の違い

胚盤以外の部分では卵子の原形質膜は不連続で、囲卵腔はなく卵黄球が卵黄膜内層と接しているか、内層に食い込んだりしているが、胚盤部分の卵子の原形質膜は微絨毛となって囲卵腔に突き刺さっている (Bakst and Howarth, 1977 a)。胚盤の周辺部には直径60~100 $\mu$ m、深さ20 $\mu$ mの丸い凹面状の小腔が80~120あり、この部分は微絨毛が少ない (Bakst and Howarth, 1977 a; Bakst, 1978)。この小腔はあたかも液体を含んでいるように見え、しかも位置的には孔が集中している内層の直下あたり、Bakst and Howarth (1977 b) は精子の先体反応を誘発する物質がこの部分にあると推察した。また、胚盤部分への精子の集中もこの小腔の液体による「走化性」として説明している (Howarth and Digby, 1973)。

胚盤部分の卵黄膜内層自体が他の部分と比べて薄く、繊維も細いという報告もある (Perry *et al.*, 1978)。鳥類の卵黄膜内層は卵胞と肝臓に由来するタンパクの複合体であり、ZPCは卵胞顆粒膜細胞が合成分泌しており

(Waclawek *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 1999; Kuroki and Mori, 1995; Pan *et al.*, 2001), ZP1は肝臓が合成分泌している (Bausek *et al.*, 2000; Sasanami *et al.*, 2002)。胚盤部分とそれ以外の部分で顆粒膜細胞の $^3$ Hチミジンの取り込みを比較すると、胚盤部分の方が多く、細胞増殖が盛んなことがわかる (Tischkau *et al.*, 1997)。これは胚盤から上皮成長因子のような細胞分裂促進因子が分泌されているためである (Volentine *et al.*, 1998)。胚盤部分を被っている顆粒膜細胞が細胞増殖の中心であるならば、ZPCの合成能は他の部分よりも低いに違いない。胚盤部分の卵黄膜内層が他の部分と比べて薄いという現象は、顆粒膜細胞によるZPCの合成分泌量が胚盤部分で少ないことに起因しているのかもしれない。

## 3. 精子レセプターの本体

### 3-1. マウスの場合

マウスでは以下の実験からZP3のO-結合オリゴ糖鎖が精子レセプターとしての機能を備えていることがわかった。

その1: 可溶化したZP3を精子とインキュベーションすることによって透明帯と結合する部分を被ってしまうと、その精子はもはや透明帯とは結合できなくなってしまう。この手法は遊離の精子レセプターが透明帯の精子レセプターと競合する点を利用しているので「競合アッセイ法」と呼ばれている。透明帯の他の構成成分であるZP1やZP2にはこのような効果はない (Bleil and Wassarman, 1980)。

その2: ZP3からN-結合オリゴ糖鎖を除去しても精子レセプター活性はそのままだが、O-結合オリゴ糖鎖を除去すると精子レセプター活性は消失する (Florman and Wassarman, 1985)。さらに、C末端近くのセリン残基に点突然変異を導入してO-結合オリゴ糖が形成されないようにしたZP3には精子レセプター活性がない (Chen *et al.*, 1998)。

その3: ZP3ノックアウトマウスにヒトZP3を遺伝子導入すると、そのマウスの透明帯にはヒトの精子ではなくマウスの精子が結合するようになる (Rankin *et al.*, 1998)。これは、導入された遺伝子から作られたZP3はヒト型のアミノ酸配列であるが、翻訳後修飾の過程でマウス型の糖鎖が付加されたためと解釈されており、精子との結合には糖鎖が認識部位となっていることの有力な証拠となっている。

### 3-2. 他の動物の場合

マウス以外の哺乳類の透明帯も、マウスと同様に3種類の糖タンパクで構成されている。初期の研究ではこれ

らのタンパクの命名に混乱があったが、アミノ酸配列の相同性から推定して、現在では ZPA グループ、ZPB グループ、ZPC グループに大別されている。マウスの ZP3 は ZPC グループに分類されている (Harris *et al.*, 1994)。

すべての動物で精子レセプターが ZPC グループに属しているわけではない (Prasad *et al.*, 2000)。例えばブタでは ZPB グループに属する ZP3 $\alpha$  と ZPC グループに属する ZP3 $\beta$  の複合体が精子レセプターの本体であり (Yurewicz *et al.*, 1998), しかもマウスとは異なり N-結合オリゴ糖鎖がその認識部位である (Yonezawa *et al.*, 1995; Nakano *et al.*, 1996)。ウサギの精子レセプターの候補となっている rc55 と呼ばれるタンパクも ZPB グループに属している (Lee *et al.*, 1993)。

### 3-3. 鳥類の場合

鳥類の精子レセプターは卵黄膜内層、特に胚盤を被っている部分に存在しているはずであるが、その本体はまだわかっていない。

ニワトリでは卵黄膜内層の可溶化物で前処理した精子は、内層を加水分解することができなくなる (Howarth, 1990)。内層の可溶化物からトリフルオロメタンスルホン酸で糖鎖を除去すると、このような阻止作用はなくなる (Howarth, 1992)。これらの研究から卵黄膜内層に含まれる糖タンパクの糖鎖部分が精子との結合に重要だと結論された。しかし卵黄膜内層の可溶化物との前処理によって精子表面の結合部位がブロックされたので精子と内層の結合が阻害されたという「競合アッセイ法」の解釈には、納得できない点もある。精子が内層と結合できなくなるような変化が前処理によって引き起こされたのかも知れない。精子表面の内層結合部位は精子の原形質膜にあると考えられるので、例えば先体反応によって原形質膜が剥がれ落ちると、その精子はもはや内層に結合できなくなるだろうし、加水分解もおこらないはずである。

内層を各種グリコシダーゼで処理して糖鎖を取り除いた結果、精子による加水分解には O-結合オリゴ糖鎖ではなく N-結合オリゴ糖鎖が重要であることがわかった。さらに WGA というレクチンで内層を前処理すると精子との反応が消失する。ConA というレクチンではそのような効果は認められなかった。これらのレクチンの糖鎖認識特性を考えると、卵黄膜内層の精子レセプターには N-アセチルグルコサミンをもった N-結合オリゴ糖が含まれていると推定することができるが (Robertson *et al.*, 1997; 2000), WGA が精子と内層との結合を阻害したのか、精子の先体反応の誘起を阻害したのか、あるいはその両方を阻害したのか、不明である。

さらに結合したレクチンによる単なる立体障害作用によって精子が内層のレセプタータンパクにアクセスできなくなったという解釈も成り立ち、結論は得られていない。

我々は産卵されたウズラ卵の卵黄膜内層から ZPC を精製し、これに対する抗体を作成した (Kuroki and Mori, 1995)。ウズラの精子レセプターの本体が ZPC であるならば、精子と内層をインビトロでインキュベーションする際に抗体を加えておけば、相互作用が阻害されるのではないかと考えたからである。事実、ZPC に対する抗体の添加によって内層の孔の数は有意に減少した (潘ら, 1999)。大豆トリプシンインヒビターの存在下で精子と内層との結合を観察したところ、ZPC に対する抗体は精子の結合を有意に阻害した。対照としてウサギ正常血清を添加した場合にはそのような阻害効果は認められないので、これは ZPC に対する抗体による特異的な効果であると言えよう。しかしこの結果だけではウズラの精子レセプターの本体が ZPC であると断定することは早計に過ぎる。上述のようにマウスの精子レセプターは ZP3 であるが、ZP2 に対する抗体を投与しても受精は阻害される (East *et al.*, 1984)。これは透明帯に抗体が結合したため、立体障害によって精子が透明帯に結合できなくなった結果と解釈されている。またブタでは ZP3 $\alpha$  は ZP3 $\beta$  との複合体として初めて精子レセプター活性をもつにもかかわらず (Yurewicz *et al.*, 1998), ZP3 $\alpha$  に対する抗体は透明帯と精子との結合を阻害するのに対し、ZP3 $\beta$  に対する抗体ではそのような効果が認められない (Sacco *et al.*, 1989)。

我々と同様の方法で内層の孔をニワトリで観察した Takeuchi *et al.* (2001) は、ZP1 に対する抗体を添加した場合でも孔の数が減少することを報告している。ウズラとニワトリでのこのような相違の原因は明らかでないが、精子レセプターの本体を同定するためには、抗体による阻害作用だけではなく、それ以外の方法による裏付けが必要であることは間違いない。

## 4. 受精後の変化

### 4-1. 卵黄膜内層の変化

哺乳類の卵子は多精子受精を防ぐために、1 匹の精子が透明帯を通過し、卵子の原形質膜と融合すると、他の精子が侵入できないような機構が備わっている。

マウスの場合、未受精卵と 2 細胞期の受精卵で透明帯から ZP3 を精製して「競合アッセイ法」をおこなったところ、未受精卵から精製した ZP3 だけが精子と透明帯との反応を阻害した。未受精卵と受精卵の透明帯の ZP3 の構造的違いに関する詳細はいまだ明らかではないが、

皮質粒から放出される酵素は ZP3 の O-結合オリゴ糖鎖を切断もしくは修飾していると考えられている (Bleil and Wassarman, 1988)。

アフリカツメガエルの場合にも、受精後の卵子に精子は結合できない (Grey *et al.*, 1976)。アフリカツメガエルの卵黄膜は他の動物と同様、数種類の糖タンパクで構成されているが、そのうちのひとつである ZPA グループに属する gp69/64 が、皮質粒から分泌されるタンパク分解酵素によって gp66/61 に変化したためである。排卵直後の卵子から精製した gp69/64 に精子レセプター活性があることは「競合アッセイ法」で示されたが (Tian *et al.*, 1997 a; 1997 b), 受精卵から精製した gp66/61 には精子レセプター活性がない (Tian *et al.*, 1999)。

鳥類の場合には多精子受精を拒否する機構はないとされているが、卵胞から得た卵子の卵黄膜内層のタンパクを、産卵した卵と比較すると、ZPC の分子量に大きな違いがある。ニワトリ (Steele *et al.*, 1994; Robertson *et al.*, 1997; Waclawek *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 1999) でもウズラ (Mori and Masuda, 1993) でも産卵した卵由来の ZPC は卵胞由来のものよりも電気泳動距離が長い。両方の ZPC から糖鎖を除去しても電気泳動距離の差は消失しないので、この違いは糖鎖によるものではない (Waclawek *et al.*, 1998)。

Takeuchi *et al.* (1999) はニワトリの ZPC で、cDNA から類推したアミノ酸配列を卵胞の ZPC から実際に読み取った N 末端配列と比較し、卵胞の ZPC は 20 残基のシグナル配列が除去されて、415 アミノ酸残基となることを報告した。しかしながら Waclawek *et al.* (1998) は産卵された卵の ZPC の N 末端がそれよりもさらに 26 残基下流にあることを示した。両者の結果を比較すると、卵胞の ZPC と産卵後の ZPC では N 末端のアミノ酸配列が異なっているということになる。

産卵されたウズラ卵の ZPC の分子量は 33,000、卵胞中では 35,000 である。これらの ZPC のアミノ酸配列を調べたところ、この違いは N 末端のアミノ酸 26 残基の消失にあることがわかった。卵胞から回収した内層を卵管ロート部に挿入したり、卵管ロート部の還流液で処理したりすると、このような ZPC の分子量の変化が再現できることから、卵管から分泌されるタンパク分解酵素が関与していることが示された (Pan *et al.*, 2000)。この酵素による切断部位は Gly-Ser-Arg の C 末端側であることも明らかにされた。ただしこのような変化は未受精卵で観察されていることで、精子の侵入とは無関係におこっている現象である。

鳥類の ZPC のこのような変化と精子レセプター活性の関係は明らかではないが、アフリカツメガエルでも、

gp43 と呼ばれる ZPC グループに属するタンパクが卵管から分泌されるタンパク分解酵素、オビダクチンによって Gly-Ser-Arg の C 末端側の切断を受けて gp41 に変化することが知られている (Kubo *et al.*, 1999)。排卵直後のアフリカツメガエルの卵子に精子は結合できない。オビダクチンによる修飾を受けて初めて卵黄膜に精子レセプター活性が現れてくる。この現象は、卵管に取り込まれるまで精子レセプターをマスクしていた gp43 が構造変化を起こすことによって卵黄膜の構成タンパクの位置に変化がおり、精子レセプターである gp69/64 が卵黄膜の表面に露出するからだと考えられている (Katagiri *et al.*, 1999)。しかし、gp43/41 の N-結合オリゴ糖鎖が精子との結合に重要だとする報告もあり (Vo and Hedrick, 2000)、いまだ結着を見ていない。

ウズラの ZPC においても同じ基質特異性を持つタンパク分解酵素によって N 末端側のアミノ酸が除去されているが、C 末端に近い部分にもオビダクチンの認識配列が存在しているので、ZPC は C 末端側でもプロセッシングを受けている可能性もある。いずれにせよ、皮質粒による多精子受精拒否の機構をもたない鳥類の卵子は、このような修飾によって余分な精子の侵入を防いでいるものと解釈されている。

#### 4-2. 卵黄膜外層の付着

排卵直後の卵子を精子とインビトロでインキュベートすると、胚盤を被っていた部分に孔があき、その孔から卵黄がもれてしまう (Howarth and Digby, 1973)。インビボではそのようなことはおきていない。卵子が卵管に取り込まれて受精が完了すると同時に、卵黄膜外層が付着して内層の孔の大きさを制限しているのである (Bain and Hall, 1969)。

卵黄膜外層は何層かの格子状の繊維でできており、3~8.5 $\mu$ m の厚さとなっている (Bellairs *et al.*, 1963; Jensen 1969)。化学的組成は、乾燥重量で約 60% のリゾチームと不溶性のオボムチン (Back *et al.*, 1982)、それに外層特異的な塩基性タンパクである VMO I (Back *et al.*, 1982) や VMO II (Kido *et al.*, 1992) であり、これらはオボムチンの繊維に強く結合している (Kido *et al.*, 1995)。

産卵されたニワトリの受精卵を観察すると、外層には内層の孔の数の 10 倍くらいの精子がトラップされている (Wishart, 1997)。これらの精子は先体反応を起こしていない (Bakst and Howarth, 1977 a)。つまり卵黄膜外層は精子のバリアーとして機能しており、これにトラップされた精子は受精には直接関与していないが、少なくとも受精の時にどれくらいの精子が卵子の周りに存在していたかの証拠となっている。これを利用して精液の評価や受精率の向上をはかる研究がすすめられている

(Wishart *et al.*, 2001)。

## 5. おわりに

「枯木に花咲くよりも生木に花咲くに驚け。石がもの言うより己がもの言うに驚け」とは、江戸時代の自然哲学者、三浦梅園の言葉である。人は往々常軌を逸した現象に珍しさを求めたがるものであるが、本当に驚くべきことは日常の中に隠されているということである。

精子が卵子に結合するという当たり前の現象に敢えて挑戦した Paul Wassarman 博士のマウス透明帯の研究は、人間の避妊ワクチンの開発という応用面では大いに貢献しているが、実際には、本当に驚くべきことがほんの少しわかりかけてきたところである。

透明帯の研究の鳥版ともいべき卵黄膜内層の研究は、絶滅の危機に瀕した希少鳥類の保護育成や、増殖し過ぎた種の個体数調節といった応用的研究に発展する可能性を秘めており、分子生物学的手法を使えばインビトロでタンパクを作らせることもできるようになったが(笹浪・森, 2002)、一方、なぜ胚盤に精子が集中するのかといった簡単な疑問にさえ答えることができないままである。そこで本稿では鳥類の受精における卵黄膜の役割を、胚盤を中心に据えて概説することによって解決の糸口を探ろうとしたが、もとより正解があるわけではない。今後の我々の研究に期待して頂きたい。

## 謝 辞

この総説は平成 13 年度日本家禽学会賞受賞課題「家禽の卵黄膜内層の形成および精子レセプターとしての機能に関する研究」の内容の一部に最近の知見を加えてまとめたものである。学会賞選考委員会および本稿をまとめる機会を与えて下さった編集委員会の諸先生方に深謝いたします。(家禽会誌, 39 : J121-J129, 2002)

## 引用文献

- Back JF, Bain JM, Vadehra DV and Burley RW. Proteins of the outer layer of the vitelline membrane of hen's eggs. *Biochimica et Biophysica Acta*, 705 : 12-19, 1982.
- Badyaev AV, Hill GE, Beck ML, Dervan AA, Duckworth RA, McGraw KJ, Nolan PM and Whittingham LA. Sex-biased hatching order and adaptive population divergence in a passerine bird. *Science*, 295 : 316-318. 2002.
- Bain JM and Hall JM. Observation on the development and structure of the vitelline membrane of the hen's egg : An electron microscope study. *Australian Journal of Biological Science*, 22 : 653-665, 1969.
- Bakst MR. Scanning electron microscopy of the vitelline membrane of the hen ovum. *Journal of Reproduction and Fertility*, 52 : 361-364. 1978.
- Bakst MR and Howarth B Jr. The fine structure of the hen's ovum at ovulation. *Biology of Reproduction*, 17 : 361-369. 1977 a.
- Bakst MR and Howarth B. Hydrolysis of the hen's perivitelline layer by cock sperm in vitro. *Biology of Reproduction*, 17 : 370-379. 1977 b.
- Bausek N, Waclawek M, Schneider WJ and Wohlrab F. The major chicken egg envelope protein ZP1 is different from ZPB and is synthesized in the liver. *Journal of Biological Chemistry*, 275 : 28866-28872. 2000.
- Bellairs R, Harkness M and Harkness RD. The vitelline membrane of the hen's egg : A chemical and electron microscopical study. *Journal of Ultrastructure Research*, 8 : 339-359. 1963.
- Bleil JD, Greve JM and Wassarman PM. Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida : Role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Developmental Biology*, 128 : 376-385. 1988.
- Bleil JD and Wassarman PM. Mammalian sperm-egg interaction : Identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell*, 20 : 873-882. 1980.
- Bleil JD and Wassarman PM. Galactose at the non-reducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85 : 6778-6782. 1988.
- Bramwell RK and Howarth B Jr. Preferential attachment of cock spermatozoa to the perivitelline layer directly over the germinal disc of the hen's ovum. *Biology of Reproduction*, 47 : 1113-1117. 1992.
- Bramwell RK, Marks HL and Howarth B. Quantitative determination of spermatozoa penetration of the perivitelline layer of the hen's ovum as assessed on oviposited eggs. *Poultry Science*, 74 : 1875-1883. 1995.
- Chen J, Litscher ES and Wassarman PM. Inactivation of the mouse sperm receptor, mZP3, by site-directed mutagenesis of individual serine residues located at the combining-site for sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 : 6193-6197. 1998.
- East IJ, Mattison DR. and Dean J. Monoclonal antibodies to the major protein of the mouse zona pellucida : Effects on fertilization and early development. *Developmental Biology*, 104 : 49-56. 1984.

- Florman HM and Wassarman PM. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell*, 41 : 313-324. 1985.
- Fofanova KV. Morphological data on polyspermy in chickens. *Federation Proceedings*, (Translation Suppl.) 24 : T239-T247. 1965.
- Greve JM and Wassarman PM. Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *Journal of Molecular Biology*, 181 : 253-264. 1985.
- Grey RD, Working PK and Hedrick JL. Evidence that the fertilization envelope blocks sperm entry in eggs of *Xenopus laevis* : Interaction of sperm with isolated envelopes. *Developmental Biology*, 54 : 52-60. 1976.
- Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz WC and Sacco AG. Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species : The ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Sequence*, 4 : 361-393. 1994.
- Howarth B. Avian sperm-egg interaction : Perivitelline layer possesses receptor activity for spermatozoa. *Poultry Sciences*, 69 : 1012-1015. 1990.
- Howarth B. Carbohydrate involvement in sperm-egg interaction in the chicken. *Journal of Receptor Research*, 12 : 255-265. 1992.
- Howarth B Jr and Digby ST. Evidence for the penetration of the vitelline membrane of the hen's ovum by a trypsin-like acrosomal enzyme. *Journal of Reproduction and Fertility*, 33 : 123-125. 1973.
- Jensen C. Ultrastructural changes in the avian vitelline membrane during embryonic development. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 21 : 467-484. 1969.
- Katagiri C, Yoshizaki N, Kotani M and Kubo H. Analysis of oviductal pars recta-induced fertilizability of coelomic eggs in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, 210 : 269-276. 1999.
- Kido S, Morimoto A, Kim F and Doi Y. Isolation of a novel protein from the outer layer of the vitelline membrane. *Biochemical Journal*, 286 : 17-22. 1992.
- Kido S, Doi Y, Kim F, Morishita E, Narita H, Kanaya S, Ohkubo T, Nishikawa K, Yao T and Ooi T. Characterization of vitelline membrane outer layer protein I, VMO-I : Amino acid sequence and structure stability. *Journal of Biochemistry*, 117 : 1183-1191. 1995.
- Kido S and Doi Y. Separation and properties of the inner and outer layers of the vitelline membrane of hen's eggs. *Poultry Science*, 67 : 476-486. 1988.
- Kido S, Janado M and Nunoura H. Macromolecular components of the vitelline membrane of hen's egg. I. Membrane structure and its deterioration with age. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 78 : 261-268. 1975.
- Kido S, Janado M and Nunoura H. Macromolecular components of the vitelline membrane of hen's egg. II. Physicochemical properties of glycoprotein I. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 79 : 1351-1356. 1976.
- Kido S, Janado M and Nunoura H. Macromolecular components of the vitelline membrane of hen's egg. III. Physicochemical properties of glycoprotein II. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 81 : 1543-1548. 1977.
- Koyanagi F, Masuda S and Nishiyama H. Acrosome reaction of cock spermatozoa incubated with the perivitelline layer of the hen's ovum. *Poultry Science*, 67 : 1770-1774. 1988.
- Kubo H, Matsushita M, Kotani M, Kawasaki H, Saido TC, Kawashima S, Katagiri C and Suzuki A. Molecular basis for oviductin-mediated processing from gp43 to gp41, predominant glycoproteins of *Xenopus laevis* egg envelopes. *Developmental Genetics*, 25 : 123-129. 1999.
- 黒木雅代. ウズラ卵における精子レセプターの特性に関する研究. 静岡大学大学院農学研究科修士論文. 1996.
- Kuroki M and Mori M. Origin of 33 kDa protein of vitelline membrane of quail egg : Immunological studies. *Development, Growth and Differentiation*, 37 : 545-550. 1995.
- Kuroki M and Mori M. Binding of spermatozoa to the perivitelline layer in the presence of a protease inhibitor. *Poultry Science*, 76 : 748-752. 1997.
- Lee VH, Schwoebel E, Prasad S, Cheung P, Timmons TM, Cook R and Dunbar BS. Identification and structural characterization of the 75-kDa rabbit zona pellucida protein. *Journal of Biological Chemistry*, 268 : 12412-12417. 1993.
- 森 誠. 卵黄膜の科学 (総説). *日本家禽学会誌*, 30 : 249-262. 1993.
- 森 誠・黒木雅代. 精子によって形成されるウズラ卵黄膜内層の孔について. *日本畜産学会報*, 68 : 54-60. 1997.
- Mori M and Masuda N. Proteins of the vitelline membrane of quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs. *Poultry Science*, 72 : 1566-1572. 1993.
- Mori M, Yamashita M, Yoshikuni M, Fukada S and Nagahama Y. Maturation-promoting factor and p34<sup>cdc2</sup> kinase during oocyte maturation of the Japanese quail. *Developmental Biology*, 146 : 246-249. 1991.
- Mortillo S. and Wassarman PM. Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments. *Development*, 113 : 141-149. 1991.
- Nakano M, Yonezawa N, Hatanaka Y and Noguchi S.

- Structure and function of the N-linked carbohydrate chains of pig zona pellucida glycoproteins. *Journal of Reproduction and Fertility*, 50 : 25-34. 1996.
- Okamura F and Nishiyama H. The passage of spermatozoa through the vitelline membrane in the domestic fowl, *Gallus gallus*. *Cell and Tissue Research*, 188 : 497-508. 1978.
- Olsen MW and Fraps RM. Maturation changes in the hen's ovum. *Journal of Experimental Zoology*, 114 : 475-489. 1950.
- 潘 建治・笹浪知宏・森 誠. 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. *日本家禽学会誌*, 36 : 364-370. 1999.
- Pan J, Sasanami T, Kono Y, Matsuda T and Mori M. Effects of testosterone on production of perivitelline membrane glycoprotein ZPC by granulosa cells of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Biology of Reproduction*, 64 : 310-316. 2001.
- Pan J, Sasanami T, Nakajima S, Kido S, Doi Y and Mori M. Characterization of progressive changes in ZPC of vitelline membrane of quail oocyte following oviductal transport. *Molecular Reproduction and Development*, 55 : 175-181. 2000.
- Patterson JT. Early development of hen's egg. *Journal of Morphology*, 21 : 101-134. 1910.
- Perry MM. Nuclear events from fertilisation to the early cleavage stages in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Journal of Anatomy*, 150 : 99-109. 1987.
- Perry MM, Gilbert AB, Evans AJ. The structure of the germinal disc region of the hen's ovarian follicle during the rapid growth phase. *Journal of Anatomy*, 127 : 379-392. 1978.
- Prasad SV, Skinner SM, Carino C, Wang N, Cartwright J and Dunbar BS. Structure and function of the proteins of the mammalian zona pellucida. *Cells Tissues Organs*, 166 : 148-164. 2000.
- Rankin T, Tong Z-B, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Nelson LM and Dean J. Human ZP3 restores fertility in Zp3 null mice without affecting order-specific sperm binding. *Development*, 125 : 2415-2424. 1998.
- Robertson L, Brown HL, Staines HJ and Wishart GJ. Characterization and application of an avian *in vitro* spermatozoa-egg interaction assay using the inner perivitelline layer from laid chicken eggs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 110 : 205-211. 1997.
- Robertson L, Wishart GJ and Horrocks AJ. Identification of perivitelline N-linked glycans as mediators of sperm-egg interaction in chickens. *Journal of Reproduction and Fertility*, 120 : 397-403. 2000.
- Sacco AG, Yurewicz EC, Subramanian MG and Matzat PD. Porcine zona pellucida : Association of sperm receptor activity with the  $\alpha$ -glycoprotein component of the Mr=55,000 family. *Biology of Reproduction*, 41 : 523-532. 1989.
- Sasanami T, Pan J and Mori M. Expression of perivitelline membrane glycoprotein ZP1 in the liver of Japanese quail (*Coturnix japonica*) after *in vivo* treatment with diethylstilbestrol. In press, 2002.
- 笹浪知宏・森 誠. ウズラ ZPC の分泌にはフェーリンの認識配列における C 末端ペプチドの切断が必要である. 鳥類内分泌研究会講演要旨. 31-32. 2002.
- Steele MG, Meldrum W, Brillard JP and Wishart GJ. The interaction of avian spermatozoa with the perivitelline layer *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101 : 599-603. 1994.
- Tain J, Gong H, and Lennarz WJ. *Xenopus laevis* sperm receptor gp69/94 glycoprotein is a homolog of the mammalian sperm receptor ZP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 : 829-834. 1999.
- Tain J, Gong H, Thomsen GH and Lennarz WJ. Gamete interactions in *Xenopus laevis* : Identification of sperm binding glycoproteins in the egg vitelline envelope. *Journal of Cell Biology*, 136 : 1099-1108. 1997 a.
- Tain J, Gong H, Thomsen GH and Lennarz WJ. *Xenopus laevis* sperm-egg adhesion is regulated by modifications in the sperm receptor and the egg vitelline envelope. *Developmental Biology*, 187 : 143-153. 1997 b.
- Takeuchi Y, Cho R, Iwata Y, Nishimura K, Kato T, Aoki N, Kitajima K and Matsuda T. Morphological and biochemical changes of isolated chicken egg-envelope during sperm penetration : Degradation of the 97-kilodalton glycoprotein is involved in sperm-driven hole formation on the egg-envelope. *Biology of Reproduction*, 64 : 822-830. 2001.
- Takeuchi Y, Nishimura K, Aoki N, Adachi T, Sato C, Kitajima K and Matsuda T. A 42-kDa glycoprotein from chicken egg-envelope, an avian homolog of the ZPC family glycoproteins in mammalian zona pellucida. *European Journal of Biochemistry*, 260 : 736-742. 1999.
- Tischkau SA, Neitzel LR, Walsh JA and Bahr JM. Characterization of the growth center of the avian preovulatory follicle. *Biology of Reproduction*, 56 : 469-474. 1997.
- Vo LH, Hedrick JL. Independent and heterooligomeric-dependent sperm binding to egg envelope glycoprotein ZPC in *Xenopus laevis*. *Biology of Reproduction*, 62 : 766-774. 2000.
- Volentine KK, Yao HH and Bahr JM. Epidermal growth factor in the germinal disc and its potential role in follicular development in the chicken. *Biology of Reproduction*, 59 : 522-526. 1998.

- Waclawek M, Foisner R, Nimpf J and Schneider WJ. The chicken homologue of zone pellucida protein-3 is synthesized by granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 59 : 1230-1239. 1998.
- Wassarman PM, Jovine L and Litscher ES. A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biology*, 3 : E59-E64. 2001.
- Wishart GJ. Quantitative aspects of sperm:egg interaction in chickens and turkeys. *Animal Reproduction Science*, 48 : 81-92. 1997.
- Wishart GJ, Staines HJ and Hazary RC. Evaluation of fertility : Biological basis and practical application. *World's Poultry Science Journal*, 57 : 309-314. 2001.
- Yonezawa N, Aoki H, Hatanaka Y and Nakano M. Involvement of N-linked carbohydrate chains of pig zona pellucida in sperm-egg binding. *European Journal of Biochemistry*, 268 : 25846-25856. 1995.
- Yurewicz EC, Sacco AG, Gupta SK, Xu N and Gage SA. Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 273 : 7488-7494. 1998.