

学 位 論 文 題 名

Studies on the Chorion Hardening upon Fertilization
in Medaka(*Oryzias latipes*)Eggs

(メダカ卵受精時の卵膜硬化に関する研究)

学位論文内容の要旨

多くの動物の卵は卵膜と呼ばれる構造によって覆われている。精子の侵入により卵付活が起こると、卵膜の物理的・化学的性質は大きく変化し、精子と卵との相互作用に大きな影響を与える。卵膜変化は多数の精子侵入を阻止し、正常な受精を保証するのに不可欠な役割を担っている。これまで、卵膜の変化が受精時に卵表層胞の外分泌により卵から放出される物質によって引き起こされることは多くの動物卵で報告されている。海産無脊椎動物や両生類の卵では受精時の卵膜の変化は「受精膜形成」として、また哺乳類の卵では「卵膜反応」として研究されており、魚卵でも早くから、受精による卵膜の変化は「卵膜硬化」として研究されてきた。近年、卵膜硬化はトランスグルタミナーゼによって触媒される卵膜タンパク質の架橋重合が原因となっていることが明らかとなった。この不活性状態のトランスグルタミナーゼは、既に受精前の卵膜内に強く結合して存在していることが報告されている。しかし、受精によって初めてトランスグルタミナーゼが活性化して、卵膜タンパク質の重合を開始するための仕組みは未だ解明されないままであった。一方、他の多くの動物と同様に、魚類においても受精時に卵の表層から新たに分泌される未知の成分が卵膜の変化を引き起こしているらしいことが多くの研究者によって報告されてきたが、そのことも証明されないままであった。そこで、卵膜硬化の開始機構を確かめること、及び、卵膜の硬化をもたらす成分を単離同定することを目的にメダカ卵を用いて研究を開始した。

はじめに、卵膜硬化に伴う卵膜構成タンパク質の変化をSDS電気泳動によって調べることから着手した(第1章)。その結果、メダカ未受精卵の卵膜は、主にZI-1,2 (73-77 kDa)とZI-3 (49 kDa)の2種類のタンパク質からなるが、媒精後5分には、61-62 kDaの新たなタンパク質が現れ、その後、132 kDa、114 kDaといった高分子量のタンパク質の出現を経て不溶性化することが観察された。抗卵膜タンパク質抗体を用いた免疫学的分析の結果、61-62 kDaは、ZI-1,2タンパク質の限定的分解によって、132 kDa、114 kDaのタンパク質は、ZI-1,2タンパク質成分にZI-3タンパク質が加わって重合することによって形成されている可能性が示された。すなわち、受精時の卵膜硬化という現象には、卵膜タンパク質の限定的分解と重合の過程があることを示した。また、卵膜除去したメダカの卵を付活させることによって採取した卵表層の分泌物を未受精卵卵膜に働かせると、受精時と同様な卵膜タ

ンパク質の変化が*in vitro*で誘起されることが判明した。しかも、受精時に分泌される表層胞の成分によっても同様な変化が引き起こされたことから、受精時に卵膜硬化を誘起する卵表層からの分泌物が表層胞成分であることを確かめることができた。さらに、この現象を*in vitro*で卵膜硬化の誘起活性を検定する方法として用いて卵表層分泌物の中からその活性成分の精製を試みた。また、予め熱処理した単離卵膜を用いることで、卵分泌物による卵膜タンパク質の限定的分解過程のみを見ることに成功し、生じた61-62 kDaタンパク質の量によってプロテアーゼ活性を定量的に測定することが可能になった(第2章)。この測定方法において、分泌物のプロテアーゼ活性はEDTA、EGTA、フェナントロリンといった金属キレート剤によって抑えられたが、セリン、システイン、アスパラギンプロテアーゼの阻害剤では抑えられなかった。EDTA処理によって失われた活性は、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} などの2価金属イオンの添加によって回復したことから、この活性はメタロプロテアーゼの一種であると推定した。SDS電気泳動上23.5 kDaの相対質量を示す単一成分のみを含む最終精製標品が卵膜硬化誘起活性とプロテアーゼ活性の両方の活性を示したことから、卵膜タンパク質を限定的に分解するプロテアーゼが卵膜硬化の引き金となっていると推論した。こうして精製された活性成分を卵の表層胞(cortical alveolus)から分泌されることからalveolinと命名した。

alveolinの分子の実体を明らかにするために、精製したalveolinの部分アミノ酸配列情報を基にalveolin cDNAをクローニングした(第4章)。cDNAの塩基配列解析から、alveolinは亜鉛結合性金属プロテアーゼのastacinファミリーに属することがわかった。さらにNorthern blot解析によって、alveolin mRNAはメダカの成体で卵巣でのみ発現していることを明らかにした。

第1章及び第2章において、メダカ卵の卵膜硬化に伴って卵膜タンパク質が変化すること、さらにその変化は卵表層から分泌される成分によって誘起されることを示した。第3章及び第4章において、メダカ卵表層胞から初めて単離同定した金属プロテアーゼalveolinが受精時における卵膜の硬化現象を誘起することを、そして、第5章では、alveolinによる卵膜タンパク質の切断とトランスグルタミナーゼによる重合反応との関係をまとめ、記述した。メダカの卵膜はZI-1,2 (73-77 kDa) とZI-3 (49 kDa) と呼ばれる2種類のタンパク質から構成されているが、卵膜硬化時には、alveolinによってZI-1,2が限定的切断を受け61-62 kDaとなった後、ZI-3と結合して132 kDaの中間産物を一過性に生成することが確かめられた。

以上、本研究はメダカ卵を用いて受精時の卵膜硬化を誘起する卵表層胞由来のプロテアーゼalveolinが存在すること、及び、それが受精時に囲卵腔に分泌され、卵膜の硬化を誘起する過程に作用することを分子レベルで世界に先駆けて解明したものである。さらに、卵膜タンパク質間の架橋構造形成による高分子化の初期過程を明らかにした。これらの知見は、従来不明であった魚類における受精時の卵膜変化の分子機構の理解に大きな貢献をするものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 範 男

副 査 教 授 高 橋 孝 行

副 査 教 授 山 下 正 兼

学 位 論 文 題 名

Studies on the Chorion Hardening upon Fertilization in Medaka(*Oryzias latipes*)Eggs

(メダカ卵受精時の卵膜硬化に関する研究)

近年、ヒトを含めた哺乳動物の生殖・発生に関する研究は活発であるが、個体発生の出発点である受精の分子機構については未だ不明な点が多い。多くの動物の卵は卵膜と呼ばれる構造によって覆われている。精子の侵入により卵付活が起こると、卵膜の物理的・化学的性質は大きく変化し、精子と卵との相互作用に大きな影響を与える。卵膜変化は多数の精子侵入を阻止し、正常な受精を保証するのに不可欠な役割を担っている。これまで、卵膜の変化が受精時に卵表層胞の外分泌により卵から放出される物質によって引き起こされることは多くの動物卵で報告されている。海産無脊椎動物や両生類の卵では受精時の卵膜の変化は「受精膜形成」として、また哺乳類の卵では「卵膜反応」として研究されており、魚卵でも早くから、受精による卵膜の変化は「卵膜硬化」として研究されてきた。近年、卵膜硬化はトランスグルタミナーゼによって触媒される卵膜タンパク質の架橋重合が原因となっていることが明らかとなった。この不活性状態のトランスグルタミナーゼは、既に受精前の卵膜内に強く結合して存在していることが報告されている。しかし、受精によって初めてトランスグルタミナーゼが活性化して、卵膜タンパク質の重合を開始するための仕組みは未だ解明されないままであった。一方、他の多くの動物と同様に、魚類においても受精時に卵の表層から新たに分泌される未知の成分が卵膜の変化を引き起こしていることが多くの研究者によって示唆されてきたが、証明されないままで放置されていた。本学位論文は、卵膜硬化の開始に関わる成分の同定をメダカ卵を用いて行い、新規のプロテアーゼを発見したものである。

学位論文は5章から構成されており、第1章では、卵膜硬化に伴う卵膜構成タンパク質の変化をSDS電気泳動によって調べ、メダカ未受精卵の卵膜は、主にZI-1,2 (73-77 kDa) とZI-3 (49 kDa) の2種類のタンパク質からなり、媒精5分後に、61-62 kDaの新たなタンパク質が現れ、その後、132 kDa、114 kDaといった高分子量のタンパク質の出現を経て不溶性化することを明らかにしている。また、抗卵膜タンパク質抗体を用いた免疫学的分析の結果、61-62 kDaは、ZI-1,2タンパク質の限定的分解によって、132 kDa、114 kDaのタンパク質は、ZI-1,2タンパク質成分にZI-3タンパク質が加わって重合することによって形成されている可能性を示唆した。このことは、受精時の卵膜硬化は、卵膜タンパク質の限定的分解と重合の過程があることを示している。第2章

では、卵膜除去したメダカの卵を付活させることによって採取した卵表層の分泌物を未受精卵卵膜に働かせると、受精時と同様な卵膜タンパク質の変化がin vitroで誘起されることも明らかにし、受精時に分泌される表層胞の成分によっても同様な変化が引き起こされたことから、受精時に卵膜硬化を誘起する卵表層からの分泌物が表層胞成分であることを明らかにした。この現象をin vitroで卵膜硬化の誘起活性を検定する方法として用いて卵表層分泌物の中からその活性成分の精製を試み、予め熱処理した単離卵膜を用いることで、卵分泌物による卵膜タンパク質の限定的分解過程のみを見ることに成功し、生じた61-62 kDaタンパク質の量によってプロテアーゼ活性を定量的に測定することが可能にした。第3章では、分泌物のプロテアーゼ活性はEDTA、EGTA、フェナントロリンといった金属キレート剤によって抑制されるが、セリン、システイン、アスパラギンプロテアーゼの阻害剤では抑制されないことを明らかにした。さらに、EDTA処理によって失われた活性は、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} などの2価金属イオンの添加によって回復したことから、この活性はメタロプロテアーゼの一種であると推定し、SDS電気泳動上23.5 kDaの単一成分にまで精製した。この最終精製標品が卵膜硬化誘起活性とプロテアーゼ活性の両方の活性を示したことから、卵膜タンパク質を限定的に分解するプロテアーゼが卵膜硬化の引き金となっていると考え、精製された活性成分を卵の表層胞 (cortical alveolus) から分泌されることからalveolinと命名した。第4章では、alveolinの分子の実体を明らかにするために、精製したalveolinの部分アミノ酸配列情報を基にalveolin cDNAをクローニングし、cDNAの塩基配列解析から、alveolinは亜鉛結合性金属プロテアーゼのastacinファミリーに属することを明らかにした。さらに、Northern blot解析によって、alveolin mRNAはメダカの成体で卵巣でのみ発現していることを明らかにした。第5章では、alveolinによる卵膜タンパク質の切断とトランスグルタミナーゼによる重合反応との関係をまとめ、記述した。メダカの卵膜はZI-1,2 (73-77 kDa) とZI-3 (49 kDa) と呼ばれる2種類のタンパク質から構成されているが、卵膜硬化時には、alveolinによってZI-1,2が限定的切断を受け61-62 kDaとなった後、ZI-3と結合して132 kDaの中間産物を一過性に生成するものと結論した。

以上、本研究はメダカ卵を用いて受精時の卵膜硬化を誘起する卵表層胞由来のプロテアーゼalveolinが存在すること、及び、それが受精時に卵腔に分泌され、卵膜の硬化を誘起する過程に作用することを分子レベルで世界に先駆けて解明したものである。さらに、卵膜タンパク質間の架橋構造形成による高分子化の初期過程を明らかにした。これらの知見は、従来不明であった魚類における受精時の卵膜変化の分子機構の理解に大きな貢献をするものである。

よって著者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格あるものと認める。