

学 位 論 文 題 名

Structures and Functions of Sperm Proteases Involved in Fertilization of the Ascidian *Halocynthia roretzi*

(原索動物の受精に関与する精子プロテアーゼの構造と機能)

学位論文内容の要旨

精子と卵との細胞間相互認識により開始される受精過程にプロテアーゼが関与することが知られている。特に、哺乳類精子トリプシン様酵素であるアクロシンは、その前駆体分子が、精子の卵透明帯（卵黄膜に相当）への結合に関与し、活性型分子種が卵透明帯に精子通過口を開ける溶解物質（ライシン）として機能すると考えられている。しかし、アクロシン遺伝子をノックアウトしたマウスにおいても、受精が成立することが判明し、アクロシンの受精における役割に疑問が投げかけられ、未知のプロテアーゼの存在が示唆されている。一方、アクロシンと相同性を示す精子プロテアーゼが、哺乳類以外の動物に存在するか否かは不明である。

私は、精子プロテアーゼの受精における役割を解明するために、受精実験が容易で、海産無脊椎動物の中でもほ乳類と卵の形態が似ている原索動物マボヤを材料として取り上げ、受精プロテアーゼの解析を行った。マボヤでは、精子の卵黄膜への結合から通過に至る過程に、精子のプロテアソームと2種類のトリプシン様酵素が関与することが、明らかにされている。2種類のトリプシン様酵素のうちの一方は、分子量や酵素学的性質において哺乳類のアクロシンに類似することから、マボヤアクロシンと命名し、他方は基質特異性において、哺乳類アクロシンとは異なることから、マボヤスペルモシンと命名した。

私は、スペルモシンとアクロシンの構造、機能解析と哺乳類精子中におけるスペルモシン様蛋白質の探索を目的に研究を行った。マボヤ精子から両酵素を精製し、アミノ酸配列の一部を明らかにした。このアミノ酸配列をもとにオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、マボヤ卵精巣から作製したcDNAライブラリーを用いて、両酵素のcDNAのクローニングを行った。マボヤプレプロアクロシンは、卵精巣に特異的に発現しており、catalytic triadを構成するHis-76、Asp-132、Ser-227の近傍では、キモトリプシン型セリンプロテアーゼと高い相同性があった。ホ乳類のアクロシンとは、33～35%の相同性を示した。また、Cysの位置からホ乳類のアクロシンと同様、L鎖、H鎖の2本のポリペプチド鎖により構成されることが示唆された。さらに、Asn-型糖鎖の結合配列の存在と、透明帯への結合にかかわる塩基性アミノ酸対の存在が確認された。精製マボヤアクロシンのアミノ酸組成分析の結果より、活性型マボヤアクロシンのC末端は、Arg-287と推定されることから、ホ乳類のアクロシンと同じ

くC末端側でプロセッシングが行われると考えられる。

私は、解明されたマボヤアクロシンの構造をもとに、卵黄膜への結合能とその結合分子の解析を行った。透明帯との結合能を有する塩基性アミノ酸対に相当する、Lys-56,His-57をアラニンに置換したペプチドを合成して、ペプチドを96穴ウェルに吸着させ、そこにビオチン化した卵黄膜成分を反応させ、ELISA法により検出した。この結果、2つの塩基性アミノ酸をアラニンに置換したペプチドでは、卵膜成分結合能が低下することが示された。また、マボヤプロアクロシンには、完全長のCUBドメインが1ヶ所と不完全長のCUBドメインが1ヶ所存在する。CUBドメインを有する分子は、透明体への結合能があることが報告されていることから、本研究では、完全長（CUB1）と不完全長

（CUB2）の各CUBドメインのペプチドを合成し、受精阻害実験と卵黄膜への結合実験を行った。受精阻害実験では、CUB1ペプチドで、著しい受精の阻害が確認された。次に、このペプチドをアガロースゲルビーズに固定化し、卵黄膜成分中のCUBドメイン結合分子を精製した。その結果、CUB1ペプチドに特異的に結合する新規の分子が4つ得られた。

スペルモシンの1次構造を解析した結果、血漿カリクレイン（マウス血漿カリクレインと32%相同）との相同性が最も高く、哺乳類のアクロシンに特徴的に見られるAsn型糖鎖の結合配列や、塩基性アミノ酸対も存在しないことがわかった。スペルモシンは、還元条件下のSDS-PAGEでは、分子量約27kのバンドを与え、非還元条件下のSDS-PAGEでは、約30kと40kのバンドを与える。非還元条件下で得られたバンドを用いて、プロテインシークエンサーでN末端のアミノ酸配列の解析を行った結果、スペルモシンは、2種類のL鎖（23～128残基目 [SL1] と、97～128残基目 [SL2] ）のいずれかを有する2つのマボヤスペルモシン分子種が存在することが明らかになった。この2つのL鎖を比較すると、プロリンを多く含む配列（SLP領域）の有無に特徴があると思われる。プロリン残基は分子間の結合に関与することがよく知られていることから、SL1で構成されるスペルモシンは卵黄膜への結合能を有する可能性が考えられる。本研究では、スペルモシンのL鎖のGST融合タンパク質を作製し、その卵黄膜への結合能をpull-down assayにより調べた。この結果、プロリンリッチな部分と特異的に結合する卵黄膜成分が存在することが明らかになった。また、抗スペルモシン抗体を用いたマウス精巣上体のウエスタンブロット解析からスペルモシン様蛋白質がマウスにも存在するという予備的な知見を得、マボヤ以外の動物にも、スペルモシンが存在することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	横沢	英良
副査	教授	長澤	滋治
副査	助教授	澤田	均
副査	助教授	高橋	和彦

学位論文題名

Structures and Functions of Sperm Proteases Involved in Fertilization of the Ascidian *Halocynthia roretzi*

(原索動物の受精に関与する精子プロテアーゼの構造と機能)

受精過程にプロテアーゼが関与することは古くから知られている。特に、哺乳類精子トリプシン様酵素アクロシンは、その前駆体分子が、精子の卵透明帯（卵黄膜に相当）への結合に関与し、活性型分子が卵透明帯に精子通過口を開ける溶解物質（ライシン）として機能すると考えられてきた。しかし、アクロシン遺伝子のノックアウトマウスにおいても受精が成立することが最近判明し、アクロシンの受精における機能に疑問が投げかけられている。一方、哺乳類以外の動物において、アクロシンホモログが存在するか否かも明らかにされていおらず、受精におけるアクロシンの機能についての一般性についても不明な点が多い。

当生化学研究室においては、精子と卵を多量に入手できるという利点に加えて、哺乳類と比較してその受精実験が容易であるという利点から、脊索動物門原索動物マボヤを研究材料とした研究を行ってきた。そして、精子の卵黄膜への結合から通過に至る過程に、2種類の精子トリプシン様酵素が関与することを明らかにしている。そのうちの一方の酵素は、分子量や酵素学的性質が哺乳類アクロシンに類似することから、マボヤアクロシンと命名され、他方は基質特異性において哺乳類アクロシンとは異なることから、マボヤズベルモシンと新規に命名されている。しかし、これらの酵素の一次構造に関する知見は得られておらず、受精における機能も充分検討されていなかった。

本学位論文は、アクロシンホモログの cDNA クローニングを哺乳類以外の動物から行った初めての論文である。その構造解析から、マボヤアクロシンはトリプシンファミリーに属するセリンプロテアーゼであること明示し、また、アクロシンに特徴的な N 末端側の塩基性アミノ酸対の存在を明らかにした。さらに CUB ドメインと呼ばれる細胞間相互作用に関わる領域をその前駆体の C 末端側に 2 ケ所有することを示している。そのうちの N 末端側の CUB ドメインは、卵黄膜に結合する活性を有していることを示した。また、その結合蛋白質の同定も行っている。哺乳類のアクロシンには CUB ドメインは存在せず、ホヤに特徴的に見られる構造であるが、哺乳類においても、その領域は卵透明帯への結合に関わることが示唆されている。

一方、マボヤスペルモシンに関しては、マボヤアクロシンと同様に、トリプシンファミリーに属するセリンプロテアーゼであるが、アクロシンに特徴的な塩基性アミノ酸対はなく、また全体的にアクロシンとの相同性が低いことが示された。これらの結果は、マボヤスペルモシンが確かに新規の酵素であることを示している。また、スペルモシンには、H 鎖に加えて全長の L 鎖を有するもの (L 1) とトランケート型の L 鎖を有するもの (L 2) の 2 種類の分子種が存在することを明らかにしている。L 1 にはプロリンに富む領域があるが、L 2 にはそれが存在しない。このプロリンに富む領域は、卵黄膜への結合活性があることを明らかにした。さらに、この L 1 に特異的に結合する卵黄膜成分の同定も行っている。また、スペルモシン様酵素が哺乳類に存在するか否かに関しても、抗スペルモシン抗体を用いたウエスタンブロット解析により検討を行い、哺乳類にもスペルモシン様酵素が存在する可能性を示した。

本学位論文に記載されている上記の内容は、動物の生殖生化学分野の進展、ひいては人類における受精機構の解明や不妊治療薬／避妊薬の開発の基礎となる研究であり、博士（薬学）の学位を授与するに値する内容であると判断される。