

学位論文題名

受精におけるユビキチンシステムの機能解析

学位論文内容の要旨

ユビキチン-プロテアソームシステムは、細胞内の選択的タンパク質分解に重要な役割を果たしている。このシステムは、低分子量（約8kDa）のタンパク質ユビキチンを、E1（ユビキチン活性化酵素）、E2（ユビキチン結合酵素）、E3（ユビキチンリガーゼ）からなるユビキチン化酵素群が基質タンパク質に共有結合させる系（ユビキチンシステム）と、ポリユビキチン化によって標識されたタンパク質を巨大分子複合体26Sプロテアソームが分解する系（プロテアソームシステム）の2つの系からなる。しかし、細胞外においてユビキチン-プロテアソームシステムが機能する報告例、分子機構は今までに見つかっていない。当研究室では、受精に伴って精子からプロテアソームが放出されること、プロテアソーム阻害剤により受精が阻害されることを明らかにし、精子の卵黄膜通過にプロテアソームが関与していると提唱した。さらに、マボヤ卵黄膜の主成分であるHrVC70タンパク質が*in vitro*でユビキチン化と26Sプロテアソームによる分解を受けることを明らかにした。本研究では、受精におけるユビキチン-プロテアソームシステムの役割をさらに解明するために、受精の場における卵黄膜タンパク質HrVC70のユビキチン化の様式、精子由来のユビキチン化酵素群の分離・精製とその機能を解析した。

卵黄膜が受精の場においてユビキチン化されるか否かを調べるために、受精前と受精時のマボヤ卵を用いて、マルチユビキチン鎖を特異的に認識するFK2抗体による蛍光抗体染色を行った。その結果、受精卵で濾胞細胞が存在する箇所のみでFK2抗体が反応することが明らかになった。この結果は、精子が卵黄膜を通過する部位（濾胞細胞が付着した箇所）で特異的に卵黄膜のユビキチン化が起きていることを示している。

次に、卵黄膜タンパク質HrVC70が受精時にユビキチン化されるか否かを調べた。マボヤ受精卵と未受精卵から調製した卵黄膜を用いて、HrVC70ペプチドに対する抗体とFK2抗体によるウェスタンブロット解析を行った。その結果、抗HrVC70抗体を用いた場合、未受精卵由来の卵黄膜ではHrVC70のみのバンドが検出されるが、受精卵由来の卵黄膜では高分子量領域にもバンドが認められ、そのバンドがFK2抗体とも反応した。以上の結果から、HrVC70が受精時に確かにユビキチン化されると結論した。

受精時に卵黄膜のユビキチン化を行う酵素群の由来を調べるため、未受精卵からの抽出液、精子ホモジネートの遠心分離（500 x g）により得られる膜画分と細胞質画分、および、精子をpH 9.6の海水で処理し活性化させた時に得られる上清画分（精子放出液）をそれぞれHrVC70と ^{125}I -ユビキチン存在下にユビキチン化反応を行い、ついでSDS-PAGEとオートラジオグラフィーを行い、HrVC70のユビキチン化の有無を調べた。その結果、精子膜画分と精子放出液にHrVC70のユビキチン化活性が認められた。精子放出液中にユビキチン化活性が検出されたことから、受精時に、卵との結合に伴って起こる精子の活性化の際に、ユビキチン化酵素群が精子から分泌されると考えられる。なお、26Sプロテアソームも精子放出液中に検出される。

また、精子放出液を用いて、ユビキチンの存在を抗ユビキチン抗体によるウェスタンブロット解析によ

って、また、ATPの存在をルシフェラーゼ測定法によって調べた結果、ユビキチンもATPも精子放出液に検出された。以上の結果から、HrVC70のユビキチン化に必要とされるシステムの構成因子、すなわち、ユビキチン化酵素群、ユビキチンおよびATPが受精時に精子から放出されることが明らかになった。

HrVC70のユビキチン化部位を同定するために、HrVC70に存在する2つのリジン残基を含む領域、すなわち、K234を含むペプチド(227-270)とK636を含むペプチド(585-661)のGST融合タンパク質と、それぞれのリジン残基をアルギニンに置換した変異体を発現し、精子放出液によるユビキチン化の有無を調べた。その結果、K234を含むペプチドのみがユビキチン化され、そのK234をアルギニンに置換した変異体ではユビキチン化されなかった。以上の結果から、VC70のユビキチン化部位はK234であると結論した。

VC70に対するユビキチン化酵素群が精子放出液に存在することが明らかになったので、精子放出液を出発材料とし、従来のE1、E2、E3酵素群の精製方法に準拠して、ユビキチン化酵素群の分離を試みた。DEAEセルロースクロマトグラフィー、ユビキチン固定化アガロースビーズによるクロマトグラフィー、ついでグリセロール密度勾配遠心分離法による分画を行った結果、分子量700kDa付近に、HrVC70のユビキチン化活性が検出された。

次に、700kDaグリセロール活性画分の諸性質を調べた。活性画分を $[^{125}\text{I}]$ -ユビキチンと共にインキュベートするとSDS-PAGEおよびオートラジオグラフィによってユビキチンと結合しているシグナルが確認でき、また活性画分はチオエステル結合を阻害するDTTの存在下ではユビキチン化活性を持たなかった。また活性はATPおよびマグネシウムイオン(20 mM)の非存在下では示さず、ATPを分解するアピラーゼの添加によって阻害された。さらに、活性の至適pHは海水のpH 8付近であり、海水に含まれるイオンのうちカルシウムイオンを除いた場合は活性が顕著に低下した。また、活性画分はHrVC70のみをユビキチン化し、熱変性リゾチームをユビキチン化できなかった。以上の結果から、精子から細胞外に放出されるユビキチン化酵素群は、細胞内におけるユビキチン化機構と同様に、ATPとマグネシウムイオンの存在を必要とし、かつ、ユビキチンとのチオエステル結合を経る機構で働いていること、本酵素群は海水中で十分に活性を発現できること、さらに、HrVC70に対して高い基質特異性を有する酵素の存在が明らかになった。

700kDaグリセロール活性画分はユビキチン-アガロースビーズからDTTによって溶出されることから、ユビキチンとチオエステル結合を形成できるE1酵素とE2酵素を含むと考えられるので、次に、E3酵素の存在について検討した。E3酵素と結合すると思われるHrVC70のユビキチン化されるK234を含むペプチドを固定化したアガロースビーズを作成し、上記の精製においてユビキチン-アガロースビーズをDTTの後にpH 9.0で洗浄した画分を用いてクロマトグラフィーを行った。その結果、K234ペプチド-アガロースビーズの吸着画分が、700kDaグリセロール活性画分のユビキチン化活性を濃度依存的に促進することが明らかになった。以上の結果は、HrVC70に対するE3酵素の存在を示している。以上の結果から、E1/E2/E3からなるユビキチン化酵素群が受精時に精子から放出され、卵黄膜のユビキチン化を行うことが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	横沢	英良
副査	教授	澤田	均
副査	助教授	松本	健一
副査	助教授	川原	裕之

学位論文題名

受精におけるユビキチンシステムの機能解析

ユビキチン・プロテアソームシステムは、細胞内の選択的タンパク質分解に重要な役割を果たしている。このシステムは、低分子量タンパク質ユビキチンを、E1（ユビキチン活性化酵素）、E2（ユビキチン結合酵素）、E3（ユビキチンリガーゼ）からなるユビキチン化酵素群が基質タンパク質に共有結合させる系（ユビキチンシステム）と、ポリユビキチン化によって標識されたタンパク質を巨大分子複合体26Sプロテアソームが分解する系（プロテアソームシステム）の2つからなる。一方、原索動物マボヤでは、受精に伴って精子からプロテアソームが放出されること、受精がプロテアソーム阻害剤により阻害されること、*in vitro*で卵黄膜タンパク質がユビキチン化され、26Sプロテアソームにより分解を受けることが明らかになっており、細胞外においてユビキチン・プロテアソームシステムが機能すると推論されている。

本論文提出者は、原索動物マボヤの受精の場における卵黄膜タンパク質のユビキチン化の様式や、精子由来のユビキチン化酵素群に関する一連の研究を展開し、以下の成果をおさめた。

(1) マルチユビキチン鎖を特異的に認識するFK2抗体を用いた蛍光抗体染色により、マボヤ受精卵において、濾胞細胞が存在する箇所だけにFK2抗体が反応することを見出し、精子が卵黄膜を通過する部位（濾胞細胞が付着した箇所）で特異的に卵黄膜のユビキチン化が起きていることを明らかにした。

(2) マボヤ受精卵と未受精卵から調製した卵黄膜を用いて、卵黄膜主要成分HrVC70由来ペプチドに対する抗体とマルチユビキチン鎖特異的FK2抗体によるウェスタンブロット解析を行い、受精時にHrVC70がユビキチン化されることを明らかにした。

(3) HrVC70をユビキチン化する活性が、精子膜画分と精子放出液（精子をpH 9.6の海水で処理して活性化させた時に得られる上清画分）に存在することを見出し、受精時に卵との結合によって起こる精子の活性化に伴って、ユビキチン化酵素群が精子

から分泌されると提案した。さらに、ユビキチンもATPも精子放出液中に存在することを明らかにした。

(4) HrVC70に存在する2つのリジン残基を含む領域、すなわち、K234を含むペプチド(227-270)とK636を含むペプチド(585-661)のGST融合タンパク質と、それぞれのリジン残基をアルギニンに置換した変異体を作成し、精子放出液によりK234を含むペプチドのみがユビキチン化され、そのK234をアルギニンに置換した変異体ではユビキチン化されないことを見出し、VC70のユビキチン化部位はK234であると結論した。

(5) 精子放出液を出発材料とし、DEAE セルロースクロマトグラフィー、ユビキチン固定化アガロースクロマトグラフィー(ジチオスレイトール溶出画分)およびグリセロール密度勾配遠心分離を行い、HrVC70をユビキチン化する酵素を精製した。本酵素の分子量は分子量700 kDaであり、活性発現にATP、マグネシウムイオンおよびカルシウムイオンの存在を必要とし、活性の至適pHは海水のpH 8付近であり、チオエステル結合形成阻害剤ジチオスレイトールやATP分解酵素アピラーゼの添加によって活性が阻害されることを明らかにした。また、本酵素がHrVC70のみをユビキチン化し、熱変性リゾチームをユビキチン化できないことを明らかにした。さらに、ユビキチン-アガロースクロマトグラフィーのpH 9.0溶出画分を用いて、K234を含むペプチドを固定化したアガロースカラムによるクロマトグラフィーを行い、E3酵素を単離した。そして、本E3酵素が700 kDaユビキチン化酵素の活性を濃度依存的に促進することを明らかにした。以上の結果から、E1/E2/E3からなるユビキチン化酵素群が受精時に精子から放出され、卵黄膜のユビキチン化を行うと提案した。

以上の新知見およびそれらを得るために用いた新研究方法は、受精における卵黄膜のユビキチン化の機構や精子由来のユビキチン化酵素系の理解にとどまらず、細胞外でのユビキチン-プロテアソームシステムによる細胞機能の制御機構を理解する上で重要な寄与をなすものである。

審査委員一同このことを高く評価し、本論文提出者が博士(薬学)の称号を受けるにふさわしいものと一致して判断した。