

## 学位論文題名

原索動物ホヤ類の卵黄膜上の精子レセプターの  
構造と機能に関する研究

## 学位論文内容の要旨

雌雄同体であるマボヤ(*Halocynthia roretzi*)やカタユレイボヤ(*Ciona intestinalis*)など多くのホヤ類は、自家不和合性を示す。この自家不和合性は、精子と卵黄膜の間の自己非自己認識機構に基づいていることが、明らかとなっている。また、マボヤの自家不和合性は、卵成熟段階で獲得され、酸処理により消失することが分かっている。そして、分子量約 70kDa のマボヤ卵黄膜タンパク質 HrVC70 は、卵成熟過程で卵黄膜における含有量が増加すること、ならびに酸処理によって卵黄膜から遊離することが見いだされてきた。以上のことから、HrVC70 がマボヤの自家不和合性に関与している可能性が考えられた。しかし、HrVC70 がマボヤの受精に関与する直接的な証拠は得られていなかった。そこで、最初に抗 HrVC70 抗体を用いて、受精阻害実験を行った。その結果、抗 HrVC70 抗体によってマボヤの受精が阻害されることが明らかとなった。次に、HrVC70 をアガロースビーズに固定化し、アガロースビーズに結合する自己と非自己の精子の数を調べた。その結果、自己の精子よりも、非自己の精子の方が HrVC70 に多く結合することが明らかとなった。また、受精時に精子を自己あるいは非自己の HrVC70 で前処理すると、自己の HrVC70 で処理した精子よりも非自己の HrVC70 で処理した精子の方が、受精率が低下することを見いだした。これらの結果は、HrVC70 がマボヤの受精において、自己と非自己の精子を直接識別していることを示している。

HrVC70 は、現在までマボヤ以外の生物では見つかっていなかった。そのため、HrVC70 の自家不和合性における一般性を検証するために、マボヤ以外のホヤ類において HrVC70 ホモログを探索することにした。そこで、マボヤと同じ *Halocynthia* 属で、進化的に最も近いと考えられているアカボヤに着目し、アカボヤの受精における自家不和合性とそれに関与する分子について調べた。その結果、アカボヤはマボヤの場合と同様に、極めて厳格な自家不和合性を示すことが明らかとなった。また、アカボヤの自家不和合性は、卵成熟段階で獲得され、酸処理によって消失することも明らかとなった。これらの結果は、アカボヤもマボヤの場合と同様の自家不和合性の機構を有することを示唆している。次に、アカボヤの未成熟卵と成熟卵の卵黄膜成分を SDS-PAGE により比較したところ、分子量約 80 kDa のタンパク質 (HaVC80) が、未成熟卵と比較して成熟卵の卵黄膜に非常に多く存在することが判明した。さらに、この HaVC80 は、卵黄膜を酸処理することによって遊離することも明らかとなった。これらの HaVC80 に関する結果は、マボヤにおける HrVC70 の場合と類似している。また、HaVC80 の N 末端アミノ酸 20 残基の配列を解析した結果、HaVC80 が HrVC70 のホモログタンパク質であることが明らかとなった。以上の事実から、アカボヤの受精においては、HaVC80 が、マボヤの受精における HrVC70 の場合と同様の役割を担っていると考えられる。

HrVC70 は、前駆体タンパク質 HrVC120 のプロセッシングにより生成すること

が明らかとなっている。そこで、HaVC80にも前駆体タンパク質が存在すると考え、アカボヤ生殖巣 cDNA ライブラリーから HaVC80 前駆体遺伝子のクローニングを行った。クローニングの結果、単離されたクローンは 3,726 塩基からなり、そのオープンリーディングフレームは 1,208 アミノ酸をコードすることが明らかとなった。この HaVC130 と名付けた遺伝子産物は、N 末端側から、シグナル配列、14 回の EGF 様繰り返し配列、哺乳類の卵透明帯にみられる ZP ドメイン、そして C 末端側に 1 回膜貫通ドメインを有している。HaVC130 は、HrVC120 と 83.4% と非常に高い相同性を示すが、HrVC120 の場合の 13 回よりも 1 回多い 14 回の EGF 様繰り返し配列を有する点において、特徴的な違いが見られた。さらに、各組織における HaVC130 遺伝子の発現量をノーザンブロット解析によって調べたところ、HaVC130 遺伝子は生殖巣に極めて特異的に発現していることが明らかになった。以上の結果は、HaVC80 が受精に深く関わる因子であることを示唆している。

HrVC70 マボヤの自家不和合性にそれぞれ関与することから、これらのアミノ酸配列が個体間で異なっている可能性が考えられる。そこで、9 個体のマボヤの生殖巣から mRNA を調製し、RT-PCR 法によって HrVC70 領域を増幅して、個体間の配列を解析した。その結果、HrVC70 は個体ごとに数カ所のアミノ酸置換が起こっていることが明らかとなった。また、5 個体のアカボヤの生殖巣から、HaVC80 領域について個体間の配列を解析することによって、HaVC80 の分子多型についても検討した。その結果、HrVC70、HaVC80 共に個体ごとに配列が異なることが判明した。多型領域が、EGF 様ドメインの第 3Cys と第 4Cys の間、ならびに EGF 様ドメイン連結部分に見られる点は、HrVC70 と HaVC80 の場合で同じであったが、EGF 領域の第 1Cys と第 2Cys の間にもアミノ酸置換が多く起こっている点は、HaVC80 の場合のみ見られる特徴であった。EGF 様繰り返し配列をもつ分子においては、1 残基のアミノ酸の違いが分子間認識に大きな影響を与えることが、膜タンパク質である Notch や Delta などによく知られている。以上の事実は、HrVC70 と HaVC80 が個体間の認識に関わっていることの構造的支持を与えている。また、HrVC70 と HaVC80 では、その分子認識機構が多少異なる可能性が考えられる。

HaVC130 と HrVC120 との間に非常に高い相同性が見られるにもかかわらず、EGF 様繰り返し配列の回数が異なることは、分子進化や種分化の観点から非常に興味深い。そこで、HaVC130 のゲノム DNA 配列を決定し、すでに明らかになっている HrVC120 のゲノム DNA 配列と比較することにより、HrVC120/HaVC130 遺伝子の分子進化について考察した。決定した DNA 配列から、HaVC130 ゲノム DNA は 5,494 塩基からなり、23 個のエキソンにより構成されていることが明らかになった。さらに、HrVC130 と HrVC120 のゲノム DNA 配列を比較した結果から、(1)元来 6 個の EGF 様繰り返し構造からなるプロトタイプの VC70/80 様タンパク質が存在し、(2)その 5 番目と 6 番目の EGF 様領域が 1 つのセットとなって重複を繰り返すことによって、12 個の EGF 様繰り返し構造からなる HrVC70 が生成し、さらに、(3)HrVC70 の 8 番目の EGF 様ドメインが HaVC80 の 8,9 番の EGF 様ドメインに重複することによって、HaVC80 が生成したという分子進化に関する仮説を提案した。

今後、本研究により解明された精子レセプターと類似の分子が、哺乳類の受精においても重要な機能を果たしているかについて検討することも今後の重要な課題である。

# 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

## 原索動物ホヤ類の卵黄膜上の精子レセプターの 構造と機能に関する研究

原索動物ホヤ類に属するマボヤ (*Halocynthia roretzi*)は、雌雄同体にもかかわらず、受精における自家不和合性を示す。この自家不和合性は、卵を取り巻く卵黄膜と精子との間の自己と非自己の認識に基づいている。古くから、マボヤの自家不和合性は卵成熟段階で獲得され、卵黄膜の酸処理により消失することが明らかにされていたが、最近、マボヤ卵黄膜上に存在する精子レセプターHrVC70 蛋白質 (分子量約 70 kDa) が、卵成熟過程で含有量が増加することや酸処理により卵黄膜から遊離することから、マボヤの受精における自家不和合性に関与する可能性が提唱されている。

本論文提出者は、マボヤ及び、マボヤと進化的に近いと考えられているアカボヤ (*Halocynthia aurantium*) に着目し、マボヤ HrVC70 及びアカボヤ HrVC70 ホモログ (HaVC80) の受精における自家不和合性への関与、HrVC70 及び HaVC80 の個体レベルでの分子多型、HaVC80 前駆体蛋白質 HaVC130 のドメイン構造とゲノム構造、さらに、HrVC70 及び HaVC80 の分子進化に関する一連の研究を展開し、以下の成果をおさめた。

(1) 抗 HrVC70 抗体を用いてマボヤの受精阻害実験を行い、この抗体によりマボヤの受精が阻害されること、アガロースビーズに固定化した HrVC70 に、自己の精子よりも非自己の精子の方が多く結合すること、さらに、自己の HrVC70 で前処理した精子よりも、非自己の HrVC70 で前処理した精子の方が、マボヤの受精率が低下することを明らかにし、マボヤの受精において、HrVC70 が自己と非自己の精子を直接識別していると結論した。

(2) 自家不和合性を示すマボヤに進化的に近いと考えられているアカボヤが、極め

て厳格な自家不和合性を示すこと、その自家不和合性は卵成熟段階で獲得され、卵黄膜の酸処理によって消失することを明らかにした。さらに、アカボヤの場合は、分子量約 80 kDa の蛋白質 (HaVC80) が、未成熟卵と比較して成熟卵の卵黄膜に非常に多く存在すること、HaVC80 が卵黄膜の酸処理で遊離することを明らかにし、HaVC80 がアカボヤの受精における自家不和合性に関与していると推論した。

(3) アカボヤ生殖巣 cDNA ライブラリーを用いて、HaVC80 前駆体蛋白質 (HaVC130) の cDNA クローニングを行い、HaVC130 のドメイン構造 (N 末端側から、シグナル配列、14 回の EGF 様繰り返し配列、哺乳類の卵透明帯にみられる ZP ドメイン、そして 1 回膜貫通ドメインからなる) を明らかにした。HaVC130 は、マボヤ HrVC70 前駆体蛋白質 HrVC120 と非常に高い相同性を示すが、13 回の EGF 様繰り返し配列を有する HrVC120 と比較して、1 回多い EGF 様繰り返し配列を有することが特徴である。さらに、9 個体のマボヤ生殖巣及び 5 個体のアカボヤ生殖巣を用いて、それぞれ HrVC70 領域及び HaVC80 領域を RT-PCR 法により増幅し、個体間のアミノ酸配列を解析・比較して、HrVC70 と HaVC80 の両者ともに、個体ごとに特定の領域におけるアミノ酸配列が異なることを明らかにし、この分子多型が受精における自家不和合性を規定していると推論した。

(4) HaVC130 のゲノム DNA 配列を決定し、HrVC120 のゲノム DNA 配列と比較することにより、HrVC70/ HaVC80 の分子進化に関する仮説を提案した。すなわち、はじめに 6 個の EGF 様繰り返し構造からなるプロトタイプが存在し、進化の進行に伴って、プロトタイプの 5 番目と 6 番目の EGF 様領域が 1 つのセットとなって重複を繰り返すことにより、12 個の EGF 様繰り返し構造からなる HrVC70 が生成し、さらに進化が進み、HrVC70 の 8 番目の EGF 様ドメインが HaVC80 の 8、9 番目の EGF 様ドメインに重複することによって、13 個の EGF 様繰り返し構造からなる HaVC80 が生成したという仮説である。

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、ホヤ類の受精における自己非自己認識機構の理解にとどまらず、広く他の生物での受精や細胞間認識における自己非自己認識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。