

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 FU Bo
論文題目 Functional studies of the egg cortical alveolus
proteases on fertilization of medaka
(メダカの受精における卵表層胞局在
プロテアーゼの機能解明)

論文審査担当者

主 査 名古屋大学教授 北島 健
委 員 名古屋大学教授 佐藤 ちひろ
委 員 名古屋大学教授 人見 清隆
委 員 名古屋大学助教 呉 迪
委 員 名古屋大学助教 羽根 正弥

論文審査の結果の要旨

殆どすべての動物において受精は胚発生の開始点であり、休眠状態にある卵が精子刺激によって活性化されると、初期胚および個体の発生に向かって迅速な形態的变化が起こる。魚類では、卵の細胞膜はコリオンと呼ばれる厚いタンパク質性の層構造に取り囲まれている。また、細胞膜直下のサイトゾル側には表層胞と呼ばれる分泌顆粒が並んでおり、受精時、表層胞は細胞膜と融合することによって、その内容物が細胞膜とコリオンの間隙である囲卵腔中に開口分泌される。その直後に、外界から囲卵腔に水が浸入してコリオンを押し上げることによってその空間が拡張すると同時に、受精前には柔らかいコリオンを強靱な硬い受精膜へと変化させる（このコリオンの変化は、卵膜硬化という）。このような受精直後に起こる卵表層の変化は表層反応と呼ばれる。表層胞には表層反応における一連の変化を引き起こす種々の成分が存在している。表層胞の主要な成分として **hyosophorin** の存在が知られている。**Hyosophorin** はシアル酸に富む糖タンパク質であり、表層胞においては特定の糖ペプチド配列を単位として数回から十数回繰り返す反復構造からなる高分子量型糖タンパク質（**H-hyosophorin** とよぶ）として存在する。興味深いことに、**H-hyosophorin** は表層反応に伴って、特定のプロテアーゼによって分解されて最小反復単位である **L-hyosophorin** 構造まで低分子化する。この低分子化に関わるプロテアーゼは **hyosophorinase** と呼ばれており表層胞成分であることが明らかにされているものの未同定である。また、メダカの表層胞内容物には、卵膜硬化に関与するプロテアーゼ **alveolin** の存在が同定されている。**alveolin** は、コリオンの主要成分である **ZPB** を切断し、それが引き金となって他のコリオン成分との架橋が促進され、硬いコリオンが形成されることが知られている。**hyosophorinase** と **alveolin** はどちらも表層胞成分であり、**alveolin** が **hyosophorinase** である可能性もあるが、全く不明である。そこで本研究は、**alveolin** と **hyosophorinase** に着目して、これらの表層胞局在プロテアーゼが表層反応においてどのような役割を果たしているのかを明らかにすることを目的とし、以下に示す実験を行った：(1) 表層胞局在性プロテアーゼの探索とその遺伝子欠損メダカの作出；(2) **hyosophorinase** の同定；(3) **alveolin** 欠損メダカを用いた **alveolin** の *in vivo* 機能の解明；(4) 表層胞局在糖タンパク質 **hyosophorin** の多重遺伝子の特徴の解析。

(1) 表層胞局在性プロテアーゼの探索とその遺伝子欠損メダカの作出 (Chapter 2) : メダカにおいて **alveolin** は卵膜硬化に関与することが知られているが、次の特徴は未同定である **hyosophorinase** と共通である：(a) 受精前は表層胞に局在し、受精後は囲卵腔に局在する；(b) 受精時、活性が増大する；(c) アスパラギン酸残基の N 端側のペプチド結合を切断する。そこでまず **hyosophorin** の候補遺伝子をデータベース上で検索し **alveolin** の類似遺伝子の存在の有無を調べた。その結果、**alveolin** と同一性 45% で相同性 84% である亜鉛金属プロテアーゼ **NAS-4** を見出した。次に、**alveolin** 遺伝子

論文審査の結果の要旨

および *NAS-4* 遺伝子の欠損が *hyosophorin* の低分子化に及ぼす効果を個体レベルで評価するために、*alveolin* ノックアウトメダカ (*Alv-KO*) および *Nas-4* ノックアウトメダカ (*Nas-4-KO*) を CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術を用いて作出した。どちらのノックアウトメダカも、精子と卵において受精ができ、胚は正常に発生、発育し、配偶子をもち子孫を残すことができた。

(2) *hyosophorinase* の同定 (Chapter 3) : *alveolin* と *Nas-4* が *H-hyosophorin* の低分子化に関与するか否を調べるために、*Alv-KO* および *Nas-4-KO* メダカから受精卵を採取し、H-および L-*hyosophorin* 画分を調製して定量した。その結果、*Nas-4-KO* 由来受精卵では *H-hyosophorin* は低分子化されることが判明した。一方、*Alv-KO* 由来受精卵では量的に減少するものの *H-hyosophorin* の低分子化は起こることが確認された。興味深いことに、*Alv-KO* ではこの *H-hyosophorin* の減少量に相当する部分は、培養液中に L-*hyosophorin* として見出された。このことは *Alv-KO* 胚の受精膜コリオンは *hyosophorin* を透過するような性質をもつことがわかった。以上のことから、*Nas-4* が *hyosophorinase* であり、表層反応における *H-hyosophorin* の低分子化を起こすことが証明された。

(3) *alveolin* 欠損メダカを用いた *alveolin* の *in vivo* 機能の解明 (Chapter 4) : *Alv-KO* コリオンの最も特徴的な性質は、コリオンが機械的に脆弱であることであった。そこで *Alv-KO* および野生メダカ (WT) のコリオンの性質として、機械的な丈夫さ、光学および透過型電子顕微鏡による形態観察、透過性測定、コリオン成分の生化学的解析を分析し比較した。まず第 1 に、*Alv-KO* の囲卵腔の容積が増大することによって卵直径が WT のそれより大きいことがわかった。第 2 に、コリオンの重層構造の層の数は変わらなかったが、*Alv-KO* のコリオンの厚さは、WT より薄かった。興味深いことに、透過型電子顕微鏡観察によって、*Alv-KO* のコリオンの内層構造のより外側部分が多孔性に富む構造を呈するようになることがわかった。第 3 に、WT コリオンと比べて、この柔らかいコリオンは、少なくとも 10 kDa FITC-標識デキストランを透過させることができた。第 4 に、WT コリオンと同様に、*Alv-KO* コリオンではその主要成分の ZPB と ZPC の架橋は起こるが、その過程は著しく遅いことがわかった。しかしこの卵膜硬化の遅延は、淡水中ではなく等張塩類溶液中ではやや加速することも見出した。注目すべきことは、*alveolin* が既知の基質 ZPB をプロセスするだけでなく、コリオンに局在するトランスグルタミナーゼもプロセスすることであり、新しい発見である。

(4) 表層胞局在糖タンパク質 *hyosophorin* の多重遺伝子の特徴の解析 (Chapter 5) : この章では、*hyosophorin* 遺伝子の特徴を最新のデータベースを探索して調べた。その結果、メダカとニジマス以外にも、コイ、ノーザンパイプ、ティラピアにも *hyosophorin* 遺伝子が見出された。*hyosophorin* は多重遺伝子をもち、個々の遺伝子が

論文審査の結果の要旨

N-領域、主要な R-領域（同一配列のタンデム反復配列）、C-領域の 3 つの領域からなることが明らかにされている。ニジマスにおいては、本研究で見出された 54 個の *hyosophorin* 遺伝子の構造的特徴は既報の構造と概ね同じであった。一方、メダカにおいては、全部で 18 個の遺伝子が見出され、その半数は R-領域に変異を有しており、既知の R-領域の特徴とは大きく異なることが判明した。これらの結果は、魚類 *hyosophorin* の R-領域の構造的保存性に 2 方向の進化が起こったことを示唆している。この点は表層胞成分の重要性と受精条件の関係を理解するために興味深い。

以上、本論文では、2 種類の表層胞局在プロテアーゼに着目して研究を行い、まず、*Nas-4* がメダカの表層反応において *hyosophorin* の低分子化を担うプロテアーゼである *hyosophorinase* であることを初めて見出すことができた。また、*alveolin* がコリオン成分である ZPB とトランスグルタミナーゼをプロテアーゼ分解することによって、ZPB-ZPC の架橋による卵膜硬化を著しく促進することも証明した。この *alveolin* が引き金を引く反応は、コリオンを強靱にし、かつ囲卵腔中の様々な可溶性因子に対する不透過性を獲得するために重要である。すなわち、本論文は、受精における表層反応の理解を分子レベルで深めただけでなく、基礎生物学および薬理学的応用におけるモデル動物としてメダカの有用性の高さを示すことに貢献している。このように本論文は、独創性および新規性において高い学術的価値をもっており、その成果はさらに社会貢献に繋がることが期待できる。したがって、審査委員会は本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値を有すると認め、論文審査に合格と判定した。