

別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 カタユウレイボヤの受精における新規自家不和合性因子に関する研究

氏 名 大塚 慧

論 文 内 容 の 要 旨

有性生殖を行う生物は、雌雄異体の場合、同種異個体由来の配偶子を受精させることで遺伝的多様性を獲得・維持し、環境に適応してきた。一方で、雌雄同体の場合は1個体が卵や精子を同時に持つため、自家受精により遺伝的多様性が失われるリスクが存在する。そこで、一部の動植物は同一個体由来の卵と精子の受精を防ぐ自家不和合性の仕組みを発達させることで自家受精を防いでいる。

雌雄同体の海産脊索動物であるカタユウレイボヤの自家不和合性は1910年に遺伝学者モルガンに発見されて以来、様々な研究が行われてきた。卵の卵黄膜を除去することで自家精子との受精が起こること、自家精子と他家精子では卵黄膜に対する精子の結合性に差があることから、卵黄膜が自家精子に対する障壁であると考えられている。また、卵を短時間酸性海水で処理すると、自家不和合性に関与する因子が遊離し、自家受精するようになることが報告されている。近年、ポジショナルクローニングと卵黄膜のプロテオーム解析から、カタユウレイボヤの自己非自己認識分子として精子側のポリシスチン1様タンパク質 *s-Themis-A* と *s-Themis-B* が、卵側のフィブリノーゲン様タンパク質 *v-Themis-A* と *v-Themis-B* が同定された。しかしながら、卵黄膜と酸可溶物のプロテオーム解析の結果、卵側の自己非自己認識分子 *v-Themis-A* と *v-Themis-B* は、卵黄膜に存在するものの、酸によって溶出されないことが示された。このことから、カタユウレイボヤの自家不和合性には *v-Themis-A* と *v-Themis-B* 以外の未知の酸可溶性卵側因子が関与していることが示唆された。そこで、再び同プロテオーム解析の結果を検証すると、フィブリノーゲン様タンパク質 *Ci-v-Themis-like* が卵黄膜に多量に存在し、酸によって溶出されるタンパク質の主成分であることが判明した。哺乳類のフィブリノーゲンは3量体を形成し機能することから、*Ci-v-Themis-like* も *v-Themis-A* および *v-Themis-B* と複合体を形成し、自家不和合性において機能する可能性が考えられた。そこで酸可溶性の卵黄膜タンパク質 *Ci-v-Themis-like* の受精および自家不和合性における機能解析を試みた。

第1章では、cDNA クローニング・mRNA の発現解析・タンパク質の局在解析・

Ci-v-Themis-like 相互作用タンパク質に焦点を当て、**Ci-v-Themis-like** の受精および自家不和合性における機能を考察した。クローニングの結果、**Ci-v-Themis-like** は **v-Themis-A** や **v-Themis-B** と同様にコイルドコイルドメインとフィブリノーゲンドメインを持つが、多型は存在しないことが明らかとなった。さらに、系統樹解析の結果、血管新生因子アンジオポイエチンや自然免疫パターン認識分子フィコリンと相同性を示し、**v-Themis-A** と **v-Themis-B** の祖先型でホヤ独自に進化したタンパク質であることが明らかとなった。アンジオポイエチンおよびフィコリンはコイルドコイルドメインを介して多量体を形成し機能する。以上のような分子的特徴に基づき、卵黄膜因子 **Ci-v-Themis-like** は **v-Themis-A** および **v-Themis-B** とコイルドコイルドメインを介して複合体を形成し、精子側の **s-Themis-A** および **s-Themis-B** と相互作用するという仮説を初めて提示した。

RT-PCR 解析と Whole mount *in situ* hybridization 解析の結果、**Ci-v-Themis-like** mRNA の発現は、卵巣と精巣の生殖組織に限定されることが明らかとなった。しかしながら、ウェスタンブロット解析により、タンパク質のバンドは卵黄膜タンパク質抽出物においてのみ検出された。また、PNGase F 処理によりバンドの移動度が大きくなることから、**Ci-v-Themis-like** は糖鎖修飾を受けていることが示唆された。さらに免疫染色によって、**Ci-v-Themis-like** は卵黄膜に確かに局在し、酸処理によりその局在が失われることを示した。次に酵母 two-hybrid 法により、精子側の **Ci-v-Themis-like** 相互作用タンパク質候補として 2 つのプロテアーゼと 3 つのコイルドコイルドメインタンパク質を含む 17 の遺伝子を同定した。そのうち 5 つの遺伝子は RT-PCR により、その mRNA の発現が精巣特異的であることを示した。また、pull-down assay により **Ci-v-Themis-like** が **v-Themis-A** と相互作用することを示した。これらの結果、および一般に受精においてプロテアーゼが重要な機能を果たすこと、コイルドコイルドメインが複合体を形成することから、**Ci-v-Themis-like** が卵黄膜上の **v-Themis-A** や、精子特異的なプロテアーゼおよびコイルドコイルドメインタンパク質との相互作用により受精や自家不和合性に関与する可能性を示した。

第 2 章では受精における **Ci-v-Themis-like** の機能解析を行った。はじめに抗 **Ci-v-Themis-like** 抗体を用いた受精阻害実験を行ったが、抗 **Ci-v-Themis-like** 抗体は受精を阻害しなかった。そこで次に TALEN を用いた変異導入による機能解析を行うため、**Ci-v-Themis-like** のゲノム配列を標的とする TALEN ペアの発現ベクターを作製した。作製した TALEN ペアは高確率で **Ci-v-Themis-like** 標的配列に変異を導入した。TALEN mRNA 注入個体の卵と精子を用いた受精実験を行った結果、TALEN 注入個体の卵と精子は非注入個体に比して高い自家受精率を示すことが明らかとなった。さらに受精実験で得られた TALEN mRNA 注入個体の次世代には 8 塩基欠損変異が見られたことから、TALEN mRNA 注入によって生殖細胞に変異が導入されていたことが明らかとなった。これらの結果は、**Ci-v-Themis-like** への変異導入が自家不和合性の機構を妨げたことを示唆している。

本研究により、卵黄膜因子 **Ci-v-Themis-like** が **v-Themis-A** および **v-Themis-B** との相互作用を介してカタユウレイボヤの自家不和合性に関与する可能性が示された。