

別紙 1-1

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

氏 名 大 塚 慧

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

論文審査担当者

主 査 名古屋大学大学院理学研究科 教授 薬学博士 澤 田 均
委 員 名古屋大学大学院理学研究科 教授 博士(理学) 大 隅 圭 太
委 員 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所
教授 博士(理学) 東 山 哲 也

論文審査の結果の要旨

別紙 1-2

多くの生物は、精子と卵との融合、すなわち受精を成立させることにより、次世代に遺伝子構成の多様性をもたらす、様々な環境変化に適応可能な子孫を生み出している。裸子植物や多くの動物は雌雄異体であるが、被子植物や一部の動物においては雌雄同体の体制をとっている。こうした雌雄同体の生物の場合、自家受精可能な種もみられるが、非自己由来の配偶子を優先する種や自家受精を防ぐ機構を獲得している種も知られている。この自家受精しない性質を「自家不和合性」と呼んでいる。雌雄同体種において、有性生殖の利点を活かすためには、自家不和合性は必要な性質であるが、その分子機構に関する研究は主に植物で盛んに研究が進められて来っており、雌雄同体の動物における自家不和合性の研究は進んでいない。

海産脊索動物であるホヤは雌雄同体であり、精子と卵をほぼ同時に海水中に放出するが、カタユウレイボヤやマボヤ等では、精子が卵保護層（卵黄膜）に結合する段階で自己と非自己の細胞認識が行われ、自家受精を防いでいる。この機構に関する研究は、著名な遺伝学者 T.H. Morgan によって 100 年程まえに研究が行われたが、その分子機構は長年の謎であった。申請者が所属する研究室では、カタユウレイボヤを用いて、自家不和合性の分子機構に関する研究が行われており、第 2 染色体の A 座位と第 7 染色体の B 座位に位置する卵側因子 (*v-Themis-A*, *v-Themis-B*) と精子側因子 (*s-Themis-A*, *s-Themis-B*) の遺伝子が各座位で近接し、個体間で配列が大きく異なり、A,B 両座位の遺伝子産物が相互に自己分子と識別すると、精子細胞内に Ca^{2+} が流入して運動性が亢進し、精子は卵黄膜から離脱して、受精できなくなることを明らかにしている。

一方、先行研究により、カタユウレイボヤの自他認識分子は、卵を酸性海水で処理すると遊離すると報告されているが、卵黄膜上の *v-Themis-A/B* は酸処理で卵黄膜から遊離しないことがプロテオーム解析で確認されており、酸可溶性の新規自家不和合性関連因子の存在が指摘されていた。そこで申請者は、酸処理上清中の主要成分で、*v-Themis-A/B* に構造的に類似している新規タンパク質 (*Ci-v-Themis-like*) に着目し、その構造と機能の解析を行った。

第 1 章では、*Ci-v-Themis-like* の cDNA クローニング、mRNA の発現と局在性の解析、タンパク質の局在性解析、相互作用タンパク質の探索を行った。cDNA クローニングの結果、*Ci-v-Themis-like* は *v-Themis-A/B* と同様にコイル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示された。さらに、分子系統解析の結果、アンジオポイエチンやフィコリンと相同性を示し *v-Themis-A/B* の祖先型分子であること、またホヤ独自に進化したタンパク質であることを明らかにした。アンジオポイエチンやフィコリンはコイルコイルドメインを介して多量体を形成し機能するが、*Ci-v-Themis-like* においても同様にコイルドコイルドメインを有する *v-Themis-A/B* と相互作用する可能性が考えられる。そこでその解析を行ったところ、少なくとも *v-Themis-A* は *Ci-v-Themis-like* と相互作用することが示された。*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が、ウェスタン解析の結果、そのタンパク質は卵黄膜にのみ検出された。さらに免疫染色によって、*Ci-v-Themis-like* は卵黄膜に局在し、酸処理によりその局在が失われることを明らかにした。また、酵母 two-hybrid 法により、精子側の *Ci-v-Themis-like* と相互作用しうる候補タンパクを 17 個同定した。これらの結果は、*Ci-v-Themis-like* が卵黄膜上の *v-Themis-A/B* と相互作用することにより受精や自家不和合性に関与する可能性を示している。

第 2 章では受精における *Ci-v-Themis-like* の機能解析を目的として、TALEN を用いた変異導入実験を行った。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と比較して高い自家受精率を示すことが、今回初めて明らかとなった。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も確かめられた。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しており、*Ci-v-Themis-like* がカタユウレイボヤの自家不和合性に重要な機能を果たす新規の酸可用性卵黄膜タンパク質であることを示している。

以上の結果は、カタユウレイボヤの自家不和合性の分子機構に関する新しい概念を提唱するものであり、その研究成果は高く評価される。よって、申請者は博士（理学）の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。