

別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目

尾索動物マボヤの HrOvochymase (Polyprotease) に関する研究
氏 名 三 野 雅 子

論 文 内 容 の 要 旨

尾索動物マボヤにおいて、卵子形成や受精にトリプシン様プロテアーゼが関与していることは各種阻害剤を用いた受精阻害実験から示唆されているが、これらの現象に関わるトリプシン様プロテアーゼの実体やその機能に関しては不明な点が多い。最初に報告されたトリプシン様プロテアーゼは、マボヤ精子から精製された 2 種類のトリプシン様プロテアーゼで、基質特異性や阻害剤を用いた受精実験の結果から受精に関与する可能性が報告されている。このうち、一方のプロテアーゼは基質特異性が類似していることから哺乳類精子 acrosin のホモログであると考えられ、HrAcrosin と命名された。先行研究により、*HrAcrosin* の cDNA クローニングが検討され、前駆体タンパク質である *HrProacrosin* の全アミノ酸配列が推定された。*HrProacrosin* は N 末端側からシグナルペプチド、トリプシン様プロテアーゼドメインおよび 2 つの CUB ドメインで構成されることが示され、プロセッシングによりプロテアーゼドメインのみを持つ *HrAcrosin* になることが示唆された。しかし、*HrAcrosin* および *HrProacrosin* のマボヤ精子における発現および局在、そして受精への関連には疑問点が残されていた。

ところが、最近公開されたマボヤゲノムデータベース *Halocynthia roretzi* MTP2014 を利用して検索したところ、*HrProacrosin* はトリプシン様プロテアーゼドメインと 6 つの CUB ドメインで構成される前駆体型ポリプロテアーゼをコードする遺伝子モデル (*Harore.CG.MTP2014.S89.g15383*) の一部であることが示唆された。そこで、本研究は *HrAcrosin* の前駆体であると考えられるポリプロテアーゼをコードする遺伝子のクローニングと発現を解析し、機能を考察することを目的とした。

Harore.CG.MTP2014.S89.g15383 遺伝子モデルの一次構造を明らかにするため、cDNA クローニングを行った。そして、得られた cDNA 塩基配列と既報の *HrProacrosin* の cDNA 塩基配列を比較した結果、*HrProacrosin* は 3' 末端付近に 4 塩基の挿入があり、それが原因でフレームシフトを生じ、終止コドンが現れる塩基配列であるということが示された。さらに、*HrAcrosin* の前駆体タンパク質はシグナルペプチド、3 つのトリプシン様プロテアーゼドメイン (α 、 β 、 γ) および 6 つの CUB ドメインで構成される前駆体型ポリプロテアーゼであること、そしてこのタンパク質は脊椎動物で発見されている ovochymase と類似していることが明らかになった。そこで、本クローニングにより得られた遺伝子を *HrOVCH*、タンパク質を HrOvochymase と命名した。HrOvochymase を構成するトリプシン様プロテアーゼのうち α および β は、三つ組触媒アミノ酸残基、および各ドメインの N 末端側に Ile が保存されていることから、プロセッシングにより活性型プロテアーゼになることが示唆された。次いで、*HrOVCH* mRNA の発現を確認するため RT-PCR を検討した。その結果、*HrOVCH* mRNA

はマボヤ精巣および卵巣特異的に発現していた。さらに、マボヤ精巣および卵巣において同様の *HrOVCH* mRNA が発現していることを確認するため、各組織から抽出した RNA を用いて first-strand cDNA を作製し、クローニングを検討した。その結果、すべて同様の HrOvochymase 推定アミノ酸配列を持つクローンを得たことから、組織間におけるスプライシングバリエーションの可能性は低いと考えられた。次に、HrOvochymase の発現と局在を明らかにするため、HrOvochymase トリプシン様プロテアーゼドメイン- α 組換えタンパク質に対する特異的抗体を作製し、アフィニティー精製した抗 HrOvochymase 抗体を使用して、マボヤ精巣、卵巣およびその配偶子のウェスタンブロッティングと免疫染色を検討した。その結果、HrOvochymase はマボヤ精巣においてプロセシングされたタンパク質断片として存在し、精子において頭部先端、中央、ミトコンドリア近傍に局在していることが示された。しかし、質量分析による結果を考慮すると、HrOvochymase のマボヤ精巣および精子における存在量は微量である可能性が示唆された。一方で、HrOvochymase はマボヤ卵巣卵の濾胞細胞において 200 kDa の前駆体型ポリプロテアーゼとして局在することを、質量分析による結果と合わせ初めて明らかにした。次に、HrOvochymase の機能を明らかにするため、トリプシン様プロテアーゼの関与が示唆されるマボヤ卵子形成と受精において、抗 HrOvochymase 抗体による阻害効果を検討した。その結果、マボヤ卵子形成最終段階の卵黄膜上昇過程と受精を阻害することが示された。卵子形成最終段階は、マボヤ卵が自家不和合性（自家受精しない性質）を獲得する過程に相当する。そこで、マボヤ卵の自家不和合性獲得に対する抗 HrOvochymase 抗体の阻害効果を検討したところ、本抗体はマボヤ卵の自家不和合性獲得を阻害することが示された。これら阻害実験の結果は、HrOvochymase がマボヤ受精に加え、卵子形成の最終段階である卵黄膜上昇や自家不和合性獲得に重要な役割を果たすことを示唆している。

本研究は、尾索動物マボヤにおいて前駆体型ポリプロテアーゼである HrOvochymase が存在することを初めて明らかにし、HrOvochymase は活性型のトリプシン様プロテアーゼとなりうることを示した。さらに、HrOvochymase はマボヤ卵子形成最終段階の卵黄膜上昇や自家不和合性の獲得、そして受精に関与する可能性を示した。今後、HrOvochymase の活性型トリプシン様プロテアーゼを同定し、その生理的基質タンパク質を明らかにすることは、長年不明だったマボヤ卵子形成や受精機構の解明に貢献できると期待される。