

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 三 野 雅 子  
論 文 題 目 尾索動物マボヤの HrOvochymase (Polyprotease)  
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
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	名古屋大学大学院生命農学研究科 教授 農学博士、医学博士	松 田 幹

## 論文審査の結果の要旨

受精や卵子形成の過程にトリプシン様プロテアーゼが関与することが知られているが、その局在性や機能に関しては不明な点が多く残されている。申請者は、配偶子の大量入手が可能で受精実験の容易な尾索動物マボヤを用いて、その受精と卵子形成におけるプロテアーゼの役割と局在性について検討を行った。

マボヤでは、各種プロテアーゼ阻害剤を用いた受精阻害実験から、精子のトリプシン様酵素とキモトリプシン様酵素が、精子の卵黄膜への結合から通過に至る過程に関与すると考えられている。その後、マボヤ精子から 2 種類のトリプシン様酵素が精製され、その一方の酵素は、哺乳類精子トリプシン様酵素アクロシンに性質が類似していることから、**HrAcrosin** と命名された。しかし、その構造、局在性、受精における役割については疑問点が残されていた。先行研究でマボヤ *HrAcrosin* の cDNA クローニングが行われ、前駆体の全アミノ酸配列が推定された。その結果、**HrAcrosin** 前駆体である **HrProacrosin** はシグナル配列に続いてプロテアーゼドメインがあり C 末端に 2 個の CUB ドメインを有することが示された。ところが、近年公開されたマボヤゲノムのデータベースを利用して検索すると、*HrAcrosin* 遺伝子は、プロテアーゼと CUB のドメインを複数もつポリプロテアーゼをコードする遺伝子 (*Harore.CG.MTP2014.S89.g15383*) の一部であることが示唆された。

そこで、申請者は *HrAcrosin* 前駆体と思われる遺伝子の cDNA クローニングを再検討した。その結果、既報の *HrProacrosin* 遺伝子配列の 3' 末端付近に 4 残基の挿入があることを見だし、それによりフレームシフトが生じて終始コドンができることに気付いた。従って、**HrAcrosin** の真の前駆体は、既報の **HrProacrosin** ではなく、シグナルペプチドに続いて、トリプシン様酵素、2 個の CUB、トリプシン様酵素、4 個の CUB、トリプシン様酵素という順にタンデムに連結したポリプロテアーゼ構造を有する分子である可能性が極めて高いこと、またこれは脊椎動物で知られているオボキマーゼのホモログであることを示した。そこで、本前駆体を **HrOvochymase (HrOVCH)** と命名した。**HrOvochymase** の 3 番目の酵素ドメインは触媒に関わる残基が保存されておらず、1 番目と 2 番目の酵素ドメインのみ活性を発現すると推定された。本酵素の mRNA は精巣と卵巣で特異的に発現しており、スプライスバリエントは検出されなかった。次に、組換え体 **HrOvochymase** に対するアフィニティ精製抗体を用いて、局在性と機能解析を行った。精子においては頭部先端と頭部中央ならびにミトコンドリア付近に局在すること、また卵においては卵巣卵の濾胞細胞に局在することが免疫染色により示唆された。特に、本酵素は卵巣卵の濾胞細胞に 200 kDa のポリプロテアーゼとして存在することを質量分析によって明らかにした。本抗体はマボヤの受精と、卵子形成最終段階における卵黄膜上昇を阻害することも明らかにした。この卵子形成最終段階は、雌雄同体のマボヤ卵が自家不和合性（自家受精しない性質）を獲得する時期に相当する。しかも、濾胞細胞由来のトリプシン様酵素が卵黄膜に作用して自家不和合性が獲得されるという報告もある。そこで抗 **HrOvochymase** 抗体の自家不和合性獲得に対する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。これらの結果は、**HrOvochymase** が、ポリプロテアーゼ前駆体として主に卵巣卵の濾胞細胞にタンパク質として局在すること、また受精に加えて、卵子形成後期段階の卵黄膜上昇と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。オボキマーゼに関する研究は両生類以外ほとんど報告されておらず、申請者の発見は、ポリプロテアーゼやオボキマーゼの局在性と機能に関する新しい概念を提供するものである。したがって、申請者は博士（理学）の学位を授与される資格があると認められる。