

博士論文

尾索動物マボヤの HrOvochymase
(Polyprotease)に関する研究

三野 雅子

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻
平成 28 年 3 月

目次

略語集	1
序論	3
第一章 <i>HrOVCH</i> のクローニング、ドメイン構造の比較、発現解析	6
1-1. 序論	6
1-2. 材料と方法	9
1-2-1. 実験材料	9
1-2-2. <i>HrOVCH</i> のクローニング	9
1-2-3. ドメイン検索、シグナルペプチド予測、N 型糖鎖修飾予測 および相同性タンパク質の検索	9
1-2-4. RT-PCR	10
1-2-5. HrOvochymase 組換えタンパク質の発現および可溶化	11
1-2-6. 抗 HrOvochymase 抗体の作製	12
1-2-7. マボヤ生殖巣および配偶子のタンパク質泳動サンプル調製	13
1-2-8. マボヤ卵巢卵の濾胞細胞、卵黄膜、卵抽出液、精巣および 精子のウェスタンブロッティング	14
1-2-9. マボヤ卵巢卵と精子の免疫染色	14
1-2-10. LC/MS/MS 解析	15
1-3. 実験結果	17
1-3-1. <i>HrOVCH</i> の配列決定およびドメイン構造	17
1-3-2. HrOvochymase アミノ酸配列と相同性のあるタンパク質の 探索と比較	18
1-3-3. <i>HrOVCH</i> mRNA の発現確認	18
1-3-4. 抗 HrOvochymase 抗体の抗原タンパク質への反応性	18
1-3-5. 抗 HrOvochymase 抗体による精巣あるいは精子タンパク質 への反応性	19
1-3-6. 抗 HrOvochymase 抗体によるマボヤ卵巢卵の濾胞細胞、卵 黄膜、卵抽出液タンパク質への反応性	20
1-4. 考察	21
1-4-1. <i>HrProacrosin</i> と <i>HrOVCH</i> の比較	21
1-4-2. HrOvochymase と相同性のあるタンパク質検索	21
1-4-3. HrOvochymase における N 型糖鎖修飾アミノ酸残基の予測	22

1-4-4. HrOvochymase 前駆体型ポリプロテアーゼが活性型トリプ シン様プロテアーゼにプロセシングされる可能性	22
1-4-5. HrOvochymase の発現と局在	24
第二章 抗 HrOvochymase 抗体を用いた阻害実験の検討	25
2-1. 序章	25
2-2. 材料と方法	27
2-2-1. 実験材料	27
2-2-2. 抗 HrOvochymase 抗体によるマボヤ受精阻害実験	27
2-2-3. 抗 HrOvochymase 抗体によるマボヤ卵子形成阻害実験	27
2-2-4. 抗 HrOvochymase 抗体による卵巣卵の自家受精阻害実験	28
2-3. 実験結果	29
2-3-1. 抗 HrOvochymase 抗体のマボヤ受精への影響	29
2-3-2. 抗 HrOvochymase 抗体のマボヤ卵子形成への影響	29
2-3-3. 抗 HrOvochymase 抗体のマボヤ卵巣卵自家受精への影響	30
2-4. 考察	31
2-4-1. 抗 HrOvochymase 抗体によるマボヤ受精への阻害効果	31
2-4-2. 抗 HrOvochymase 抗体によるマボヤ卵子形成への阻害効果	31
2-4-3. 抗 HrOvochymase 抗体によるマボヤ卵の自家不和合性獲得 への阻害効果	32
結語	34
謝辞	36
参考文献	37
図の説明	42

略語集

Ab	antibody
AB	ammonium bicarbonate
AGPC	acid guanidium thiocyanate phenol chloroform
ANISEED	Ascidian Network for In Situ Expression and Embryological Data
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl
BPB	bromophenol blue
BSA	bovine serum albumin
CBS	Center for Biological Sequence analysis
CG	protein coding gene
CUB	component C1r/C1s, Uegf, Bmp1
DEPC	diethylpyrocarbonate
ECL	Enhanced ChemiLuminascence
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EPFS	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinepropanesulfonic acid
FOVE	full grown ovarian egg
FSW	UV irradiated filtered seawater
GST	glutathione S-transferase
HrEF1a	<i>Halocynthia roretzi</i> elongation factor 1- α
HRP	horseradish peroxidase
IgG	immunoglobulin G
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB	lysogeny broth medium
LC/MS/MS	liquid chromatography tandem mass spectrometry
MAFFT	multiple alignment using fast fourier transform
MCA	4-methylcoumaryl-7-amide
MOPS	3-(<i>N</i> -morpholino) propanesulfonic acid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nr	non-redundant
OVCH	ovochymase
OVE	ovarian egg
PBS	phosphate buffered saline
PBS-T	phosphate buffered saline containing 0.1% Tween 20
PCR	polymerase chain reaction
RACE	rapid amplification of cDNA ends
rpm	revolution per minute
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SMART	switching mechanism at 5' end of RNA template
SMART program	simple modular architecture research tool program
STI	soybean trypsin inhibitor
TEE	translation enhancing element
TF	Trigger Factor
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
Trx	thioredoxin
UFE	unfertilized egg

序論

生物は子孫を残すために生殖という方法で自らと同じ種の個体を作出する。生殖には無性生殖と有性生殖があり、前者の無性生殖は性を伴わず、親の体の一部を使って新しい個体が生み出される生殖方法である。分裂、出芽、栄養生殖そして孢子生殖といった無性生殖があり、一個体から新しい個体を作出することが可能である。しかし、親と全く同じ遺伝子が受け継がれるため遺伝的多様性がなく適応能力に乏しい。一方で、後者の有性生殖は減数分裂によって作られる 2 つの配偶子が融合 (接合) することにより遺伝子の組換えが起こり、新しい遺伝子の組み合わせを持つ接合子が生まれる生殖方法である。雌雄の区別がない同形配偶子とは異なり、運動性の小型配偶子である精子と非運動性の大型配偶子である卵子による交配を特に受精と呼ぶ。有性生殖を行うためには複数の個体が配偶子を作り、異個体由来の配偶子が出会う必要があるが、それにより遺伝的多様性が生まれ、適応力が高まると考えられている。

尾索動物ホヤ類は脊索動物に属し、脊椎動物に対して姉妹関係にあたる群を形成している。単体で生活する種類のホヤ (単体ボヤ) は有性生殖を行い、一個体から大量の配偶子を得ることができる (佐藤, 1998)。さらに受精実験も容易に行えるため、古くから受精学や発生学の実験材料として使用されてきた。また、ホヤは例外なく雌雄同体で、一個体が精子と卵子の両配偶子を産生することが知られている (佐藤, 1998)。興味深いことに、単体ボヤには自家受精する自家和合種と、自家受精できない自家不和合種がいる (佐藤, 1998; 澤田, 2014)。近年、この自家不和合性機構に関わる因子として、マボヤ *Halocynthia roretzi* においては HrVC70 が、カタユウレイボヤ *Ciona intestinalis* においては s/v-Themis、Ci-v-Themis-like の存在が報告された (Sawada *et al.*, 2004; Harada *et al.*, 2008; Yamada *et al.*, 2009; Otsuka *et al.*, 2013)。遺伝的多様性を生むためには自家不和合種である方が有利であり、受精と自家不和合性の機構は強く関係していると考えられる。このことから、マボヤやカタユウレイボヤを含む自家不和合種のホヤは実験材料として非常に興味深い生物である。

さて、トリプシン様プロテアーゼやキモトリプシン様プロテアーゼを含むセリンプロテアーゼは配偶子の成熟や受精に関与する重要な酵素であることが様々な生物において報告されている。ホヤ類においても例外ではなく、トリプシン様あるいはキモトリプシン様の酵素活性を持つプロテアーゼが卵子形成や受精に関与する可能性が阻害剤を用いたホヤ卵子形成阻害実験および受精阻害実験から示唆されている (Hoshi *et al.*, 1981; Sakairi and

Shirai, 1991; Fuke and Numakunai, 1999) (Fig. 1)。

HrSpermosin と HrAcrosin はマボヤ精子から精製された受精に関わるトリプシン様プロテアーゼの候補である (Sawada *et al.*, 1984a; 1984b; Sawada and Someno, 1996)。前者の HrSpermosin は哺乳類精子から発見されたトリプシン様プロテアーゼ acrosin の基質特異性とは異なり、Boc-Val-Pro-Arg-I-MCA 水解活性のみを示す新規プロテアーゼである。特異的抗体を用いた免疫学的実験から HrSpermosin はマボヤ精子頭部に存在し、精子反応前後で精子細胞外へと放出され、受精に関与すると考えられている (Sawada *et al.*, 1996)。さらに、cDNA クローニングの結果、シグナルペプチド、Pro-rich 領域およびトリプシン様プロテアーゼドメインで構成されるタンパク質をコードする遺伝子であることが示された (Kodama *et al.*, 2002)。後者の HrAcrosin は哺乳類 acrosin と基質特異性が類似していたことから哺乳類 acrosin のホモログであると考えられている (Sawada *et al.*, 1984; 毛利および星, 2006)。しかし、cDNA クローニングの結果、シグナルペプチド、トリプシン様プロテアーゼドメインに加えて哺乳類 acrosin にはない2つの CUB ドメインをC末端側に持つことが示された (Kodama *et al.*, 2001)。得られた cDNA の推定アミノ酸配列の分子量 (55,003 Da) と精製 HrAcrosin の SDS-PAGE により示された分子量 (約 35 kDa) との比較、そして精製 HrAcrosin の N 末端アミノ酸配列解析の結果から、HrAcrosin はプロセシングにより生じるトリプシン様プロテアーゼドメインのみで構成される活性型プロテアーゼであることが示唆された (Kodama *et al.*, 2001)。

これらの報告を受けて、HrAcrosin および HrSpermosin の前駆体タンパク質から活性型プロテアーゼへのプロセシングとプロテアーゼ活性がマボヤ精子の卵黄膜結合および卵黄膜通過に関与する仮説が立てられた (Sawada, 2002)。つまり、前駆体タンパク質 HrProacrosin にしかないCUB ドメインと Hr(Pro)Spermosin の Pro-rich 領域が精子の卵黄膜結合を補助し、前駆体タンパク質のプロセシングによって生じた活性型 HrAcrosin と HrSpermosin が卵黄膜成分を分解して、精子の卵黄膜通過を助けるという仮説である。次いで、前駆体 HrProacrosin の CUB ドメインおよび Hr(Pro)Spermosin の Pro-rich 領域はマボヤ卵黄膜タンパク質である vitellogenin の C 末端側断片と結合することが報告された (Kodama *et al.*, 2001; 2002; Akasaka *et al.*, 2010)。これらの報告から、マボヤ vitellogenin は前駆体 HrProacrosin と Hr(Pro)Spermosin の相互作用タンパク質であることが示唆されている (Akasaka *et al.*, 2010)。このように、マボヤの受精に関わるトリプシン様プロテアーゼの分子実体として HrAcrosin と HrSpermosin が精製され、その分子構造や相互作用タンパク質の解析が行われ

たが、特に HrAcrosin の局在や機能に関しては不明な点が多く残されている。

近年、大規模なゲノム解析によりマボヤを含むホヤ類数種のゲノム配列と遺伝子モデルが明らかになり (Brozovic *et al.*, 2015)、*HrProacrosin* 塩基配列は *Harore.CG.MTP2014.S89.g15383* という遺伝子モデルの一部に保存されていることが示された (Fig. 2A)。この遺伝子モデル *Harore.CG.MTP2014.S89.g15383* から予測される一次構造は1つのプロテアーゼドメインと6つのCUBドメインをもつ巨大な前駆体タンパク質ポリプロテアーゼであることが示された (Fig. 2C)。さらに、*HrProacrosin* 推定アミノ酸配列と相同なタンパク質をNCBIのnr protein database に対してblast 検索した結果、*HrProacrosin* は *ovochymase* というセリンプロテアーゼタンパク質ファミリーと類似していることが示された (data not shown)。興味深いことに、*Xenopus laevis* において、*ovochymase-2/oviductin* は卵成熟過程において卵に受精能力を付与するトリプシン様プロテアーゼの前駆体タンパク質であることが報告されている (Lindsay *et al.*, 1999a; 1999b)。しかし、*ovochymase* は脊椎動物においての報告例しかなく、脊椎動物と姉妹関係にある尾索動物ホヤ類においては報告がない。

本研究の第一章では、トリプシンプロテアーゼドメインと複数のCUBドメインを持つマボヤ遺伝子モデル *Harore.CG.MTP2014.S89.g15383* を *Halocynthia roretzi OVCH* (*HrOVCH*) と名付け、*HrOVCH* の cDNA クローニング、ドメイン構造の比較、*HrOVCH* mRNA の発現解析、そして *HrOvochymase* の発現および局在解析を検討し、尾索動物においても *ovochymase* が配偶子に存在し、活性型トリプシン様プロテアーゼとして機能するか否かを検討した。

第二章では、特異的抗体を用いた阻害実験を検討した。特異的抗体がマボヤの卵子形成や受精に与える影響を観察し、*HrOvochymase* が卵子形成や受精に関与するか否かを検討した。

本研究においては、遺伝子を *HrOVCH* と表記し、前駆体型のポリプロテアーゼであるタンパク質を *HrOvochymase* と表記する。

第一章 *HrOVCH* のクローニング、ドメイン構造の比較、発現解析

1-1. 序論

受精に関与するトリプシン様プロテアーゼとしてマボヤ精子から2種類のトリプシン様プロテアーゼが精製された (Sawada *et al.*, 1984a)。基質特異性の違いから、哺乳類精子トリプシン様プロテアーゼ acrosin とは異なり、Boc-Val-Pro-Arg-MCA 水解活性のみを示す酵素はマボヤ spermosin (HrSpermosin)、一方で哺乳類精子 acrosin と基質特異性が類似している酵素はマボヤ Acrosin (HrAcrosin) と名付けられ (Sawada *et al.*, 1984a)、これらマボヤ精子トリプシン様プロテアーゼの構造や受精における機能が調べられてきた。

HrSpermosin の推定アミノ酸配列はシグナルペプチド、Pro-rich 領域およびトリプシン様プロテアーゼドメインで構成され、前駆体タンパク質として発現すると考えられている (Kodama *et al.*, 2002)。前駆体タンパク質 (Hr(Pro)Spermosin) が Arg¹²⁹-Ile¹³⁰ で切断され、Pro-rich 領域を含む軽鎖あるいは含まない軽鎖とトリプシン様プロテアーゼドメインを持つ重鎖がジスルフィド結合し、重鎖の N 末端側アミノ酸残基 Ile¹³⁰-Val¹³¹-Gly¹³²-Gly¹³³ が露出して、Ile¹³⁰ と Asp³¹⁷ が結合すると HrSpermosin 活性型トリプシン様プロテアーゼが生じると考えられている (Kodama *et al.*, 2002)。精製 HrSpermosin の SDS-PAGE 泳動パターンから HrSpermosin の活性型は 2 タイプあり、一方は Pro-rich 領域を含む軽鎖と他方はそれを含まない軽鎖から成り、このいずれかの軽鎖と重鎖がジスルフィド結合を形成してプロテアーゼ活性を持つ分子になると考えられている (Kodama *et al.*, 2002)。特異的抗体を用いた免疫学的実験から HrSpermosin はマボヤ精子頭部に存在し、精子反応後に精子細胞外へと放出されることが示唆されている (Sawada *et al.*, 1996)。

一方、HrAcrosin は前駆体タンパク質である HrProacrosin のプロセッシングによって生じる活性型トリプシン様プロテアーゼである (Kodama *et al.*, 2001)。HrProacrosin から予測されるドメイン構造はシグナルペプチド、トリプシン様プロテアーゼドメインおよび 2 つの CUB ドメインである (Kodama *et al.*, 2001)。哺乳類精子 acrosin zymogen ドメイン構造と比較すると CUB ドメインの有無という点において異なるが、哺乳類精子 acrosin と HrProacrosin の両者はトリプシン様プロテアーゼドメインを持つという点と、前駆体領域 (pro-piece) が C 末端側に伸びている点は共通している (Baba *et al.*, 1989a; 1989b; Sawada and Someno, 1996; Kodama *et al.*, 2001)。さらに両者の活性型である哺乳類 acrosin と HrAcrosin は前駆体タンパク質のプロセッシングによってトリプシン様プロテアーゼドメイ

ンのみを持つ一次構造をとり (Baba *et al.*, 1989)、その基質特異性も類似している (Sawada *et al.*, 1984a)。特異的抗体を用いた免疫学的実験から HrAcrosin はマボヤ精子に存在することが示唆されたが、活性型 HrAcrosin が受精に関与するという直接的証拠や局在に関しては報告されていない。

最近公開されたマボヤゲノムデータベース *Halocynthia roretzi* MTP2014 において、*HrProacrosin* は *Harore.CG.MTP2014.S89.g15383* という遺伝子モデルの一部分に存在していることが明らかになった (Fig. 2A)。さらに、*HrProacrosin* および *Harore.CG.MTP2014.S89.g15383* 遺伝子モデルに保存されているタンパク質コーディング領域の塩基配列を比較した結果、*HrProacrosin* の 3'側に 4 塩基挿入が発見され、その結果フレームシフトが起こり約 20 塩基後に終止コドンが現れることが示された (Fig. 2B)。また *HrProacrosin* と *Harore.CG.MTP2014.S89.g15383* 遺伝子モデルの推定アミノ酸配列を NCBI の nr protein database に対して blast 検索した結果、両者は acrosin ではなく ovochymase タンパク質ファミリーと類似していることが示された (data not shown)。

Ovochymase は ovochymase-1 あるいは ovochymase-2 という 2 種類の前駆体型ポリプロテアーゼで構成されるタンパク質ファミリーである。Ovochymase-1 は *Xenopus laevis* で発見された前駆体型ポリプロテアーゼで、*X. laevis* ovochymase-1 はシグナルペプチド、2 つのトリプシン様プロテアーゼドメイン、1 つのキモトリプシン様プロテアーゼドメインおよび 5 つの CUB ドメインで構成されることが報告されている (Lindsay *et al.*, 1999b)。この *X. laevis* Ovochymase-1/polyprotease はプロセッシングにより 3 つの活性型プロテアーゼ、ovotrypsin-1、ovotrypsin-2 そして ovochymase になることが明らかになっている (Lindsay *et al.*, 1999)。さらに *X. laevis* ovochymase-2/oviductin も前駆体型ポリプロテアーゼであり、ovochymase-2 の推定アミノ酸配列はシグナルペプチド、2 つのトリプシン様プロテアーゼドメインおよび 3 つの CUB ドメインで構成されている。*X. laevis* ovochymase-1/ polyprotease と同様に、ovochymase-2/oviductin もプロセッシングによって oviductin-alpha と oviductin-beta になることが示唆されているが、活性型プロテアーゼ oviductin-alpha の存在のみが確認されている (Hardy *et al.*, 1992; Lindsay *et al.*, 1999a)。興味深いことに、上記の *X. laevis* 活性型トリプシン様あるいはキモトリプシン様プロテアーゼは輸卵管直部から発見されており、卵の精子結合能を促進する細胞外プロテアーゼであることも知られている (Hardy *et al.*, 1992; Lindsay *et al.*, 1999a; 1999b)。

そこで、*Harore.CG.MTP2014.S89.g15383* 遺伝子モデルが ovochymase として発現し機能

するか否かを明らかにするため、この遺伝子モデルを *HrOVCH* と名付け、*HrOVCH* の分子構造と発現および HrOvochymase の発現と局在を検討した。

1-2. 材料と方法

1-2-1. 実験材料

マボヤ *Halocynthia roretzi* は外見と生殖時期の違いから A 型 (生殖時期: 11 月中旬～1 月頃、朝)、B 型 (11 月頃、夕)、C 型 (12 月下旬～2 月頃、昼) の 3 タイプに分類することができる。本研究では、青森県陸奥湾産の養殖マボヤ A 型と C 型の成体を実験材料として用いた。

1-2-2. *HrOVCH* のクローニング

HrProacrosin cDNA の塩基配列 (Kodama *et al.*, 2001) をもとに Primer3 (v.0.4.0) プログラム (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Koressaar *et al.*, 2007; Untergasser *et al.*, 2012) を利用してプライマーを設計し (Fig. 3A, B)、SMARTer RACE cDNA amplification kit (Clontech) を用いて作製したマボヤ卵巣および精巣の cDNA ライブラリーをテンプレートとして 3' RACE および 5' RACE を行った。得られた配列をもとに Primer3 (v.0.4.0) プログラムを利用して新たにプライマーを設計し、SuperScript III First-Strand Synthesis System (Life Technologies) を用いて作製したマボヤ卵巣および精巣の First strand cDNA をテンプレートとして PCR を行った。得られた PCR 産物を TOPO TA Cloning Kit (Life Technologies) を用いて添付の説明書に従い pCR2.1-TOPO vector (Life Technologies) にサブクローニングした。使用したプライマーは Table 1 に示した。塩基配列は Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems) および Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて解析した。

1-2-3. ドメイン検索、シグナルペプチド予測、N 型糖鎖修飾予測および相同性タンパク質の検索

HrOVCH cDNA のクローニングにより得られた予測アミノ酸配列を用い、SMART プログラム (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (Schults *et al.*, 1998; Letuinic *et al.*, 2014) を利用してドメイン検索を行い、CBS の SignalIP 4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP/>) (Peterson *et al.*, 2011) を利用してシグナルペプチドを予測し、CBS の NetNGlyc 1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) を利用して N 型糖鎖修飾アミノ酸残基を予測した。また NCBI の nr protein database への blast 検索 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) および ANISEED の ascidian genome database への blast 検索 (<http://www.aniseed.cnrs.fr/aniseed/>)

(Brozovic *et al.*, 2015) を行い相同性のあるタンパク質あるいは遺伝子を検索した。

HrOvochymase 推定アミノ酸配列とドメイン構造は、HrProacrosin (Kodama *et al.*, 2001)、*Sus scrofa* acrosin zymogen (accession number: J04950) (Baba *et al.*, 1989a)、*Homo sapiens* acrosin (Y00970) (Baba *et al.*, 1989b)、*Xenopus laevis* ovochymase-1/polyprotease (U81290) (Lindsay *et al.*, 1999a)、*Xenopus laevis* ovochymase-2/oviductin (U81291) (Lindsay *et al.*, 1998b)、*Homo sapiens* ovochymase-1 (BN000128) (Puente *et al.*, 2003)、*Homo sapiens* ovochymase-2 (BN0001200) (Puente *et al.*, 2003)と比較した。アミノ酸配列の比較には、各種 N 末端に位置する約 230 アミノ酸残基で構成されるトリプシン様プロテアーゼドメインのアミノ酸配列を用い、MAFFT version 7 プログラム ([http://mafft.cbrc.jp/alignment/ server/](http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/)) (Katoh *et al.*, 2013) を利用してアライメントを行った。また各種ドメイン構造を並記して、ドメイン構成を比較した。

1-2-4. RT-PCR

Total RNA をマボヤ A 型および C 型の成体の精巣、卵巣、えら、筋肉、心臓、消化管、肝臓から抽出した。RNA 抽出は AGPC 法 (Chomczynski *et al.*, 1987) あるいは TRIzol RNA Isolation Reagents (Invitrogen) を用いた方法で行った。APGC 法を用いた RNA 抽出は以下のように行った。マボヤ A 型および C 型それぞれから生殖巣を取り出し、解剖はさみとメスを用いて精巣と卵巣を分離し、各々 5 mm 角片ぐらいの組織断片に切り取った。これらの組織を 200 μ l の Denaturing Solution (4 M Guanidium thiocyanate, 25 mM Sodium citrate, pH 7.0, 0.5% Sarcosyl, 0.72% 2-Mercaptoethanol) を加えた 1.5ml チューブに加え、ホモジナイザーペッスルを用いて手で組織を破碎した。次に 19 μ l の 2.4 M Sodium acetate (pH 4.0) と 250 μ l の Phenol-Chloroform 溶液 (Phenol と Chloroform を 1:1 で混合したもの) を加えて混合し、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離した。上清を回収し、250 μ l の Isopropanol を加えてよく混合し、-20 °C で 30 分間冷却した。その後、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離して上清を除去し、100 μ l の 75% ethanol を加えてさらに 15,000 rpm、4 °C で 10 分間遠心分離し、上清を除去した。得られた沈殿物を風乾させ、20 μ l の DEPC-超純水に溶解した。このうち 2 μ l を RNA 濃度測定に使用した。さらに 2 μ l を泳動サンプルとし、1%アガロースゲルにアプライして電気泳動し、得られた RNA サンプルのバンドパターンを確かめた。TRIzol RNA Isolation Reagents を用いた RNA 抽出は添付の説明書に従って行い、得られた RNA を 20 μ l の DEPC-超純水に溶解した。上記と同様に、得られた RNA サンプルの濃度

測定と泳動後のバンドパターンを確かめた。次に、得られた RNA サンプル に含まれる DNA を除去するために 1 µg の RNA サンプルに対して 1 µl の 10X DNase I Reaction Buffer (Life Technologies)、1 µl の DNase I, Amplification Grade, 1 U/µl (Life Technologies) 、および合計 10 µl になるように DEPC-超純水を加え、25 °C で 15 分間反応させた。その後、1 µl の 25 mM EDTA を加えて 65 °C で 10 分間インキュベートし、total RNA サンプルとした。

上記で得た total RNA サンプルと SuperScript III First-Strand Synthetic System (Life Technologies)を使用して添付の説明書に従い、first-strand cDNA を合成した。得られた cDNA をテンプレートとし、Table 1 で示したプライマーを用いて PCR を行い、1% アガロースゲルで電気泳動した。コントロールとして *Halocynthia roretzi elongation factor 1a* (HrEF1a) を用いた。

1-2-5. HrOvochymase 組換えタンパク質の発現および可溶化

HrOvochymase の N 末端側トリプシンプロテアーゼドメイン (Ovochymase-alpha) を含む塩基配列を pET-32a (+) vector (Novagen)、pCold TF DNA (TaKaRa)に、HrOvochymase の N 末端側トリプシンプロテアーゼドメイン (Ovochymase-alpha)、CUB domain 1、CUB domain 2 を含む塩基配列を pGEX-4T-1 vector (GE Healthcare) にサブクローニングしたコンストラクトは赤坂茉莉博士から供与されたものを使用した (Fig. 4)。コンストラクトを大腸菌 BL21 (DE3) 株に形質転換し、ampicillin sodium 100 µg/ml を含む液体 LB 培地中で 37 °C で培養し、OD₆₀₀ が 0.4~0.5 の間に達したら IPTG (終濃度 0.1 mM) を加え組換えタンパク質の発現を誘導した。pET-32a (+) vector および pGEX-4T-1 vector の場合 30 °C で 4 時間、pCold TF DNA の場合 13 °C で 18 時間振とうした後、7,000 rpm で 5 分間遠心分離して大腸菌を集菌した。

Trx-His-S-HrOvochymase組換えタンパク質を発現させた大腸菌はPBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄•12 H₂O, 1.47 mM KH₂PO₄) を加えて懸濁し、氷上で超音波破碎した。15,000 rpmで10分間遠心分離した沈殿に6 M Ureaを含むPBSを加えて懸濁し、Trx-His-S-HrOvochymase組換えタンパク質を可溶化した。Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) に400 mM NiSO₄を添加してNi²⁺を結合させ、6 M Ureaを含むBinding buffer (50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, pH 7.4)で平衡化したカラムに可溶化Trx-His-S-HrOvochymase組換えタンパク質を添加した。カラムを6 M Ureaを含むWash buffer (100 mM Sodium phosphate, 300 mM NaCl, 100 mM Imidazole, pH 6.0)で洗浄した後、6 M Ureaを含む

Elution buffer (100 mM Sodium phosphate, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazole, pH 6.0) で Trx-His-S-HrOvochymase組換えタンパク質を溶出した。精製したTrx-His-HrOVCH組換えタンパク質はUreaとImidazoleを除去するためにPBSに対して4 °Cで透析した。

TEE-His-TF-HrOvochymase組換えタンパク質を発現させた大腸菌はPBSを加えて懸濁し、氷上で超音波破碎した。破碎液を15,000 rpmで10分間遠心分離し、上清を回収して可溶化したTEE-His-TF-HrOvochymase組換えタンパク質とした。Ni²⁺を結合させ、Binding bufferで平衡化したChelating Sepharose Fast Flow カラムにTEE-His-TF-HrOvochymase組換えタンパク質溶液を添加し、Wash bufferでカラムを洗浄し、Elution bufferでTEE-His-TF-HrOvochymase組換えタンパク質を溶出した。精製したTEE-His-TF-HrOvochymase組換えタンパク質はimidazoleを除去するためにPBSに対して4 °Cで透析した。

GST-HrOvochymase組換えタンパク質を発現させた大腸菌はPBSを加えて懸濁し、氷上で超音波破碎した。破碎液を15,000 rpmで10分間遠心分離し、上清を回収し、可溶化したGST-HrOvochymase組換えタンパク質とした。このGST-HrOvochymase組換えタンパク質に等量の2X SDS sample buffer (4% SDS, 20% Glycerol, 0.01% BPB, 10% 2-mercaptoethanol, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8)を加えて95 °Cで5分間加熱した。

1-2-6. 抗 HrOvochymase 抗体の作製

上記で作製したTrx-His-S-HrOvochymase組換えタンパク質をウサギに免疫し、6週間後に全採血して抗血清を得た。次に、TEE-His-TF-HrOvochymase組換えタンパク質をAffi- Gel 10 Resin (Bio-Rad) にカップリングさせた抗体精製カラムを作製した。このカラムに氷冷Elution buffer (0.1 M glycine-HCl, 1 M NaCl, pH 2.5) 、氷冷PBSを順に添加してカラムを平衡化し、2 mlの抗血清と3 mlの氷冷PBSを添加し、4 °Cで一晩ローテータを用いてインキュベートした。カラムを氷冷PBSで洗浄後、500 µlの氷冷Elution bufferで抗体を溶出し、直ちに50 µlの1 M Tris-HCl, pH 9.0で溶出画分を中和した。Nano Drop 2000 (Thermo) を利用して280 nmにおける吸光度を測定し、吸光度0.1以上を抗体が含まれる画分とし、Amicon Ultra 0.5 mL Centrifugal Filters (EMD Millipore) を用いて14,000 Xg、4 °Cで15分間遠心分離して濃縮し、氷冷PBSを添加して14,000 Xg、4 °Cで10分間遠心分離した。濃縮された溶出画分を抗HrOvochymase抗体として以下の実験で使用した。

抗HrOvochymase抗体の反応性を確かめるために、抗HrOvochymase抗体を用いて上記で作製したGST-HrOvochymase組換えタンパク質とGSTタンパク質のウェスタンブロッティ

ングを検討した。GST-HrOvochymase組換えタンパク質あるいはGSTタンパク質の泳動サンプルを10%ポリアクリルアミドゲルに添加して電気泳動し、タンパク質をImmobilon -P membrane (EMD Millipore) にブロッティングした。メンブレンを5% Skim Milk (Becton, Dickinson and Company) を含むPBS-T (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄•12 H₂O, 1.47 mM KH₂PO₄, 0.1% Tween 20) 中で穏やかに振とうして室温で60分間ブロッキングした後、抗HrOvochymase抗体 (終濃度0.2 µg/ml) および3% Skim Milkを含むPBS-T中において室温で60分間反応させた。次いでPBS-Tで洗浄した後、1/5000倍量のAnti-Rabbit IgG HRP-Linked Whole Ab Donkey (GE Healthcare) および1% Skim Milkを含むPBS-T中において室温で60分間反応させた後、このメンブレンをPBS-Tで洗浄し、ECL Prime Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を加えて発光させ、ATTO Light Capture AE-6972C (ATTO) を使用してシグナルを検出した。コントロールとして抗GST抗体 (Anti GST, Monoclonal Antibody, Wako) およびrabbit IgG (IgG from rabbit serum, Sigma-Aldrich) を一次抗体反応で使用した。

1-2-7. マボヤ生殖巣および配偶子のタンパク質泳動サンプル調製

過去に報告された方法に従い、海水温と光条件を調節して放精放卵を誘導させたマボヤA型およびC型の成体から精巣、精子、卵巣卵、未受精卵を得た (Hoshi *et al.*, 1981; Sawada *et al.*, 1984b; Sakairi and Shirai, 1991; Fuke and Numakunai, 1996; 1999)。

精巣および精子ホモジネートは次に示した方法に従い4 °Cで調製した。凍結精巣および精子は5倍量あるいは10倍量のHomogenize Buffer (92 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM EPPS, pH 8.0, 1X cOmplete Mini EDTA-free (Roche)) に懸濁し、テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした (2,000 rpmで20 strokes)。ホモジネートを15,000 rpm、4 °Cで10分間遠心分離し、上清と沈殿に2X SDS sample Bufferを加え、95 °Cで5分間加熱し、泳動サンプルとした。

マボヤ卵巣卵の濾胞細胞、卵黄膜および卵抽出液はFig. 5に示す操作で得た。マボヤA型成体より得た卵巣卵をUVろ過海水 (FSW) で洗浄した後、Defolliculation Buffer (2% EDTA, 0.46 M NaCl, 10 mM KCl, 50 mM EPPS, pH 8.0) 中において4 °Cで1時間振とうし、Falcon 40 µm Cell Strainer (Becton, Dickinson and Company) に添加した。ろ液は15,000 rpm、4 °Cで10分間遠心分離し、Homogenize Bufferで洗浄した後、等量のHomogenize Bufferを加えてペッスルでホモジナイズし、ホモジネートを濾胞細胞画分とした。Falcon Cell Strainer上に残った濾胞細胞除去卵を1.5 mlチューブに回収し、等量のHomogenize Bufferを加えてペ

ッスルでホモジナイズし、ホモジネートをFalcon 40 µm Cell Strainerに添加した。ろ液を卵抽出液画分として回収した。Falcon Cell Strainer上に残った卵黄膜はHomogenize Bufferで洗浄したものを卵黄膜画分として回収した。濾胞細胞画分、卵黄膜画分および卵抽出液画分に2X SDS sample Bufferを加え、95 °Cで5分間加熱し、泳動サンプルとした。

1-2-8. マボヤ卵巣卵の濾胞細胞、卵黄膜、卵抽出液、精巣および精子のウェスタンブロットティング

1-2-7で調製したマボヤ卵巣卵の泳動サンプルを7.5% ポリアクリルアミドゲルに添加しSDS-PAGEを行い、Immobilon-P Membrane (EMD Millipore) にブロットティングした。メンブレンを5% Skim Milkを含むPBS-T中、室温で60分間振とうした後、抗HrOvchymase 抗体(終濃度0.3 µg/ml) および3% Skim Milkを含むPBS-T中で、室温で60分間穏やかに振とうして一次抗体反応を行った。メンブレンをPBS-Tで洗浄した後、1/3000に希釈したAnti-Rabbit IgG HRP-Linked Whole Ab Donkeyおよび1% Skim Milkを含むPBS-T中で、室温で60分間穏やかに振とうして二次抗体反応を行った。次いでメンブレンをPBS-Tで洗浄した後、ECL Prime Western Blotting Detection Reagentsを加えて発光させ、ATTO Light Capture AE6972を用いてシグナルを検出した。Rabbit IgG (IgG from rabbit serum, Sigma-Aldrich) を一次抗体のネガティブコントロールとして用いた。

1-2-7で調製したマボヤ精巣あるいは精子ホモジネートの泳動サンプルを10% ポリアクリルアミドゲルに添加しSDS-PAGEを行い、Immobilon-P Membraneにブロットティングした。以下のブロッッキング反応、抗体反応およびシグナルの検出は卵巣卵のウェスタンブロットティングと同様の操作で行い、一次抗体反応は抗HrOvchymase抗体 (終濃度1 µg/ml) および3% Skim Milkを含むPBS-Tを用いて行った。

1-2-9. マボヤ卵巣卵と精子の免疫染色

Fukeら (Fuke and Numakunai, 1999) とHoshiら (Hoshi *et al.*, 1981) の方法に従い、マボヤA型から卵巣卵を、マボヤC型から精子を採集し、Fixing Solution (4% paraformaldehyde, 0.46 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 50 mM MOPS, pH 7.0) 中、室温で60分間穏やかに振とうすることにより固定した。以下、精子はMASコートスライドグラス (松浪硝子工業) にスポットしてMASコートグラス上で、卵巣卵は2.0 mlチューブ中で操作した。固定したサンプルをPBSで洗浄した後、0.1% TritonX-100を含むPBS中において室温で

15分間反応させ透過処理を行った。PBSで洗浄した後、4% BSAを含むPBS中において室温で60分間反応させ、抗HrOvochymase抗体 (終濃度1 µg/ml) を含むPBS中で一次抗体と反応させた。PBSで洗浄した後、Alexa Fluor 488/594 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Life Technologies) (終濃度1 µg/ml) を含むPBS中において室温で遮光しながら60分間反応させた。PBSで洗浄した後、ProLong Gold Antifade Reagent (Life Technologies) で封入し、KEYENCE BZ-710 (KEYENCE) 使って観察した。精子の免疫染色の場合のみ、二次抗体反応においてDAPI (終濃度5 µg/ml) およびMitoTracker CMXRos (終濃度10 µM, Life Technologies) を加えて室温で60分間インキュベートした。

1-2-10. LC/MS/MS 解析

精巣および濾胞細胞ホモジネートを用いて10%あるいは7.5% ポリアクリルアミドによるSDS-PAGEを行い、Coomassie Brilliant Blue R-250 (Wako) で染色した。精巣ホモジネートの120 kDa、85 kDa、52 kDaおよび濾胞細胞の200 kDa付近のゲルを切り出し、25 mM ammonium bicarbonate (AB) を含む100 µlの50% acetonitrile中、25 °Cで75分間 (15分を5回) 振とうすることにより脱色した。ゲル断片を100 µlの100% acetonitrile に加えて25 °Cで5分間振とうし、Centrifugal evaporatorを使って乾燥させた。その後、ゲル断片を10 mM Dithiothreitolを含む100 µlの25 mM ABに加え、56 °Cで60分間振とうすることによって還元反応を行った。その後、余分な溶液を取り除き、5 mgのiodoacetoamideを含む100 µlの25 mM AB 中、25 °Cで50分間遮光しながら振とうした。25 mM ABを含む200 µlの50% acetonitrile 中において25 °Cで20分間 (10分を2回) 振とうした後、ゲル断片を乾燥させた。ゲル断片をAsp-N 10 µg/ml (Sequence Grade, Promega) を含む 50 µlの50 mM AB中において氷上で30分間浸した後、37 °Cで一晩振とうし、ゲル内消化を行った。その後、ゲル断片を3% formic acid を含む50 µlの50% acetonitrile中において室温で60分間 (30分間を2回) 振とうし、3% formic acidを含む50 µlの100% acetonitrile中において室温で30分間振とうして、消化されたペプチドを抽出した。抽出液はCentrifugal evaporatorを使って乾燥させ、0.1% formic acidに溶解し、Nakazawaらの方法に従いLC/MS/MS解析に供した (Nakazawa *et al.*, 2015)。スペクトルはマボヤA型卵巣由来HrOvochymaseの推定アミノ酸配列を使用し、 Mascot 2.4.1を用いて次の条件で検索した。Fixed modification: Carbamidomethyl (C), Variable modification: None, Peptide charge: +1, +2 and +3, Peptide mass tolerance: 0.8 Da, Fragment mass tolerance: 0.8 Da,

Mass values: monoisotopic, Instrument type: ESI-TRAP. 検出されたペプチドのうち、イオンスコアが40以上のペプチドを示した。スペクトルの例はFig. 16CおよびDに示した。

1-3. 実験結果

1-3-1. *HrOVCH* の配列決定およびドメイン構造

マボヤ精子トリプシン様プロテアーゼHrAcrosinの前駆体であるHrProacrosinをコードする *HrProacrosin* は(Kodama *et al.*, 2001) は、マボヤゲノムデータベースの *Harore.CG. MTP2014.S89.g15383*の一部に保存された遺伝子であった (Fig. 2A)。この遺伝子モデルから推定されるタンパク質はトリプシン様プロテアーゼドメインと複数のCUBドメインから構成され、ovochymaseに類似していることが示された (Fig. 2C)。そこで、本論文では *Harore.CG. MTP2014.S89.g15383*を *Halocynthia roretzi OVCH (HrOVCH)* と名付け、*HrOVCH* の配列決定を試みた。

HrProacrosin (Kodama *et al.*, 2001) のトリプシン様プロテアーゼドメインの配列を元に、5'RACE法および3'RACE法を用いて開始コドンおよびポリA付加シグナルを含む全5,973 bpの塩基配列をクローニングした。得られた*HrOVCH*および*HrProacrosin* (Kodama *et al.*, 2001) におけるタンパク質コーディング領域の塩基配列を比較したところ、*HrProacrosin* 塩基配列には3'側に4塩基挿入があり、それが原因でフレームシフトが起こっていることが分かった (Fig. 6)。得られた*HrOVCH*の塩基配列から推定されるアミノ酸配列は1,575アミノ酸残基だった (Fig. 7A)。SMARTプログラムを利用し、HrOvochymase推定アミノ酸配列を用いてドメイン構造を調べた結果、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 (HrOvochymase-alpha、-beta、gamma)および6つのCUBドメイン (1~6) で構成されるタンパク質であることが予測された (Fig. 7B)。NetNGlyc 1.0 serverを利用してN型糖鎖修飾を予測した結果、HrOvochymaseは10箇所のN型糖鎖修飾部位を持つことが示された (Fig. 7B、マゼンタラベル)。

本研究では2タイプのマボヤ (A型およびC型) を用いたので、どちらのマボヤにおいても同様の*HrOVCH*が存在していること確認した。マボヤA型の精巣および卵巣、マボヤC型の精巣および卵巣から得たmRNAを使用し、5'RACEおよび3'RACE法を用いてクローニングし*HrOVCH* cDNAを得た。これらの推定アミノ酸配列を比較したところ、全1,575アミノ酸残基のうち36箇所のアミノ酸置換が確認された (Fig. 8, 赤ラベル)。しかし、三つ組触媒アミノ酸残基 (Fig. 8, 黄ラベル)、S1部位 (Fig. 8, 青ラベル)、N型糖鎖修飾部位 (Fig. 8, マゼンタラベル)にアミノ酸残基置換は確認されず、SMARTプログラムを利用したドメイン構造予測においても、各々のHrOvochymaseは同様のドメイン構造であることが示された (data not shown)。

1-3-2. HrOvochymase アミノ酸配列と相同性のあるタンパク質の探索と比較

NCBIのnr-protein-databaseに対してblast検索を行った結果、HrOvochymase推定アミノ酸配列は既知ovochymase-1あるいはovochymase-2と相同性を持つことが示された (data not shown)。ANISEEDのホヤゲノムデータベース (<http://www.aniseed.cnrs.fr/>) に対してblast検索した結果、*HrOVCH*と相同性を持つ遺伝子が*Phallusia mammillata* (Phmamm.CG.MTP 2014.S27.g01100)、*Ciona intestinalis* type A (KH2012:KH.C11.304)、*C. savignyi* (Cisavi.CG.ENS81.R304.50858-56714)、および*Botryllus schlosseri* (Boschl.CG.Botznik2013.chrUn.g33850) に存在することが示された (Table 2)。一方で、*Molgula oculata*、*M. oculata*、*M. occidentalis*、*P. fugimata*そして*H. aurantium*において*HrOVCH*と相同性がある遺伝子は発見されなかった (2016年1月29日検索)。

既知acrosin zymogen、既知ovochymase、HrProacrosin (Kodama *et al.*, 2001)およびHrOvochymaseが共通して持つN末端のトリプシンプロテアーゼドメインのアミノ酸配列を比較した結果、HrOvochymaseおよびHrProacrosinは既知のAcrosin zymogenより既知のovochymaseと類似していることが示された (Fig. 9A)。同様に、上記タンパク質のドメイン構造を比較したところ、HrOvochymaseおよびHrProacrosinは既知ovochymaseに類似していることが示された (Fig. 9B)。

1-3-3. *HrOVCH* mRNA の発現確認

*HrOVCH*の発現様式を明らかにするため、マボヤA型およびC型の精巣、卵巣、筋肉、えら、心臓、消化管、肝臓から抽出したRNAを用いてfirst-strand cDNAを作製し、RT-PCRを検討した。その結果、*HrOVCH* mRNAはマボヤタイプに関わらず精巣および卵巣特異的に発現していることが示された (Fig. 10)。

1-3-4. 抗 HrOvochymase 抗体の抗原タンパク質への反応性

Trx-His-Sタグ融合HrOvochymaseトリプシン様プロテアーゼドメイン-alpha組換えタンパク質を作製し (Fig. 4)、ウサギに免疫して6週間後に全採血し、抗血清を得た。抗血清をTEE-His-TF-HrOvochymaseをカップリングさせたAffigel-10カラムを用いてアフィニティー精製し、得られた抗体を抗HrOvochymase抗体として以下の実験に使用した。

抗HrOvochymase抗体の抗原タンパク質への反応性を検討するために、HrOvochymaseトリプシン様プロテアーゼドメイン-alpha、CUBドメイン1および2とGSTタグを融合させた

GST-HrOvochymase組換えタンパク質を作製した (Fig. 4)。次に、抗HrOvochymase抗体を用いてGST-HrOvochymase組換えタンパク質およびGSTタンパク質のウェスタンブロッティングを検討した結果、抗HrOvochymase抗体は約90 kDaのGST-HrOvochymase組換えタンパク質に反応し、約27 kDaのGSTタンパク質に反応しなかった (Fig. 11)。コントロールとして使用した抗GST抗体は約90 kDaのGST-HrOvochymase組換えタンパク質および約27 kDaのGSTタンパク質の両者に反応したが、rabbit IgGは反応しなかった (Fig. 11)。以上の結果は、抗HrOvochymase抗体がHrOvochymaseトリプシン様プロテアーゼドメイン-alphaに対して特異的に反応することを示している。そこで、本抗体を用いて以下の実験を検討した。

1-3-5. 抗 HrOvochymase 抗体による精巣あるいは精子タンパク質への反応性

HrOvochymaseの精巣および精子における発現を調べるために、抗HrOvochymase抗体を用いてマボヤ精巣および精子ホモジネートのウェスタンブロッティングを検討した。その結果、抗HrOvochymase抗体は精巣および精子ホモジネートの120 kDa、85 kDaおよび52 kDaに位置するタンパク質に反応した (Fig. 12)。

マボヤ精子からHrAcrosinが精製されていること (Sawada *et al.*, 1984a)、そしてHrOvochymaseのN末端側には精子HrAcrosinと同一の推定アミノ酸配列が存在していることを考慮し、HrOvochymaseは精子に存在しているのではないかと考えた。そこで、抗HrOvochymase抗体を用いてマボヤ精子の免疫染色を検討した。その結果、精子頭部の先端、中央およびミトコンドリア近傍に抗HrOvochymase抗体の特異的蛍光が観察された (Fig. 13A, B)。

抗HrOvochymase抗体がHrOvochymaseに反応していることを確かめるため、精巣ホモジネートの120 kDa、85 kDa、52 kDaのタンパク質をAsp-Nで消化したペプチドをLC/MS/MSを使用して解析した。しかし、いずれの分子量のタンパク質においてもHrOvochymase由来のペプチドは検出限界以下であった。このことは、マボヤ精巣・精子にはHrOvochymaseが微量にしか存在しない可能性を示唆している。

1-3-6. 抗 HrOvochymase 抗体によるマボヤ卵巢卵の濾胞細胞、卵黄膜、卵抽出液タンパク質への反応性

HrOvochymaseの卵巢における発現を調べるため、卵巢の大部分を占める卵巢卵を採集して、濾胞細胞、卵黄膜および卵抽出液に分離し、抗HrOvochymase抗体を用いた濾胞細胞、卵黄膜および卵抽出液のウェスタンブロッティングを検討した。その結果、抗HrOvochymase抗体は濾胞細胞の200 kDaに位置するタンパク質に反応し、卵黄膜および卵抽出液のタンパク質には反応しなかった (Fig. 14)。

抗HrOvochymase抗体を用いたマボヤ卵巢卵の免疫染色を検討した結果、マボヤ卵巢卵の外側と卵細胞において蛍光が観察された (Fig. 15A)。しかし、コントロールとして使用したrabbit IgG (IgG from rabbit serum, Sigma-Aldrich)を一次抗体として反応させた場合においても卵細胞に同様の蛍光が観察された (Fig. 15A)。これは、卵細胞で観察される蛍光はバックグラウンドの蛍光 (卵細胞の自家蛍光) であることを示している。一方で、濾胞細胞が一部欠落し、卵黄膜が露出したマボヤ卵巢卵の免疫染色の結果、濾胞細胞欠落部位における卵巢卵の外側では蛍光は観察されなかった (Fig. 15B)。この結果は、卵巢卵の外側で観察される蛍光は卵黄膜ではなく濾胞細胞由来であることを示している (Fig. 15C)。

抗HrOvochymase抗体がHrOvochymaseに反応していることを確かめるため、濾胞細胞ホモジネートを用いてSDS-PAGEを行い、200 kDaに位置するゲル断片を切り出した。このゲル断片に含まれるタンパク質をAsp-Nで消化し、そのペプチド断片をLC/MS/MSを使用して解析した。その結果、このタンパク質画分からHrOvochymase由来の28種類のペプチドが検出された (Fig. 16A)。これらペプチドはHrOvochymaseアミノ酸配列のAsp⁶⁷からGln¹⁵⁷⁵の範囲で検出されたものである (Fig. 16B)。この結果は、マボヤ卵巢卵の濾胞細胞における200 kDaのタンパク質にはHrOvochymaseが含まれており、C末端側でプロセシングされていない、ほぼ全長のHrOvochymaseが存在することを示している。

1-4. 考察

1-4-1. *HrProacrosin* と *HrOVCH* の比較

受精に関与するプロテアーゼとして、マボヤ精子から2種類のトリプシン様プロテアーゼが精製され、その内のひとつであるHrAcrosinは酵素学的な側面から哺乳類acrosinと類似しているトリプシン様プロテアーゼであり、哺乳類acrosinのホモログであると考えられてきた(Sawada *et al.*, 1984a; Sawada. 2002)。その後、cDNAクローニングが検討された結果、HrAcrosinは前駆体タンパク質であるHrProacrosinがシグナルペプチド、1つのトリプシンプロテアーゼドメインおよび2つのCUBドメインがプロセシングされた活性型プロテアーゼであることが明らかになった (Kodama *et al.*, 2001)。ところが、近年マボヤを含めた数種類のホヤ類についてゲノムが解読され、マボヤのゲノムデータベースが構築されたことを受けて *HrProacrosin* を調べ直したところ、*HrProacrosin* はマボヤゲノムデータベース Halocynthia roretzi MTP2014上の *Harore.CG.MTP2014.S89. g15383* 遺伝子モデル (本研究において *HrOVCH* と名付けた) の5'側の一部にヒットすることが明らかになった (Fig. 2A)。

HrProacrosin cDNA (Accession number: AB052635, Kodama *et al.*, 2001) および本研究で明らかにされた *HrOVCH* cDNA (Accession number: LC102208) を比較した結果、*HrProacrosin* は3'-end付近に4塩基の挿入 (C¹⁴⁹⁸-A¹⁴⁹⁹-G¹⁵⁰⁰-C¹⁵⁰¹) があり、フレームシフトが生じて約20塩基後に終止コドンが現れる塩基配列であることが示された (Fig. 6)。また遺伝子モデルにおいても *HrProacrosin* と同様の4塩基挿入は見つからなかった (Fig. 2B)。 *HrProacrosin* および *HrOVCH* 間の塩基配列に上記のような挿入が確認された理由として次の可能性が考えられる: 1) *HrProacrosin* を含む *HrOVCH* のスプライシングバリエーションが存在する可能性、2) *HrProacrosin* のクローニングの際にPCRエラーがあった可能性、3) 選別したクローンに偶然4塩基の挿入があった可能性、4) シーケンス解析におけるエラーの可能性の4つである。1) の可能性を完全に否定する証拠はないが、本研究では *HrProacrosin* 遺伝子の塩基配列を持つcDNAを得ることができなかったことから、2) から4) の可能性が高いと考えられる。

1-4-2. *HrOvochymase* と相同性のあるタンパク質検索

全長HrOvochymase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および6つのCUBドメインで構成されるポリプロテアーゼとして発現することが明らかにされた (Fig. 7B)。そして、ドメイン構造はヒト、ブタ、アフリカツメガエルを含む脊椎動物において発見されていたovochoymaseに類似していることが示された (Fig. 9B)。脊椎動物と姉

妹群に属す尾索動物におけるovochymaseの報告は本研究が初めてであり、近年のホヤ類ゲノムデータベースの構築によりHrOVCHのホモログと考えられる遺伝子が*B. schlosseri*、*P. mammillata*、*Ciona intestinalis*および*C. savignyi*にあることが示された (2016年1月29日検索) (Table 2)。このことは、ovochymaseが脊椎動物およびその姉妹群である尾索動物を含む脊索動物において幅広く保存されたタンパク質であることを示唆している。

HrOvochymaseはそのドメイン構造からovochymaseに類似していることが示された (Fig. 9B)。Ovochymaseはovochymase-1およびOvochymase-2の2タイプに分けられる。しかし、本研究で同定したHrOvochymaseはNCBIのnr-protein-databaseに対するblast検索の結果、既知のovochymase-1およびovochymase-2のどちらにも相同性があると示されたことから、HrOvochymaseがovochymase-1またはovochymase-2のどちらかに明確に分類される分子ではないと考えられる (data not shown)。

1-4-3. HrOvochymase における N 型糖鎖修飾アミノ酸残基の予測

HrOvochymaseはSDS-PAGEにより200 kDaに位置することが示された (Fig. 14)。アミノ酸残基から推定される分子量は 174, 601 Da であることと比較すると少し分子量が大きい。HrOvochymase推定アミノ酸配列には合計10箇所のN型糖鎖修飾アミノ酸残基の存在が予測されたことから、HrOvochymaseは糖鎖修飾されたため推定分子量よりも高分子側に検出された可能性が考えられる (Fig. 7A、マゼンタラベル)。

1-4-4. HrOvochymase 前駆体型ポリプロテアーゼが活性型トリプシン様プロテアーゼにプロセシングされる可能性

HrOvochymase前駆体型ポリプロテアーゼを構成する3つのトリプシン様プロテアーゼドメインのうち、HrOvochymaseトリプシン様プロテアーゼドメイン-alphaおよび-betaは活性型トリプシン様プロテアーゼになりうると考えられる。なぜなら、三つ組触媒アミノ酸残基としてHis⁷⁶、Asp¹³²、Ser²²⁷およびHis⁶¹⁷、Asp⁶⁶⁵、Ser⁷⁶⁰が保存されており、Ser²²⁷およびSer⁷⁶⁰の6残基前にAsp²²¹およびAsp⁷⁵⁴が存在しているからである (Fig. 7A、黄ラベルおよび青ラベル)。Asp²²¹とAsp⁷⁵⁴は塩基性アミノ酸を収容するトリプシン様の基質結合ポケットS1部位を作るために重要である。さらに、HrOvochymase-alphaドメインおよび-betaドメインは活性化に必要である切断部位が、Arg³⁵-Ile³⁶およびArg⁵⁷⁴-Ile⁵⁷⁵に存在していた (Fig. 7A、緑ラベル)。一般的によく知られているヒト膵臓トリプシノーゲン (前駆体) の活性化

は、enteropeptidaseによってLys¹⁵-Ile¹⁶-Val¹⁷-Gly¹⁸-Gly¹⁹が切断され、Asp¹⁹⁴ (Ser¹⁹⁵の6残基前)と結合するためのIle¹⁶が露出し、基質結合ポケットS1部位の構造が変化することが知られている (Bode *et al.*, 1978; Barrett *et al.*, 2013)。この報告を考慮すると、HrOvochymaseトリプシン様プロテアーゼ-alphaおよび-betaは活性型になるための条件がそろっており、プロセシングあるいは自己触媒により各々が活性型トリプシン様プロテアーゼになる可能性が高い。一方、HrOvochymaseトリプシン様プロテアーゼドメイン-gammaは三つ組触媒アミノ酸残基が保存されておらず (Thr¹³⁹¹, Asp¹⁴³⁴, Val¹⁵²⁰)、活性化に必要な切断部位も存在していないため(Ser¹³⁵¹-Ser¹³⁵²)、不活性型であると考えられる(Fig. 7A)。

Ovochymase前駆体型ポリプロテアーゼから活性型プロテアーゼになる例として、*Xenopus laevis* ovochymase-1/polyproteaseと ovochymase-2/oviductinが報告されている。*X. laevis* ovochymase-1/polyproteaseはシグナルペプチド、2つのトリプシン様プロテアーゼドメイン、1つのキモトリプシン様プロテアーゼドメインおよび5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 (Lindsay *et al.*, 1999b)。この *X. laevis* ovochymase-1/polyproteaseは翻訳後のプロセシングによってovotrypsin 1 (1つのトリプシン様プロテアーゼドメインと1つのCUBドメイン)、ovotrypsin 2 (1つのトリプシン様プロテアーゼドメインと2つのCUBドメイン)、そしてovochymase (1つのキモトリプシン様プロテアーゼドメインと1つのCUBドメイン)になることが報告されている (Lindsay *et al.*, 1999b)。さらに、*X. laevis* ovochymase-2/oviductinはシグナルペプチド、2つのトリプシン様プロテアーゼドメインと3つのCUBドメインで構成される前駆体タンパク質である (Lindsay *et al.*, 1999a)。*X. laevis* ovochymase-1/polyproteaseと同様に、ovochymase-2/oviductinも翻訳後プロセシングにより oviductin-alpha (1つのトリプシン様プロテアーゼドメインと2つのCUBドメイン)、oviductin-beta (1つのトリプシン様プロテアーゼドメインと1つのCUBドメイン) になることが報告されている (Lindsay *et al.*, 1999b)。そして、oviductin-betaを除く ovotrypsin 1、ovotrypsin 2、ovochymase、oviductin-alphaの各々が活性型プロテアーゼとして発見されている。これらを考慮すると、前駆体型ポリプロテアーゼであるHrOvochymaseも活性型HrOvochymase-alphaおよびHrOvochymase-beta、そして不活性型HrOvochymase-gammaにプロセシングされている可能性が考えられる。

本研究で同定したHrOvochymaseはシグナルペプチド、3つのトリプシンプロテアーゼドメインと6つのCUBドメインから構成される前駆体型ポリプロテアーゼであった。また、*X. laevis* ovochymase-1/polyproteaseおよびovochymase-2/oviductinのプロセシング、そしてト

トリプシノーゲンの活性化条件を考慮すると、他のトリプシン様プロテアーゼあるいは自己触媒によってHrOvochymase-alphaおよびHrOvochymase-betaは活性型トリプシン様プロテアーゼになりうることが示唆された。今後HrOvochymaseのプロテアーゼとしての機能を明らかにするため、まずプロセシングされたHrOvochymase-alpha、-betaおよび-gammaが存在するか否か、プロテアーゼ活性を持つか否かを調べる必要があると考えられる。

1-4-5. HrOvochymase の発現と局在

精巣および精子ホモジネートのウェスタンブロッティングと精子の免疫染色の結果は、HrOvochymaseが120 kDa、85 kDa、52 kDaのプロセシングされたタンパク質断片として精巣および精子に存在し、精子の頭部先端、中央およびミトコンドリア近傍に局在している可能性を示していた (Fig. 12および13A, B)。しかし、LC/MS/MS解析の結果、抗HrOvochymase抗体が反応した 120 kDa、85 kDa、52 kDa の精巣タンパク質をAsp-Nで消化したペプチドのうち、HrOvochymase由来のペプチドは検出限界以下だった (data not shown)。これはHrOvochymaseが精巣および精子においてLC/MS/MSで検出できないくらい微量にしか含まれていない可能性を示唆している。

マボヤ卵巢卵のウェスタンブロッティングと免疫染色の結果、HrOvochymaseは200 kDaのタンパク質として濾胞細胞に存在することが明らかになった (Fig. 14)。濾胞細胞中の200 kDaに一致していたタンパク質のペプチドをLC/MS/MSを利用して解析した結果、この200 kDaのタンパク質にHrOvochymase由来のペプチドが含まれていることが確認できた (Fig. 16A, B, C, D)。これらの結果を合わせると、HrOvochymaseは前駆体型ポリプロテアーゼとして濾胞細胞に局在していることが明らかになった。また、マボヤ卵巢卵の免疫染色の結果、HrOvochymaseが濾胞細胞に局在していることが示され、上記ウェスタンブロッティングの結果を裏付けている。

第二章 抗 HrOvochymase 抗体を用いた阻害実験の検討

2-1. 序章

生殖期のマボヤ卵巢には成熟しつつある卵母細胞が貯蔵されているが、完全に成熟した卵子はほとんど観察されない (Sakairi and Shirai, 1991)。すなわち、マボヤ卵は放卵前の卵子形成最終段階に、卵黄膜と卵細胞膜との間に囲卵腔と呼ばれる空間が形成され、その中にテスト細胞が分散された卵子になる (Satoh, 1994; Fuke and Numakunai, 1996; 澤田, 2014)。そして、完全に成熟した卵子が未受精卵として放卵される (Sakairi and Shirai, 1991)。マボヤ卵子形成の最終段階は卵核胞の崩壊、卵黄膜上昇および自家不和合性獲得という過程で構成されていることが *in vitro* における実験で示され、これらの過程にトリプシン様プロテアーゼが関与している可能性が報告されている (Fuke, 1983; Sakairi and Shirai, 1991; Fuke and Numakunai, 1996; 1999; 佐藤, 1998; 澤田, 2014)。

マボヤ卵巢から採集した卵巢卵は、卵黄形成期、卵細胞からのテスト細胞放出期、テスト細胞が卵黄膜内側に並ぶ時期に分けられる (Fuke and Numakunai, 1996; 佐藤, 1998; 澤田, 2104)。いずれのマボヤ卵巢卵も卵核胞が存在するが、海水中で卵巢卵をインキュベートすることにより卵核胞の崩壊および囲卵腔の出現を観察することができる。しかし、トリプシン阻害剤である leupeptin や STI 存在下で卵巢卵をインキュベートすると卵核胞崩壊が阻害される (Sakairi and Shirai, 1991)。さらに、弱酸性 pH 5.0 あるいは Ca^{2+} 欠除海水中で卵巢卵をインキュベートした場合も卵核胞崩壊が阻害される。ところが、阻害剤を除去あるいは弱酸性から pH 8.0 に戻した海水中で再インキュベートすると卵核胞崩壊が起こる (Sakairi and Shirai, 1991)。また興味深いことに、濾胞細胞除去卵巢卵は卵核胞崩壊を起こさないが、この濾胞細胞除去卵巢卵をトリプシン存在下でインキュベートすると卵核胞崩壊が起こる (Sakairi and Shirai, 1991)。それゆえ、濾胞細胞由来のトリプシン様プロテアーゼがマボヤ卵巢卵の卵核胞崩壊に関与している可能性が示されている (Sakairi and Shirai, 1991)。

マボヤ卵子の自家不和合性は卵子形成の最終段階で獲得される (Fuke and Numakunai, 1999)。卵核胞崩壊を起こしたマボヤ卵巢卵は自己／非自己両者の精子と受精するが、徐々に自己精子とは受精できなくなる (*in vitro* における海水インキュベート4時間後で約60%の卵巢卵は自己精子と受精しない) (Fuke and Numakunai, 1999)。興味深いことに、マボヤ卵巢卵を予めトリプシン処理すると濃度依存的に卵巢卵は自己精子と受精できなくなると同

時に、マボヤ卵巣卵の卵黄膜上昇 (囲卵腔の増大)が観察される (Fuke and Numakunai, 1999)。さらに、マボヤ濾胞細胞除去卵をトリプシン処理すると卵黄膜上昇が確認できる (この場合、濾胞細胞がないので受精はできない) (Fuke and Numakunai, 1999)。これらの結果から、トリプシン様プロテアーゼがマボヤ卵巣卵の自家不和合性獲得および卵黄膜上昇に関与すると考えられている (Fuke and Numakunai, 1999)。

一方、マボヤ受精において、トリプシン様およびキモトリプシン様酵素活性を示すプロテアーゼが特に精子の卵黄膜結合・溶解・通過に関与している可能性が報告されている (Hoshi *et al.*, 1981)。その後、キモトリプシン様酵素活性を示すマボヤ精子プロテアソームが卵黄膜を溶解するライシンとして機能していることが報告されている (Sawada, 2002; Sawada *et al.*, 2002a; 2002b)。しかし、STI、leupeptinあるいはleupeptinアナログもマボヤの受精を強く阻害することから、トリプシン様プロテアーゼも受精に関与している可能性が考えられる (Sawada *et al.*, 1984b; Sawada and Someno, 1996)。そのトリプシン様プロテアーゼの候補として、マボヤ精子HrAcrosinとHrSpermosinが挙げられる (Sawada *et al.*, 1984a; 1984b; 1996)。

本研究の第一章においてHrOvochymaseはプロセッシングにより2つの活性型トリプシン様プロテアーゼになる可能性が示された。そこで、第二章ではHrOvochymaseの機能を明らかにすることを目指し、特異的抗体を用いたマボヤ卵子形成、卵の自家不和合性獲得および受精について*in vitro*における阻害実験の検討を行い、HrOvochymaseの機能を考察した。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 実験材料

本章では、第一章と同様に、青森県陸奥湾産の養殖マボヤA型あるいはC型の成体を8 °Cの海水で、恒明条件下において飼育した個体を実験材料とした。

2-2-2. 抗 HrOvochymase 抗体によるマボヤ受精阻害実験

Hoshiらの方法 (Hoshi *et al.*, 1981)を参考にし、配偶子の採集および懸濁液の調製は8 °Cで行った。海水温と光条件を調節して放精放卵を誘導させたマボヤC型の成体から生殖巣を切り出し、UV-irradiated filleted seawater (FSW)を入れたペトリ皿の中に置き、生殖巣の輸精管および輸卵管から放出される精子と未受精卵を採集した。精子は1.5 mlチューブに入れ、使用するまで氷上で保存した。未受精卵はFSWで3回洗浄し、使用するまでFSWを加えた 50 mlチューブに入れて氷上で保存した。精子は各濃度の抗HrOvochymase抗体を含む480 µlのFSWに懸濁し、8 °Cで30分間反応させた後、約100個の卵を含む20 µlの未受精卵懸濁液を加え、13 °Cで2時間反応させた。その後、実体顕微鏡下で2細胞期のマボヤ卵数および総卵数を数え、受精率を算出した。抗HrOvochymase抗体は「1-2-6. 抗HrOvochymase抗体の作製」で調製したものを使用し、0.4, 2, 10, 50 µg/mlという条件下で精子とプレインキュベートした。コントロールとしてrabbit (IgG from rabbit serum, Sigma-Aldrich)を終濃度1 mg/mlになるようPBSに溶解したものを使用した。この実験を3回行った。

2-2-3. 抗 HrOvochymase 抗体によるマボヤ卵子形成阻害実験

Sakairiらの方法 (Sakairi and Shirai, 1991) を参考にし、配偶子の採集と懸濁液の調製は8 °Cで行った。マボヤA型の成体から切り出した生殖巣をFSWで洗浄し、卵巢部分を解剖バサミで傷つけ、生殖巣を押し出すようにして採集した卵巢卵をステンレス製茶こしでろ過して残渣を除去し、卵巢卵を含むろ液を50 mlチューブに回収し、FSWで3回洗浄した。そして卵巢卵と等量のFSWを加えて卵巢卵懸濁液とし、使用するまで氷上で保存した。各濃度の抗HrOvochymase抗体を含む480 µlのFSWに、約100個の卵巢卵を含む20 µlの卵巢卵懸濁液を加えて混合した後、13 °Cでインキュベートし4時間後および17時間40分後の卵巢卵を観察した。そして、卵核胞を持つ卵巢卵、卵核胞が観察されない成熟卵巢卵 (FOVE) あるいは囲卵腔が観察される未受精卵 (UFE) の3つに分けて各種卵巢卵の数を数えた。そしてインキュベート4時間後の成熟卵巢卵あるいは17時間40分後の未受精卵の数と総卵数か

ら各ステージ卵巣卵の割合を算出した。抗HrOvochymase抗体は「1-2-6. 抗HrOvochymase抗体の作製」で調製したものを使用し、2, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ という条件下で卵巣卵とインキュベートした。コントロールとして、rabbit IgG (IgG from rabbit serum, Sigma-Aldrich)、STI (大豆トリプシンインヒビター, Wako)、BSA (Sigma-Aldrich) を終濃度1 mg/ml になるようPBSに溶解したものを使用した。この実験を3回あるいは5回行った。

2-2-4. 抗 HrOvochymase 抗体による卵巣卵の自家受精阻害実験

Fukeらの方法 (Fuke and Numakunai, 1999)を参考にして、配偶子の採集と調製は8 $^{\circ}\text{C}$ で行った。マボヤA型の卵巣卵は「2-2-3. 抗HrOvochymase抗体によるマボヤ卵子形成阻害実験」と同様にして採集し、卵巣卵懸濁液を調製した。解剖した生殖巣のうち精巣部分を切り出し、FSWで洗浄後、余分なFSWをキムワイプで拭き取って1.5 mlチューブに加えて、使用するまで4 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。そして媒精前に約0.5 mm角の精巣断片を1 mlのFSW中に加え、解剖バサミで切り刻んで混合したものを精子懸濁液として使用した。

各濃度の抗HrOvochymase抗体を含む480 μl のFSWに、約100個の卵巣卵を含む20 μl の卵巣卵懸濁液を加えて混合し、13 $^{\circ}\text{C}$ で2時間プレインキュベートした。その後、卵巣卵をFSWで3回洗浄し、プレインキュベートした卵巣卵を含む480 μl のFSWに20 μl の精子懸濁液を加えて混合し、13 $^{\circ}\text{C}$ で4時間インキュベートした。そしてKEYENCE BZ-9000を使って卵割が観察された卵と総卵数を数えた。抗HrOvochymase抗体は「1-2-6. 抗HrOvochymase抗体の作製」で調製したものを使用し、1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ という条件下で卵巣卵とプレインキュベートした。コントロールとしてrabbit IgG (IgG from rabbit serum, Sigma-Aldrich)、STI (大豆トリプシンインヒビター, Wako) を終濃度1 mg/ml になるようPBSに溶解したものを使用した。この実験を5回行った。

2-3. 実験結果

2-3-1. 抗 HrOvochymase 抗体のマボヤ受精への影響

抗HrOvochymase抗体がマボヤの受精を阻害するか否かを検討した。その結果、抗HrOvochymase抗体は0.8, 4, 20 $\mu\text{g/ml}$ の濃度ではコントロールであるrabbit IgGと比較して受精を有意に阻害しないことが示された (Fig. 17)。しかし、抗HrOvochymase抗体を100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度にしたところ、受精率は74.4%に低下することが示された。この時、rabbit IgG存在下での受精率は94.8%であったことから、抗HrOvochymase抗体による受精率との間に有意な差が認められた (Fig. 17)。この結果は、100 $\mu\text{g/ml}$ の抗HrOvochymase抗体は約20%受精を阻害したことを示している。

2-3-2. 抗 HrOvochymase 抗体のマボヤ卵子形成への影響

第一減数分裂前期で停止したマボヤ卵巣卵は、*in vitro*において成熟および卵子形成を誘導することができる (Shakairi and Shirai, 1991; Fuke and Numakunai, 1999)。マボヤ卵巣卵 (卵細胞内に卵核胞が観察される卵巣卵、OVE) を13 $^{\circ}\text{C}$ のFSW, pH8.0中でインキュベートすると、2~4時間後に卵細胞内の卵核胞の崩壊が起こった成熟卵巣卵 (FOVE) が、17時間以降に囲卵腔の存在 (卵黄膜の上昇) する未受精卵 (UFE) が確認された (Fig. 18A)。そこで、抗HrOvochymase抗体が*in vitro*におけるマボヤ卵巣卵成熟と卵子形成を阻害するかどうかを検討した (Fig. 18B)。その結果、抗HrOvochymase抗体 2, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ を含むFSW中においてマボヤ卵巣卵をインキュベートした場合、4時間後の卵巣卵は98.9%, 97.4%, 96.6%が成熟卵巣卵だった (Fig. 18C)。コントロールとして用いたrabbit IgGを含む同条件下の場合、96.7%, 96.1%, 97.4%が成熟卵巣卵だった (Fig. 18C)。ポジティブコントロールとして用いたSTI (トリプシン阻害剤) を含む同条件下の場合、95.6%, 99.3%, 98.1%が成熟卵巣卵だった (Fig. 18C)。ネガティブコントロールとして用いたBSAを含む同条件下の場合、97.9%, 87.2%, 87.4%が成熟卵巣卵だった (Fig. 18C)。これらの結果は、2~50 $\mu\text{g/ml}$ というタンパク質濃度範囲において、抗HrOvochymase抗体、rabbit IgG、STIあるいはBSAと卵巣卵をインキュベートした場合、いずれの濃度条件においてもほとんどの卵巣卵が成熟卵巣卵になったことを示している。よって、本実験で検討した条件において、抗HrOvochymase抗体は卵巣卵の卵核胞崩壊が起こる過程を阻害しないことが示された。

一方で、抗HrOvochymase抗体 2, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ を含むFSW中において卵巣卵をインキュベートした場合、17時間40分後の卵巣卵は44.7%, 31.4%, 18.8%が未受精卵だった (Fig. 18D)。

さらにSTIを含む同条件下の場合、7.9%, 4.6%, 4.5%が未受精卵だった (Fig. 18D)。しかし、コントロールとして用いたrabbit IgGを含む条件下の場合は65.2%, 75.5%, 76.2%が未受精卵で、BSAの場合は74.9%, 82.6%, 86.8%が未受精卵だった (Fig. 18D)。これらの結果は、コントロールと比べて抗HrOvchymase抗体あるいはSTIを含むFSWで卵巣卵をインキュベートした場合、未受精卵へと成熟する割合が減少していることを示している。つまり、本実験で検討した条件において、抗HrOvchymase抗体は卵巣卵の卵黄膜上昇 (囲卵腔の増大) が起こる過程を阻害したことが明らかになった。

2-3-3. 抗 HrOvchymase 抗体のマボヤ卵巣卵自家受精への影響

2-3-2において、抗HrOvchymase抗体はマボヤ卵巣卵の卵黄膜上昇 (囲卵腔の増大) 過程を阻害したことが示された (Fig. 18D)。卵核胞崩壊後のマボヤ卵巣卵は自己／非自己両者の精子と受精可能であるが、卵黄膜上昇 (囲卵腔の増大) 過程を経るとマボヤ卵巣卵は自己精子と受精できなくなる (Fuke and Numakunai, 1999)。つまり、マボヤ卵巣卵は卵黄膜上昇 (囲卵腔の増大) が観察される過程で自家不和合性を獲得すると考えられる。そこで、抗HrOvchymase抗体がマボヤ卵巣卵の自家不和合性獲得を阻害するかどうか検討した (Fig. 19A)。その結果、抗HrOvchymase抗体 100 μ g/mlを含むFSWでプレインキュベートしたマボヤ卵巣卵に自己精子を媒精した場合、自家受精率は59.3%であった (Fig. 19C)。しかし、コントロールとして用いたrabbit IgGをプレインキュベートした場合、自家受精率は22.4%だった (Fig. 19C)。ポジティブコントロールとして用いたSTIをプレインキュベートした場合、自家受精率は58.4%だった (Fig. 19C)。また抗体や阻害剤のバッファーであるPBSのみをプレインキュベートした場合、自家受精率は26.5%だった (Fig. 19C)。なお、上記条件の卵巣卵に非自己精子を媒精した場合、いずれの条件においても受精率は100%であった (Fig. 19B)。これらの結果は、抗HrOvchymase抗体あるいはSTIでプレインキュベートした卵巣卵に自己精子を媒精した場合、rabbit IgGあるいはPBSの場合と比べて自家受精率が高いことを示している。すなわち、本実験で検討した条件において、抗HrOvchymase抗体はマボヤ卵巣卵の自家不和合性獲得を阻害したことを示している。

2-4. 考察

2-4-1. 抗 HrOvochymase 抗体によるマボヤ受精への阻害効果

抗HrOvochymase抗体がマボヤ受精を阻害するかどうか検討したところ、0.8~20 $\mu\text{g/ml}$ という低濃度抗HrOvochymase抗体存在下においてマボヤ受精は阻害されなかったが、100 $\mu\text{g/ml}$ という高濃度抗HrOvochymase抗体存在下においてマボヤ受精は約20%阻害された (Fig. 17)。本実験条件のように高濃度の抗HrOvochymase抗体存在下においてのみ受精阻害が観察された理由として、抗体の反応性は受精のような「速い反応」に対して阻害効果が弱い、一方で卵子形成のような「遅い (緩徐な) 反応」に対しては抗体による阻害効果が出やすいと考えられる。これを考慮すると、低濃度の抗HrOvochymase抗体存在では受精阻害効果が弱かった可能性が考えられる。

本研究で使用した抗HrOvochymase抗体は、HrOvochymase-alphaドメインに対する特異的抗体である。第一章で考察したように、HrOvochymase前駆体型ポリプロテアーゼはプロセシングによりHrOvochymase-alphaとHrOvochymase-betaという活性型トリプシン様プロテアーゼになる可能性がある。そして、HrOvochymase-alphaアミノ酸残基に対してHrOvochymase-betaアミノ酸残基は34.5%しか一致しないことから、抗HrOvochymase抗体がHrOvochymase-betaタンパク質に反応する可能性は低い (data not shown)。このような場合、抗HrOvochymase抗体はHrOvochymase-alphaを阻害することができるが、HrOvochymase-betaを阻害する可能性は低いと考えられる。つまり、主にHrOvochymase-betaという活性型トリプシン様プロテアーゼが受精に関与していた場合、本受精阻害実験では十分な阻害効果を示すことができなかったと考えられる。

本研究では、マボヤ精子トリプシン様プロテアーゼHrSpermosinのような特異的抗体による受精阻害効果 (Sawada *et al.*, 1996) は観察されなかったが、100 $\mu\text{g/ml}$ という抗HrOvochymase抗体の濃度条件下においては20%の受精阻害効果を示した (Fig. 17)。したがって、抗HrOvochymase抗体による受精阻害効果が弱いとはいえ、HrOvochymaseが受精に関与することを示唆する結果であると考えられる。

2-4-2. 抗 HrOvochymase 抗体によるマボヤ卵子形成への阻害効果

トリプシン阻害剤はマボヤ卵子形成の卵核胞崩壊、卵黄膜上昇 (囲卵腔増大) を阻害することが報告されている (Sakairi and Shirai, 1991; Fuke and Numakunai, 1999)。そこで、抗HrOvochymase抗体が*in vitro*におけるマボヤ卵子形成を阻害するかどうか検討した結果、抗

HrOvochymase抗体およびSTIは卵巣卵の卵核胞崩壊を阻害しなかった (Fig. 18C)。STI 20, 200, 2000 $\mu\text{g/ml}$ を含む海水中においてマボヤ卵巣卵をインキュベートした結果、卵核胞崩壊が起こった割合は92%、16%、5%だったと報告されている (Sakairi and Shirai, 1991)。これを考慮すると、本実験のように低濃度条件下 (2, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$) では卵核胞崩壊を阻害することができなかったと考えられ、本実験結果からHrOvochymaseが卵核胞崩壊に関与するかどうか明らかにすることはできなかった。抗HrOvochymase抗体が卵核胞崩壊を阻害するか否か、さらに高濃度の抗体存在下における検討が必要である。また、マボヤ卵から約31 kDaのトリプシン様プロテアーゼが精製されたことが報告されており (Sawada *et al.*, 1985)、卵核胞崩壊にはこのマボヤ卵由来の31 kDaのプロテアーゼが関与している可能性も考えられる (Sakairi and Shirai, 1991)。

抗HrOvochymase抗体は*in vitro*におけるマボヤ卵巣卵の卵黄膜上昇を阻害した (Fig. 18D)。このことは、活性型HrOvochymase-alphaがマボヤ卵巣卵の卵黄膜上昇に関与することを示唆している。また、STIを含む海水中でマボヤ卵巣卵をインキュベートすると卵黄膜上昇は阻害され、トリプシンを含む海水中でマボヤ濾胞細胞除去卵巣卵をインキュベートすると卵黄膜上昇を誘導できることが報告されている (Fuke and Numakunai, 1999)。この報告を合わせて考慮すると、マボヤ濾胞細胞由来のトリプシン様プロテアーゼHrOvochymase-alphaがマボヤ卵巣卵の卵黄膜上昇に関与していると考えられる。トリプシン様プロテアーゼがマボヤ卵巣卵の卵黄膜上昇に関わる詳細なメカニズムは明らかではないが、次の可能性が考えられる。マボヤ濾胞細胞由来の活性型HrOvochymase-alphaは卵黄膜タンパク質を部分分解し、卵黄膜に伸縮性が生じること、また囲卵腔タンパク質等が分解されて膠質浸透圧が上昇して卵黄膜外から囲卵腔内へと海水が浸入し、その結果マボヤ卵黄膜が上昇するという可能性である (Schuel *et al.*, 1973; Carroll and Epel, 1975; Sawada *et al.*, 1984c)。この可能性を証明するために、マボヤ濾胞細胞由来のHrOvochymase-alpha活性型プロテアーゼの精製を試み、HrOvochymase-alphaが卵黄膜タンパク質や囲卵腔のタンパク質を分解するか否かを調べる必要がある。

2-4-3. 抗 HrOvochymase 抗体によるマボヤ卵の自家不和合性獲得への阻害効果

本研究において、抗HrOvochymase抗体はマボヤ卵巣卵の卵黄膜上昇を阻害していることが示された (Fig. 18D)。興味深いことに、*in vitro*におけるマボヤ卵巣卵は卵黄膜上昇 (囲卵腔増大) と同時期に自家不和合性を獲得することが報告されている (Fuke and Numakunai,

1999)。そこで、抗HrOvochymase抗体がマボヤ卵巣卵の自家不和合性獲得を阻害するか否かを検討した。その結果、抗HrOvochymase抗体100 µg/mlを含む海水中においてマボヤ卵巣卵をプレインキュベートした場合、コントロールであるrabbit IgGの場合と比較して、マボヤ卵巣卵の自家受精率は高くなることが分かった（自家受精率は抗HrOvochymase抗体: 59.3%, rabbit IgG: 22.4%）(Fig. 19C)。この結果は、抗HrOvochymase抗体がマボヤ卵巣卵の*in vitro*における自家不和合性獲得を阻害したことを示している。そしてHrOvochymase-alphaがマボヤ卵巣卵の自家不和合性因子に関与する可能性を示唆している。興味深いことに、マボヤ卵の自家不和合性因子HrVC120前駆体タンパク質は、furinおよびトリプシン様プロテアーゼによるプロセッシングを経て、HrVC70成熟型タンパク質になると考えられている (Sawada *et al.*, 2002)。これは、HrVC120アミノ酸配列にfurinによって切断されうる部位 (Arg¹⁰⁴⁴-Lys¹⁰⁴⁵-Arg¹⁰⁴⁶-Arg¹⁰⁴⁷-|-Gly¹⁰⁴⁸)、トリプシン様プロテアーゼによる切断部位 (Gly⁶⁶⁷-Arg⁶⁶⁸-|-Ala⁶⁶⁹) があること、HrVC70のC末端アミノ酸配列分析の結果からC末端アミノ酸残基が -Gly-Arg であること、そしてMALDI/TOF/MS解析により得られた分子量と推定アミノ酸配列から得られる分子量が一致するという結果に起因している (Sawada *et al.*, 2002)。この報告を考慮すると、HrVC120前駆体タンパク質からHrVC70成熟型タンパク質へのプロセッシングにHrOvochymase-alpha活性型トリプシン様プロテアーゼが関わっている可能性が考えられる。今後、マボヤ濾胞細胞由来のHrOvochymase-alpha活性型プロテアーゼを精製し、HrOvochymase-alphaがHrVC120をプロセッシングするか、マボヤ卵巣卵の自家不和合性を誘導できるかを検討することが重要な課題である。

結語

マボヤ大量精子サンプルから精製された2種類のトリプシン様プロテアーゼのうち、HrAcrosinとその前駆体HrProacrosinはその局在や受精との関連性など不明な点が多く残されていた。ところが、近年公開されたホヤゲノムデータベースによって、HrAcrosinの前駆体HrProacrosinの遺伝子がコードされているのは*Harore.CG.MTP2014.S89.g15383*遺伝子モデルの一部分であること、そしてHrProacrosinを*Harore.CG.MTP2014.S89.g15383*遺伝子モデルと比較した場合4塩基の挿入が存在するためにフレームシフト突然変異と終止コドンが出現する可能性が示された。さらに、この*Harore.CG.MTP2014.S89.g15383*遺伝子モデルの推定アミノ酸配列はProacrosin (acrosin zymogen) ではなく前駆体型ポリプロテアーゼであるovochymaseタンパク質ファミリーに類似していることが分かった。興味深いことに、*X. laevis*においてovochymaseは複数の活性型トリプシン様／キモトリプシン様プロテアーゼの前駆体ポリプロテアーゼであり、そしてプロセシングによって生じた活性型プロテアーゼは排卵前の卵子表面の糖タンパク質を分解し、精子結合能を与えていることが報告されている。そこで本研究では、HrAcrosinの前駆体HrProacrosinがコードされている遺伝子モデルをHrOVCH遺伝子と名付け、HrOvchymase前駆体型ポリプロテアーゼの発現を明らかにし、卵子形成および受精において機能しうることを明らかにした。

第一章において、HrOVCHの構造、発現と局在を解析した。その結果、HrOvchymase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および6つのCUBドメインで構成されるタンパク質で、ovochymaseと類似する前駆体型ポリプロテアーゼであることが明らかになった。HrOVCH mRNAは精巣および卵巢特異的に発現していることが示されたため、精巣、卵巢およびそれらの配偶子におけるタンパク質発現を検討した。その結果、少なくともHrOvchymaseはマボヤ卵巢卵の濾胞細胞において局在していることが明らかになった。

本研究において、クローニングにより精巣および卵巢の両者から得られたcDNAはHrOVCHであり、4塩基挿入のあるHrProacrosinをコードするcDNAは得られなかった。この要因としてHrOVCHにスプライシングバリエーションが存在する可能性、そしてHrProacrosinのクローニング実験 (Kodama *et al.*, 2001) において何らかのエラーが発生していた可能性が考えられた。これらの可能性を検討するため、今後クローニング数の増加やノーザンブロットングを詳細に行い、HrProacrosin mRNAの発現を慎重に確かめる必要がある。

Ovochymaseは *X. laevis* での発見を筆頭に脊椎動物における存在が報告されてきたが、脊椎動物の姉妹群を形成する尾索動物においてovochymaseが発見されたことは本研究が初めてである。本研究で発見されたHrOvochymaseは、*X. laevis* ovochymaseと同様に、自己触媒あるいは他のトリプシン様プロテアーゼによるプロセッシングによって活性型トリプシン様プロテアーゼになりうるアミノ酸残基で構成され、少なくともマボヤ卵の濾胞細胞に局在する前駆体型ポリプロテアーゼであることが示された。今後、HrOvochymase由来の活性型トリプシン様プロテアーゼを発見することが重要であり、さらにその生理的基質タンパク質の探索も課題である。

第二章において、HrOvochymaseのN末端側に位置していたトリプシン様プロテアーゼドメイン (HrOvochymase-alpha) に対する特異的抗体 (抗HrOvochymase抗体) を作製し、それを用いた阻害実験を検討した。その結果、抗HrOvochymase抗体はマボヤ卵子形成の最終段階である卵黄膜上昇と自家不和合性獲得、および受精への阻害効果を示した。この結果は、マボヤ濾胞細胞由来のHrOvochymase、特にHrOvochymase-alphaドメインを持つ活性型トリプシン様プロテアーゼがマボヤ卵子の卵黄膜上昇と自家不和合性獲得という卵子形成過程において機能する可能性と受精において機能する可能性の2つを示唆している。今後、HrOvochymase由来の活性型トリプシン様プロテアーゼがマボヤ卵の卵黄膜上昇あるいは自家不和合性獲得を誘引しうるか否か、またマボヤ精子あるいは未受精卵のいずれに存在するHrOvochymaseが受精に関与しているのかを検討する必要がある。

最後に、尾索動物マボヤ卵の濾胞細胞にHrOvochymaseが存在し、その特異的抗体はマボヤ卵の卵黄膜上昇と自家不和合性獲得への阻害効果があったことを示したのは本研究が最初である (Fig. 20)。これは長年不明だったマボヤ卵の卵黄膜上昇と自家不和合性獲得、そして受精とトリプシン様プロテアーゼとの関連の解明につながる第一歩になると考えられる。今後、HrOvochymase由来の活性型トリプシン様プロテアーゼの発見、生理的基質タンパク質の探索等を検討することがマボヤ卵子形成と自家不和合性獲得、および受精機構の解明につながると考えられる。

謝辞

本博士論文は、筆者が名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻博士課程後期課程において海洋発生生化学グループに所属して行った研究をまとめたものである。

本研究を行う機会と素晴らしい環境を与えて頂き、多大なるご指導、ご助言を賜りました指導教官である名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 澤田均教授に深く御礼申し上げます。

本論文の審査にあたり、有益なご意見を頂きました本学 大隅圭太教授、東山哲也教授、松田幹教授に深く御礼申し上げます。

本研究の第一章でコンストラクトを快く提供して頂き、基礎的な実験操作を直接ご指導頂きました本学 赤坂茉莉助教に深く御礼申し上げます。

本研究の第一章でLC/MS/MS解析を遂行するにあたり試料分析をご支援頂きました本学中澤志織特任助教に御礼申し上げます。

本研究の第一章でLC/MS/MS解析を遂行するにあたり試料調製を直接ご指導頂きました山田力志博士に深く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたりご意見を頂きました本学 荒木聡彦講師、原田淑人助教、白江麻貴特任助教、伊勢優史特任助教に御礼申し上げます。

本研究で使用した実験材料マボヤを提供して頂きました東北大学大学院生命科学研究科附属浅虫生物学教育研究センター 熊野岳教授、鷺尾正彦氏に深く御礼申し上げます。

筆者が名古屋大学大学院理学研究科附属臨海実験所において研究生活を送るにあたりご支援頂きました砂川昌彦氏、上村由貴代氏、福岡雅史氏に深く御礼申し上げます。

最後に、研究生活を送るにあたり様々な面で支えて頂いた研究室の皆様、友人、そして家族に心から感謝致します。

参考文献

- Akasaka M, Harada Y, Sawada H. 2010. Vitellogenin C-terminal fragments participate in fertilization as egg-coat binding partners of sperm trypsin-like proteases in the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 392: 479-484.
- Akasaka M, Kato KH, Kitajima K, Sawada H. 2013. Identification of novel isoforms of vitellogenin expressed in ascidian eggs. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 320: 118-128.
- Baba T, Kashiwabara S, Watanabe K, Itoh H, Michikawa Y, Kimura K, Takada M, Fukamizu A, Arai Y. 1989a. Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. *J Biol Chem* 264:11920-11927.
- Baba T, Kashiwabara S, Watanabe K, Arai S. 1989b. Primary structure of human proacrosin deduced from its cDNA sequence. *FEBS Lett* 244: 296-300.
- Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF. 2013. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Third edition, academic Press.
- Bode W, Schwager P, Huber R. 1978. The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding Ile-Val at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* 118: 88-122.
- Brozovic M, Martin C, Dantec C, Dauga D, Mendez M, Simion P, Percher M, Laporte B, Scornavacca C, Di Gregorio A, Fujiwara S, Gineste M, Lowe EK, Piette J, Racioppi C, Ristoratore F, Sasakura Y, Takatori N, Brown TC, Delsuc F, Douzery E, Gissi C, McDougall A, Nishida H, Sawada H, Swalla BJ, Yasuo H, Lemaire P. 2015. ANISEED 2015: a digital framework for the comparative developmental biology of ascidians.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
- De santis R, MR Pinto. 1991. Gamete self-discrimination in ascidians: a role for the follicle cells. *Mol Reprod Dev* 26:319-323.
- Fuke M. 1983 Self and non-self recognition between gametes of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Roux's Arch Dev Biol* 192:347-352.
- Fuke M, Numakunai T. 1996. Establishment of self-sterility of eggs in the ovary of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Roux's Arch Dev Biol* 205:391-400.
- Fukumoto M. 1993. Acrosome reaction in ascidians induced by a calcium ionophore. *J Struct Biol*

111: 77-83.

- Gerton GL, Hedrick JL. 1986. The coelomic envelope to vitelline envelope conversion in eggs of *Xenopus laevis*. *J Cell Biochem* 30: 341-350.
- Hardy DM, Hedrick JL. 1992. Oviductin. Purification and properties of the oviductal protease that processes the molecular weight 43,000 glycoprotein of the *Xenopus laevis* egg envelope. *Biochemistry* 31: 4466-4472.
- Harada Y, Takagaki Y, Sunagawa M, Saito T, Yamada L, Taniguchi H, Shoguchi E, Sawada H. 2008. Mechanism of self-sterility in a hermaphroditic chordate. *Science* 320: 548-550.
- Hoshi M, Numakunai T, Sawada H. 1981. Evidence for participation of sperm proteinases in fertilization of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*: effects of protease inhibitors. *Dev Biol* 86: 117-121.
- Katoh K, Standley MD. 2013. MAFFT multiple alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30:772-780.
- Kodama E, Baba T, Yokosawa H, Sawada H. 2001. cDNA cloning and functional analysis of ascidian sperm proacrosin. *J Biol Chem* 276: 24594-24600.
- Kodama E, Baba T, Kohno N, Satoh S, Yokosawa H, Sawada H. 2002. Spermosin, a trypsin-like protease from ascidian sperm: cDNA cloning, protein structures and functional analysis. *Eur J Biochem* 269: 657-663.
- Koressaar T, Remm M. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23: 1289-1291.
- Lindsay LL, Wieduwilt MJ, Hedrick JL. 1999a. Oviductin, the *Xenopus laevis* oviductal protease that processes egg envelope glycoprotein gp43, increases sperm binding to envelopes, and is translated as part of an unusual mosaic protein composed of two protease and several CUB domains. *Biol Reprod* 60: 989-995.
- Lindsay L, Hedrick J. 1998. Treatment of *Xenopus laevis* coelomic eggs with trypsin mimics pararecta oviductal transit by selectively hydrolyzing envelope glycoprotein gp43, increasing sperm binding to the envelope, and rendering eggs fertilizable. *J Exp Zool Part B* 281: 132-138.
- Lindsay LL, Yang JC, Hedrick JL. 1999b. Ovocymase, a *Xenopus laevis* egg extracellular protease, is translated as part of an unusual polyprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11253-11258.
- Mackie GO. 1995. On the 'visceral nervous system' of *Ciona*. *J Mar Biol Ass UK* 75: 141-151.

- Morgan TH. 1910. Cross-and self-fertilization in *Ciona intestinalis*. Roux's Arch Teil 30:206-235.
- Morgan TH. 1923. Removal of the block to self-fertilization in the ascidian *Ciona*. Proc Natl Acad Sci USA 9:170-171.
- Morgan TH. 1939. The genetic and physiological problems of self-sterility in *Ciona* III. Induced self-fertilization. J Exp Zool 80:19-54.
- Morgan TH. 1942. The genetic and physiological problems of self-sterility in *Ciona* IV. The genetic problem. J Exp Zool 90:199-288.
- Morgan TH. 1944. The genetic and physiological problems of self-sterility in *Ciona* VI. Theoretical discussion of genetic data. J Exp Zool 95:37-59.
- Nakazawa S, Shirae-Kurabayashi M, Otsuka K, Sawada H. 2015. Proteomics of ionomycin-induced ascidian sperm reaction: Released and exposed sperm proteins in the ascidian *Ciona intestinalis*. Proteomics 15: 4064-4079.
- Otsuka K, Yamada L, Sawada H. 2013. cDNA cloning, localization, and candidate binding partners of acid-extractable vitelline-coat protein Ci-v-Themis-like in the ascidian *Ciona intestinalis*. Mol Reprod Dev 80: 840-848.
- Peterson TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalIP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat Methods 8: 785-786.
- Powell JFF, Reska-Skinner MS, Prakash OM, Fischer HW, Park M, River EJ, Craig GA, Mackie OG, Sherwood MO. 1996. Two new forms of gonadotropin-releasing hormone in a protochordate and the evolutionary implications. Proc Natl Acad Sci:10461-10464.
- Saitoh Y, Sawada H, Yokosawa. 1993. High-molecular-weight protease complexes (proteasomes) of sperm of the ascidian, *Halocynthia roretzi*: isolation, characterization, and physiological roles in fertilization. Dev Biol 158: 238-244.
- Sakairi K, Shirai H. 1991. Possible MIS production by follicle cells in spontaneous oocyte maturation of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. Develop Growth & Differ 33:155-162.
- Satoh N. 1994. Developmental biology of ascidians. Cambridge.
- Sawada H. 2002. Ascidian sperm lysin system. Zoolog Sci 19: 139-151.
- Sawada H, Iwasaki K, Kihara-Negishi F, Ariga H, Yokosawa H. 1996. Localization, expression, and the role in fertilization of spermosin, an ascidian sperm trypsin-like protease. Biochem Biophys Res Commun 222: 499-504.

- Sawada H, Kawahigashi M, Yokosawa H, Ishii S. 1985. Trypsin-like enzyme from eggs of the ascidian (Protochordate), *Halocynthia roretzi*. J Biol Chem 260: 15694-15698.
- Sawada H, Miura M, Yokosawa H, Ishii S. 1984c. Purification and characterization of trypsin-like enzyme from sea urchin eggs: Substrate specificity and physiological role. Biochem Biophys Res Commun 121: 598-604.
- Sawada H, Sakai N, Abe Y, Tanaka E, Takahashi Y, Fujino J, Kodama E, Takizawa S, Yokosawa H. 2002a. Extracellular ubiquitination and proteasome-mediated degradation of the ascidian sperm receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 1223-1228.
- Sawada H, Someno T. 1996. Substrate specificity of ascidian sperm trypsin-like proteases, spermosin and acrosin. Mol Reprod Dev 45: 240-243.
- Sawada H, Takahashi T, Fujino J, Flores YS, Yokosawa H. 2002b. Localization and roles in fertilization of sperm proteasomes in the ascidian *Halocynthia roretzi*. Mol Reprod Dev 62: 271-276.
- Sawada H, Tanaka E, Ban S, Yamasaki C, Fujino J, Ooura K, Abe Y, Matsumoto K, Yokosawa H. 2004. Self/nonself recognition in ascidian fertilization: vitelline coat protein HrVC70 is a candidate allorecognition molecule. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 15614-15620.
- Sawada H, Yokosawa H, Ishii S. 1984a. Purification and characterization of two types of trypsin-like enzymes from sperm of the ascidian (Prochordata) *Halocynthia roretzi*. Evidence for the presence of spermosin, a novel acrosin-like enzyme. J Biol Chem 259: 2900-2904.
- Sawada H, Yokosawa H, Someno T, Saino T, Ishii S. 1984b. Evidence for the participation of two sperm proteases, spermosin and acrosin, in fertilization of the ascidian, *Halocynthia roretzi*; inhibitory effects of leupeptin analogs on enzyme activities and fertilization. Dev Biol 105: 246-249.
- Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. Proc Natl Acad Sci USA 95: 5857-5864.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3 – new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research 40: 115.
- Yamada L, Saito T, Taniguchi H, Sawada H, Harada Y. 2009. Comprehensive egg coat proteome of the ascidian *Ciona intestinalis* reveals gamete recognition molecules involved in self-sterility. J Biol Chem 284: 9402-9410.

Yokota N, Kataoka Y, Hashii N, Kawasaki N, Sawada H. 2011. Sperm-specific C-terminal processing of the proteasome PSMA1/ α 6 subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 410: 809-815.

佐藤矩行 編. 1998. ホヤの生物学. 東京大学出版会.

澤田均 編. 2014. 動植物の受精学. 化学同人.

毛利秀雄, 星元紀 監修. 2006. 新編精子学. 東京大学出版会.

図の説明

Fig. 1 マボヤ卵子形成と受精に関わるトリプシン様プロテアーゼの報告

阻害剤を用いた阻害実験により、卵子形成における卵核胞の崩壊、卵子形成最終段階における卵黄膜上昇 (囲卵腔の増大) および自家不和合性獲得、受精、受精後の卵黄膜上昇にトリプシン様プロテアーゼが関与していることが示唆された。受精に関与する可能性のあるトリプシン様プロテアーゼとして最初に報告されたのは、マボヤ精子から精製された HrAcrosin および HrSpermosin だった。

Fig. 2 HrProacrosin と Harore.CG.MTP2014.S89.g15383 遺伝子モデル

A. ゲノムブラウザ Halocynthia roretzi MTP2014 上における HrProacrosin の位置。HrProacrosin (Kodama *et al.*, 2001) を ANISEED のマボヤゲノムブラウザ Halocynthia roretzi MTP2014 に対して blast 検索し、一致した位置とその遺伝子モデル Harore.CG.MTP2014.S89.g15383 を示した。**B.** HrProacrosin の 3'側塩基配列周辺および一致する遺伝子モデル Harore.CG.MTP2014.S89.g15383 (パネル内で S89.g15383 と表記) の塩基配列の比較。塩基配列の外側に、予測アミノ酸残基を灰色文字で示し、アスタリスクは終止コドンを示した。赤ラベルは遺伝子モデルに対して 4 塩基挿入が確認された配列を、青ラベルは終止コドンを示した。**C.** Harore.CG.MTP2014.S89.g15383 から推測されるドメイン構造。SMART プログラムを利用して、遺伝子モデルの推定アミノ酸配列からドメイン構造を推測した。

Fig. 3 HrOVCH の cDNA クローニングで設計したプライマー

A. ドメイン構造上における作製したプライマーの位置。**B.** マボヤゲノムデータベース上における作製したプライマーの位置。HrProacrosin (Kodama *et al.*, 2001) を元に、トリプシンプロテアーゼドメインの N 末端側および C 末端側にプライマーを作製した。プライマーの配列は Table 2 を参照。

Fig. 4 HrOvochymase 組換えタンパク質

HrOvochymase トリプシン様プロテアーゼドメイン-alpha あるいは HrOvochymase トリプシン様プロテアーゼドメイン-alpha、CUB ドメイン 1 および 2 をサブクローニングして、pET32a (+) vector、pColdTF vector あるいは pGEX4T-1 vector に挿入し、そのドメイン構造

を示した。

Fig. 5 マボヤ卵巣卵のサンプリングとサンプル調製

FC: 濾胞細胞、VC: 卵黄膜、TC: テスト細胞、EC: 卵細胞、GV: 卵核胞。

Fig. 6 *HrProacrosin* および *HrOVCH* の塩基配列の比較

HrProacrosin (Kodama *et al.*, 2001) と *HrOvochymase* (本研究) のドメイン構造を並記し、点線で囲んだ部分について塩基配列を比較した。比較に用いた *HrOVCH* 塩基配列はマボヤ A 型卵巣由来である。

Fig. 7 *HrOvochymase* の推定アミノ酸配列とドメイン構造

A. マボヤ A 型卵巣由来 *HrOvochymase* の推定アミノ酸配列。黒ラベルはシグナルペプチド、青文字はトリプシン様プロテアーゼ、赤文字は CUB ドメイン、黄ラベルは三つ組触媒アミノ酸残基、青ラベルは基質結合ポケットの S1 部位、マゼンタラベルは N 型糖鎖修飾予測アミノ酸残基を示した。**B.** *HrOvochymase* のドメイン構造。黒はシグナルペプチド、青はトリプシン様プロテアーゼドメイン、赤は CUB ドメインを示した。

Fig. 8 マボヤ A 型/C 型の精巣および卵巣から得た *HrOvochymase* 推定アミノ酸配列の比較

マボヤ A 型/C 型の精巣および卵巣由来 *HrOVCH* 塩基配列の推定アミノ酸配列の比較。赤ラベルはアミノ酸残基が置換されていることを示した。黄ラベルは三つ組触媒アミノ酸残基、青ラベルは基質結合ポケットの S1 部位、マゼンタラベルは N 型糖鎖修飾予測アミノ酸残基を示した。Testis_A: マボヤ A 型精巣由来、Ovary_A: マボヤ A 型卵巣由来、Testis_C: マボヤ C 型精巣由来、Ovary_C: マボヤ C 型卵巣由来の *HrOVCH* cDNA を示す。

Fig. 9 既知 *Acrosin zymogen*、既知 *ovochymase*、*HrProacrosin* および *HrOvochymase* アミノ酸配列とドメイン構造の比較

A. 既知 *Acrosin zymogen*、既知 *ovochymase*、*HrProacrosin* および *HrOvochymase* の N 末端に位置するトリプシンプロテアーゼドメインの予測アミノ酸配列のアライメント。黄ラベルは三つ組触媒アミノ酸残基、青ラベルは基質結合ポケットの S1 部位を示した。**B.** 既

知 Acrosin zymogen、既知 ovochymase、HrProacrosin および HrOvochymase のドメイン構造の比較。黒色はシグナルペプチド、灰色はトリプシンプロテアーゼドメイン、白は CUB ドメインを示した。

Fig. 10 マボヤのタイプ別 (A 型および C 型) における *HrOVCH* mRNA の発現

マボヤ成体の組織別 RT-PCR。本研究で使用したマボヤ A 型および C 型について、精巣、卵巣、えら、筋肉、心臓、消化管、肝膵臓から作製した cDNA を用いて RT-PCR を検討した。コントロールとして *Halocynthia roretzi Elongation Factor 1a (HrEF1a)* 遺伝子を使用した。Type A: マボヤ A 型、Type C: マボヤ C 型、Testis: 精巣、Ovary: 卵巣、Gill: えら、Muscle: 筋肉、Heart: 心臓、Intestine: 消化管、Hepatopancreas: 肝膵臓。

Fig. 11 HrOvochymase 組換えタンパク質の作製と特異的抗体の反応性

本研究で作製した抗 HrOvochymase 抗体の反応性。泳動タンパク質のコントロールとして GST タンパク質を、一次抗体のコントロールとして rabbit IgG (IgG from rabbit serum, Sigma-Aldrich) および抗 GST 抗体を使用した。

Fig. 12 抗 HrOvochymase 抗体を用いた精巣および精子ホモジネートのウェスタンブロッティング

精巣／精子ホモジネートの沈殿において検出された 120 kDa、85 kDa、52 kDa のタンパク質は LC/MS/MS 解析によって HrOvochymase 由来のペプチドが含まれるかどうか検討した。sup: 精巣／精子ホモジネートの上清、ppt: 精巣／精子ホモジネートの沈殿、Testis: 精巣ホモジネート、Sperm: 精子ホモジネート。コントロールとして Rabbit IgG (IgG from rabbit serum, Sigma-Aldrich) を使用した。

Fig. 13 抗 HrOvochymase 抗体を用いたマボヤ精子の免疫染色

A. 精子の免疫染色。一次抗体反応において抗 HrOvochymase 抗体あるいは Rabbit IgG (IgG from rabbit serum, Sigma-Aldrich) を使用し、二次抗体反応において Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Life Technologies)、MitoTracker Red CMXRos (Life Technologies)、DAPI を使用した。Enlarged views は、精子頭部を含む白点線で囲んだ範囲を拡大して示したものである。スケールバーは 10 μ m を示した。**B.** 精子頭部の模式図。マボヤ精子は 1 つの

核、1つのミトコンドリアおよび1つの小胞から構成されている (Fukumoto, 1993)。

Fig. 14 抗 HrOvochymase 抗体を用いた卵巢卵の濾胞細胞、卵黄膜および卵抽出液のウェスタンブロッティング

濾胞細胞の 200 kDa のタンパク質は HrOvochymase 由来のペプチドを含むかどうか LC/MS/MS 解析によって検討した。コントロールとして Rabbit IgG (IgG from rabbit serum, Sigma-Aldrich) を使用した。FC: 濾胞細胞、VC: 卵黄膜、EE: 卵抽出液。

Fig. 15 抗 HrOvochymase 抗体を用いたマボヤ卵巢卵の免疫染色

A. 濾胞細胞がある卵巢卵の免疫染色。**B.** 濾胞細胞が一部欠落した卵巢卵の免疫染色。点線で囲った部分を拡大したものを右カラムに示した。スケールバーは 100 μ m を示した。一次抗体のコントロールとして Rabbi IgG (IgG from rabbit serum, Sigma-Aldrich) を使用した。**C.** 卵巢卵の模式図。FC: 濾胞細胞、VC: 卵黄膜、TC: テスト細胞、EC: 卵細胞、GV: 卵核胞。

Fig. 16 濾胞細胞 200 kDa タンパク質から HrOvochymase 由来のペプチドの検出

A. HrOvochymase 由来推定アミノ酸配列に一致し、イオンスコア 40 以上のスペクトルを示したペプチドの一覧。**B.** 検出されたペプチドのうち、HrOvochymase 推定アミノ酸配列と一致するイオンスコア 40 以上のペプチドを太字で示した。**C** および **D.** 検出されたペプチドのスペクトルを二例示した。

Fig. 17 抗 HrOvochymase 抗体によるマボヤ受精への影響

A. 各抗 HrOvochymase 抗体濃度別の受精率の表。**B.** 受精率のグラフ。黒丸は抗 HrOvochymase 抗体存在下、白丸は rabbit IgG 存在下の場合を示した。 \pm は標準誤差を示した。

Fig. 18 抗 HrOvochymase 抗体によるマボヤ卵子形成への影響

A. *in vitro* における卵子形成の過程。マボヤ卵巢から得た卵巢卵を FSW に加えて 13 $^{\circ}$ C でインキュベートすると、インキュベート開始時の卵巢卵は卵核胞が観察され、卵黄膜と

卵細胞膜との間に空間がないように観察された (卵巣卵, OVE)。インキュベート 2~4 時間後、卵巣卵の卵核胞は観察されなくなったことから卵核胞の崩壊が起こったと考えられる (成熟卵巣卵, FOVE)。インキュベート 17 時間後、卵黄膜と卵細胞膜との間に空間 (囲卵腔) が観察され、未受精卵に類似した卵巣卵を観察することができた (未受精卵, UFE)。スケールバーは 100 μm を示した。**B.** 卵子形成における各過程の卵。抗 HrOvochymase 抗体 2 $\mu\text{g/ml}$ 存在下における各過程の卵の割合を経時的に示した。10 $\mu\text{g/ml}$ および 50 $\mu\text{g/ml}$ の場合も同様に行ったが本研究では示さない。黒棒：OVE、グレー棒：FOVE、白棒：UFE を示した。コントロールとして Rabbit IgG、STI、BSA を使用した。**C.** インキュベート 4 時間後における成熟卵巣卵の割合。黒棒：2 $\mu\text{g/ml}$ 、グレー棒：10 $\mu\text{g/ml}$ 、白棒：50 $\mu\text{g/ml}$ の抗体あるいは阻害剤存在下における成熟卵巣卵の割合を示した。**D.** インキュベート 17 時間 40 分後における未受精卵の割合。棒グラフの色は(C)と同様、抗 HrOvochymase 抗体あるいは阻害剤の濃度を示した。N=3 または 5。

Fig. 19 抗 HrOvochymase 抗体によるマボヤ卵巣卵の自家不和合性獲得への影響

A. 自己精子を媒精して 4 時間後の卵を、KEYENCE BZ-9000 で撮影した。抗 HrOvochymase 抗体、Rabbit IgG、STI および BSA は、プレインキュベート時に添加し、FSW で洗浄後、自己精子を媒精し、13 $^{\circ}\text{C}$ で 4 時間インキュベートした。**B.** マボヤ卵に非自己精子を媒精し、受精率を確かめた。**C.** 抗 HrOvochymase 抗体、Rabbit IgG、STI および BSA をプレインキュベートした場合の自家受精率のグラフ。棒グラフの上に受精率 (卵割が観察された卵数/総卵数) を示した。N=5。

Fig. 20 マボヤ卵子形成および受精における HrOvochymase の作用機構モデル

受精阻害実験、卵子形成阻害実験および自家不和合性獲得の阻害実験から予測される HrOvochymase の作用機構を示した。HrOvochymase は卵子形成の最終段階に観察される卵黄膜上昇と自家不和合性獲得、そして受精に関与している可能性が示唆された。既知 ovochymase のプロセッシングと細胞外における機能を考慮すると、濾胞細胞に存在する HrOvochymase はプロセッシングされ、濾胞細胞外に放出されて卵黄膜に作用する可能性が予測された。一方、受精においても HrOvochymase が関与する可能性が示唆されたが、精子あるいは濾胞細胞のいずれに局在する HrOvochymase が関与しているか否かを明らかにするため、今後詳細な検討が必要である。

Table 1 本研究で用いたプライマー

Table 2 他種ホヤにおける *HrOVCH* と相同性のある遺伝子

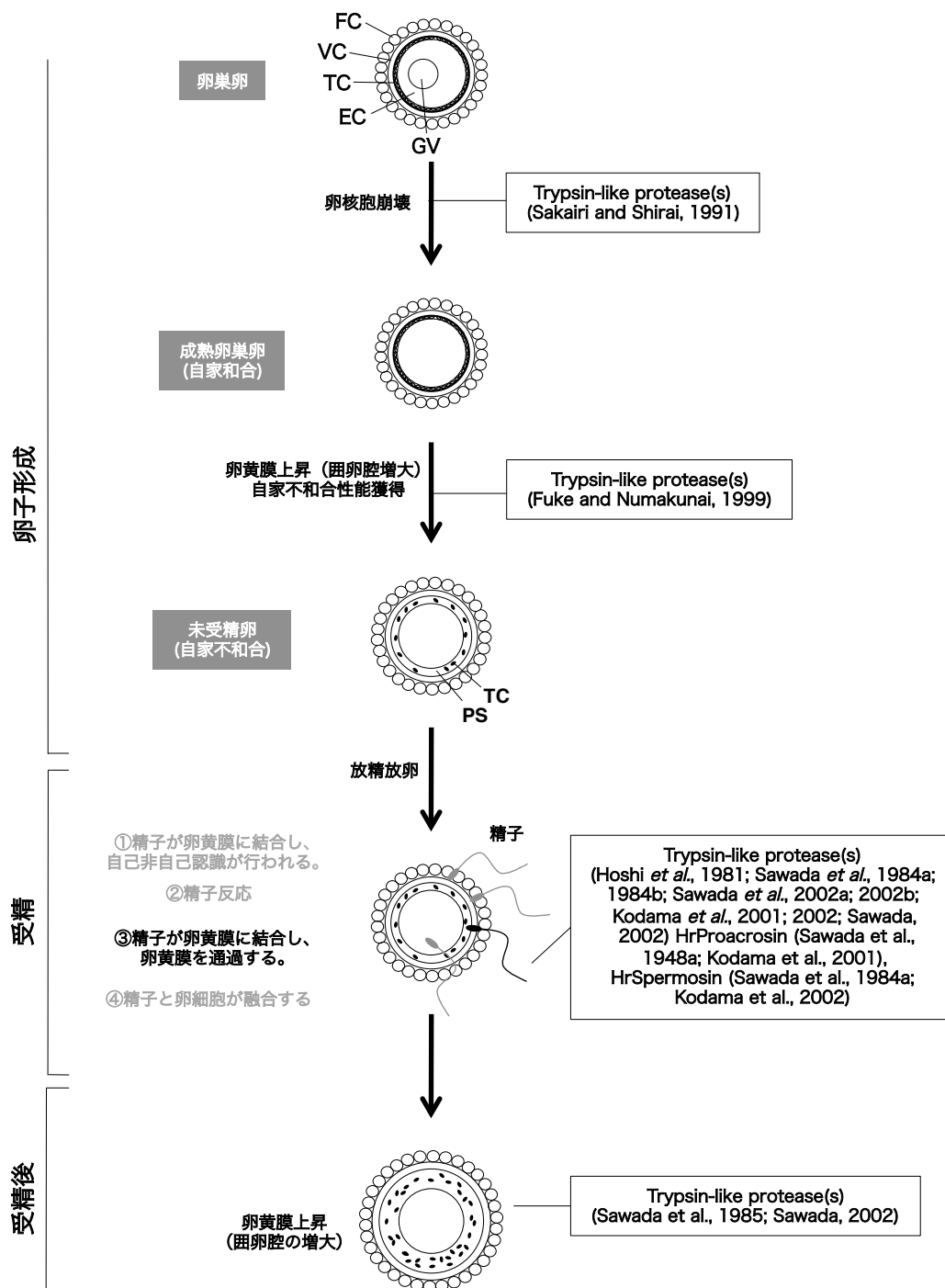
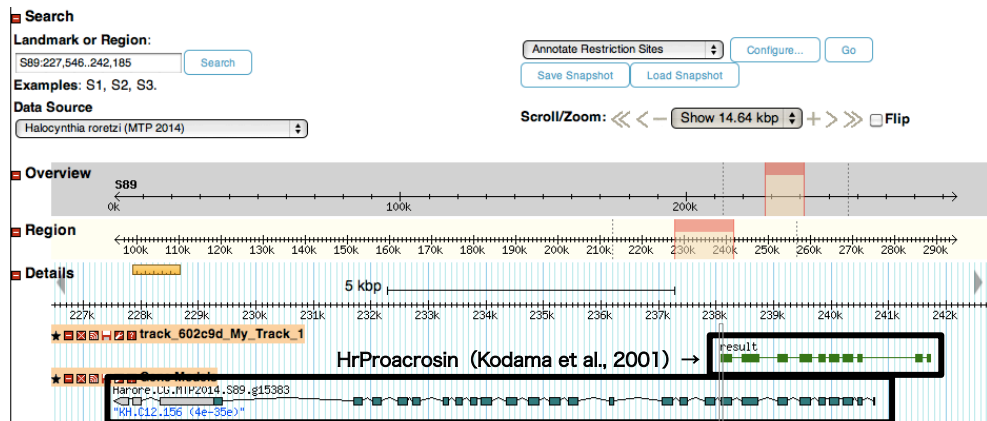


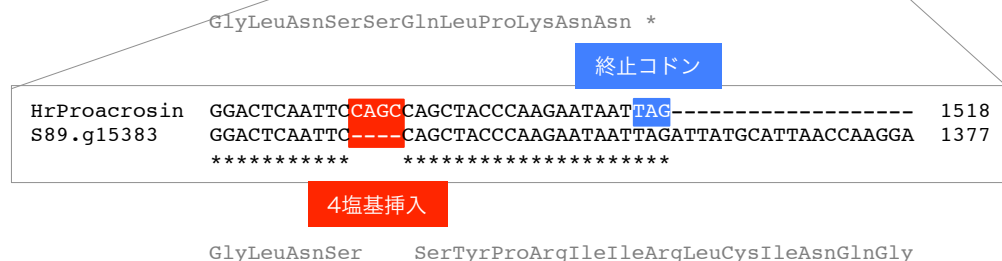
Fig. 1 マボヤ卵子形成と受精に関わるトリプシン様プロテアーゼの報告

A



A gene encoding of Harore.CG.MTP2014.S89.g15383
本研究において '*Halocynthia roretzi* OVCH (*HrOVCH*)' と名付けた

B



C

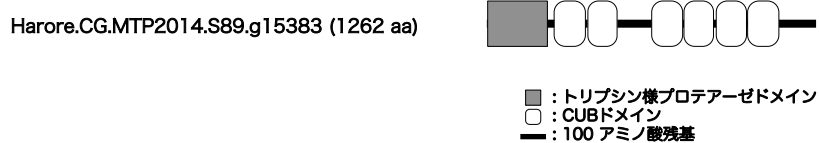
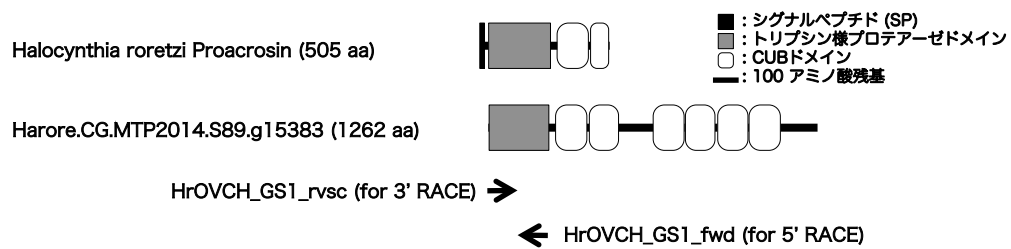
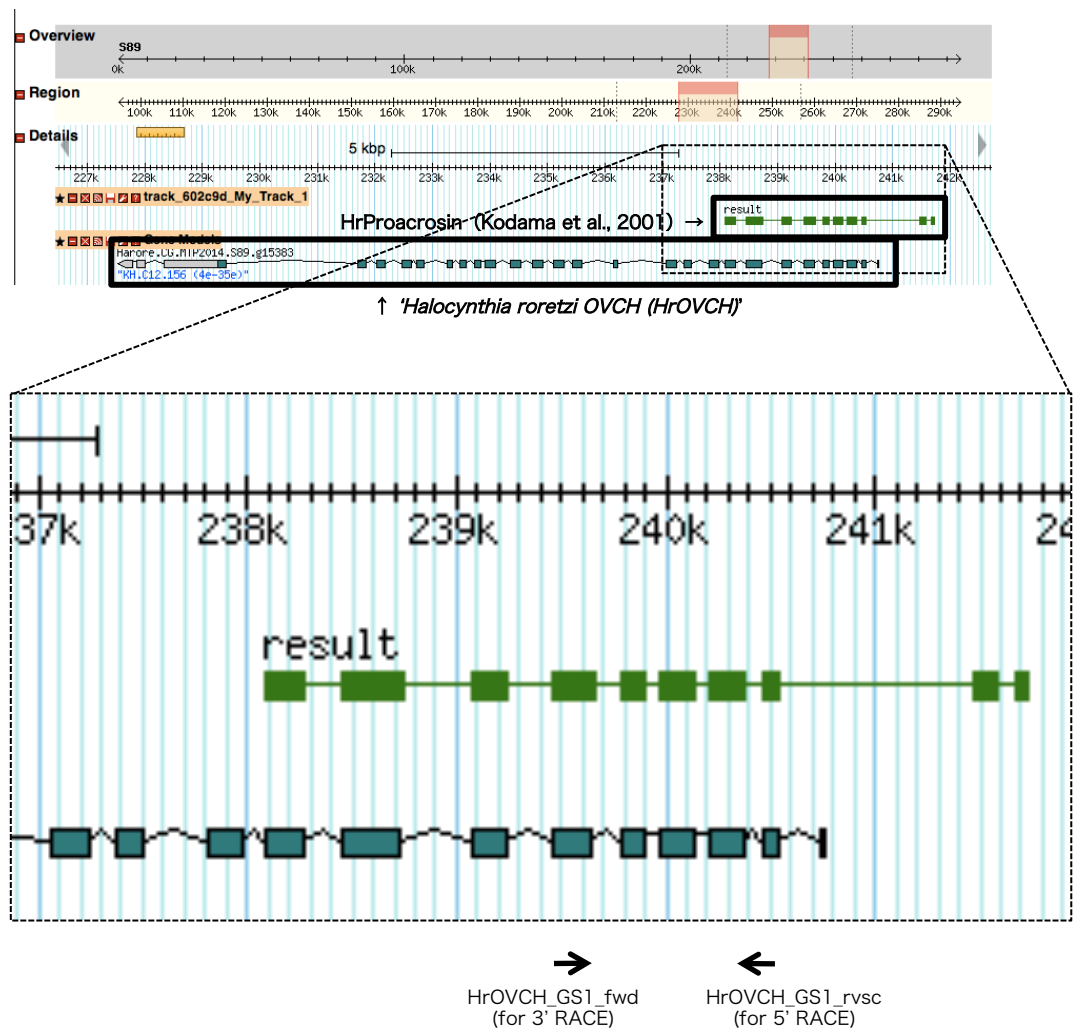


Fig. 2 *HrProacrosin*と*Harore.CG.MTP2014.S89.g15383*遺伝子モデル

A



B



HrProacrosin遺伝子トリプシン様プロテアーゼドメインの塩基配列を元に、
 N末端側あるいはC末端側にプライマーを設計した。
 (配列情報は、Table 2を参照)

Fig. 3 *HrOVCH*のcDNAクローニングで設計したプライマー

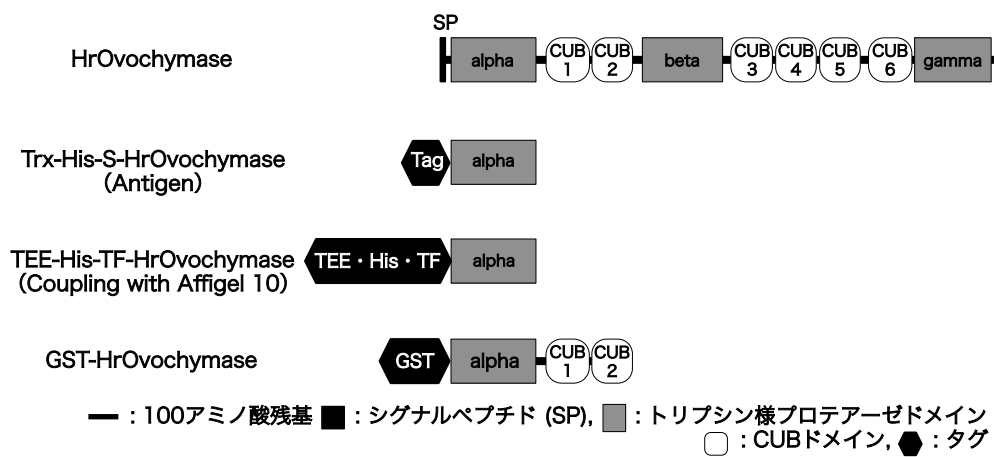


Fig. 4 HrOvochymase組換えタンパク質

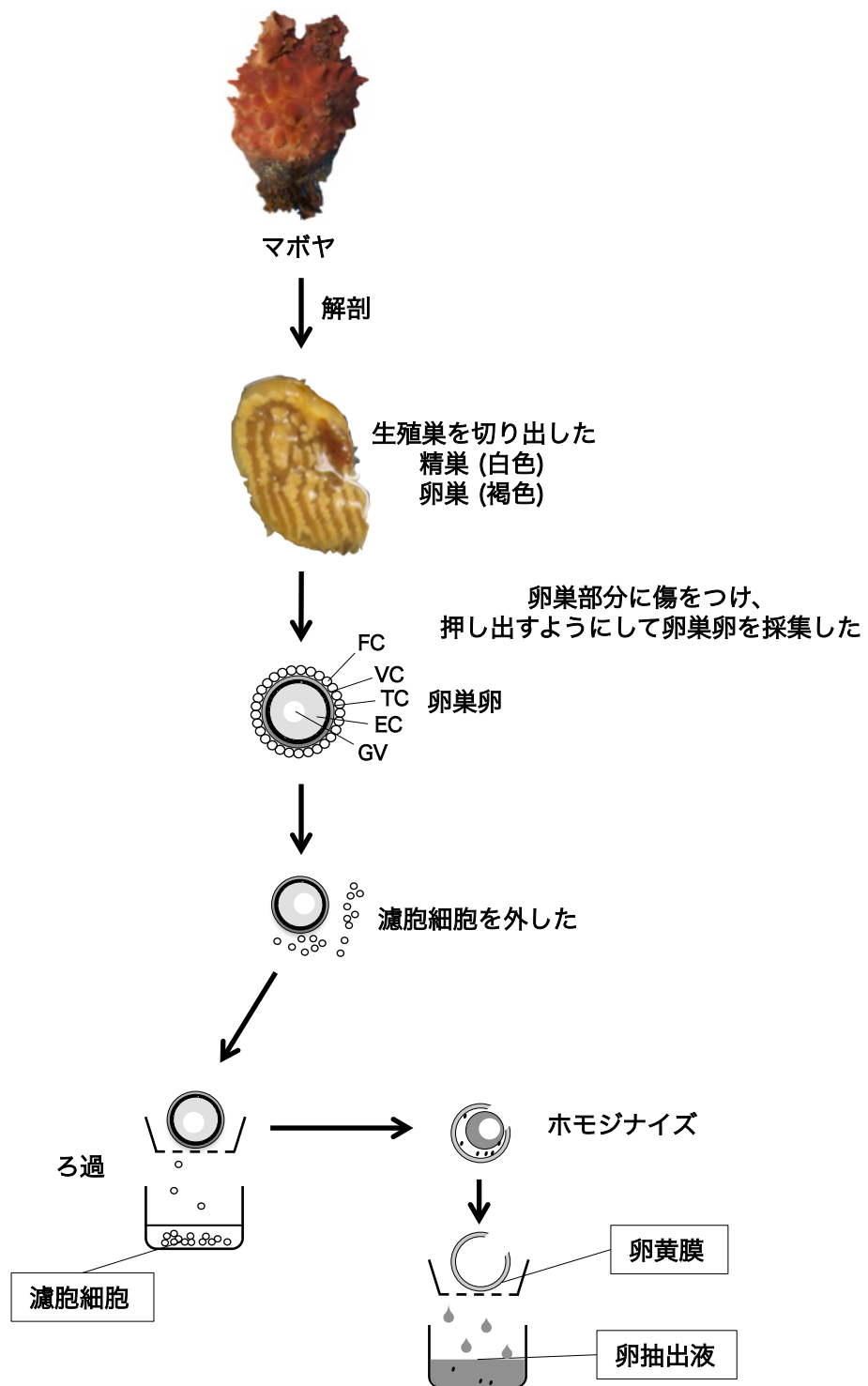


Fig. 5 マボヤ卵巣卵のサンプリングとサンプル調製

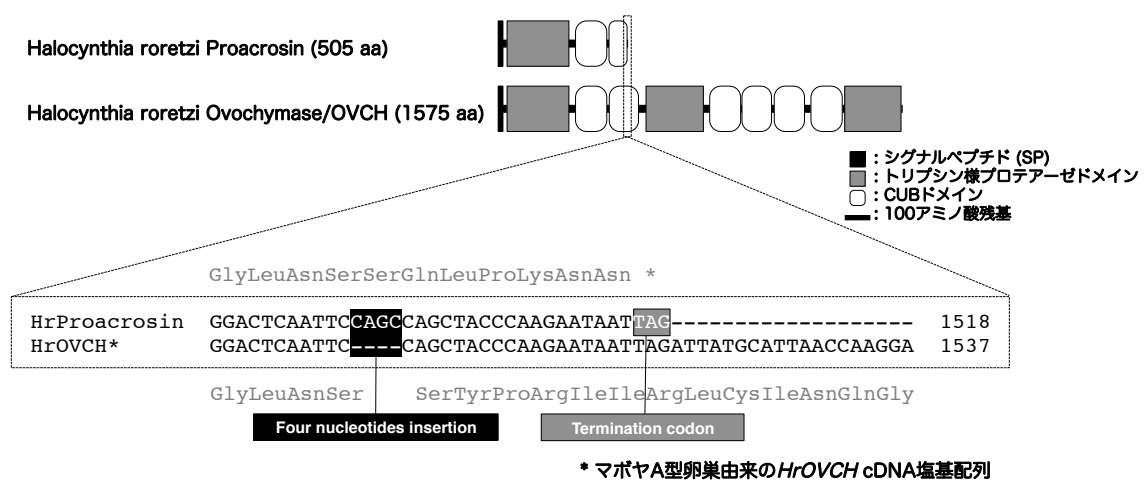


Fig. 6 *HrProacrosin*および*HrOVCH* cDNA塩基配列の比較

A

MIVTFVALAL	SCCTPQVTA	D	CGLRPRLQSA	IITGR	IVGGE	MAKLGEFPWQ	50	
AAFLYKHHVQV	CGGTIIDTTW		ILSAAH	CFDP	HMVYKLQSIKK	EDALIRVADL	100	
DKTDDTDEGE	MTFEVKDIII		HEQYNRQTFD	ND	IMLIEILG	SITYGPTVQP	150	
ACIPGANDAV	ADGTKCLISG		WGDTQDHVHN	RWPKDLQKAQ	VEVFARAQCL		200	
AAYPESTENM	ICAGLRTGGI		DSCQGD	SGGP	LACPFTENTA	QPTFFLQGI	250	
SWGRGCALDG	FPGVYTEVRK		YSSWIAN	YTQ	HLLQDRNADV	ATFTTITGDPC	300	
SS	NGSIISGS		EGDFSSPGFY	SGSYTDNLDC	KWIIQIPDIG	SRIQLSFTEF	350	
GVEYHTFCWY	DDVKVYSGAV		GNIASADAAD	LLGSHCGMNI	PSDLLSDGSS		400	
MTVIFHSDYM	THTLGFRVAF		HAVSADVSQS	GCGGIRELLT	DHGEFSSKH		450	
PNYYDADSIC	ECFITAPTGK		TIELNFLSFR	LAGSDCADNV	AIYDGL	NSS	500	
PRIIRLCINQ	GF	NVTVPSSS	NTMFVSFKTD	GQVQDVGF	EA	YYYFSSNG	NS	550
TDDTDYSQCG	FSSTPINADQ		TAA	RIVNGDI	AIAGSWPWQI	SIRLCDTCNH	600	
YCGGSIISPS	WIVTAA	H	CIE	SSAHITYIRA	GDFDRFTIEI	SETIVPVAQI	650	
FIHPDYQKDL	PNNAD	D	IALLK	LANPLSYSST	IRPVCFPSQI	STIPEENAEC	700	
YVTGWGLTEE	NVMAQKLREA		KLPLMPYDQC	LNVTYSYVLN	ENMLCAG	N	IS	750
SGI	D	TCLGDS	GGPFVCRKSR	NDPWILYGVS	AFGRECGSSR	YPGVYTKVTR	800	
YIDWIIATAN	VSTVTSVVEE		HDPTEFEQGC	IQLLVLSNHE	GDLSSPEYPE		850	
LYGEGMLDCQ	WKIVLMDRTK		SLNINFRFSH	SQQDTAAACS	LANIRISESY		900	
SDGTVGRQYG	PYCGSSESIL		ISSLHDLVVS	LHNSQSQVKI	GLKLEYRLEE		950	
LEQSGCGQLK	HLIENKGNFS		SINYPNIYSA	NSHCEWYLHA	SIATHYLIQIS		1000	
LSQFSLENAY	QCRYDFLTVI		DVTENG	N	ISH	GPYCGNSIPH	VITGHGLFHI	1050
KFRSDASLNY	KGFFASFVEL		NERPQEESGC	GGVKFL	N	GTN	GTFQTAGFPL	1100
AYEANLDCTW	VIEVEDGYKV		RLNFQOFSLE	SSSSCKYDWA	MLYNGEFAFE		1150	
AQRIDTLCGY	DVKLEDIFES		TSNMVRIDFH	SDFSFNKQGF	LAMYTAVSPG		1200	
SSRSSVHQRE	NHLQEKRS	GG	CQDSIFTDEE	GVIEYKQGDH	TGNTRCLFRI		1250	
LTNHLHVIRL	WLRKLSSLNL		HENDSIKIYD	KIDVDDIYSG	VVKPVFQFTG		1300	
IIGYLDLPA	YLDYNGGEIS		MLFSSDGQHG	DTSFELIYKL	MQDKSSTTNP		1350	
KQLWNDHHGK	WPWMVSLFGS		SKYYFCSGVI	ISSRWIATAA	T	CNLRSSSEIH	1400	
IIFPEGTNPK	KIWEVEKIVV		HPEFKMIYNV	PQND	LALIQ	VDPIEHIPPV	1450	
CLPVASNIYS	DCHVLKIPRL		AGSAAFDPIDV	RISSVDTLAH	DICMREWHLR		1500	
ITDDMLCGRI	N	GTNSCQDV	GGPLVCQSPS	DDAWYFVGIS	SWGPKICNDN		1550	
TAHHRLPDVY	VSVAYFLKWI		TKIIQ*				1575	

■ : シグナルペプチド, トリプシン様プロテアーゼドメイン, CUBドメイン
 ■ : 三つ組触媒アミノ酸残基, ■ : 結合ポケットのS1部位, ■ : 予測N型糖鎖修飾アミノ酸残基
 ■ : プロテアーゼによってプロセッシングされるアミノ酸残基

B

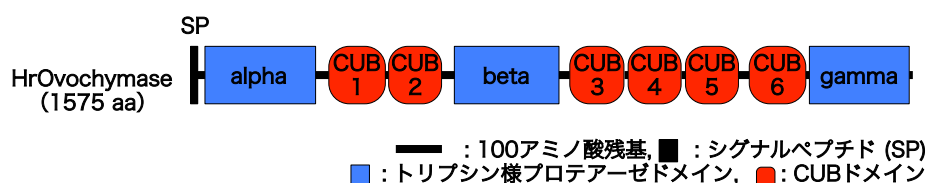


Fig. 7 HrOvochymase推定アミノ酸配列とドメイン構造

Testis_A	MIVTFVALAL	SCCTPQVTAD	CGLRPRLQSA	IITGRIVGGE	MAKLGEFFWQ	AAFLYKHVQV	CGGTIIDTTW	ILSAAHCFDP	HMVQLQSIKK	EDALRVADL	100
Ovary_C	MIVTFVALAL	SCCTPQVTAD	CGLRPRLQSA	IITGRIVGGE	MAKLGEFFWQ	AAFLYKHVQV	CGGTIIDTTW	ILSAAHCFDP	HMVQLQSIKK	EDALRVADL	100
Testis_C	MIVTFVALAL	SCCTPQVTAD	CGLRPRLQSA	IITGRIVGGE	MAKLGEFFWQ	AAFLYKHVQV	CGGTIIDTTW	ILSAAHCFDP	HMVQLQSIKK	EDALRVADL	100
Ovary_A	MIVTFVALAL	SCCTPQVTAD	CGLRPRLQSA	IITGRIVGGE	MAKLGEFFWQ	AAFLYKHVQV	CGGTIIDTTW	ILSAAHCFDP	HMVQLQSIKK	EDALRVADL	100
Testis_A	DKTDDTDEGE	MTFEVKDIII	HEQYNRQTFD	NDIMLIEILG	SITYGPTVPQ	ACIPGANDAV	ADGTKCLISG	WGDQTQDHVHN	RWPKLKQAKQ	VEVFARAQCL	200
Ovary_C	DKTDDTDEGE	MTFEVKDIII	HEQYNRQTFD	NDIMLIEILG	SITYGPTVPQ	ACIPGANDAV	ADGTKCLISG	WGDQTQDHVHN	RWPKLKQAKQ	VEVFARAQCL	200
Testis_C	DKTDDTDEGE	MTFEVKDIII	HEQYNRQTFD	NDIMLIEILG	SITYGPTVPQ	ACIPGANDAV	ADGTKCLISG	WGDQTQDHVHN	RWPKLKQAKQ	VEVFARAQCL	200
Ovary_A	DKTDDTDEGE	MTFEVKDIII	HEQYNRQTFD	NDIMLIEILG	SITYGPTVPQ	ACIPGANDAV	ADGTKCLISG	WGDQTQDHVHN	RWPKLKQAKQ	VEVFARAQCL	200
Testis_A	AYPESTENN	ICAGLRTGGI	SCQGDSSGGP	LACPPTENTA	QPTFFQGV	SWGRGCALDG	FPGVYTEVRK	YSSWIANVYTO	HLLQDRNADV	ATFTITGDPC	300
Ovary_C	AYPESTENN	ICAGLRTGGI	SCQGDSSGGP	LACPPTENTA	QPTFFQGV	SWGRGCALDG	FPGVYTEVRK	YSSWIANVYTO	HLLQDRNADV	ATFTITGDPC	300
Testis_C	AYPESTENN	ICAGLRTGGI	SCQGDSSGGP	LACPPTENTA	QPTFFQGV	SWGRGCALDG	FPGVYTEVRK	YSSWIANVYTO	HLLQDRNADV	ATFTITGDPC	300
Ovary_A	AYPESTENN	ICAGLRTGGI	SCQGDSSGGP	LACPPTENTA	QPTFFQGV	SWGRGCALDG	FPGVYTEVRK	YSSWIANVYTO	HLLQDRNADV	ATFTITGDPC	300
Testis_A	SSNGSIIISGS	EGDFSSPGFY	SGSYTDNLDC	KWIIQIPDGI	SRIQLSFTEF	GVEYHTFCWY	DDVKVYSGAV	GNIASADAAD	LLGSHCGMNI	PSDLLSDGSS	400
Ovary_C	SSNGSIIISGS	EGDFSSPGFY	SGSYTDNLDC	KWIIQIPDGI	SRIQLSFTEF	GVEYHTFCWY	DDVKVYSGAV	GNIASADAAD	LLGSHCGMNI	PSDLLSDGSS	400
Testis_C	SSNGSIIISGS	EGDFSSPGFY	SGSYTDNLDC	KWIIQIPDGI	SRIQLSFTEF	GVEYHTFCWY	DDVKVYSGAV	GNIASADAAD	LLGSHCGMNI	PSDLLSDGSS	400
Ovary_A	SSNGSIIISGS	EGDFSSPGFY	SGSYTDNLDC	KWIIQIPDGI	SRIQLSFTEF	GVEYHTFCWY	DDVKVYSGAV	GNIASADAAD	LLGSHCGMNI	PSDLLSDGSS	400
Testis_A	MTVIFHSDYM	THTLGFIAVF	HAVSADVSQS	GCGGIRELLT	DHGEFSSKHY	PNYDADSC	EWLITAPTGK	TIELNFLSFR	LAGSDCADNV	AIYDGLN	500
Ovary_C	MTVIFHSDYM	THTLGFIAVF	HAVSADVSQS	GCGGIRELLT	DHGEFSSKHY	PNYDADSC	EWLITAPTGK	TIELNFLSFR	LAGSDCADNV	AIYDGLN	500
Testis_C	MTVIFHSDYM	THTLGFIAVF	HAVSADVSQS	GCGGIRELLT	DHGEFSSKHY	PNYDADSC	EWLITAPTGK	TIELNFLSFR	LAGSDCADNV	AIYDGLN	500
Ovary_A	MTVIFHSDYM	THTLGFIAVF	HAVSADVSQS	GCGGIRELLT	DHGEFSSKHY	PNYDADSC	EWLITAPTGK	TIELNFLSFR	LAGSDCADNV	AIYDGLN	500
Testis_A	PRIIRLCINQ	GNVTVTPSSS	NTMFVSFKTD	GQVQDVGFEA	YYYFSSNGS	TDDTDYSCQG	SSSTPINADQ	TAARIVNGDI	AIAGSWPWOI	SIRLCDTCNH	600
Ovary_C	PRIIRLCINQ	GNVTVTPSSS	NTMFVSFKTD	GQVQDVGFEA	YYYFSSNGS	TDDTDYSCQG	SSSTPINADQ	TAARIVNGDI	AIAGSWPWOI	SIRLCDTCNH	600
Testis_C	PRIIRLCINQ	GNVTVTPSSS	NTMFVSFKTD	GQVQDVGFEA	YYYFSSNGS	TDDTDYSCQG	SSSTPINADQ	TAARIVNGDI	AIAGSWPWOI	SIRLCDTCNH	600
Ovary_A	PRIIRLCINQ	GNVTVTPSSS	NTMFVSFKTD	GQVQDVGFEA	YYYFSSNGS	TDDTDYSCQG	SSSTPINADQ	TAARIVNGDI	AIAGSWPWOI	SIRLCDTCNH	600
Testis_A	YCGGSIIISPS	WIVTAAHCIE	SSAHITYIRA	GFDFRFTIEI	SETIVPVAQI	FIHPDYQKDL	PNNADIALLK	LANPLSYSST	IRPVCFPSQI	STIPEENAE	700
Ovary_C	YCGGSIIISPS	WIVTAAHCIE	SSAHITYIRA	GFDFRFTIEI	SETIVPVAQI	FIHPDYQKDL	PNNADIALLK	LANPLSYSST	IRPVCFPSQI	STIPEENAE	700
Testis_C	YCGGSIIISPS	WIVTAAHCIE	SSAHITYIRA	GFDFRFTIEI	SETIVPVAQI	FIHPDYQKDL	PNNADIALLK	LANPLSYSST	IRPVCFPSQI	STIPEENAE	700
Ovary_A	YCGGSIIISPS	WIVTAAHCIE	SSAHITYIRA	GFDFRFTIEI	SETIVPVAQI	FIHPDYQKDL	PNNADIALLK	LANPLSYSST	IRPVCFPSQI	STIPEENAE	700
Testis_A	YVTGWGLTEE	NVMAQKLREA	KLPLMPYDQC	LNVTYSVLN	ENMLCAGNIS	SGIITCLGDS	GGPFVCRKSR	NDPWILYGV	AFGRECGSSR	YPGVYTKVTR	800
Ovary_C	YVTGWGLTEE	NVMAQKLREA	KLPLMPYDQC	LNVTYSVLN	ENMLCAGNIS	SGIITCLGDS	GGPFVCRKSR	NDPWILYGV	AFGRECGSSR	YPGVYTKVTR	800
Testis_C	YVTGWGLTEE	NVMAQKLREA	KLPLMPYDQC	LNVTYSVLN	ENMLCAGNIS	SGIITCLGDS	GGPFVCRKSR	NDPWILYGV	AFGRECGSSR	YPGVYTKVTR	800
Ovary_A	YVTGWGLTEE	NVMAQKLREA	KLPLMPYDQC	LNVTYSVLN	ENMLCAGNIS	SGIITCLGDS	GGPFVCRKSR	NDPWILYGV	AFGRECGSSR	YPGVYTKVTR	800
Testis_A	YIDWIIATAN	VSVVTSVABE	HDPTEFEQGC	IQLLVLSNHE	GDLSSPEYPE	LYGEGMLDCQ	WKIVLMDRT	SLNINFRFSH	SQODTAAACS	LANIRISESY	900
Ovary_C	YIDWIIATAN	VSVVTSVABE	HDPTEFEQGC	IQLLVLSNHE	GDLSSPEYPE	LYGEGMLDCQ	WKIVLMDRT	SLNINFRFSH	SQODTAAACS	LANIRISESY	900
Testis_C	YIDWIIATAN	VSVVTSVABE	HDPTEFEQGC	IQLLVLSNHE	GDLSSPEYPE	LYGEGMLDCQ	WKIVLMDRT	SLNINFRFSH	SQODTAAACS	LANIRISESY	900
Ovary_A	YIDWIIATAN	VSVVTSVABE	HDPTEFEQGC	IQLLVLSNHE	GDLSSPEYPE	LYGEGMLDCQ	WKIVLMDRT	SLNINFRFSH	SQODTAAACS	LANIRISESY	900
Testis_A	YDGTGVRQYQ	PYCGSSSIL	ISLHDLVVS	LHNSQSQVKI	GLKLEYRL	LEQSGCGQLK	HLIENKGNFS	SINYPNIYSA	NSHCEWYLHA	SIATHYLQIS	1000
Ovary_C	YDGTGVRQYQ	PYCGSSSIL	ISLHDLVVS	LHNSQSQVKI	GLKLEYRL	LEQSGCGQLK	HLIENKGNFS	SINYPNIYSA	NSHCEWYLHA	SIATHYLQIS	1000
Testis_C	YDGTGVRQYQ	PYCGSSSIL	ISLHDLVVS	LHNSQSQVKI	GLKLEYRL	LEQSGCGQLK	HLIENKGNFS	SINYPNIYSA	NSHCEWYLHA	SIATHYLQIS	1000
Ovary_A	YDGTGVRQYQ	PYCGSSSIL	ISLHDLVVS	LHNSQSQVKI	GLKLEYRL	LEQSGCGQLK	HLIENKGNFS	SINYPNIYSA	NSHCEWYLHA	SIATHYLQIS	1000
Testis_A	LSQFSLENAY	QCRDPLTVI	DVTENGNIH	GPYCGNSIPH	ITGHGLHI	KFRSDASLNY	KGFFASFVEL	NERPOESG	GGVKFLNGT	GTFTAGFPL	1100
Ovary_C	LSQFSLENAY	QCRDPLTVI	DVTENGNIH	GPYCGNSIPH	ITGHGLHI	KFRSDASLNY	KGFFASFVEL	NERPOESG	GGVKFLNGT	GTFTAGFPL	1100
Testis_C	LSQFSLENAY	QCRDPLTVI	DVTENGNIH	GPYCGNSIPH	ITGHGLHI	KFRSDASLNY	KGFFASFVEL	NERPOESG	GGVKFLNGT	GTFTAGFPL	1100
Ovary_A	LSQFSLENAY	QCRDPLTVI	DVTENGNIH	GPYCGNSIPH	ITGHGLHI	KFRSDASLNY	KGFFASFVEL	NERPOESG	GGVKFLNGT	GTFTAGFPL	1100
Testis_A	AYEANLDCWT	YIEVEDGYKV	RLNFQQFSLE	SSSSCKYDWA	LYNGEFAFE	AQRITLCGY	DKVLEDIFES	TSNVMRIDFH	SDPSFNKGQF	LAMYTAVS	1200
Ovary_C	AYEANLDCWT	YIEVEDGYKV	RLNFQQFSLE	SSSSCKYDWA	LYNGEFAFE	AQRITLCGY	DKVLEDIFES	TSNVMRIDFH	SDPSFNKGQF	LAMYTAVS	1200
Testis_C	AYEANLDCWT	YIEVEDGYKV	RLNFQQFSLE	SSSSCKYDWA	LYNGEFAFE	AQRITLCGY	DKVLEDIFES	TSNVMRIDFH	SDPSFNKGQF	LAMYTAVS	1200
Ovary_A	AYEANLDCWT	YIEVEDGYKV	RLNFQQFSLE	SSSSCKYDWA	LYNGEFAFE	AQRITLCGY	DKVLEDIFES	TSNVMRIDFH	SDPSFNKGQF	LAMYTAVS	1200
Testis_A	SRSSSVHQRE	NHLQEKRSQG	QDQSIPTDEE	GVEYKQGDH	TGNTRCLFRI	LTNHLHVIRL	WLRLKSSLN	HENDSIKIYD	KIDVDDIYSG	VMPVFOFTG	1300
Ovary_C	SRSSSVHQRE	NHLQEKRSQG	QDQSIPTDEE	GVEYKQGDH	TGNTRCLFRI	LTNHLHVIRL	WLRLKSSLN	HENDSIKIYD	KIDVDDIYSG	VMPVFOFTG	1300
Testis_C	SRSSSVHQRE	NHLQEKRSQG	QDQSIPTDEE	GVEYKQGDH	TGNTRCLFRI	LTNHLHVIRL	WLRLKSSLN	HENDSIKIYD	KIDVDDIYSG	VMPVFOFTG	1300
Ovary_A	SRSSSVHQRE	NHLQEKRSQG	QDQSIPTDEE	GVEYKQGDH	TGNTRCLFRI	LTNHLHVIRL	WLRLKSSLN	HENDSIKIYD	KIDVDDIYSG	VMPVFOFTG	1300
Testis_A	IIGYLDLSPA	YLDYNGGEIS	ILFSSDGQHG	DTSFELIYKL	MDQKSSTTNI	SSCGMTINGK	WPMVSLFGS	SKYFFCSGVI	ISSRWIATAA	TCLNRSSEIH	1400
Ovary_C	IIGYLDLSPA	YLDYNGGEIS	ILFSSDGQHG	DTSFELIYKL	MDQKSSTTNI	SSCGMTINGK	WPMVSLFGS	SKYFFCSGVI	ISSRWIATAA	TCLNRSSEIH	1400
Testis_C	IIGYLDLSPA	YLDYNGGEIS	ILFSSDGQHG	DTSFELIYKL	MDQKSSTTNI	SSCGMTINGK	WPMVSLFGS	SKYFFCSGVI	ISSRWIATAA	TCLNRSSEIH	1400
Ovary_A	IIGYLDLSPA	YLDYNGGEIS	ILFSSDGQHG	DTSFELIYKL	MDQKSSTTNI	SSCGMTINGK	WPMVSLFGS	SKYFFCSGVI	ISSRWIATAA	TCLNRSSEIH	1400
Testis_A	IIFPEGTNPK	KIWEVEKIVV	HPEFKMIYNV	PQNDLALIQ	VDPIEHIPV	CLPVASNIYS	DCHVLKIPRL	AGSAFPDIV	RISSVDTLAH	DICMREWL	1500
Ovary_C	IIFPEGTNPK	KIWEVEKIVV	HPEFKMIYNV	PQNDLALIQ	VDPIEHIPV	CLPVASNIYS	DCHVLKIPRL	AGSAFPDIV	RISSVDTLAH	DICMREWL	1500
Testis_C	IIFPEGTNPK	KIWEVEKIVV	HPEFKMIYNV	PQNDLALIQ	VDPIEHIPV	CLPVASNIYS	DCHVLKIPRL	AGSAFPDIV	RISSVDTLAH	DICMREWL	1499
Ovary_A	IIFPEGTNPK	KIWEVEKIVV	HPEFKMIYNV	PQNDLALIQ	VDPIEHIPV	CLPVASNIYS	DCHVLKIPRL	AGSAFPDIV	RISSVDTLAH	DICMREWL	1500
Testis_A	ITDDMLCGRI	NGTNSCQRDV	GGPLVCQSPS	DDAWYFVGIS	SWGPKICNDN	AHHRLPDVY	VSVAYFLKWI	TKIIQ*			1575
Ovary_C	ITDDMLCGRI	NGTNSCQRDV	GGPLVCQSPS	DDAWYFVGIS	SWGPKICNDN	AHHRLPDVY	VSVAYFLKWI	TKIIQ*			1575
Testis_C	ITDDMLCGRI	NGTNSCQRDV	GGPLVCQSPS	DDAWYFVGIS	SWGPKICNDN	AHHRLPDVY	VSVAYFLKWI	TKIIQ*			1574
Ovary_A	ITDDMLCGRI	NGTNSCQRDV	GGPLVCQSPS	DDAWYFVGIS	SWGPKICNDN	AHHRLPDVY	VSVAYFLKWI	TKIIQ*			1575

: 三つ組触媒アミノ酸残基,
 : 基質結合ポケットのS1部位,
 : 予測N型糖鎖修飾アミノ酸残基,
 : アミノ酸置換

Fig. 8 マボヤA型/C型の精巣および卵巣から得た HrOvochymase推定アミノ酸配列の比較

A

Ss_Acrosin	RVGGMGAEPGAWPVMVSLQIFMYHNNRRYHTCGGILLNSHWLTAAC ¹ CF-----KNKKVTDWRLIFGANEVWGSNKPKPLQERFVEEIIIEHKYV-SGLEINDIALIKITPPVP
Hs_Acrosin	RIVGGKAAQHGAWPWMVSLQIFTY-NSHRYHTCGGILLNSRWLTAAC ¹ CF-----VGKNNVDWRLVFGAKEITYGNNKPKAPLQERYVEKIIIEHKYN-SATEGNDIALVEITPPIS
Xl_OVCH1	RIVGGDAAVGGQPTWTVSL-----KLNERHICGGSIVRKDMVTAAC ¹ CVYP-----VTEIKVSHMTIVGEYDQ-----VMSDQEQSIPVSHIEPHPNYRGDNMGYDIALVFLSKPII
Hs_OVCH1	RISWRNSTVTGHPWQVSL-----KSEHHFCGGSLIQEDRVVTAAC ¹ CLDS-----LSEKQLKNITVTSGEYSLF-----QKDKQEQNIPVSKIITHPEYNSREYMSYDIALLYLKHVK
Xl_OVCH2	RIVGGRSKKQHPWTVSL-----KRNGKHFCGGTLVSHCHVLTAA ¹ HC-----LDRNVKLYMRVYIGEYDQ-----LKEETEQMFRVIEIFKHPNFNSQPMNYDAVLLLDGVS
Hs_OVCH2	RILGGSQVERKGYPPWVSL-----KQRQKHICGGSIVSPQWVTAAC ¹ CI-----ANRNIVSTLNVTAGYDLS-----QTDPEQTLTETVTHHHPFSTKKPMDYDIALKMGAFQ
Hr_Proacrosin	RIVGGEMAKLGEFPWQAAF-----LYKHVQVCGGTIIDTTWILSAA ¹ CFDPHMYNLQSIKKEDALIRVADLDKT-----DDTDEGEMTFEVKDIIIEHQYN-RQTFDNDIMLIEILGSIT
Hr_OVCH	RIVGGEMAKLGEFPWQAAF-----LYKHVQVCGGTIIDTTWILSAA ¹ CFDPHMYKLQSIKKEDALIRVADLDKT-----DDTDEGEMTFEVKDIIIEHQYN-RQTFDNDIMLIEILGSIT
	*: . ** .: : : *** : : : : : * * . : . . . : : * . : * : : : .
Ss_Acrosin	CGPFI ² GPGLPQFKAGPPRAPQTCWVTGWGLKEKG-PRTSPTLQEARVALIDLELCNSTQ--WYNGRVSTNVCAGYPRGKI ² TCQGD ³ SGPLMCR--DRAENTFVVVGITSWGVC
Hs_Acrosin	CGRF ² IGPGCLPHFKAGLPRGSQSCWVAGWYIEEKA-PRPSSILMEARVDLIDLCLNSTQ--WYNGRVQPTNVCAGYPVGKID ² TCQGD ³ SGPLMCK--DSKESAYVVVGITSWGVC
Xl_OVCH1	FGSQVQPICLPQVGEKIEAGTL-CVSSGWGRLEENG--DLSPLVQEVKLPVVDNCTHVALEPIGHPVLDDTMCAGFPPEGMDACQGD ³ SGPFCR--RRSGVWFLAGCVSWGLGCG
Hs_OVCH1	FGNAVQPICLPDSDDKVPEGLL-CLSSGWGKISKTS--EYSNVLQEMELPIMDDRACNTVLKSMNLPPLGRMTLCAGFPDWGMDACQGD ³ SGPLVCR--RGGGIWLAGITSWAGCA
Xl_OVCH2	FDENIQACLPENPDVFEFGDL-CVTLGWGHLTENG--ILPVVLQEVYLPVLDLSSCLHVSALKGT ² VSSYIVCAGFPPEGMDACQGD ³ SGPLLCQ--RRHGSWVLHGLTWSWGMCG
Hs_OVCH2	FGHFVGPICLPDLREQFEAGFI-CTTAGWGRLETEGG--VLSQVLQEVNLPILTWECEVAALLTLKRPISGKTFCLTGFPDGGRDACQGD ³ SGSLMCR--NKKGAWTLAGVTSWGLGCG
Hr_Proacrosin	YGPTVQACIPGANDAVADGK-CLISGWGDTQDHVHNRPDKLQKAQVEVFARAQCLATY----PESTENMICAGLRTGGID ² SCQGD ³ SGPLACPTTENTAQPTFFLQIVSWGRGCA
Hr_OVCH	YGPTVQACIPGANDAVADGK-CLISGWGDTQDHVHNRPDKLQKAQVEVFARAQCLAA----PESTENMICAGLRTGGID ² SCQGD ³ SGPLACPTTENTAQPTFFLQIVSWGRGCA
	. : * * : . * *** . . * : : : . * . : * : * * : * * * * : : * : : * * * .
Ss_Acrosin	R-----AKRPGVYTSTWPLYLNWI
Hs_Acrosin	R-----AKRPGIYTATWPLYLNWI
Xl_OVCH1	RSWGAQIIRSQ--SGSPAIFSRVSVLDPL
Hs_OVCH1	GG--SVPRNNHVKASLGIFSKVSELMDFI
Xl_OVCH2	RSWKNNVFLPHN-RKGSPIGIFTDIQKLGLGW
Hs_OVCH2	RGRN--VRKS-DQGSPIGIFTDISKVLFWI
Hr_Proacrosin	L-----DGFPGVYTEVRK--
Hr_OVCH	L-----DGFPGVYTEVRK--
	. : : :

■ : 三つ組触媒アミノ酸残基, ■ : 基質結合ポケットのS1部位

B

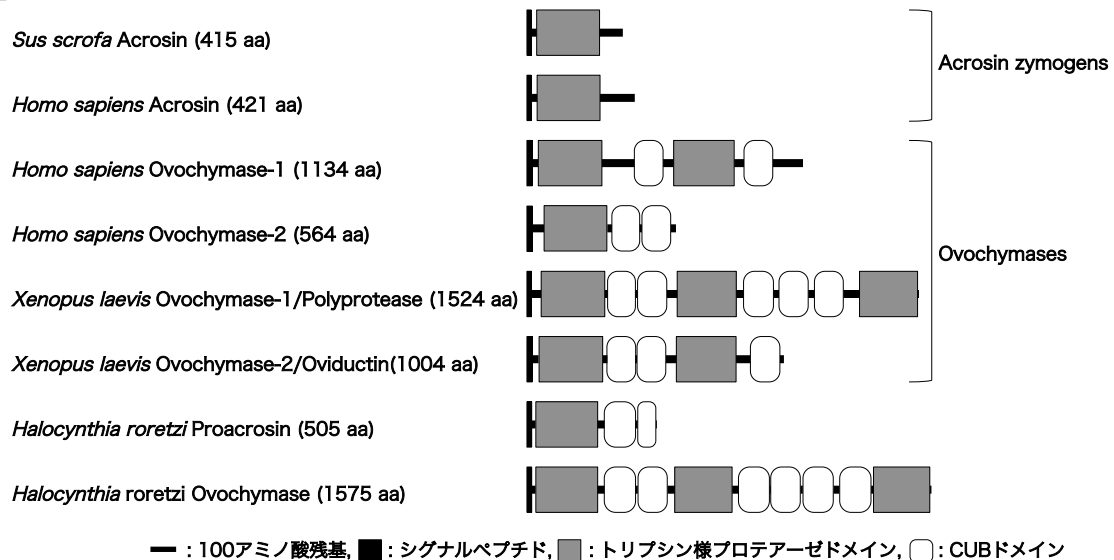


Fig. 9 既知acrosin zymogene、既知ovochymase、HrProacrosinおよびHrOvochymaseのアミノ酸配列とドメイン構造の比較

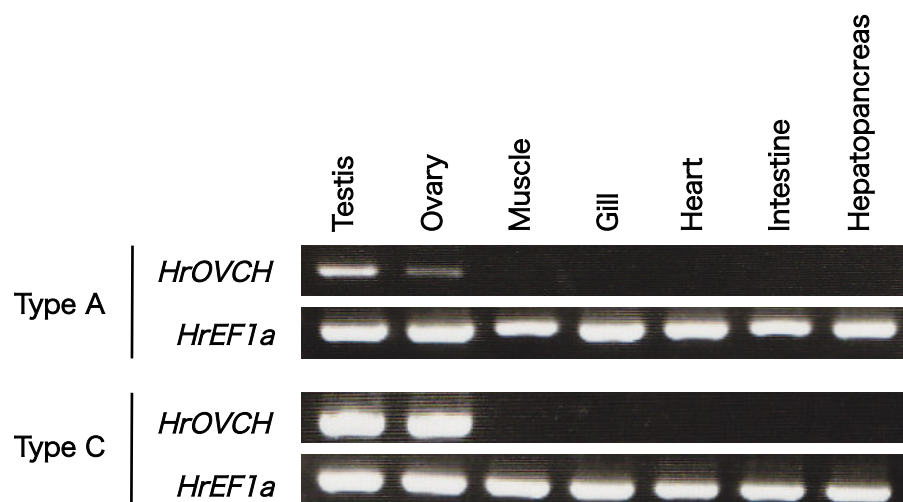


Fig. 10 マボヤのタイプ別 (A型あるいはC型) における *HrOVCH* mRNAの発現

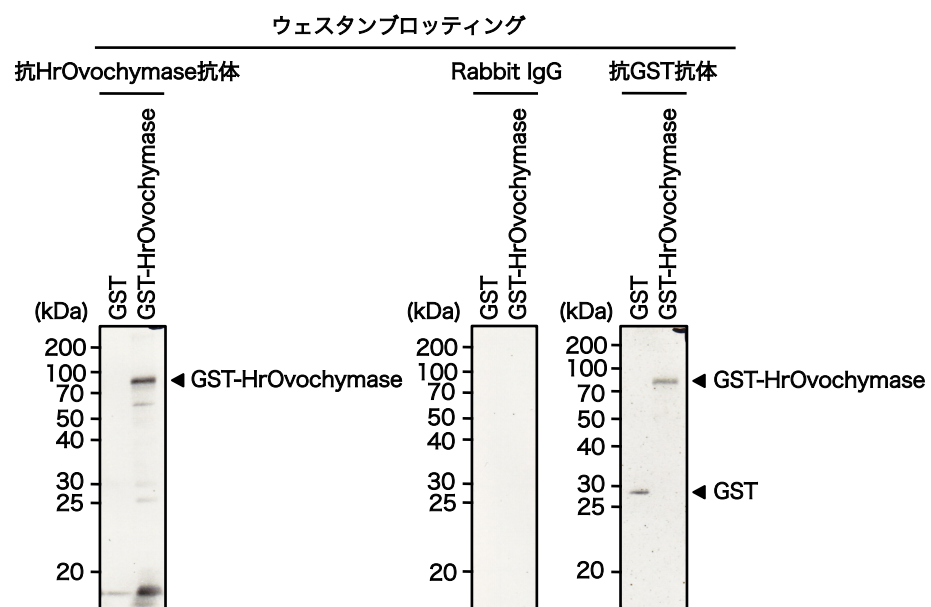


Fig. 11 抗HrOvochymase抗体の組換えタンパク質に対する反応性

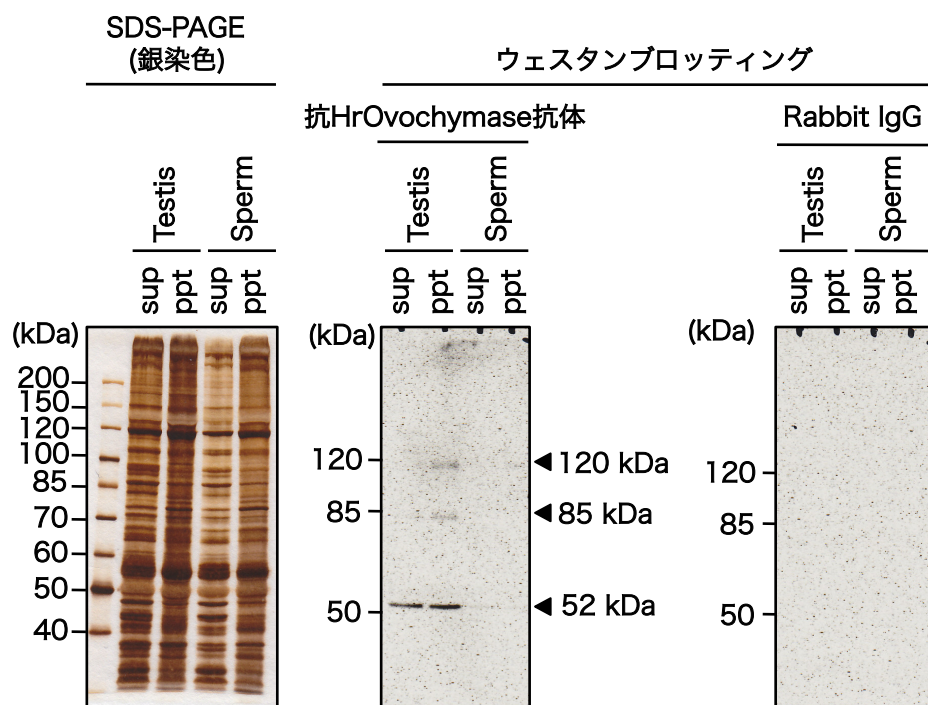
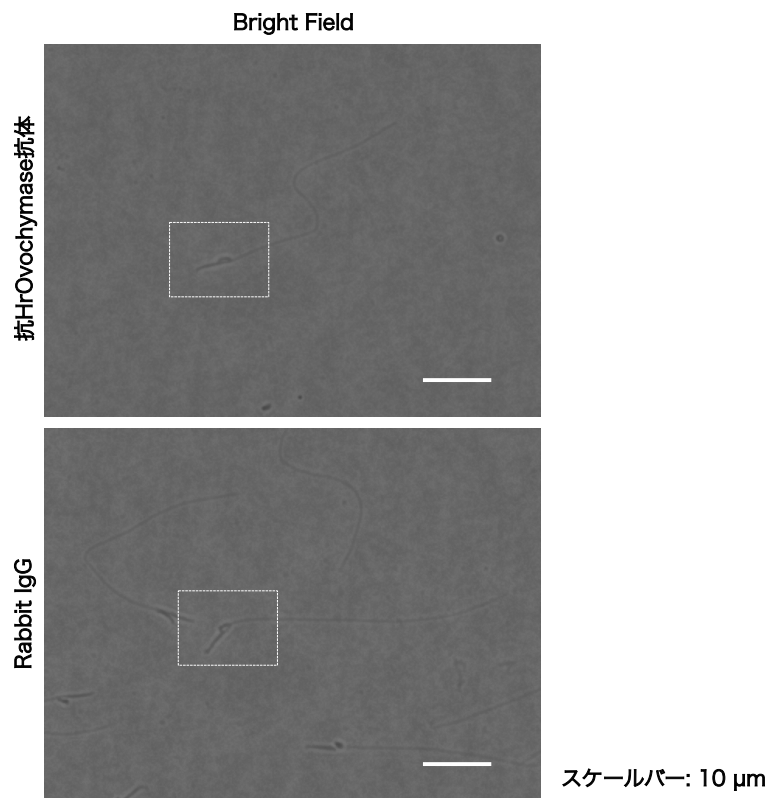
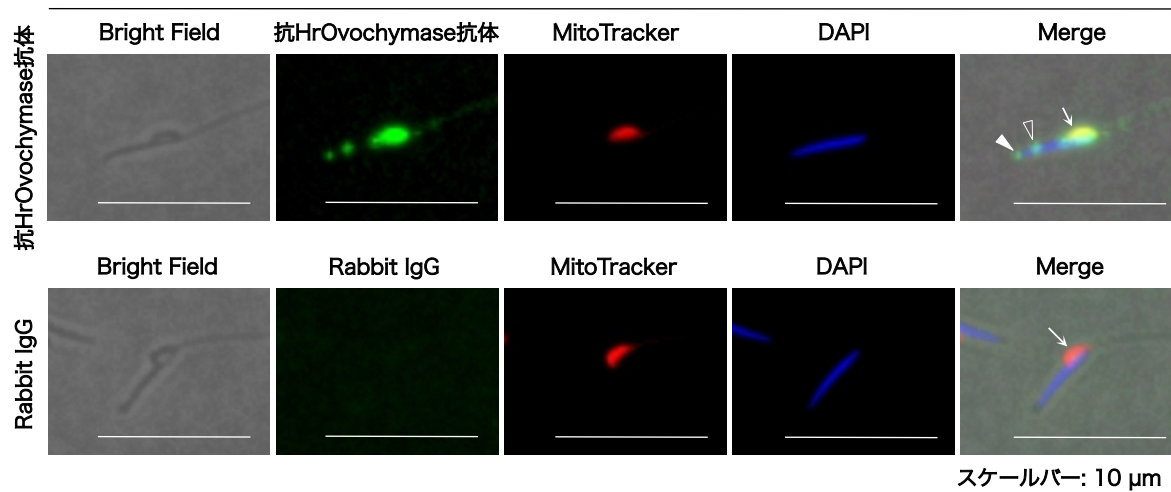


Fig. 12 抗HrOVCH抗体を用いた精巣および精子ホモジネートのウェスタンブロッティング

A



点線で囲んだ部分の拡大図



B

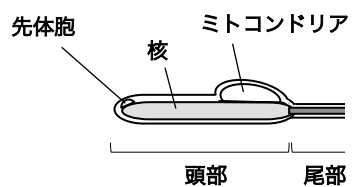


Fig. 13 抗HrOvochymase抗体を用いたマボヤ精子の免疫染色

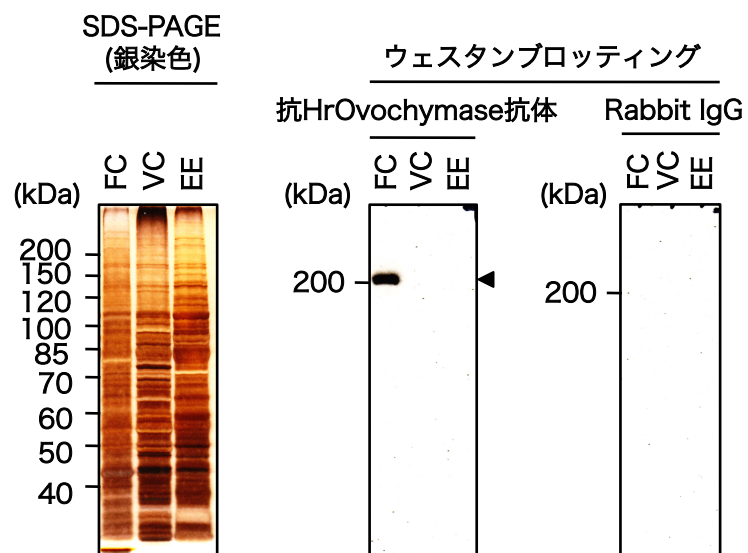


Fig. 14 抗HrOvochymase抗体を用いたマボヤ卵巣卵の濾胞細胞、卵黄膜
および卵抽出液のウェスタンブロッティング

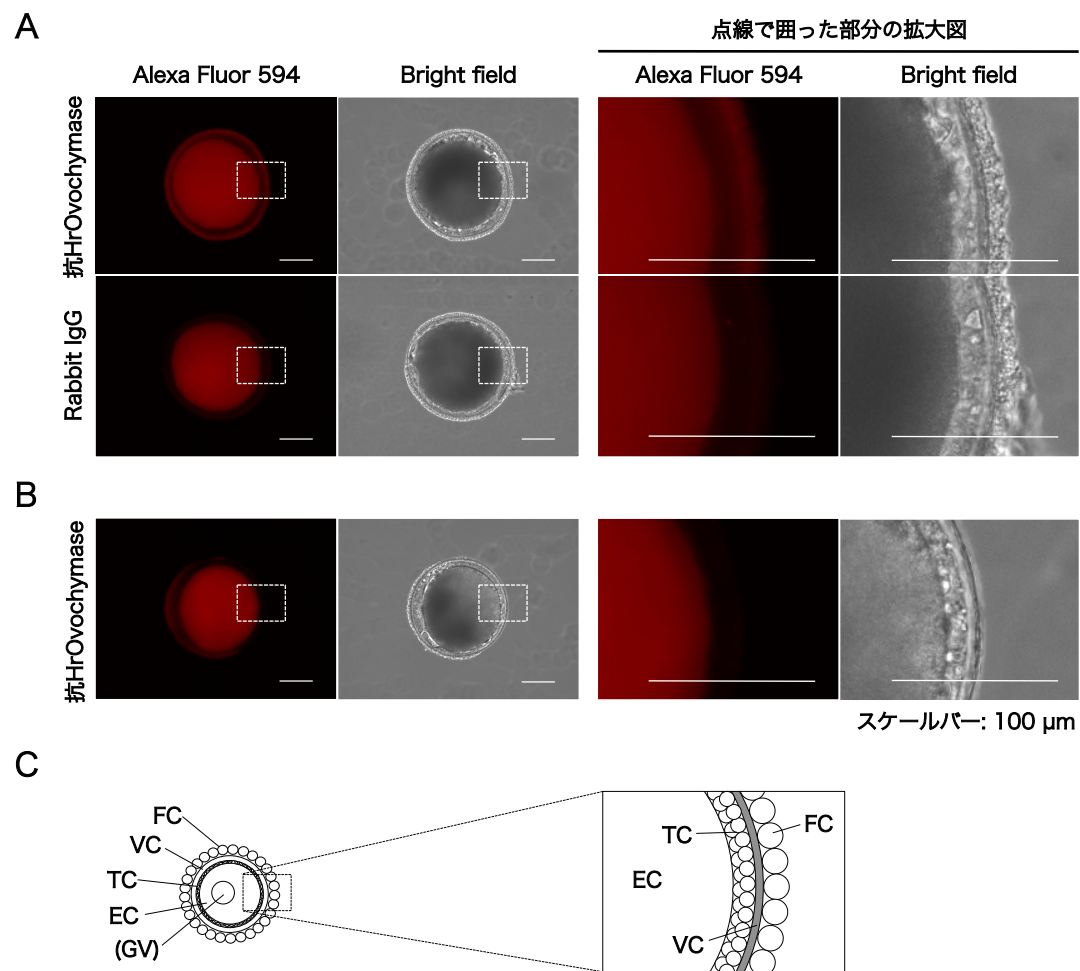


Fig. 15 抗HrOvochymase抗体を用いたマボヤ卵巣卵の免疫染色

A

<i>m/z</i>	Identified peptide		Calculated exact mass	Error (Da)
	Position	Sequence		
711.54	67 – 78	I.DTTWILSAAHCF.D	1420.6445	0.4193
757.45	92 – 98	E.DALIRVA.D	756.4494	-0.0061
592.48	107 – 116	T.DEGEMTFEVK.D	1183.5067	-0.5596
839.04	117 – 129	K.DIIHEQYNRQTF.D	1675.8318	0.2249
577.76	184 – 198	P.DKLQKAQVEVFARAQ.C	1729.9475	0.3059
1414.40	313 – 325	G.DFSSPGFYSGSYT.D	1413.5725	-0.1779
587.02	329 – 337	L.DCKWIIQIP.D	1171.606	0.4109
783.71	361 – 376	Y.DDVKVYSGAVGNIA.SA.D	1564.7733	0.6413
590.94	397 – 407	S.DGSSMTVIFHS.D	1179.523	0.3433
1012.25	408 – 425	S.DYMTHTLGFRVFAVSA.D	2021.9782	0.5095
568.44	426 – 436	A.DVSQSGCGGIR.E	1134.5088	0.3622
796.33	426 – 440	A.DVSQSGCGGIRELLT.D	1590.7672	-0.1134
872.53	441 – 454	T.DHGEFSSKHYPNYY.D	1742.7325	0.3167
677.57	473 – 484	I.ELNFLSFRLAGS.D	1352.7088	0.4181
523.00	569 – 578	A.DQTAARIVNG.D	1043.536	0.4439
732.55	642 – 654	S.ETIVPVAQIFIHP.D	1462.8184	0.2615
1143.79	822 – 841	H.DPTEFEQGCIQLLVLSNHEG.D	2285.0634	0.505
1292.34	902 – 925	S.DGTVGRQYGPYCGSSEILISLH.D	2582.2071	0.4587
961.79	1055 – 1071	S.DASLNYKGFFASFVELN.E	1920.9258	0.6318
1150.36	1107 – 1115	L.DCTWVIEVE.D	1149.5012	-0.1513
633.58	1228 – 1238	T.DEEGVIEYKQG.D	1265.5775	-0.4308
1166.05	1285 – 1305	V.DDIYSGVVKPVFQFTGIIGYL.D	2330.2199	-0.1414
1108.50	1286 – 1305	D.DIYSGVVKPVFQFTGIIGYL.D	2215.1929	-0.2067
744.59	1331 – 1342	G.DTSFELIYKLMQ.D	1486.7377	0.4335
884.40	1434 – 1441	N.DLALIQLV.D	883.5379	-0.141
1061.39	1442 – 1460	V.DPIEHPPVCLPVASNIYS.D	2120.0612	0.7101
1058.05	1531 – 1548	S.DDAWYFVGISWGPKICN.D	2113.9568	0.1239
1093.41	1558 – 1575	P.DVYVSVAYFLKWITKIIQ.-	2185.2187	-0.4042

Fig. 16 濾胞細胞200 kDaタンパク質からHrOvochymase由来のペプチドの検出

B

1	MIVTFVALAL	SCCTPQVTAD	CGLRPRLQSA	IITGRIVGGE	MAKLGEFPWQ
51	AAFLYKHVQV	CGGTIIDTTW	ILSAAHCFDP	HMYKLQSIKK	EDALIRVADL
101	DKTDDT DEGE	MTFEVKDIII	HEQYNRQTFD	NDIMLIEILG	SITYGPTVQP
151	ACIPGANDAV	ADGTKCLISG	WGDTQDHVHN	RWPDKLQKAQ	VEVFARAQCL
201	AAYPESTENM	ICAGLRTGGI	DSCQGDSGGP	LACPFTENTA	QPTFFLQGIV
251	SWGRGCALDG	FPGVYTEVRK	YSSWIANYTQ	HLLQDRNADV	ATFTITGDPC
301	SSNGSIISGS	EG DFSSPGFY	SGSYTDNLDC	KWIIQIPDIG	SRIQLSFTEF
351	GVEYHTFCWY	DDVKVYSGAV	GNIASADAAD	LLGSHCGMNI	PSDLLSDGSS
401	MTVIFHSDYM	THTLGFRADF	HAVSADVSQS	GCGGIRELLT	DHGEFSSKHY
451	PNYYDADSIC	ECFITAPTGK	TIELNFLSFR	LAGSDCADNV	AIYDGLNSSY
501	PRIIRLCINQ	GFNVTVPSSS	NTMFVSFKTD	GQVQDVGFEA	YYYFSSNGNS
551	TDDTDYSQCG	FSSTPINADQ	TAARIVNGDI	AIAGSWPWQI	SIRLCDTCNH
601	YCGGSIISPS	WIVTAAHCIE	SSAHITYIRA	GDFDRFTIEI	SETIVPVAQI
651	FIHPDYQKDL	PNNADIALLK	LANPLSYSST	IRPVCFPSQI	STIPEENAE
701	YVTGWGLTEE	KLPLMPYDQC	LNVTYSYVLN	ENMLCAGNIS	ENMLCAGNIS
751	SGIDTCLGDS	GGPFVCRKSR	NDPWILYGVS	AFGRECGSSR	YPGVYTKVTR
801	YIDWIIATAN	VSTVTSVVEE	HDPTEFEQGC	IQLLVLSNHE	GDLSSPEYPE
851	LYGEGMLDCQ	WKIVLMDRTK	SLNINFRFSH	SQQDTAAACS	LANIRISESY
901	SDGTVGRQYG	PYCGSSESIL	ISSLHDLVVS	LHNSQSQVKI	GLKLEYRLEE
951	LEQSGCGQLK	HLIENKGNFS	SINYPNIYSA	NSHCEWYLHA	SIATHYLQIS
1001	LSQFSLENAY	QCRYDFLTVI	DVTENGNISH	GPYCGNSIPH	VITGHGLFHI
1051	KFRSD ASLNY	KGFFASFVEL	NERPQEESSG	GGVKFLNGTN	GTFQTAGFPL
1101	AYEANL DCTW	VIEVEDGYKV	RLNFQQFSLE	SSSSCKYDWA	MLYNGEFAFE
1151	AQRIDTLCGY	DVKLEDIFES	TSNVMRIDFH	SDFSFNKQGF	LAMYTAVSPG
1201	SSRSSVHQRE	NHLQEKRSRG	CQDSIFT DEE	GVIEYKQGDH	TGNTRCLFRI
1251	LTNHLHVIRL	WLRKLSSLNL	HENDSIKIYD	KIDVDDI YSG	VVKPVFQFTG
1301	IIGYLD SLPA	YLDYNGGEIS	MLFSSDGQHG	DTSFELIYKL	MQDKSSTTNP
1351	KQLWNDHHGK	WPWMVSLFGS	SKYYFCSGVI	ISSRWIATAA	TCNLRSSSEIH
1401	IIFPEGTNPK	KIWEVEKIVV	HPEFKMIYNV	PQNDLALIQL	VDPIEHIPPV
1451	CLPVASNIYS	DCHVLKIPRL	AGSAAFPDIV	RISSVDTLAH	DICMREWHLR
1501	ITDDMLCGRI	NGTNSCQRDV	GGPLVCQSPS	DDAWYFVGIS	SWGPKICNDN
1551	TAHHRLPDVY	VSVAYFLKWI	TKIIQNVMAQKLREA		

太字: 検出されたペプチド

Fig. 16 濾胞細胞200 kDaタンパク質からHrOvochymase由来のペプチドの検出 (つづき)

$$D^{822} \quad P \quad T \quad E \quad \left[\begin{array}{c} Y_{16} \quad Y_{15} \quad Y_{14} \quad Y_{13} \quad Y_{12} \quad Y_{11} \quad Y_{10} \quad Y_9 \quad Y_8 \quad Y_7 \quad Y_6 \quad Y_5 \quad Y_4 \\ F \quad E \quad Q \quad G \quad C \quad I \quad Q \quad L \quad L \quad V \quad L \quad S \quad N \\ b_5 \quad b_6 \quad b_7 \quad b_8 \quad b_9 \quad b_{10} \quad b_{11} \quad b_{12} \quad b_{13} \quad b_{14} \quad b_{15} \quad b_{16} \quad b_{17} \end{array} \right] \quad H \quad E \quad G^{841}$$

Observed mass: 2285.57

Mass spectrum of the precursor ion at m/z 2285.0634. The x-axis represents m/z from 400 to 2000, and the y-axis represents Relative Abundance from 0 to 100. The base peak is at m/z 1630.61 (b_{14}). Other significant peaks are labeled with their m/z values and series (y or b).

Series	m/z	Relative Abundance (approx.)
y_4	543.90	65
y_5	581.36	15
y_6	656.30	85
y_7	755.47	75
y_8	847.70	45
y_9	981.41	25
y_{10}	1109.56	65
y_{11}	1177.34	35
y_{12}	1222.35	15
y_{13}	1305.53	20
y_{14}	1418.56	40
y_{15}	1459.87	70
b_1	1531.58	85
b_{14}	1630.61	100
b_{15}	1743.67	95
b_{16}	1843.92	25
b_{17}	1944.98	5

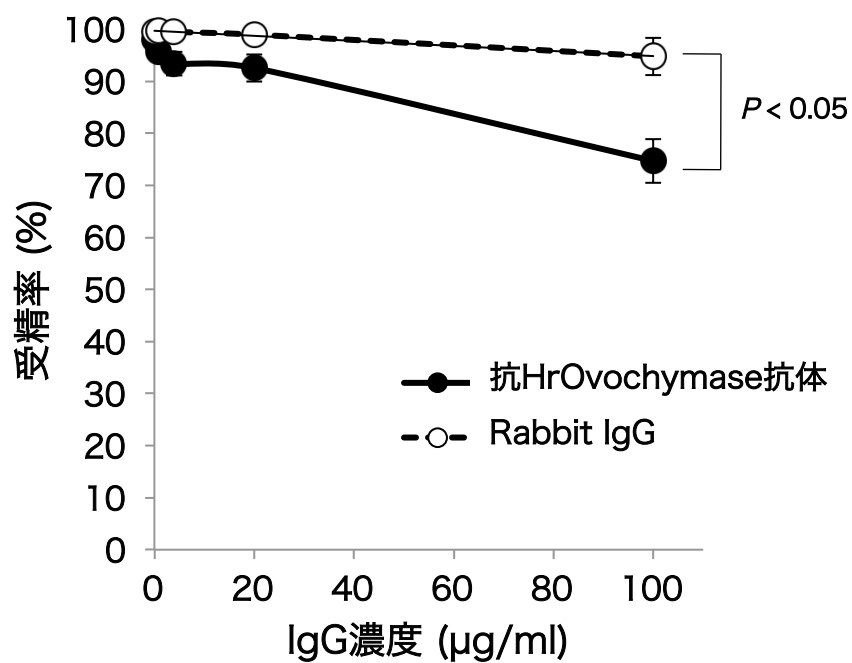
$$D^{361} \left[\begin{array}{cccccccccccccccc} & & & Y_{13} & Y_{12} & Y_{11} & Y_{10} & Y_9 & & Y_7 & Y_6 & & Y_4 & Y_3 & & \\ D & V & K & V & Y & S & G & A & V & G & N & I & A & S & A^{376} \\ & b_2 & b_3 & b_4 & b_5 & b_6 & b_7 & b_8 & b_9 & b_{10} & b_{11} & b_{12} & b_{13} & b_{14} \end{array} \right]$$

Observed mass: 1565.41

Mass spectrum of the $[M+H]^+$ ion of compound 1. The x-axis represents m/z from 0 to 1500, and the y-axis represents Relative Abundance from 0 to 100. The base peak is at m/z 1034.57. Labeled peaks include b_1 , y_1 , b_2 , y_2 , b_3 , y_3 , b_4 , y_4 , b_5 , y_5 , b_6 , y_6 , b_7 , y_7 , b_8 , y_8 , b_9 , y_9 , b_{10} , y_{10} , b_{11} , y_{11} , b_{12} , y_{12} , b_{13} , y_{13} , b_{14} , and y_{14} . A dashed line indicates the theoretical fragmentation pattern.

Fig. 16 濾胞細胞200 kDaタンパク質バンドからHrOvochymase由来のペプチドの検出 (つづき)

	濃度 (μg/ml)	受精率 (±SE)
抗HrOvochymase抗体	0	98.0 (±0.9)
	0.8	95.6 (±1.6)
	4	93.3 (±2.3)
	20	92.6 (±2.7)
	100	74.7 (±4.2)
Rabbit IgG	0	99.5 (±0.3)
	0.8	99.7 (±0.2)
	4	99.5 (±0.2)
	20	99.0 (±0.5)
	100	94.8 (±3.6)



N=3, Mean ± SE

Fig. 17 抗HrOvochymase抗体の受精への影響

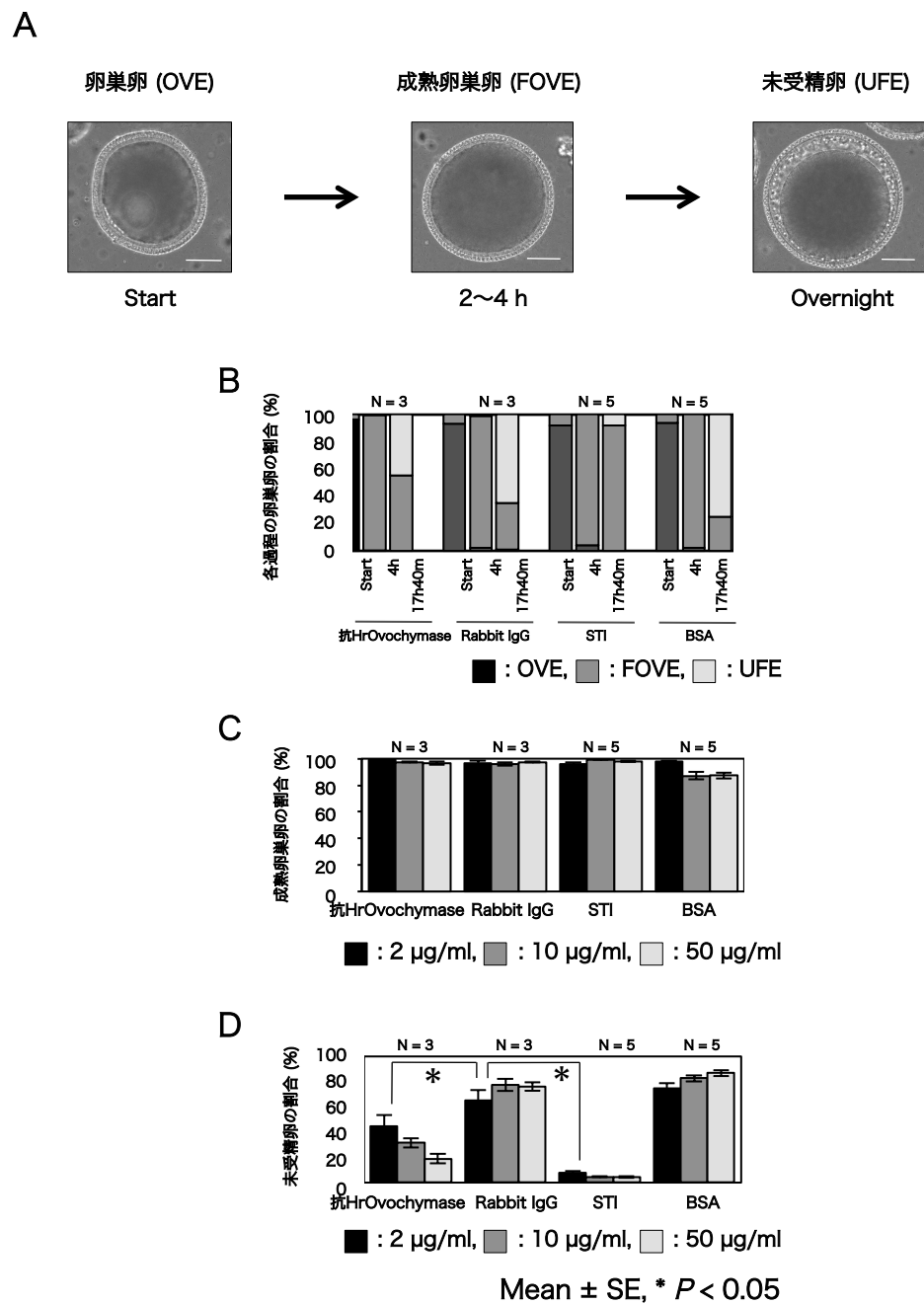


Fig. 18 抗HrOvochymase抗体の卵子形成への影響

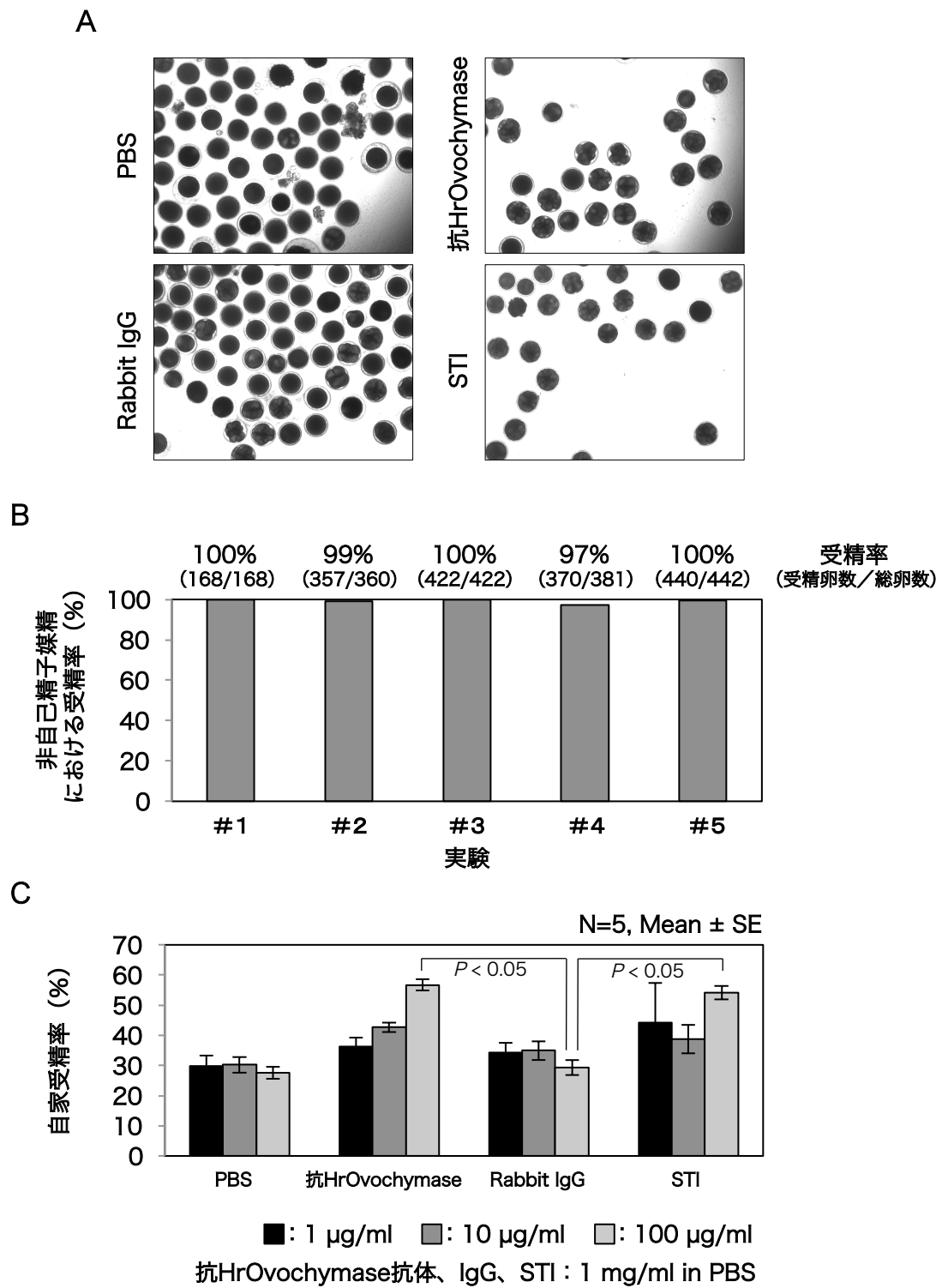


Fig. 19 抗HrOvochymase抗体の自家不和合性獲得への影響

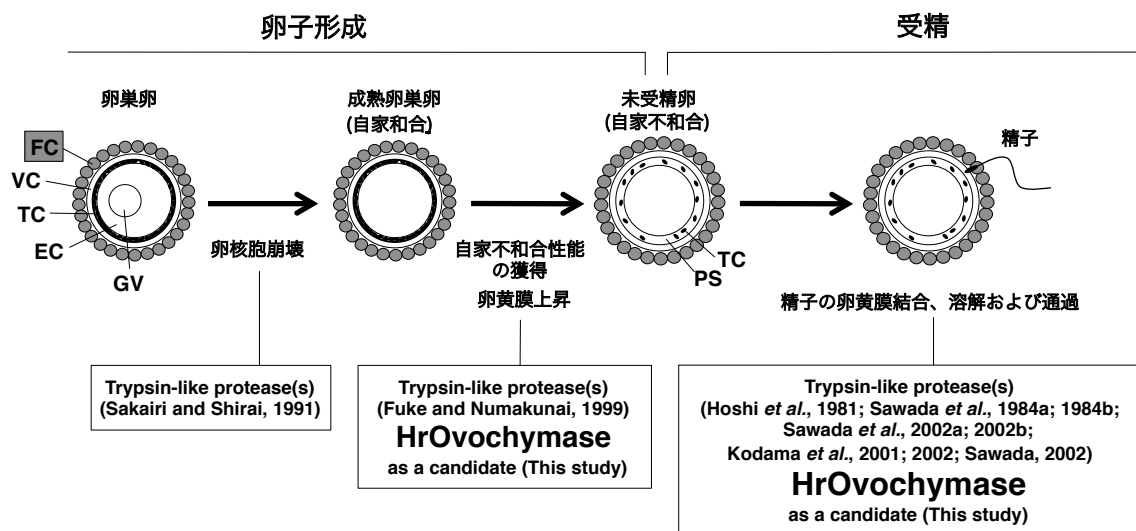


Fig. 20 卵子形成および受精におけるHrOvochymase作用機構のモデル

Experiments	Primer name	Sequence
3'RACE	HrOVCH_GS1_fwd	GGGTGGCAGATCTGGATAAA
	HrOVCH_GS2_fwd	AAATGATGCAGTTGCTGACG
	HrOVCH_GS3_fwd	CTGATGGTCAGGTCCAGGAT
	HrOVCH_GS4_fwd	GTGGTTTTTCCAGCACACCT
	HrOVCH_GS5_fwd	TGTGCTAGAAGCaCTTCCAAA
	HrOVCH_GS6_fwd	AGGACATGGACTGCTTCACA
	HrOVCH_GS7_fwd	GGGAGTGTGGAAGCAGTAGA
	HrOVCH_GS8_fwd	AGATAGAAATGCTGACGTGGC
5'RACE	HrOVCH_GS1_rvsc	TGCCAATGTCTGGAATCTGA
	HrOVCH_GS2_rcsc	TGTCCTCAACCCAGCACATA
	HrOVCH_GS3_rvsc	TTCAGCCATAGCATTGGACA
	HrOVCH_GS4_rvsc	TTCAGCTTTCAGCCATAGCA
	HrOVCH_GS5_rvsc	TGATCATAACGGCATCAGTGGA
	HrOVCH_GS6_rvsc	GGTGTTCGATTTGTGCCATG
	HrOVCH_GS7_rcsc	CAAGATCGTTTTGCGGTACA
RT-PCR	HrOVCH_trypl_fwd	GACTGTGGTTTGCGTCC
	HrOVCH_trypl_rvsc	TCTATCTTGGAGCAAATGTTG
	HrEF1a_fwd	GGGAAGAGTGGAGACTGGA
	HrEF1a_rvs	CTTACCAGAGCGACGATCG

Table 1 本研究で用いたプライマー

遺伝子モデル名	種
<i>Boschl.CG.MTP2013.chrUn.g033850</i>	<i>Botryllus schlosseri</i>
<i>Phmamm.CG.MTP2014.S27.g01100</i>	<i>Phallusia mammlata</i>
<i>KH2012:KH.C11.304</i>	<i>Ciona intestinalis</i>
<i>Cisavi.CG.ENS81.R304.50858-56714.03403</i>	<i>Ciona savigyni</i>

2016年1月29日時点

Table 2 他種ホヤにおける*HrOVCH*と相同性のある遺伝子