

原索動物の受精機構に関する研究
Studies on the Mechanism of Ascidian Fertilization

(日本動物学会推薦)

代表研究者 名古屋大学 澤田 均 Nagoya University Hitoshi Sawada
協同研究者 名古屋大学 原田淑人 Nagoya University Yoshito Harada

Fertilization is a precisely controlled process involving many gamete molecules in sperm binding to and penetration through the extracellular matrix of the egg. We have been studying the fertilization mechanism in ascidians, because we can obtain large quantities of gametes, which are readily fertilized in the laboratory. Whereas ascidians are hermaphrodites, many ascidians are strictly self-sterile. Therefore, after sperm recognize the vitelline coat as nonself, the sperm lysin system seems to be activated. We revealed that two sperm trypsin-like proteases, acrosin and spermosin, and the proteasome are essential for fertilization in *H. roretzi*. We found that the proteasome rather than trypsin-like proteases has a direct lytic activity toward the vitelline coat. The target for the lysin was found to be a 70-kDa vitelline-coat component called HrVC70, which is made up of 12 EGF-like repeats. In addition to the proteasome, the ubiquitination system toward the HrVC70 was found to be necessary for ascidian fertilization. In this report, I describe recent progress on the novel extracellular ubiquitin-proteasome system, which plays an essential role in the degradation of the vitelline coat, and also the self/nonself-recognition mechanism during fertilization.

研究目的

受精は、精子と卵との細胞間相互認識により始まる生命誕生の場であり、これにより新しい遺伝子構成をもつ生命体の誕生が可能となる。本申請者は、この受精機構に関する分子的理解を深めることを目的として、精子の卵保護層通過機構と、精子と卵との細胞間相互認識機構について研究を行ってきた。

哺乳類では、「精子先体胞中のトリプシン様酵素であるアクロシンが卵保護層（透明帯）に精子通過口を開けるライシンである」と永年信じられてきたが、アクロシンのノックアウトマウスの精子においても精子の透明帯通過が可能なが示され、ライシンとして機能する精子側の分子の究明が望まれている。我々は、精子と卵の大量入手が可能で受精実験の用意な原索動物マボヤを用いて、受精に関与する精子プロテアーゼの探索を行ってきた。そして、2種類の精子トリプシン様酵素（アクロシンと新規酵素スペルモシン）と精子プロテアソームが精子の卵黄膜通過に必須であること、また、卵黄膜を直接溶解しているのは、アクロシンではなく精子プロテアソームであることを明らかにした。プロテアソームは一般に細胞内タンパク質のエネルギー依存的な分解に関わるが、マボヤの受精経路においては、卵黄膜成分 HrVC70 の細胞外でのユビキチン化が起こった後に、それが精子 26S プロテアソームによって分解されることを見いだしている。本研究では、この受精に関与する新しい細胞外ユビキチン-プロテアソームシステムに関する更なる知見を得ることを目的としている。

そして、第二の目的として、ホヤ類における自己非自己識別機構の解明が挙げられる。ホヤ類は一般に雌雄同体で、生殖時期には精子と卵を同時に放出するが、マボヤ等では決して自家受精は起こらない。本申請者らは、精子プロテアソームの標的分子となっている精子レセプターHrVC70 が、自己と非自己の精子に対する識別分子であると同時に種認識分子であるという知見を得つつある。そこで本研究では、生化学的・分子生物学的手法を用いて、HrVC70 がホヤ類における種認識と個体認識にどのように関わっているかについて、詳細に解析することを目的としている。

研究経過と考察

1. 受精における細胞外ユビキチン-プロテアソーム系の解析

マボヤの受精時に卵黄膜がユビキチン化されるか否かを、ユビキチン鎖に特異的なモノクローナル抗体 FK2 を用いて解析した。まず免疫細胞化学により

調べたところ、未受精卵の卵黄膜はユビキチン化されていないが、受精後に強くユビキチン化されることが明らかとなった。マボヤでは、濾胞細胞が卵黄膜に接着していることが受精に必須であると報告されているが、濾胞細胞を一部除去した卵を用いると、濾胞細胞が結合している卵黄膜部分のみがユビキチン化されることが示された。このことは、精子が進入する部位が特異的にユビキチン化されることを示唆している。次に、ウエスタンブロット解析を行ったところ、未受精卵の卵黄膜の VC70 はユビキチン化されていないが、受精すると高分子量側にバンドがシフトし、それはユビキチンコンジュゲートであることが明らかになった。また、FK2 抗体は受精阻害活性が強いこと、精子を活性化するとユビキチンや ATP が細胞外に放出されること、細胞外 ATP をアピラーゼで枯渇させると受精が阻害されること、などの実験結果からマボヤの受精時には VC70 の細胞外ユビキチン化が分解に先立って起こっていると考えられる。

このユビキチン化酵素群の精製を試みたところ、分子量 700kDa の複合体を形成しており、VC70 特異的にユビキチン化することが示された。また、海水中で活性を有し、活性発現に 10 mM Ca^{2+} を必要とする点など細胞外で機能する酵素としての特性を有していた。本酵素は大量精製が困難なため、そのアミノ酸配列に関する情報は得られていないが、ゲノム情報が公開されているカタユレイボヤのデータベースを用いて、ユビキチンリガーゼ E3 の候補分子の探索を行った。その結果、精巣で強く発現している E3 様分子を 2 種類発見し、それを融合タンパク質として得ることに成功した。今後は、これが受精時における卵黄膜のユビキチン化に関わるか否かについて詳細に解析する必要がある。

2. 受精における自己非自己識別機構の解析

VC70 は、自家受精拒否機構が備わる卵成熟段階で大量に卵黄膜に接着するようになること、自家不稔が解除される卵の弱酸処理により卵黄膜から遊離すること、この分子をアガロースビーズに固定化して精子の結合数を調べると、自己より非自己の精子の方がより多く結合すること、自己と非自己の VC70 で精子を前処理して受精させると、非自己の VC70 で前処理した場合が自己の VC70 で前処理した場合よりも受精阻害効果が強いことが示された。これらの結果は、VC70 がマボヤの受精における自己非自己識別分子の一つであること

を示している。

もし、この分子が自他認識に直接関わるならば、個体レベルで分子構造に違いが見られるはずである。そこで、10個体のマボヤ生殖巣から個体別に RNA を調製し、RT-PCR 法によって VC70 領域を増幅し配列を調べた。その結果、各個体の生殖巣では、父方と母方の両遺伝子に由来する VC70 の mRNA が発現していること、個体間でアミノ酸残基の置換を伴う変異が起きていることが明らかになった (Fig. 1)。この変異が起こる詳細な機構は明らかではないが、特定の塩基修飾酵素によりこの変異が起きている可能性も考えられる。Notch/Delta のように、EGF 様反復配列を有する分子間相互作用においては 1 残基の置換によっても、Notch シグナリングの異状や疾患が引き起こされることが知られている。今後は VC70 に対する精子側のリガンドを探索し、VC70 とそのリガンドとの結合が、VC70 の分子多型によって影響を受けるか否かを解析することが重要な課題である。

VC70 がマボヤ以外のホヤ類にも存在するか否かは、分子進化や種分化機構を考える上でも興味ある問題である。そこで、マボヤ (*Halocynthia roretzi*) と同属のアカボヤ (*Halocynthia aurantium*) に着目し、HrVC70 のホモログ探索を行った。その結果、アカボヤの卵黄膜にも VC70 ホモログが存在することが明らかになった。この分子は 80kDa であることから HaVC80 と名付けた。HrVC70 は 12 個の EGF 様反復配列により構成されるのに対して、HaVC80 は 13 回の EGF 様反復配列により構成される。これは、HrVC70 の 8 番目の EGF 様配列が、HaVC80 においては 8 番目と 9 番目の位置に重複しているためであることが示された。ゲノム DNA の配列も決定しており、EGF-8 に対応するエキソンとその 5' 端に位置するイントロンが一緒に遺伝子重複していることが示唆された。アカボヤ卵を酸処理すると HaVC80 が遊離し、自己精子との受精が可能となるが、それだけでなくマボヤ精子との受精も可能になる。これは、VC70/80 が個体認識に関与するのみならず、種認識にも関わる可能性を示唆しており興味深い。VC70/80 のような精子レセプターの構造変化は、種分化を引き起こす鍵となりうる可能性がある。今後は、この種認識と種分化の観点から VC70 の研究を行うことも重要な課題である。

研究発表

紙上発表

1. N. Sakai, H. Sawada, and H. Yokosawa; Extracellular ubiquitin system

implicated in fertilization of the ascidian, *Halocynthia roretzi*: isolation and characterization. *Dev Biol.* **264**, 299-307 (2003).

2. H. Sawada, E. Tanaka, S. Ban, C. Yamasaki, J. Fujino, K. Ooura, Y. Abe, K. Matsumoto, and H. Yokosawa; Self/nonself recognition in ascidian fertilization: vitelline coat protein HrVC70 is a candidate allorecognition molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15615-15620 (2004).

口頭発表 (国際会議)

1. H. Sawada; Degradation of Sperm Receptor on the Vitelline Coat by Sperm-derived Extracellular Ubiquitin-Proteasome System during Fertilization of the Ascidian, *Halocynthia roretzi*. The 3rd General Meeting of the International Proteolysis Society (Nagoya, 2003).
2. H. Sawada, K. Ooura, S. Ban, K. Kobayashi, E. Tanaka, C. Yamasaki, Y. Abe, and H. Yokosawa (2003). Allogeneic recognition mechanisms in ascidian fertilization. Marine Biotechnology Conference 2003 (Chiba, 2003).
3. H. Sawada, S. Ban, Y. Harada, and H. Yokosawa; Self/nonself-recognizable sperm receptor on the vitelline coat is degraded by the sperm ubiquitin-proteasome system during ascidian fertilization. The 4th International Symposium on the Molecular and Cell Biology of Egg- and Embryo-Coats (Ise-Shima, 2004).
4. Y. Harada, K. Kobayashi, Y. Takagaki, and H. Sawada; Genetic studies on the mechanism of self-sterility in the ascidian, *Ciona intestinalis*. The 4th International Symposium on the Molecular and Cell Biology of Egg- and Embryo-Coats (Ise-Shima, 2004).
5. S. Ban, Y. Harada, H. Yokosawa, and H. Sawada; Cloning and structural analysis of polymorphic vitelline-coat protein HaVC80 from the ascidian, *Halocynthia aurantium*: Implication in self-sterility and speciation. The 4th International Symposium on the Molecular and Cell Biology of Egg- and Embryo-Coats (Ise-Shima, 2004).

口頭発表 (国内学会)

1. 澤田 均 ; 「原索動物の受精におけるライシン系の自己非自己識別機

- 構」、日本動物学会（函館、2003）
2. 小林和博、原田淑人、澤田均；「カタユレイボヤの自家不稔性の機構に関する遺伝学的解析」、日本動物学会（神戸、2004）
3. 坂 晋、原田淑人、横沢英良、澤田 均；「アカボヤ卵黄膜蛋白質 HaVC80 のゲノム解析および分子進化」、日本動物学会（神戸、2004）

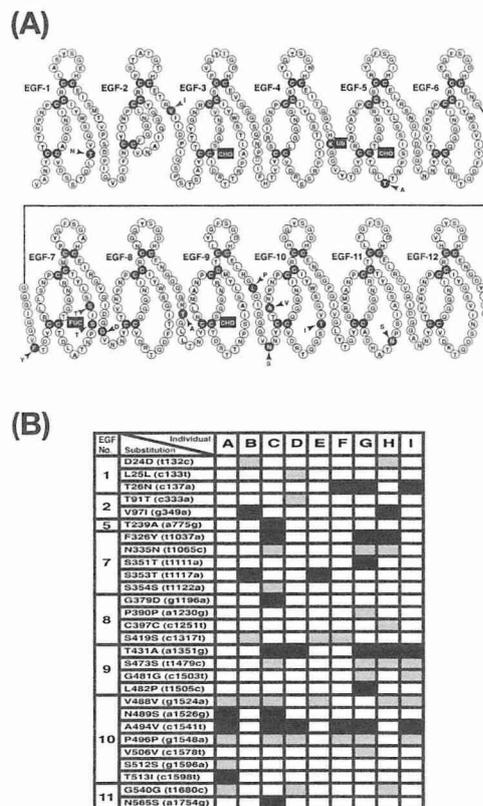


Fig. 1. Polymorphisms in HrVC70. (A) HrVC70 consists of 12 EGF-like repeats, and is highly polymorphic at the sites indicated by arrows and letters. Ub and CHO indicate the ubiquitination and glycosylation sites, respectively. (B) Summary of nucleotide- and amino-acid-replacements in HrVC70, which are observed in 9 individuals A-I. Black and gray boxes indicate synonymous and nonsynonymous substitutions, respectively.