

## 論文審査の結果の要旨

氏名 近藤 江里

本論文は受精時に観察される、卵による精子の誘引機構を扱った論文である。全体の構成は、General Introduction (イントロダクション)、2章からなる研究成果内容、Conclusion and Perspectives (結論) からなる。イントロダクションでは、精子の卵に対する走化性機構について概説し、その中で未だ不明である点、特に卵側における精子誘引能の調節機構の研究が進んでいなかった点について問題提起がなされている。研究成果内容は、第1章では卵形成から受精前後にかけての卵の精子誘引能の消長について、第2章では卵の精子誘引物質放出の分子機構について、それぞれ序論・研究手法・結果・考察が書かれている。結論では、これらの成果をふまえ、卵における精子誘引物質放出の調節機構について、総合的な考察がされている。

研究成果内容のうち第1章では、尾索動物のカタユレイボヤを実験材料に用いて、受精時の精子誘引活性の消長について詳細に調べられている。カタユレイボヤは、精子誘引物質として硫酸化ステロイドである SAAF が同定されており、精子走化性の研究が進む数少ない動物の一つであり、詳細な精子誘引物質の放出機構を明らかにするために最適な材料である。そして、卵からの精子誘引物質の放出が非常に限られた期間のみ行われることを初めて明らかにした。カタユレイボヤの卵成熟過程から受精後までの一連の SAAF の放出パターンを明らかにするため、未成熟な卵母細胞から、成熟後、放卵後、受精後までの各ステージにおいて、卵の SAAF 活性の測定および抗 SAAF 抗体を用いた SAAF 放出量の定量を行った。その結果、SAAF は卵成熟による卵核胞崩壊後に合成もしくは活性化され、さらに放出が開始すること、受精後には SAAF 放出が停止することが明らかとなった。また、卵は受精後に SAAF 活性を失わせるタンパク質性因子を放出し、卵の精子誘引活性を積極的に消失させていることも示唆された。

第2章は、精子誘引物質の輸送経路に関わる分子の解析について述べられている。これまでに精子誘引物質を卵内から放出する機構については全く知見がなかったため、まず、卵内の SAAF の合成や輸送に関わる候補分子の探索をプロテオミクスの手法を用いて行った結果、SAAF と特異的に結合するいくつかのタンパク質が同定され、そのうち分子シャペロンである VCP/p97 が最も顕著な

タンパク質として検出された。VCP/p97 は AAA (ATPases associated with various cellular activities) ファミリータンパク質で、膜融合、アポトーシス、小胞体関連分解や物質の輸送に関わるなど、多様な機能を持つことが知られていることから、カタユレイボヤの卵内においても VCP/p97 が SAAF の輸送に関わる可能性があると考え、実際に SAAF と相互作用するかどうかをプルダウンアッセイにより調べたところ、確かに SAAF と VCP/p97 とは結合することが示された。さらに、VCP/p97 の卵内での局在を解析したところ、VCP/p97 は未受精卵および受精卵内では細胞質中の小胞体周辺および卵膜直下に局在していた。加えて、卵成熟過程において VCP/p97 の局在が変化することが明らかとなった。VCP/p97 の局在が細胞質中および卵膜直下へ変化する時期は、卵成熟に伴う SAAF の放出開始する時期と同時期であることから、二つの物質の関連が予想された。更に、SAAF を放出する膜タンパク質として、いくつかのトランスポーターの阻害実験により、ABC トランスポーターが SAAF 放出に関与することが示唆された。

このように本研究により、動物において初めて卵による卵成熟過程から受精後までの一連の精子誘引物質の放出パターンを明らかとし、受精可能時期のみ精子誘引物質が放出されているという、より効率的な精子誘引機構の仕組みが示された。さらに、方ユレイボヤにおいては卵内にシャペロン分子 VCP/p97 が存在し、精子誘引物質 SAAF の輸送に働いていることが示唆された。先にも述べたように受精時における卵の精子誘引調節機構の研究はこれまで皆無だったと言って良く、全く未知の領域を切り開く本論文は発生生物学研究、特に受精に関する研究分野の新規領域の礎となる研究内容であり、貢献度は大であると言える。

なお、本論文の一部は、指導教員の吉田学、および筑波大学・稲葉一男、筑波大学・紺野在、大阪大学・大石徹、大阪大学・村田道雄との共著論文として印刷公表されたが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

以上のことから、博士(理学)の学位を授与出来ると認める。