

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03672

研究課題名(和文)精子と卵の細胞間相互認識：アロとゼノの分子識別機構に関する研究

研究課題名(英文) Intercellular recognition between sperm and eggs: Studies on the allogeneic and xenogeneic molecular recognition

研究代表者

澤田 均 (Sawada, Hitoshi)

金城学院大学・生活環境学部・教授

研究者番号：60158946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ホヤ類は雌雄同体であるが、カタユウレイボヤやマボヤでは、同種異個体認識(アロ認識)が行われ、自家受精はおこらない。カタユウレイボヤでは、精子のs-Themisと卵黄膜のv-Themisがアロ認識で中心的役割を果たすことは報告しているが、今回、s/v-Themis-A, -B, -B2の3遺伝子ペアが機能することを明らかにした。また、精子が自己卵の卵黄膜に結合するとCa濃度が上昇するが、低Ca海水を用いてCa上昇を抑制すると自家不和合性が解除されることも見出した。一方、マボヤでは低Ca海水では自家不和合性は解除されないことから、種によって機構が異なることも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホヤの自家不稔性機構は動植物共通の生殖原理に基づくと考えられる。また、カタユウレイボヤで発見された精子s-Themisは、哺乳類精子のPKDREJと相同な分子で、多型がみられる。従って、配偶子間相互作用において同系統個体と認識されて受精が阻害され不妊になる可能性も考えられる。ホヤの受精研究から、ヒトの不妊診断・治療の研究に発展する可能性も考えられ、社会的にも臨床医学的にも意義深い研究である。

研究成果の概要(英文)：Ascidians are hermaphrodites, which release sperm and eggs nearly simultaneously, but self-fertilization is prohibited in *Ciona intestinalis* and *Halocynthia roretzi*. In *C. intestinalis*, we reported that two gene pairs, s-Themis-A and v-Themis-A in locus A, and s-Themis-B and v-Themis-B in locus B, play a pivotal role in self-sterility. Here, we identified one additional gene pair s/v-Themis-B2 in locus B involved in this system. Therefore, three multi-allelic gene pairs, s/v-Themis-A, -B, and B2, are responsible for self-sterility in *C. intestinalis*. We previously showed that the increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> takes place after sperm recognizes the vitelline coat of the egg as self-egg, resulting in the detachment from the vitelline coat. Here, we revealed low Ca<sup>2+</sup> seawater enables self-fertilization, probably because of inhibition of Ca<sup>2+</sup>. However, these phenomena were never observed in *H. roretzi*, suggesting that the mechanism of self-sterility appears to be different.

研究分野：細胞生物学

キーワード：受精 自家不和合性 細胞間相互作用 ホヤ 精子 卵

1. 研究開始当初の背景

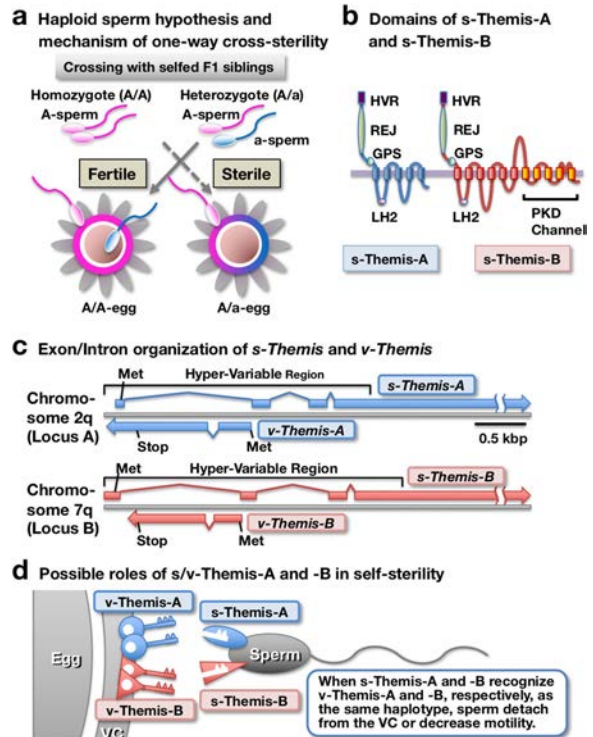
精子と卵の細胞間相互認識には、種認識（ゼノ認識）と同種異個体認識（アロ認識）の2つの現象が関わっている。海産脊索動物のホヤは雌雄同体で、精子と卵をほぼ同時に海水中に放出するが、多くの種で、自己と非自己の細胞認識（アロ認識）機構が働き、自家受精を回避している。この性質を自家不和合性（Self-incompatibility: SI）という。獲得免疫系を持たないホヤが自己と非自己の細胞を識別する機構はほとんど解明されていない。我々は、カタユレイボヤを用いた遺伝解析とプロテオーム解析から、第2染色体の locus A に存在する遺伝子ペア（卵黄膜タンパク質 *v-Themis-A* と精子タンパク質 *s-Themis-A* をコードする遺伝子ペア）と第7染色体の locus B に存在する遺伝子ペア（*v-Themis-B* と *s-Themis-B*）が近接して存在し、その配列がアレル間で多型にとみ、自己アレルに特異的に結合することにより SI を発揮するのではないかと、というモデルを提唱している（文献1）。一方で、locus B には2つの *s/v-Themis-B* ペアが存在する可能性があり、そのどちらか、または両方が SI に関与するのとも明確ではなかった。さらに、精子が自己卵の卵黄膜に結合すると細胞内カルシウムの濃度上昇がおこり、それがシグナルとなって卵黄膜から離脱することも報告したが（文献2）、カルシウム濃度上昇が自家不和合性に不可欠であるかは明確ではない。そこで本研究では、主にカタユレイボヤを用い、自家不和合性に関わる *s/v-Themis* アレルペアを明確に示すとともに、主にアロ認識の視点から、配偶子間における分子識別機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

カタユレイボヤは自家不和合種であるが、自然交配では他家受精で不和合という組み合わせはほとんど見られない。それに対して、卵を酸処理して自家受精させた子供の配偶子同士では、自己と認識して受精できない組み合わせが生じる。このことから、Morgan は、ホヤの SI は遺伝的に制御されていると結論付けている。また、一方向性不稔という現象も見つけており、その解釈として次の仮説を提唱している（図1a）。すなわち、SI に関わる精子側と卵側の遺伝子が近接し、受精時に自己のアレルペアを認識して自家受精を回避していること、さらに精子因子は一倍体発現で、卵因子は二倍体発現すると仮定すると、ヘテロ接合体の「雄（精子提供個体）」は A-精子と a-精子を放出し、ホモ接合体の「雌（卵提供個体）」は、A/A または a/a の精子受容体を卵黄膜に発現しているため、ヘテロ接合体の精子のいずれか一方はホモ接合体の卵を非自己と認識して受精できると考えられる。一方、ホモ接合体の精子は A-精子または a-精子のいずれかとなり、ヘテロ接合体（A/a）の卵では A-精子と a-精子の受容体の両者を卵黄膜に発現しているため、いずれの精子も受精不可能となる（図1a）。

従って、もし一方向性不稔現象が観察されれば、その精子提供個体はホモ接合体で、卵提供個体はヘテロ接合体であることがわかる。これを指標として、目的遺伝子座をポジショナルクローニングにより絞り込み、locus A を同定した。さらに卵黄膜で発現しているタンパク質の網羅的解析と精巣で発現している多型遺伝子を探ることで、第2染色体の locus A に存在する *s(sperm)-Themis-A* と *v(vitelline coat)-Themis-A* のペアと、第7染色体の locus B に存在する *s-Themis-B* と *v-Themis-B* の遺伝子ペアが SI に関わることを見出した（文献1: 図1a）。A, B の遺伝子座で *v-Themis* は *s-Themis* 遺伝子の第1イントロンに逆向きにコードされており、強い連鎖関係にある（図1c）。

また *s-Themis* の N 末端付近には超可変領域（HVR）が存在し、*v-Themis* は全長に亘って多型に富むことから、これらの領域が自己認識に関わると考えられる（図1b,c,d）。しかし、locus B には *s/v-Themis-B* に相同な別の *s/v-Themis-B* 様遺伝子ペアが存在する可能性がある（文献1）。



【図1】カタユレイボヤの自家不和合性に関わる *s/v-Themis-A* と *s/v-Themis-B* の遺伝子とタンパク質のドメイン構造、さらに機能に関する作業仮説。(a) ハプロタイププロイド精子仮説と一方向性不稔、(b) *s-Themis-A* と *s-Themis-B* の模式図、(c) *s/v-Themis-A* と *s/v-Themis-B* の遺伝子の模式図、(d) *s/v-Themis-A*, -B が自家不和合性に関わるモデル。

従って、この第3の遺伝子ペア (*s/v-Themis-B2*) の存否と自家不和合性への関わりについて、今回詳細に解析した (文献3)。

一方、自己卵由来の卵黄膜に精子を加えると、精子内に  $Ca^{2+}$  が流入して運動性が亢進し、精子が卵黄膜から離脱して、受精が回避されることを報告しているが、海水中の  $Ca^{2+}$  濃度を低下させると  $Ca^{2+}$  流入が起こらなくなることを報告している (文献2)。しかし、この条件で自家不和合性が解除されるか否かは明らかになっていないので、その点も解析した。

さらに、*s-Themis* と *v-Themis* とのアレル特異的相互作用を解析する目的で、そのリコンビナントの発現条件の検討を広範に行った。

### 3. 研究の方法

(1) *s/v-Themis-B2* 遺伝子の存在証明: *s/v-Themis-B* の遺伝子の近くに新規 *s/v-Themis* 様遺伝子が存在するか否かを確認する目的で、ゲノムDNAライブラリーから locus B を含む領域のDNA配列を決定した。また *s/v-Themis-B2* のDNA配列決定、*s/v-Themis-B2* の複数のアレルのゲノムDNA配列とcDNA配列を決定した。さらに、*v-Themis-B2* のタンパク質の発現解析に関しては、卵黄膜のLC/MS/MS解析により行った。

(2) *s/v-Themis-A, -B, -B2* の3遺伝子ペアの自家不和合性への関与の解析: A, B, B2の3つの遺伝子ペア (ハプロタイプ) が自家不和合性に関与しているか否かを検討するために、酸性海水処理で自家受精させたF1とF2を用いて交配実験を行った。アレルに関しては、入水口を部分切除してRNAを調製しRT-PCR法でアレル確認をした。次に、*s/v-Themis-A, -B, -B2* の遺伝子を、TALENによるゲノム編集技術を用いて破壊し、自家不和合性が消失するか否かを検討した。

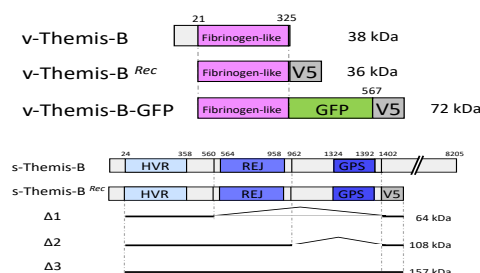
(3) *s/v-Themis-B/B2* のリコンビナントの発現と昆虫細胞での発現解析: カタウレイボヤの卵巣と精巣から個体ごとにRNAを抽出し、*v-Themis-B* と *s-Themis-B* のcDNAクローニングを行った。アレルは082、JGIの2つを用いた。*v-Themis-B* に関してはN末側のシグナル配列を除いた全長とC末側にGFP tagを付けたもの (*v-Themis-B-GFP*)、また *s-Themis-B* に関してはシグナル配列の直後からHVRの後まで ( $\Delta 1$ )、REJドメインの後まで ( $\Delta 2$ )、細胞外領域まで ( $\Delta 3$ ) という3種類のコンストラクトを作製した (図2参照)。各コンストラクトのN末端には分泌シグナルBiPを、C末側にはV5 tagを付加した。これらをショウジョウバエ由来の培養細胞S2細胞に遺伝子導入し、タンパク質を発現させた。その後、培養上清を回収し、抗V5抗体を用いたウェスタンブロット解析により発現と相互作用解析を行った。また、*s/v-Themis-B2* についても同様のコンストラクトを作製し、哺乳類細胞 (HEK293) での発現条件の検討を行った。用いたアレルはMI001, MI002, MG001の3アレルで、cDNAクローニングと配列解析も行った。

(4) 低 $Ca^{2+}$  海水での自家不和合性実験:  $Ca^{2+}$  を含まない人工海水と通常的人工海水をいくつかの比率で混合することで低 $Ca^{2+}$  人工海水を調製し、自家受精率を卵割の有無を指標として解析した。

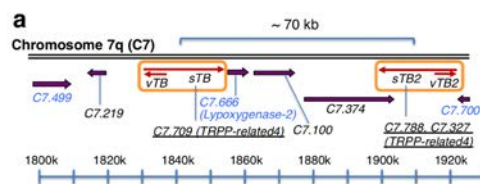
### 4. 研究成果

(1) *s/v-Themis-B2* 遺伝子の存在証明: まず *s/v-Themis-B* 領域のDNA配列を決定し、JGI database と Ghost database を比較したところ、JGIの配列とは合致したが、Ghost database と合致しないことが判明した。Ghost database では、*s/v-Themis-B* 遺伝子内に不完全長の *s/v-Themis-B* 遺伝子が挿入した配列であった。当初、Ghost database の配列が間違いではないかと考えていたが、その後、複数のアレルのDNA配列を決定したところ、JGI型の配列とGhost型の配列の2パターンが存在することが判明した。これは、PCRによる *s/v-Themis-B* のアレル解析を行う際に注意する必要があることを示唆している。

次に、*s-Themis-B* から70kb離れた領域の配列を決定したところ、*s/v-Themis-B* に類似した遺伝子ペア (*s/v-Themis-B2* と命名) が存在することが判明した (図3)。そのアレルとして、MI001 (新規名称B2-1), MI002 (B2-3), MG001 (B2-4) を取り上げ、cDNA配列の決定を行った。その結果、B2-3のアレルには終止コドンが複数発見され、偽遺伝子であることが示された。後述する交配実験で、*s/v-Themis-B2* がSIに関わらないアレルが3例発見されたが、そのうちの2例は、このB2-3アレルであることがわかり、SIに機能しないと考えると矛盾しない結果である。卵黄膜のプロテオーム解析を行ったところ、*v-Themis-A, -B, -B2* の複数のアレルの翻訳産物が卵黄膜上に



【図2】 *s-Themis-B* と *v-Themis-B* のリコンビナントの模式図



【図3】 *s/v-Themis-B* と *s/v-Themis-B2* の遺伝子の位置関係。 *s/v-Themis-B* の遺伝子座から約70kb離れた位置に *s/v-Themis-B2* の遺伝子が存在する。

検出されたが、B2-3に関しては検出されず、cDNA配列で終止コドンが複数存在するという結果を支持した。

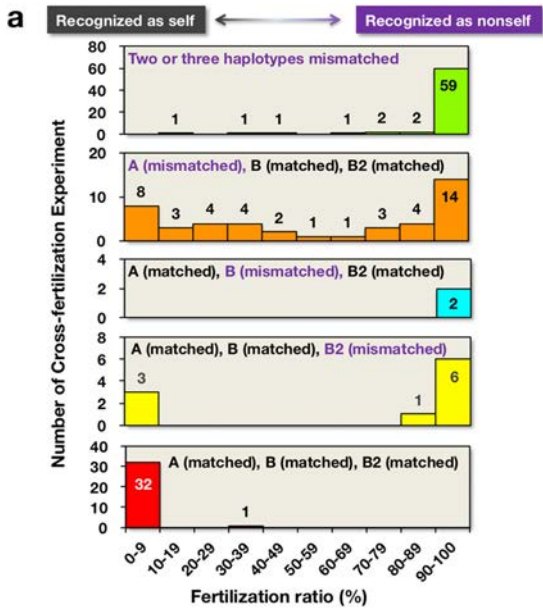
(2) *s/v-Themis-A, -B, -B2*の3遺伝子ペアの自家不和合性への関与：*s/v-Themis-A, B, B2*の3者がSIに関与するのか、あるいは一部なのかを知る目的で、交配実験を行った(図4)。その結果、A, B, B2の3つのハプロタイプ(遺伝子ペア)が合致(マッチング)すると、他家受精であっても受精しなくなるが示された(図4、赤)。また、一部の例外を除いて、A(橙)、B(青)、B2(黄)のいずれかのハプロタイプが合致しない場合には、非自己と認識されて受精することも判明した。Aに関しては、ハプロタイプが合致していても受精しない組み合わせや中程度の受精率の個体も見られた。おそらく、PKDチャンネルをC末端に有する*s-Themis-B*や*s-Themis-B2*の方が、SI認識に深く関わっていると考えられる。

ついで、逆遺伝学的手法で機能解析を検討した。*s/v-Themis-A*と*s/v-Themis-B/B2*の遺伝子をTALEN法によるゲノム編集技術により、遺伝子破壊を行い、自家受精率に影響を及ぼすかを解析した(図5)。その結果、*s-Themis-A*と*s-Themis-B/B2*のいずれにおいても、ゲノム編集した個体では、自家受精率が顕著に上昇することが判明した。*s/v-Themis-A*では自家受精に時間を要したが、*s/v-Themis-B/B2*では時間の遅れなく自家受精率が顕著に上昇した。これらの結果は*s/v-Themis-A*よりも*s/v-Themis-B/B2*がSIに深く関わることを示唆する結果と考えられる。

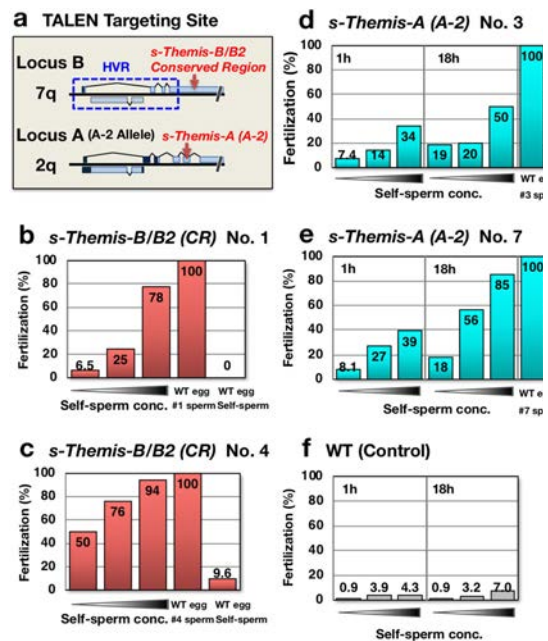
(3) *s/v-Themis-B/B2*のリコンビナントの発現と昆虫細胞での発現：*v-Themis-B-GFP*、また*s-Themis-B*に関しては $\Delta 1$ 、 $\Delta 2$ 、 $\Delta 3$ は、S2細胞で発現することは確認できたが、発現効率は極めて低く、また細胞外に分泌されるタンパク質はほとんど検出されなかった。*s-Themis*と*v-Themis*の共発現実験も検討したが、アレル特異的な相互作用は確認されなかった。発現効率が低い原因は不明であるが*s/v-Themis*の構造に原因がある可能性もある。

次に、*s/v-Themis-B2*を用いて、哺乳類細胞(HEK293)での発現条件の検討を行った。発現効率の向上を目指して、MBPタグを付加した。また、コドン適正化も検討したが、発現効率に有意な差が見られないか、逆に発現効率が低下する場合も見られた。今後はさらに発現・分泌条件の検討を行う必要がある。

(4) 低Ca<sup>2+</sup>海水の自家不和合性(アロ認識)に及ぼす影響：カタユレイボヤでは精子が自己卵の卵黄膜に結合するとカルシウムが流入し、卵黄膜から離脱して自家受精を防いでいる。今回、海水中のカルシウム濃度を低下させる実験を行ったところ、自家受精が可能になることが新たにわかった。またこの現象はマボヤでは見られないことから、両ホヤでアロ認識機構が異なることが明確となった。



【図4】自家受精によるF1とF2の間の交配実験。*s/v-Themis-A, B, B2*の遺伝子が同一のハプロタイプ(遺伝子ペア)か否かと受精率の関係調べた。3者のハプロタイプが一致した場合では例外なく自己と認識され受精しなかった(赤)。また2または3つのハプロタイプが異なる場合はほぼ例外なく受精した(黄緑)。Aではハプロタイプが合致していなくても受精できる組み合わせや色々なパターンに分かれた(橙)。Bではハプロタイプが合致しないと非自己と認識され受精(青)。B2ではハプロタイプが合致しないと非自己と認識され受精するケースが多いが3例の例外がみられた(黄)



【図5】*s/v-Themis-A*と*s/v-Themis-B/B2*のゲノム編集 (a) *s/v-Themis-A*と*s/v-Themis-B/B2*のTALENによるゲノム編集部位、(b, c) *s/v-Themis-B/B2*をゲノム編集した胚を飼育し、成体から得られた精子と卵で受精実験を行った。野生型では、自家受精しない濃度の精子で自家受精することが判明。(d, e) *s/v-Themis-A*をゲノム編集した胚を飼育し、成体から得られた精子と卵で受精実験を行った。*s/v-Themis-B/B2*の場合より時間がかかるが、自家受精することがわかった。

<総括>

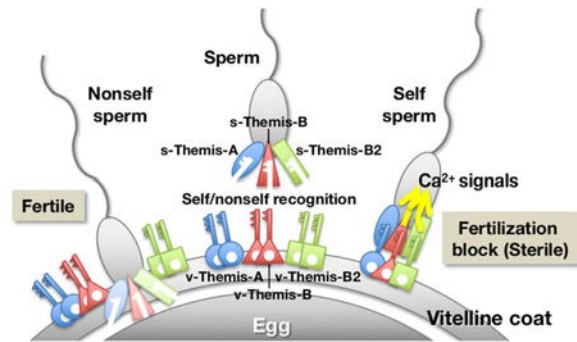
自家不和合種であるカタユレイボヤが自家受精を回避する機構（アロ認識機構）について、今までは仮説であったのが、本研究により、その関わりがより明確になった。精子には、*s-Themis-A*, *s-Themis-B*, *s-Themis-B2*が一倍体発現しており、卵黄膜では、*v-Themis-A*, *v-Themis-B*, *v-Themis-B2*が二倍体発現している。その模式図を（図6）に示した。*s-Themis-A*, *s-Themis-B*, *s-Themis-B2*はそれぞれ、2つずつ発現している*v-Themis-A*, *v-Themis-B*, *v-Themis-B2*のアレルのうちの少なくとも一方と合致すると、自己卵と認識し、おそらく*s-Themis-B/B2*のC末端にあるPKDチャンネルを介して $Ca^{2+}$ が流入し、精子が卵黄膜を離脱することで自家受精を回避しているものと思われる。カタユレイボヤの自家不和合性の研究は、主に配偶子間相互作用に関わる分子の探索というアプローチで研究が進められてきた。しかし、本研究では、遺伝学的解析、ポジショナルクローニング、プロテオーム解析という別角度からの解析により、その実体が解明されつつある。

しかし、配偶子間相互作用におけるアロ認識機構を裏付けるタンパク質間相互作用に関する知見は未だに得られていない。精子における*s-Themis*の存在すら、プロテオーム解析で見つかっていないのが実情である。タンパク質発現効率が低い可能性や、SDS-サンプルバッファー処理後の加熱処理で不溶化する可能性などが考えられる。また、リコンビナントの発現効率が低い理由としては、タンパク質としての毒性がある可能性や、細胞外輸送に関する機構がホヤと昆虫や哺乳類で異なる可能性などが考えられる。今後に残された大きな課題であろう。

*s-Themis*は哺乳類精子のPKDREJタンパク質と相同性がある。マウスで*PKDREJ*遺伝子をノックアウトしても不稔にはならない。しかし、受精の遅延があると報告されている。また、哺乳類の*PKDREJ*においても多型があるという報告もある。その意味では、哺乳類においても、未知のアロ認識機構があり、遺伝子的に近縁な男女では妊娠しにくいということがあるのかもしれない。ホヤの受精研究が、哺乳類を含めた受精機構の共通原理の解明や、不妊症の診断治療の研究に結びついていくことを期待してやまない。

<引用文献> (\*は責任著者)

- 1) Harada, Y., Takagaki, Y., Sunagawa, M., Saito, T., Yamada, L., Taniguchi, H., and Shoguchi, E., and \*Sawada, H. (2008). Mechanism of self-sterility in a hermaphroditic chordate. *Science* 320, 548-550.
- 2) Saito, T., Shiba, T., Inaba, K., \*Yamada, L., and \*Sawada, H. (2012). Self-incompatibility response induced by calcium increase in sperm of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(11), 4158-4162.
- 3) \*Sawada, H., Yamamoto, K., Yamaguchi, A., Yamada, L., Higuchi, A., Nukaya, H., Fukuoka, M., Sakuma, T., Yamamoto, Sasakura, Y., Shirae-Kurabayashi, M. (2020). Three multi-allelic gene pairs are responsible for self-sterility in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Sci. Rep.* 10(1):251.



【図6】 *s/v-Themis-B*, *s/v-Themis-B*, *s/v-Themis-B2*が自家不和合性に関与する作業仮説 A, B, B2の3者において、*v-Themis*の少なくとも一方が *s-Themis*と相互作用し、同一ハプロタイプ（アレルペア）であると認識されると、*s-Themis-B/B2*のC末端のPKDチャンネルから $Ca^{2+}$ が流入し、卵黄膜から離脱して受精が阻害されるというモデル。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Sawada, H., Yamamoto, K., Yamaguchi, A., Yamada, L., Higuchi, A., Nukaya, H., Fukuoka, M., Sakuma, T., Yamamoto, Sasakura, Y., Shirae-Kurabayashi, M.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Three multi-allelic gene pairs are responsible for self-sterility in the ascidian <i>Ciona intestinalis</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-59147-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakazawa, S., Shirae-Kurabayashi, M., Sawada, H.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 The role of metalloproteases in fertilisation in the ascidian <i>Ciona robusta</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1009
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-37721-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakazawa, S., Shirae-Kurabayashi, M., and Sawada, H.	4. 巻 85(6)
2. 論文標題 Peanut agglutinin specifically binds to a sperm region between the nucleus and mitochondria in tunicates and sea urchin.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 464-477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mrd.22982	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sawada, H., Shirae-Kurabayashi M., Takaharu Numakunai	4. 巻 84
2. 論文標題 Spawning of the ascidian <i>Halocynthia roretzi</i> .	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mrd.22776.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 澤田 均
2. 発表標題 ホヤの自家不和合機構と精子プロテアーゼの役割
3. 学会等名 第5回ホヤ研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤田 均
2. 発表標題 ホヤの受精研究から学んだこと
3. 学会等名 第7回生殖若手の会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sawada, H.
2. 発表標題 Ascidian gamete self/nonself-recognition proteins (s-Themis and v-Themis) during fertilization of a hermaphroditic marine chordate <i>Ciona intestinalis</i>
3. 学会等名 Gordon Research Conferences "Fertilization and Activation of Development"（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田 均
2. 発表標題 雌雄同体のホヤが自家受精しないしくみと精子の卵膜通過について
3. 学会等名 第90回日本動物学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部 郁也, 橋下 志津弥, 磯和 幸延, 白江-倉林 麻貴, 荒木 聡彦, 澤田 均
2. 発表標題 ホヤ精子アスタシン様金属 プロテアーゼの性質と受精 における役割
3. 学会等名 第90回日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 糠谷 晴彦, 白江-倉林 麻貴, 澤田 均
2. 発表標題 カタコウレイボヤの自家不 和合性に関わるs/v-Themis- B2 アレルのcDNA cloning と発現解析
3. 学会等名 第90回日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本 志津弥, 澤田 均
2. 発表標題 カタコウレイボヤの自家不 和合性は低Ca <sup>2+</sup> 海水により解除される
3. 学会等名 第90回日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田 均
2. 発表標題 ホヤの受精機構: 自家不和合性とライシンについて
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 成山 奏子、白江-倉林 麻貴、澤田 均
2. 発表標題 昆虫細胞を用いたカタユレイボヤs-Themis, v-Themisタンパク質の相互作用解析
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 成山 奏子、西尾 俊亮、白江-倉林 麻貴、松田 幹、澤田 均
2. 発表標題 昆虫細胞を用いたカタユレイボヤs-Themis、v-Themisタンパク質の相互作用についての研究
3. 学会等名 日本動物学会中部支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 成山 奏子、白江-倉林 麻貴、中澤 志織、澤田 均
2. 発表標題 TALENを用いたカタユレイボヤにおける精子タンパク質Urabinの機能解析
3. 学会等名 第88回日本動物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakazawa, S., Shirae-Kurabayashi, M., Sawada, H.
2. 発表標題 Roles of ascidian sperm metalloproteases in fertilization of a marine invertebrate <i>Ciona robusta</i>
3. 学会等名 Gordon Research Conference: Fertilization & Activation of Development (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sawada, H., Inoue, S., Otsuka, K., Shirae-Kurabayashi
2. 発表標題 cDNA cloning and expression of two ubiquitin-activating enzymes UBA1 and UBA6 in gametes of the ascidian <i>Halocynthia rotezi</i>
3. 学会等名 Gordon Research Conference: Fertilization & Activation of Development (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 Inaba, K., Sawada, H. Yoshida, M., Shiba, K., Shirae-Kurabayashi, M.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 367
3. 書名 Japanese marine Life; A Practical Training Guide in Marine Biology (Eds. Inaba, K., Hall-Spencer, J. M.) (Chapter 9: Gametes and Fertilization.)	

1. 著者名 Sawada, H., Shirae-Kurabayashi, M.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 379
3. 書名 Reproduction in Aquacutic animals: From Basic Biology to Acquaculture Technology (Eds. Yoshida, M., Asturiano J. F.) (Chapter 9: Self- and nonself-recognition of gametes in ascidians.)	

1. 著者名 Sawada H., Nakazawa, S., Shirai-Kurabayashi, M.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 789
3. 書名 Reproductive and Developmental Strategies: The Continuity of Life (Y. Iwao, S. Kobayashi eds.) (Chapter 23: Ascidian sexual reproductive strategies: Mechanisms of sperm-egg interaction and self-sterility.)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------