

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390019

研究課題名（和文）

精子ユビキチン-プロテアソーム系の構造特性と生殖における役割

研究課題名（英文）Structures and functions of the sperm ubiquitin-proteasome system involved in fertilization and reproduction.

研究代表者

澤田 均 (SAWADA HITOSHI)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：60158946

研究成果の概要（和文）：我々は、ホヤの受精時に、精子ユビキチン-プロテアソーム系（UPS）が卵外被に精子通過口をあけるライシンとして細胞外で機能することを報告している。今回、その細胞外で機能する UPS の分子の実体や細胞外輸送機構を検討した。まず、ホヤ精巣特異的に発現するユビキチン結合酵素(E2)を探索し、その同定に成功した。また、精子プロテアソームを精製し構造特性を解析した結果、ホヤでは精子プロテアソームの $\alpha 6$ サブユニットのC末端16残基がプロセッシングされていることを見出した。このC末端プロセッシングは報告例がなく、新知見である。これが細胞外輸送シグナルになっているか否かを現在解析している。

研究成果の概要（英文）：We previously reported that the ubiquitin-proteasome system (UPS) plays a key extracellular role in fertilization, as an egg-coat lysin, which allows sperm to penetrate through the egg-coat in the ascidians *H. roretzi* and *C. intestinalis*. However, the structural features and the sorting mechanism of the sperm UPS are not known. Here, we investigated the sperm-specific UPS using these ascidians. We found that a certain ubiquitin-conjugating enzyme (Ube2r) is specifically expressed in the testis of *C. intestinalis* and that the C-terminal 16 residues of the $\alpha 6$ /PSMA1 subunit of the sperm 20S proteasome are specifically processed in *H. roretzi*. These findings enabled us to further investigate the possible involvement of the C-terminal processing of the proteasome in the sorting of the proteasome to an acrosome or outer surface of sperm head regions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

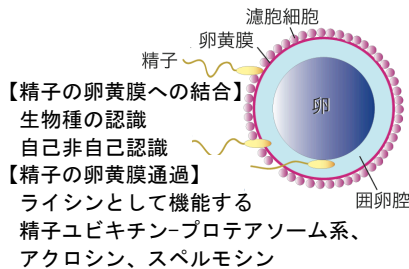
キーワード：受精、ユビキチン、プロテアソーム、精子、卵、ホヤ

1. 研究開始当初の背景

ユビキチン-プロテアソーム系（UPS）は、細胞内タンパク質分解系において最も重要な分解システムの一つであるが、細胞外での役割はほとんど知られていない。

我々は、受精過程のなかでも特に精子が卵外被を通過する際に、精子由来の酵素が卵外被タンパク質（精子受容体：HrVC70）を細胞外でユビキチン化すること、またそれを精子細胞膜結合型プロテアソームが分解するこ

とを、原索動物マボヤを用いて明らかにしてきた (図 1 参照)。最近哺乳類においても同様の現象が存在することが Sutovsky らによって報告されている。本研究では、従来細胞内でしか機能しないと考えられてきた UPS の概念を打破し、新しい角度から受精に関与する細胞外 UPS の全容を解明することを目的としている。



【図 1】マボヤの受精の模式図

2. 研究の目的

(1) ユビキチン化酵素系：本研究における第 1 の目的は、受精・生殖において細胞外で機能する新しいユビキチン化酵素を探索し、その特性を解明することである。そして第 2 の目的は、その受精や配偶子形成における役割を明らかにすることである。
(2) プロテアソーム系：精子プロテアソームを細胞外あるいは先体胞に輸送するシステムを探索し、それを同定することを目的としている。その解析の第一歩として、精子特異的サブユニットが存在するか否か、あるいはプロテアソームにおける精子・精巣特異的プロセッシングの有無を解析する。そしてそれが、先体胞や細胞膜表面に輸送する特殊なシステムとどのように関わるかについて解析する。

3. 研究の方法

(1) ユビキチン化酵素系：ゲノム概要配列が公開されているカタユウレイボヤを用い、精巣で特異的に発現しているユビキチン結合酵素 E2 を、精巣の EST データベースから探索し、それが真に精巣特異的に発現しているか否か、またその機能について解析を行なった。
(2) プロテアソーム系：精子とそれ以外の細胞・組織のプロテアソームによってサブユニット構造に相違があるか否かを解析した。まず、カタユウレイボヤを用いて、20S プロテアソームサブユニットのパラログ遺伝子の探索を行った。次いで、精製酵素のサブユニット構成を比較するために、マボヤの精子、卵、筋肉から 20S プロテアソームを精製し、

そのサブユニットを 2 次元電気泳動により解析した。また LC/MS/MS によりサブユニット同定を行い、そのプロセッシングサイトの同定も行った。

4. 研究成果

(1) ユビキチン化酵素系：ゲノム概要配列と EST のデータベースが活用可能なカタユウレイボヤを用いて、精巣特異的に発現している E2 の探索を行った。その結果、精巣で強発現している E2 は 8 種類存在したが、その中で精巣特異的に発現しているものを 1 種類 (Ci0100152677) 同定した。

この遺伝子モデルが実際に遺伝子発現しているか否かを確認するために、cDNA クローニングを行い、ノーザンブロット解析を行ったところ、精巣特異的に発現していることが確認された。また精巣内の精巣濾胞の内部で発現していることが *in situ hybridization* により確認され、精子形成の後期段階で発現していることが示唆された。この酵素は Ube2r に分類されるユビキチン結合酵素 E2 であり、実際にユビキチンとチオエステル結合を形成することも確認した。今後は、この精巣特異的 E2 がホヤの受精や精子形成にどのように関わるかを明らかにすることが課題である。

(2) プロテアソーム系：マボヤの精子、卵、筋肉の抽出液を出発物質として、Q-セファロース、ハイドロキシアパタイト、セファロース CL-4B を用いたクロマトグラフィーにより精製し、純度の高い精製 20S プロテアソーム標品を得た。これらの標品を用いて等電点電気泳動と SDS 電気泳動による 2 次元電気泳動を行ったところ、高分子量サブユニットが臓器によって異なることが示された。このサブユニットを同定するために、カタユウレイボヤのデータベースを用いて LC/MS/MS 分析により解析を行なった所、これはプロテアソームの $\alpha 6$ /PSMA1 サブユニットであることが示唆された。そこで次に、このサブユニットの cDNA をマボヤから単離し、構造を決定した。この精子のサブユニットが、筋肉のサブユニットより分子量が低いことから、プロセッシングされている可能性を考えた。そこで、トリプシン消化物の中から Arg または Lys を C 末端に持たない断片の探索を行なった所、C 末端から 16 残基が精巣特異的に切断されていることが明らかとなった (図 2)。またこの切断部位近傍の配列は、カタユウレイボヤにおいても高度に保存されており、おそらく同様の箇所での切断が起こっていると予想される。プロテアソームの α サブユニットが細胞や組織特異的にプロセッシングされるという例は知られておらず、新知見である。今後は、今回明らかになった C 末端プロセシ

ングの生理的役割について解析することが課題である。

```
1 MFRNQYDNDV TVWSPQGRIH QIEYAMEAVK QGSATVGLKS 40
41 KTHAVLVALK RAQSDLTAAH KKLLRIAPHV AIGIAGLTAD 80
81 GRSLGNFMRK ECLHSDVFVE RRLPISRLVN SVGNKTAAPT 120
121 QRYGRRPVGV GILVAGYDDQ GPHIYQTCPS ANFYNCKAMA 200
161 IGSRSQSART YLERNCKKFL DCSVDELVNH GLLALRETL 160
201 SEQELISINC SVAIVGKAQD VVIYEDEKVE PFLTRIEETK 240
241 AAVAADVPMQ QDQEVGQGEL SGLVFPVSGQ PPQDKDDAQ 280
281 MDTDG
```

【図2】マボヤ精子プロテアソームの $\alpha 6$ サブユニットの切断部位。Gly-269とGln-270の間で切断されることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

- ① Takako Saito, Kogiku Shiba, Kazuo Inaba, Lixy Yamada, and Hitoshi Sawada. Self-incompatibility response induced by calcium increase in sperm of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 109, 4158-4162, 2012. 査読有. doi: 10.1073/pnas.1115086109
- ② Naoto Yokota, Yohei Kataoka, Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, and Hitoshi Sawada. Sperm-specific C-terminal processing of the proteasome PSMA1/ $\alpha 6$ subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410, 809-815, 2011. 査読有. doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.069
- ③ Akira Yamaguchi, Takako Saito, Lixy Yamada, Hisaaki Taniguchi, Yoshito Harada, and Hitoshi Sawada. Identification and localization of the sperm CRISP family protein CiUrafin involved in gamete interaction in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mol. Reprod. Dev.* 78, 488-497, 2011. 査読有. doi: 10.1002/mrd.21329
- ④ Naoto Yokota, Yoshito Harada, and Hitoshi Sawada. Identification of testis-specific ubiquitin-conjugating enzyme in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mol. Reprod. Dev.* 77, 640-647, 2010. 査読有. doi: 10.1002/mrd.21198
- ⑤ Mari Akasaka, Yoshito Harada, and Hitoshi Sawada. 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.* 329, 479-484, 2010. 査読有. doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.01.006
- ⑥ Lixy Yamada, Takako Saito, Hisaaki Taniguchi, Hitoshi Sawada, and Yoshiko Harada. Comprehensive egg coat proteome of the ascidian *Ciona intestinalis* reveals gamete recognition molecules involved in self-sterility. *J. Biol. Chem.* 284, 9402-9410, 2009. 査読有. doi: 10.1074/jbc.M809672200

[学会発表] (計56件)

- ① Hitoshi Sawada. Ubiquitin-proteasome system

involved in fertilization of ascidians and sea urchins. Mini-symposium: Post-translational protein modifications in gametes, embryos and the reproductive system. August 2, 2011, Oregon Convention Center, Portland, USA.

- ② Naoto Yokota. Variety of the 20S proteasome $\alpha 6$ subunit among tissues in the ascidian *Halocynthia roretzi*. International Symposium on Biodiversity Sciences 2010 "Genome, Evolution and Environment", 2010年8月1日、名古屋.
- ③ 横田直人、マボヤ20Sプロテアソームの $\alpha 6$ サブユニットは精子、卵、筋肉で異なっている. 日本生化学会、2009年10月21日、神戸

[図書] (計2件)

- ① Hitoshi Sawada, Takako Saito, Akira Yamaguchi, Yoshito Harada, and Lixy Yamada. Allorecognition mechanisms in ascidian fertilization: A reproduction strategy shared with flowering plants. In "Sperm Cell Research in the 21st Century: Historical Discoveries to New Horizons (Morisawa M., ed)", Adthree Publishing Co., 2012, in press.
- ② Hitoshi Sawada. Spermisin. In "Handbook of Proteolytic Enzyme Vol 3 (Neil D. Rawlings et al., eds.)", Elsevier, 2012, in press.

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/~SugashimamBL/index.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
澤田 均 (SAWADA HITOSHI)
研究者番号: 60158946
- (2) 研究分担者: なし
- (3) 連携研究者: なし