

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291024

研究課題名(和文)受精に関与する精子細胞外ユビキチン-プロテアソーム系に関する研究

研究課題名(英文)Studies on the sperm extracellular ubiquitin-proteasome system involved in fertilization

研究代表者

澤田 均 (Sawada, Hitoshi)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60158946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、マボヤ精子の卵黄膜通過時にユビキチン-プロテアソーム系がライシンとして細胞外で機能する可能性を報告した。今回、2つのユビキチン活性化酵素のcDNAクローニングを行った。両酵素のmRNAは、卵巣と精巣を含む各器官で発現していた。抗体を作製して免疫染色を行ったところ、卵の濾胞細胞と精子ミトコンドリアを被う細胞膜に局在することが示された。また、E1阻害剤は受精を阻害することも示された。一方、精子プロテアソームの免疫染色を行ったところ、精子ミトコンドリアを被う細胞膜表面にプロテアソームが局在することが示唆された。本抗体は受精を強く阻害することから、受精時に細胞外で機能することも示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that the extracellular ubiquitin-proteasome system may be involved in fertilization of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Here, we cloned two cDNAs of ubiquitin-activating enzymes (E1), HrUBA1 and HrUBA6 and showed that these mRNAs are expressed in most organs, including the ovary and testis. Immunocytochemistry using peptide antibodies revealed that these enzymes are localized on follicle cells of the eggs and on sperm head around a mitochondrion. E1 inhibitor PYR-41 inhibited fertilization, suggesting that gamete E1s may be involved in fertilization. We also studied on the sperm proteasome by using a peptide antibody against sperm proteasome. The results showed that the sperm proteasome is localized on the surface of sperm head over a mitochondrion. Since anti-proteasome antibodies inhibited fertilization, it was suggested that the sperm proteasome plays a key extracellular role in fertilization.

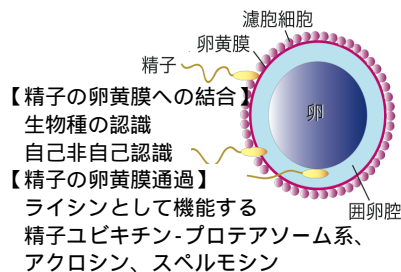
研究分野：生化学

キーワード：受精 ユビキチン プロテアソーム 精子 細胞外

1. 研究開始当初の背景

ユビキチンは酵母からヒトに至るまで高度に保存された 76 残基のアミノ酸からなるタンパク質で、多くの細胞内タンパク質の分解シグナルとなっている。また最近、細胞内タンパク質の機能改変や局在性を決定する翻訳後修飾分子としてユビキチン様タンパク質も注目されつつある。しかし、これらはいずれも細胞内でのタンパク質の修飾であり、細胞外でのユビキチン(あるいはユビキチン様タンパク質)修飾の研究はほとんど行われていない。

本申請者は、受精過程のなかでも特に精子が卵黄膜(卵保護層)を通過する際に、精子由来の酵素が卵黄膜タンパク質(精子レセプタータンパク質: HrVC70)を細胞外でユビキチン化すること(文献1) 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(文献2、図1参照)を、原索動物マボヤを用いて明らかにしてきた。その後、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た(文献3(総説))。また男性不妊患者のなかには精子細胞膜表面タンパク質に対する自己抗体を産生する例が報告され、その中には抗プロテアソーム抗体を産生する患者も報告されている。これらの背景から、受精や生殖に関する未知の細胞外ユビキチン-プロテアソーム系の全容解明が今強く望まれている。



【図1】マボヤの受精の模式図

2. 研究の目的

本研究課題では、従来細胞内でしか機能しないと考えられてきたユビキチン-プロテアソーム系の概念を打ち破り、全く新しい角度から受精に関する新しい細胞外ユビキチン-プロテアソーム系の全容を解明することを目的としている。材料としては、配偶子採取と受精実験が容易でゲノム概要配列が解読されつつある原索動物マボヤ、ゲノム構造がすでに解読されておりトランスジェニック動物の作出が可能なカタユレイボヤなどを、実験目的に応じて適宜使い分けて使用する。

本研究の第1の目的は、受精系において細胞外で機能する新しいユビキチン-プロテア

ソーム系の酵素分子を同定すること、さらに細胞外(先体胞内)への輸送システムを明らかにすることである。そして、第2の目的は、同定された酵素の受精における役割を明確にすることである。

ペルオキシソームでは、PTS(Peroxisome-targeting signal)の一つPTS1と呼ばれるC末端3残基の配列([SAGCN]-[RKH]-[LIVMAF])があると、プロテアソームのような巨大分子複合体であってもペルオキシソーム内に複合体のまま輸送させることが可能なが知られている。この現象がヒントとなり、acrosome-targeting signalのようなものが存在し、それによってプロテアソームやユビキチン化酵素複合体が輸送されているのではなか、と考えるに至った。

ユビキチン化酵素に関しては、まずユビキチン化における最初の反応を触媒するユビキチン活性化酵素E1に着目し、そのクローニングと機能解析を行う。

プロテアソームに関しては、少なくともマボヤにおいては、6サブユニットのC末端16残基が、精子特異のプロセシングで除去されることを見出している(文献4)。それが先体胞や細胞膜表面に輸送するシステムにどのように関わるかを解析する。この新しいC末端配列は、膜結合性プロテアソームの細胞膜へのアンカリングに関わる可能性もあるので、このC末端配列と相互作用する膜タンパク質を探索し、そこから新たな展開を図る。

3. 研究の方法

A型またはC型マボヤを東北大学浅虫海洋生物学教育研究センターで、10前後で飼育保存した。既報に従い、放精放卵を誘起し、精子と卵を調製して、受精阻害実験を行った。

2種類のユビキチン活性化酵素(UBA1, UBA6)の遺伝子モデルをANESEEDのゲノムデータベースから検索し、その配列をもとに、cDNAクローニングを行った。この両者に共通配列と特異的配列をもとにペプチド抗体を作製し、免疫染色を行った。

マボヤプロテアソームの6サブユニットのC末端15残基に対するペプチド抗体(C15)と精子プロテアソームのプロセシングで出現するC末端15残基に対するペプチド抗体(Csp15)を作製した。

免疫染色は、4%パラホルムアルデヒド固定した精子を洗浄後、ブロッキングしてから一次抗体を反応させ、Alexa Fluor 488 標識二次抗体を用いて行った。ミトコンドリアはMitoTrackerを用いて染色し、その位置を確認した。また、細胞膜の透過処理は、0.1% Triton X-100により行った。

免疫沈降はProtein A-Sepharoseを用いて既報に従って行い、沈降物をSDS-PAGE後、特異的バンドを切り出してトリプシン処理し、LC/MSで分析した。

4. 研究成果

(1) ユビキチン活性化酵素 E1 に関する研究: ユビキチン化反応の最初の反応を触媒するのがユビキチン活性化酵素 E1 である。これは最近まで 1 種類と考えられていたが、実際には 2 種類存在する。一方はユビキチンのみを活性化する UBA1 で、他方は、ユビキチンと FAT10 (=HLA-F Adjacent Transcript 10: ユビキチン様タンパク質) の両者を活性化する UBA6 である。FAT10 は 2 個ユビキチン(Ub) が結合したような構造をしており、単一分子修飾でプロテアソームによる分解シグナルとなる。

マボヤゲノムデータベース (ANESEED) を利用して、UBA1 と UBA6 の遺伝子モデルを探索し、その候補遺伝子を同定した。その配列をもとにプライマーを作製し、cDNA クローニングを行った。まず、両者の発現量について、q-PCR を行った。その結果、いずれの酵素遺伝子も精巣と卵巣で発現していることが確認されたが、特に卵巣で強く発現していることが示された。

次に、配列情報をもとにペプチド抗体を作製し、アフィニティ精製した抗体を用いて、免疫染色を行った。その結果、E1 抗体は卵の濾胞細胞に特異的に反応することが示された。また精子では頭部ミトコンドリアを被う細胞膜付近が免疫染色された。精子反応を行うと、精子ミトコンドリアが尾部を通過して離脱するが、その際に離脱したミトコンドリアにも E1 が存在することが示された。

次に受精における機能を調べる目的で、抗体による受精阻害実験を行ったが、検討した条件では強い阻害効果は検出されなかった。一方、E1 阻害剤である PYR-41 の受精に及ぼす影響を調べたところ、マボヤの受精を濃度依存的に阻害することが判明した。

以上の結果は、HrUBA1 または HrUBA6 または両者が精子ミトコンドリア近傍と卵濾胞細胞に局在し、受精時 (特に精子の卵黄膜通過時) に重要な役割を果たすことを示している。

(2) プロテアソームの局在性と受精における役割: マボヤでは、精子プロテアソーム特異的に、その 6 サブユニットの C 末端 16 残基がプロセシングされることを報告している。今回、本来の C 末端配列の 15 残基と、16 残基切断後に新たに生じる C 末端配列の 15 残基をハプテンとしてヘモシアニンに結合後、それを抗原としてウサギに免疫して、ペプチド抗体を作製した。前者を C15 抗体、後者を Csp15 と命名した。2 種類の抗体は、抗原ペプチドカラムでアフィニティ精製して使用した。

精製 C15 抗体はウエスタンブロット解析で、マボヤ精子抽出液中のプロテアソーム 6 サブユニットと反応しないことが示された。よって、プロセシングされているプロテアソ

ムとプロセシングされていないプロテアソームを区別して局在性変化を解析することは困難であることが示された。一方、Csp15 抗体は精製精子 20S プロテアソームの 32kDa タンパク質 (6) と特異的に反応するばかりでなく、精子粗抽出液に対しても同一分子量の位置に単一バンドを与えることが示された。この結果は、精子中には、6 の C 末がプロセシングされたプロテアソームのみが存在すること、また Csp15 抗体は精子中タンパク質のうちプロテアソームのみと反応することを示している。この Csp15 抗体を用いて免疫染色した結果、精子頭部ミトコンドリアを被う細胞膜が特異的に染色されることが示された。精子をカルシウムイオノフォアで処理すると、精子運動性が亢進し、頭部側面に存在する単一のミトコンドリアが軸系を伝って移動し尾部先端から離脱する。これを精子反応 (sperm reaction) と呼んでいる。この精子反応に伴ってミトコンドリアが離脱する際に、プロテアソームがミトコンドリアから遊離することが示唆された。

次に、受精におけるプロテアソームの役割を再検証する目的で、Csp15 抗体を用いて受精阻害効果を検討した。その結果、本抗体は濃度依存的に受精を強く阻害することが示された。このことは、精子頭部のミトコンドリアを被う細胞膜表面に存在プロテアソームが受精時に細胞外で重要な役割を果たすことを示している。おそらくライシンとしての働く精子プロテアソームの役割を阻害するものと思われる。

プロテアソームと相互作用する精子膜タンパク質を同定する目的で、免疫沈降実験を行った。その結果、精子抽出液中の HrUrabin や HrTTSP-1 が Csp15 抗体により免疫沈降されることが LC/MS 解析で明らかになった。また、精子膜画分においては、免疫沈降される 90kDa の特異的成分に 6 サブユニット断片が含まれることも示された。この結果は、プロテアソームが精子細胞膜上で HrUrabin や HrTTSP-1 と相互作用している可能性、さらに他成分と共有結合している可能性を示唆しており、非常に興味深い。今後の更なる解析が望まれる。

(3) プロテアソームアクティベーターの解析

最近、プロテアソームアクティベーターである PA200 と PA28 のダブルノックアウトマウスで、雄性不稔になることが報告された。そこでカタユレイボヤにおけるこれらのアクティベーターを探索し、同定することに成功した。現在ゲノム編集により PA200 遺伝子の破壊実験を行っており、今後その生殖における役割を検討する予定である。

<引用文献>

Sawada, H., et al. (2002). Extracellular ubiquitination and proteasome-mediated degradation of the ascidian sperm

receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (3), 1223-1228.

Sawada, H., et al. (2002). Localization and roles in fertilization of sperm proteasomes in the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Mol. Reprod. Develop.* 62 (6), 271-276.

Sutovsky, P. (2011). Sperm proteasome and fertilization. *Reproduction* 142 (1), 1-14.

Yokota, N., et al. (2011). Sperm-specific C-terminal processing of the proteasome PSMA1/α6 subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 410 (4), 809-815.

5 . 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (総件数 15、主要論文 14 件)

Sawada, H., Shirae-Kurabayashi M., and Takaharu Numakunai (2017). Spawning of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Mol. Reprod. Dev.*, 84(2), 93. doi: 10.1002/mrd.22776 (査読有り)

Takeuchi T., Yamada, L., Shinzato, C., Sawada, H., and Satoh N. (2016). Stepwise evolution of coral biomineralization revealed with genome-wide proteomics and transcriptomics. *PLoS One*, 11(6), e0156424. doi: 10.1371/journal.pone.0156424 (査読有り)

Okamoto M, Yamada L, Fujisaki Y, Bloomfield G, Yoshida K, Kuwayama H, Sawada H, Mori T, Urushihara H. (2016). Two HAP2-GCS1 homologs responsible for gamete interactions in the cellular slime mold with multiple mating types: Implication for common mechanisms of sexual reproduction shared by plants and protozoa and for male-female differentiation. *Dev. Biol.*, 415(1), 6-13. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.05.018. (査読有り)

Mino, M., and Sawada, H. (2016) Follicle cell trypsin-like protease HrOvochymase: its cDNA cloning, localization, and involvement in the late stage of oogenesis in the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Mol. Reprod. Dev.*, 83 (4), 347-58. doi: 10.1002/mrd.22627 (査読有り)

Higo A., Niwa, M., Yamato, K.T., Yamada L., Sawada H., Sakamoto, T., Kurata T., Shiyawaka, M., Endo M., Shigenobu, S., Yamaguchi, K., Ishizaki, K., Nishihama, R., Korchi T., and Araki, T. (2016). Transcriptional framework of male gametogenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol.*, 57(2), 325-338. doi: 10.1093/pcp/pcw005. (査読有り)

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, Ristatore F, Sasakura Y, Takatori N, Brown TC, Delsuc F, Douzery E, Gissi C, McDougall A, Nishida H, Sawada H. Swalla BJ, Yasuo H, and Lemaire P. (2016). ANISEED 2015: a digital framework for the comparative developmental biology of ascidians. *Nucleic Acids Res.* 44(D1), D808-818. doi: 10.1093/nar/gkv966. (査読有り)

Nakazawa, S., Shirae-Kurabayashi, M., Otsuka, K., and Sawada, H. (2015). Proteomics of ionomycin-induced ascidian sperm reaction: Released and exposed sperm proteins in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Proteomics*, 15 (23-25), 4064-4079. doi: 10.1002/pmic.201500162. (査読有り)

Sawada H., Morita, M., and Iwano, M. (2014). Self/non-self recognition mechanisms in sexual reproduction: New insight into the self-incompatibility system shared by flowering plants and hermaphroditic animals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 450(3), 1142-1148. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.099. (査読有り)

Yoshida, M.A., Yamada, L., Ochi, H., Iwata, Y., Tamura-Nakano, M., Sawada, H., Sauer, W.H., Ogura, A., and Hirohashi, N. (2014). Integrative omic analysis reveals differentially distributed proteins in dimorphic euspermatozoa of the squid, *Loligo bleekeri*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 450(3), 1218-1224. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.076. (査読有り)

Edzuka, Y., Yamada, L., Kanamaru, K., Sawada, H., and Goshima, G. (2014). Identification of the augmin complex in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* 9(7), e101471. doi: 10.1371/journal.pone.0101471. (査読有り)

Jin, Y., Yaguchi, S., Shiba, K., Yamada, L., Yaguchi, J., Shibata, D. Sawada, H., and Inaba, K. (2013). Glutathione transferase theta in apical ciliary tuft regulates mechanical reception and swimming behavior of sea urchin embryos. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 70, 453-470. doi: 10.1002/cm.21127. (査読有り)

Otsuka, K., Yamada, L., and 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. doi: 10.1002/mrd.22213. (査読有り)

Akasaka, M., Kato, K.H., Kitajima, K., and Sawada, H. (2013). Identification of novel isoforms of vitellogenin expressed in ascidian eggs. *J. Exp. Zool. (Part B, Mol. Dev. Evol.)*, 320, 118-128. doi: 10.1002/jez.b.22488. (査読有り)

Harada, Y., and Sawada, H. (2013). Self-incompatibility in gamete recognition: single self-recognizing determinants and multiple, non-self-recognizing ones function in the same individual. *Mol. Reprod. Dev.* 80, 2-7. doi: 10.1002/mrd.22134. (査読有り)

[学会発表] (総件数 35, 主要発表 28 件)

Nakazawa, S., Shirae-Kurabayashi, M., and Sawada, H. Functions of sperm astacin-like metalloproteases in fertilization of the ascidian *Ciona intestinalis*. The 22nd International Congress of Zoology (沖縄、2016年11月14-19日)

Sawada, H., Otsuka, K., Higuchi, A., Yamamoto, K., Yamaguchi, A., Yamada, L., Harada, Y., Fukuoka, M., Nakazawa, Shirae-Kurabayashi, M. Self-incompatibility in the ascidian, *Ciona intestinalis*: Possible roles of s/v-Themis-A, B, B2 and Themis-like in gamete self-recognition. The 22nd International Congress of Zoology (沖縄、2016年11月14-19日)

白江-倉林 麻貴、佐久間 哲史、笹倉 靖徳、中村 輝、山本 卓、中澤 志織、澤田 均、尾索動物カタユレイボヤにおける有性生殖関連因子のノックアウト解析. 第1回ゲノム編集学会(広島、2016年9月6-7日)

大塚 慧、白江-倉林 麻貴、山田 力志、樋口 新、佐久間 哲之、山本 卓、澤田 均、カタユレイボヤの受精における酸可溶性タンパク質Ci-v-Themis-likeの機能. 日本動物学会第86回大会(新潟、2015年9月17-19日)

白江-倉林 麻貴、砂長 毅、澤田 均、腸性目の単体ホヤと群体ホヤにおける生殖細胞形成の比較解析. 日本動物学会第86回大会(新潟、2015年9月17-19日)

平田 琢真、白江-倉林 麻貴、山田 力志、澤田 均、自家不和合性因子s/v-Themisのマボヤにおける多型解析. 日本動物学会第86回大会(新潟、2015年9月17-19日)

Kutomi, O., Hirose, K., Shiba, K., Yamada, L., Sawada, H., and Inaba, K. Characterization of molecular compositions of inner arm dyneins from sperm flagella in *Ciona intestinalis*. 日本生物物理学学会第 53 回年会(金沢、2015年9月13-15日)

豊岡 博子、森 稔幸、中澤 志織、山田 力志、鈴木 雅大、茂木 祐子、浜地 貴志、宮城島 進也、澤田 均、野崎 久義、緑藻ゴニウムのプラス/マイナス配偶子からの接合突起の単離と解析—新規接合関連因子の同定を目指して—日本植物学会第79回大会(新潟、2015年9月6-8日)

高橋 太郎、森 稔幸、上田 健治、豊岡 博子、山田 力志、澤田 均、野崎 久義、井川 智子、新規雄性配偶子膜特異的タンパク質AtLGM1の機能解析. 日本植物学会第79回大会(新潟、2015年9月6-8日)

Kawai-Toyooka, H., Mori, T., Nakazawa, S., Yamada, L., Suzuki, M., Mogi, Y., Hamaji, T., Miyagishima, S., Sawada, H., and Nozaki, H. Isolation and characterization of the *plus* and *minus* tubular mating structures from the isogamous volvocine alga *Gonium pectoral*. The International Volvox Conference (ケンブリッジ、2015年8月19-22日)

Nakazawa, S., Otsuka, K., Shirae-Kurabayashi, M., and Sawada, H. A novel acrosome-like region in ascidian sperm. Gordon Research Conferences, “Fertilization and Activation of Development” (Holderness, NH, USA, 2015年7月19-24日)

Sawada, H., Otsuka, K., Yamamoto, K., Yamaguchi, A., Yamada, L., Fukuoka, M. and Shirae-Kurabayashi, M. Sperm s-Themis and egg v-Themis and v-Themis-like are responsible for self-Incompatibility in the ascidian *Ciona intestinalis*. Gordon Research Conferences, “Fertilization and Activation of Development” (Holderness, NH, USA, 2015年7月19-24日)

Nakazawa, S., Otsuka, K., Shirae-Kurabayashi, M., and Sawada, H. Metalloproteases are necessary for sperm binding to or penetration through the vitelline coat in *Ciona intestinalis*. The 8th International Tunicate Meeting(青森、2015年7月12-17日)

Sawada, H. Three s/v-Themis pairs and v-Themis-like are responsible for self-incompatibility in the ascidian *Ciona intestinalis*. The 8th International Tunicate Meeting (青森、2015年7月12-17日)

Nakazawa, S., Otsuka, K., Shirae-Kurabayashi, M., and Sawada, H. Released and exposed proteins via calcium ionophore-induced sperm reaction in the ascidian *Ciona intestinalis*. 日本発生物学会第48回大会(つくば、2015年6月2-5日)

Sawada, H. Self/nonselself-recognition in ascidian fertilization: Common mechanisms with angiosperm self-incompatibility. 日本発生物学会第48回大会(つくば、2015年6月2-5日)

Inoue, S., Shirae-Kurabayashi, M., and Sawada, H. cDNA cloning and the role in fertilization of a novel ubiquitin-activating enzyme E1 in the ascidian *Halocynthia*

- roretzi*. 日本分子生物学会第37回大会 (横浜、2014年11月25-27日)
- 澤田 均. ホヤの受精機構に関する研究 (動物学会賞受賞講演)、日本動物学会第85回大会 (仙台、2014年9月10-13日)
- 原田 茂雅, 山田 力志, 白江-倉林 麻貴, 澤田 均. カタクウレイボヤ自家不和合性因子s/v-Themis の発現解析、日本動物学会第85回大会 (仙台、2014年9月10-13日)
- 駱 乙、竹内 猛、小柳 亮、田中 牧子、Mariia Khalturina、藤江 学、山崎 慎一、山田 力志、澤田 均、遠藤 一佳、佐藤 矩行. 腕足動物のゲノム解読：触手冠動物の進化とバイオミネラリゼーション. 日本動物学会第85回大会 (仙台、2014年9月10-13日)
- ②1 久富 理、水野 克俊、広瀬 恵子、柴田 大輔、山田 力志、澤田 均、柴 小菊、稲葉 一男. カタクウレイボヤ精子鞭毛における内腕ダイニンf の単離・解析. 日本動物学会第85回大会 (仙台、2014年9月10-13日)
- ②2 澤田 均. ホヤのアロ認識機構からみた動植物共通の生殖タクティクス. 日本分子生物学会第36回大会 (神戸、2013年12月3-6日)
- ②3 三野雅子、澤田 均. マボヤの受精に関与する精子プロテアーゼHrSpermosinの解析. 日本分子生物学会第36回大会 (神戸、2013年12月3-6日)
- ②4 Sawada, H. Ascidian reproductive tactics: From basic biology to applications. The 4th International Conference Green Technology (Malang, Indonesia, 2013年11月9日)
- ②5 大塚 慧、山田力志、澤田 均. カタクウレイボヤの酸可溶性卵黄膜タンパク質 Ci-v-Themis-likeとv-Themisとの相互作用. 日本動物学会第84回大会 (岡山、2013年9月26-28日)
- ②6 Sawada, H. Mechanisms of self-incompatibility in the ascidian *Ciona intestinalis*. The 7th Tunicate Meeting (Naples, Italy, 2013年7月22-25日)
- ②7 Otsuka, K., Yamada, L., Sawada, H. cDNA cloning, localization and candidate binding partners of acid-extractable vitelline-coat protein Ci-v-Themis-like in the ascidian *Ciona intestinalis*. Gordon Research Conferences, “Fertilization and Activation of Development” (Holderness, NH, USA, 2013年7月14-19日)
- ②8 Sawada, H., Yamamoto, K., Yamaguchi, A., Otsuka, K., and Yamada, L. Self-sterile mechanism in an ascidian (primitive chordate) *Ciona intestinalis*: Its reproductive tactics shared with flowering plants. Gordon

Research Conferences, “Fertilization and Activation of Development” (Holderness, NH, USA, 2013年7月14-19日)

〔図書〕(計6件)

- 澤田 均 (2014). まえがき、動植物の受精学：共通機構と多様性 (澤田 均 編) 化学同人、p iii
- 澤田 均 (2014). 動物と植物の受精機構—その多様性と共通性、動植物の受精学：共通機構と多様性 (澤田 均 編) 化学同人、pp. 15-31.
- 澤田 均、笹倉 靖徳、山田 力志 (2014). 原索動物(ホヤ)の受精. 動植物の受精学：共通機構と多様性 (澤田 均 編) 化学同人、pp. 167-184.
- Akasaka, M., Kato, K.H., Kitajima, K., and Sawada, H. (2014). Novel isoform of vitellogenin expressed in eggs is a binding partner of the sperm proteases, HrProacrosin and HrSpermosin, in the ascidian *Halocynthia roretzi*. In “**Sexual Reproduction in Animals and Plants** (H. Sawada, N. Inoue, M. Iwano, eds.)”, pp. 131-139, Springer.
- Sawada, H., Yamamoto, K., Otsuka, K., Saito, T., Yamaguchi, A., Mino, M., Akasaka, M., Harada, Y. and Yamada, L. (2014). Allorecognition and lysin systems during ascidian fertilization. In “**Sexual Reproduction in Animals and Plants** (H. Sawada, N. Inoue, M. Iwano, eds.)”, pp. 131-139, Springer.
- Sawada, H., Mino, M., and Akasaka, M. (2014). Sperm proteases and extracellular ubiquitin-proteasome system involved in fertilization of ascidians and sea urchins. In “**Advances in Experimental Medicine and Biology** (P. Sutovsky, ed.)”, 759, pp. 1-11, Springer.

〔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)
 名古屋大学・大学院理学研究科・教授
 研究者番号：60158946
- (2) 研究分担者：なし
- (3) 連携研究者：なし
- (4) 研究協力者：なし