

# 主 論 文 要 旨

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	成瀬正啓
主 論 文 題 目： 先体反応誘起の分子機構とその進化に関する研究				
(内容の要旨) 先体反応は受精の際の精子-卵相互作用において必須のプロセスとなるエクソサイトーシス現象であり、それによって精子は卵外被の通過・卵との膜融合が可能となる。一般的に卵外被に存在する複合糖質が先体反応誘起に関わっており、その誘起活性は種特異性を有している。多様な構造を持ち得る糖鎖によって卵は卵外被に種間の差を作り出し、精子はそれを認識している。 第1章では、本研究で主に用いたマヒトデの受精における先行研究の知見を、他の実験動物と比較しながらまとめた。マヒトデにおいては卵ゼリー層中の3つの成分、ARIS (acrosome reaction-inducing substance), Co-ARIS, asterosap が協調的に働いて先体反応を誘起することが既に明らかにされており、主因子 ARIS は巨大な硫酸化プロテオグリカン様分子、補因子 asterosap は精子活性化ペプチド、もう一つの補因子は Co-ARIS は硫酸化ステロイドサポニンである。ARIS の活性はその硫酸化糖鎖が担っており、先体反応を誘起する最小活性単位は Fragment 1 (Fr. 1) と呼ばれる5糖の10回程程度の繰り返しであることが明らかにされている。 第2章において、Fr. 1 糖鎖がクラスター化した状態においてより強い活性を持つことを示し、また AFM 観察と動的光散乱測定の結果、コアタンパク質が互いに結合することで複合体を形成することを明らかにした。従って、コアタンパク質が Fr. 1 糖鎖を高密度化することで ARIS の強い活性が発揮されることを示唆した。第3章では、このコアタンパク質の一次構造の性質について論じた。ARIS がいずれも Fr. 1 糖鎖による修飾を受けた3つのタンパク質から構成され、その配列決定により、ARIS タンパク質群は互いに保存された領域 (ARIS ドメイン) を有していることを発見した。第4章において ARIS ドメインの分子系統進化について論じた。この ARIS ドメインが有櫛動物から頭索動物まで広く保存されていることを発見したことから ARIS ドメインを持つ ARIS タンパク質はこれらの無脊椎動物の受精において普遍的な役割をもつと考えられ、卵外被構造タンパク質 ARIS と精子先体反応時の先体突起形成とが共進化している可能性を提案した。 一方、第5章では精子側の認識分子である ARIS 受容体について論じた。この分子を同定するため、ARIS を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行って 38kD の Fr. 1 糖鎖特異的な結合性を有する ARIS 受容体候補分子を発見し、この分子が精子膜マイクロドメインに局在することを明らかにした。また、第6章において、補因子 Co-ARIS が精子膜上のマイクロドメインに侵入することで作用することを示し、糖脂質クラスターの構造変化を引き起こすことを解明した。従って、マイクロドメイン上で ARIS と Co-ARIS のシグナルが合流するモデルについて考察した。 第7章では、以上の研究を総括し、受精現象の共通性と多様性について述べた。				

## SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School of Fundamental Science and Technology	Student Identification Number	SURNAME, First name NARUSE, Masahiro
<p>Title</p> <p>Studies on molecular mechanisms and evolution of acrosome reaction-induction</p>		
<p>Abstract</p> <p>The acrosome reaction (AR) is an essential event for fertilization in many species. Acrosome-reacted sperm can penetrate the egg-coat and fuse with the egg plasma membrane. The sperm specifically recognizes signal molecules in the egg-coat. In general, the key molecule that triggers the AR is a group of carbohydrate-protein complex: this molecule interacts with a receptor protein on the sperm surface membrane.</p> <p>In first chapter, I summarized the findings of fertilization in starfish <i>Asterias amurensis</i>, as follows. In <i>Asterias amurensis</i>, a major egg-jelly component, namely ARIS (AR-inducing substance), induces the acrosome reaction in combination with co-factors such as Co-ARIS or asterosap. ARIS, a highly sulfated proteoglycan-like molecule, has an apparent molecular size of more than <math>10^7</math> kDa, and its pentasaccharide repeating units termed as Fragment 1 (Fr. 1) retains biological activity of ARIS.</p> <p>In second chapter, I revealed that ARIS or clustered Fr. 1 showed stronger AR-inducing activity than purified Fr. 1. It seems likely that the macroscopic structure formed by the ARIS core protein is important for arranging the Fr. 1 sugar chain into an AR-inducing state. Atomic force microscopy (AFM) images showed that ARIS is composed of thick core protein fibres and thin sugar chain filaments. Depending on their exact concentration, the core proteins structured themselves into a fibrous network. In third chapter, I investigated the structure of ARIS for the first time. Electrophoretic analysis revealed that ARIS is a complex of three proteins, all of which are modified by the Fr. 1 sugar chain. Sequencing indicated that there are two novel conserved sequences in all three ARIS proteins: AR-N and AR-C domain. We hypothesize that ARIS proteins interact with each other via their AR-N and AR-C motifs, and form fibrous network structures like those of mammalian ZP proteins. In fourth chapter, I found ARIS-like genes in many phyla, from Ctenophora to Prochordata, indicating that the current results may have broad applicability throughout the animal kingdom.</p> <p>Then I investigated how sperm recognize the signal molecules for AR induction. In fifth chapter, I isolated a 38 kD protein molecule specifically bound to ARIS as the putative ARIS receptor, and this protein is located to micro domain fraction from sperm membrane. In sixth chapter, I also revealed Co-ARIS, sulfated steroidal saponin, colocalizes with GM1 clusters on the micro domain, and alters its higher order structure. Thus I proposed a model for the induction of acrosome reaction, that sugar part of ARIS and Co-ARIS have a cooperative function on the sperm micro domain.</p> <p>Seventh, I demonstrated the commonality and diversity of fertilization on the basis of whole my research.</p>		