

学位論文
博士（理学）

先体反応誘起の分子機構とその進化
に関する研究

2010 年度

慶應義塾大学大学院

理工学研究科 基礎理工学専攻

成瀬 正啓

目次

略語表

第1章 序論

1-1 有性生殖と受精	1
1-2 受精と先体反応	2
1-3 先体反応誘起物質	6
1-4 マヒトデにおける先体反応誘起	10

第2章 ARIS の高次構造と先体反応誘起活性

2-1 緒言	15
2-2 方法	19
2-3 結果	
2-3-1 金コロイド粒子を用いた Fr. 1 糖鎖のクラスター化	26
2-3-2 抗 Fr. 1 抗体を用いた Fr. 1 糖鎖のクラスター化	29
2-3-3 AFM による ARIS 高次構造の観察	31
2-3-4 動的散乱を用いたクラスター形成の解析	33
2-4 考察	38

第3章 マヒトデ ARIS タンパク質の同定

3-1 緒言	42
3-2 方法	44
3-3 結果	
3-3-1 電気泳動による ARIS 構成物質の解析	52
3-3-2 Native-PAGE を用いた ARIS の性状解析	54
3-3-3 脱硫酸化 ARIS の解析	57
3-3-4 ARIS のアミノ酸配列解析	59
3-3-5 ARIS 遺伝子・ARIS タンパク質全長配列決定	62
3-3-6 ARIS 類似遺伝子の探索	71
3-4 考察	73

第4章	ARIS domain の動物界における広がり	
4-1	緒言	76
4-2	方法	79
4-3	結果	
4-3-1	ヒトデ綱における ARIS	84
4-3-2	棘皮動物門における先体反応誘起物質	100
4-3-3	棘皮動物門における ARIS 遺伝子	107
4-3-4	その他の動物における ARIS 遺伝子	119
4-3-5	ARIS 遺伝子群の系統学的解析	133
4-4	考察	135
第5章	ARIS 受容体の解析	
5-1	緒言	149
5-2	方法	152
5-3	結果	
5-3-1	ARIS 結合分子の探索	156
5-3-2	種特異性の解析	158
5-3-3	Smiss 分解を用いた、糖鎖との相互作用解析	160
5-3-4	Fr. 1 糖鎖との相互作用の解析	162
5-3-5	精子膜マイクロドメインに局在するタンパク質の解析	164
5-3-6	先体反応時に放出されるタンパク質の解析	166
5-3-7	ARIS 受容体候補分子の濃縮と配列解析	168
5-4	考察	172
第6章	先体反応誘起補因子 Co-ARIS の作用機構	
6-1	緒言	174
6-2	方法	179
6-3	結果	
6-3-1	cholesterol 添加による Co-ARIS 活性の阻害	186
6-3-2	精子膜 sterol に対する Co-ARIS の影響	190
6-3-3	精子の Co-ARIS 取り込み量の解析	194

6-3-4 精子膜マイクロドメインの観察	197
6-3-5 Caveola breaking assay	201
6-3-6 人工膜マイクロドメインを用いた解析	203
6-4 考察	211
第7章 総括	218
参考文献	222
謝辞	

略語表

1-MA	1-methyl adenine
AFM	atomic force microscopy
APS	Ammonium Persulfate
ARIS	Acrosome Reaction-Inducing Substance
ASA	Asterosaponin A
ASW	artificial sea water
Au-Fr. 1	Fragment 1 coated Au beads
BPB	bromo phenol blue
CAV1	caveolin 1
CBB	coomassie brilliant blue
Chl	chloroform
CHO	chinese hamster ovary
Co-ARIS	Co-factor for ARIS
CTx	cholera toxin
DEAE	diethylaminoethyl
DEPC	diethylpyrocarbonate
DPM	disintegration per minutes
EDC	(1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)-carbodiimide
EPPS	3-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]- propanesulfonic acid
EtOH	ethanol
FA5/8C	coagulation factor 5/8 type C
FITC	fluorescein isothiocyanate
Fr. 1	Fragment 1
FSP	fucose sulfate polymer
Fuc	fucose
GalNAc	N-acetylgalactosamine
GalT	galactose Transferase
GlcNAc	N-acetylglucosamine
GSS	gonad-stimulating substance

HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horse radish peroxidase
Ig	immuno globlin
M β CD	methyl- β -cyclodextrin
MeOH	methanol
LB	Langumuir, Brodgett
ODS	octa decyl silyl
ORF	open reading frame
P-ARIS	Pronase digest of ARIS
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
POPC	1-palmitoyl 2-oleoyl phosphatidylcholine
PTFE	polytetrafluoroethylene
PVDF	polyvinylidene difluoride
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RI	radio isotope
RU	resonance unit
SD	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	scaning electron microscopy
SM	sphingomyelin
SPR	surface plasmon resonance
SOC	store-operated channel
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine
TLC	thin layer chromatography
TNE	Tris-NaCl-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Triton X-100	polyoxyethylene-p-isooctylphenol
UV	ultra violet
XC	xylene cyanol

Xyl

xylose

ZP

zona pellucida

第1章 序論

1-1 有性生殖と受精

我々人間を含め多くの多細胞生物は有性生殖を行なうことで自らの子孫を残し、種を存続するとともに遺伝子を混ぜ合わせて多様性を創生している。有性生殖によって有利な変異の伝播・不利な変異の除去が効率良くなされ、ゲノムの進化が進んだと考えられる。遺伝子を混ぜ合わせるという意味で、一对の遺伝情報を組み換えつつ、半数体である配偶子を生み出す減数分裂という過程、そして二つの配偶子が合わさることで新しい一对の遺伝情報が出来上がる接合という過程は有性生殖とは切り離せない2本柱ともいうべきものである。

動物界における接合は一般に受精と呼ばれ、雌雄の配偶子は巨大な卵と微小な精子という極端に二型化したものとなっている。運動性を持たない卵へ、運動性を有する精子が到達し、2つの異なる細胞が融合することで受精が起こる。多くの動物種にとって受精の場は体外であり、特に海中は複数種の配偶子が混在する危険性がある。従って、両配偶子には互いに認識して種特異的に受精を行うシステムが存在している (Hirohashi et al., 2008; Harada et al., 2008)。

1-2 受精と先体反応

受精という現象は、文字通り卵が精子を受け入れることを示すが、その過程は単純ではなく、複数の段階からなる。動物種によって細かな段階は異なるものの、かなりの共通性が存在している。近年の動物界における幅広い研究成果を参考に筆者は次に示すような段階に分類した。

すなわち、

- ①. 精子の卵への誘引（走化性）
- ②. 卵外被と精子の結合
- ③. 精子先体反応
- ④. 精子の卵外被の通過
- ⑤. 卵黄膜への精子の結合
- ⑥. 卵と精子の融合

という6段階である (Fig. 1-1)。

本研究では第三段階である精子の先体反応に着目した。先体反応とは、精子内部の先体胞と呼ばれる小胞のエクソサイトーシスである。多くの動物において、卵外被に結合した精子は先体反応によって卵外被通過の手段を得ることで卵への到達が可能になり、また新たに露出した細胞膜部分で卵と結合・融合する。従って、先体反応が受精に不可欠である。本研究で主として用いた棘皮動物においては、ゼリー層と呼ばれる卵外被に達した精子が先体反応を起こし、先体胞の放出に伴って先体突起が伸長して卵外被を貫通することで、精子は卵に到達することが知られている (Ikadai and Hoshi, 1981) (Fig. 1-2)。ゼリー層によって誘起される先体反応はある程度の特異性を持っており、ヒトデ類の例を挙

げるならば、本研究で用いたマヒトデ *Asterias amurensis* (Asteroidea 科 Asteroidea 亜科 *Asterias* 属) のゼリー層は同じ属の *Asterias forbesi*, *Asterias rubens* 及び同じ亜科のエゾヒトデ *Aphelasterias japonica* (Asteroidea 科 Asteroidea 亜科 *Aphelasterias* 属) には先体反応を誘起できるものの、同じ Asteroidea 科でも異なる亜科に属するニッポンヒトデ *Distolasterias nipon* (Asteroidea 科 Coscinasteroidea 亜科 *Distolasterias* 属) には先体反応を誘起できない (Nakachi et al., 2006; Nakachi 2008)。よって、マヒトデのゼリー層は亜科レベルでの特異性を有しているといえる。

受精において精子が先体反応を行なうということは必須であり、また先体反応誘起にはある程度の種特異性が存在する。これは受精における種認識の一部を先体反応誘起機構が担っていることを意味しており、卵-精子間の認識の分子機構の解明は受精研究において重要な位置を占める。

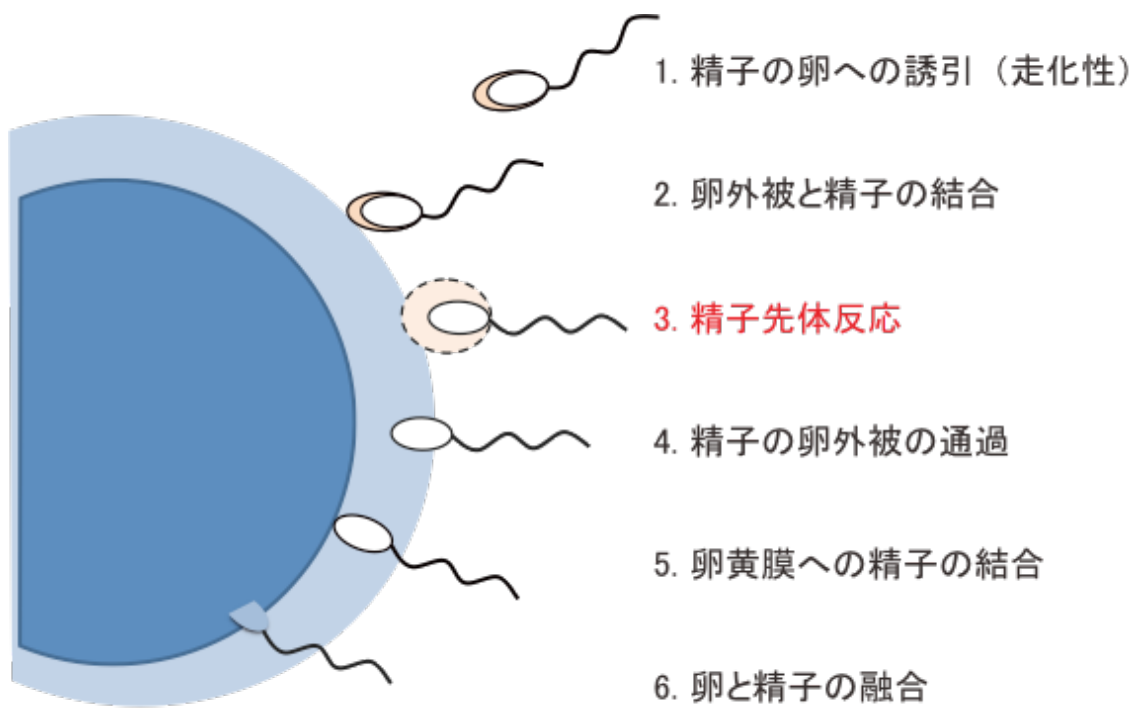


Fig 1-1 受精の素過程 模式図

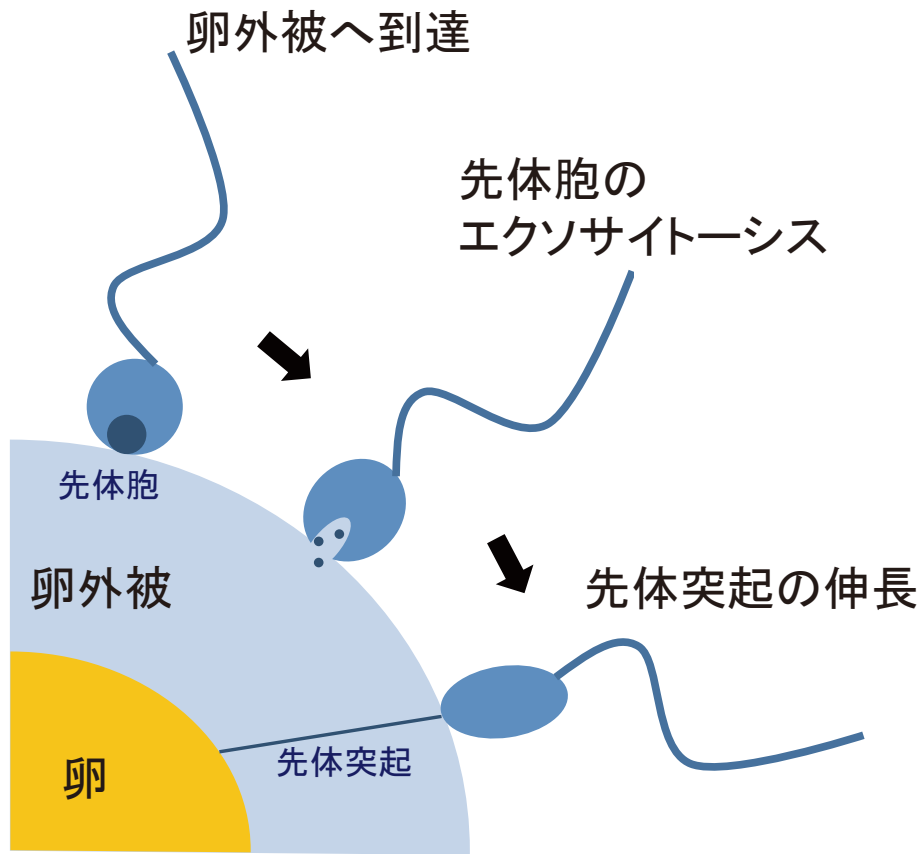


Fig 1-2 ヒトでの受精 模式図

1-3 先体反応誘起物質

様々な生物に関して、その卵外被に存在する先体反応誘起物質の研究が行なわれている。中でも体外受精であるために *in vitro* の系として生理的な受精を完全に再現できる海産動物、特に棘皮動物に関しては多くの知見がある。例えばウニにおいてはその卵外被にあたるゼリー層にフコース硫酸ポリマー (Fucose Sulfate polymer: FSP) と呼ばれる糖鎖が存在し、先体反応誘起活性を担っている (SeGall and Lennarz, 1979)。そして、FSP は糖鎖の繰り返し構造・硫酸化の位置が種によって異なり、それらが種特異性を決めていることが示されている (Vilela-Silva et al., 2002; Hirohashi et al., 2002) (Fig. 1-3)。

また、哺乳類の研究はマウスを用いてなされている。マウスの先体反応の伝統的な研究において、先体反応は卵外被にあたる透明帯で起こり、透明帯を構成する ZP1, ZP2, ZP3 と呼ばれる 3 つの硫酸化糖タンパク質のうち ZP3 が先体反応誘起物質であるとされている (Bleil and Wassarman, 1980; Bleil and Wassarman, 1988)。ZP3 の糖鎖部分とタンパク部分の両方が先体反応誘起に必要であるとされ、C 末端側半分に存在している O-結合型糖鎖とポリペプチド鎖が関わっていると推定されている (Florman and Wassarman, 1985)。精子の認識の標的となる糖残基については今なお議論が続いており、非還元末端の β -GlcNAc 残基とする説 (Shur and Hall, 1982) と非還元末端の α -Gal 残基とする説 (Bleil et al., 1988) の 2 説がある。ただし、近年、ZP3 が先体反応誘起物質であるという説そのものが議論の対象となってきている。例えば、先体反応誘起の本体の候補とされている β -GlcNAc 残基及び α -Gal 残基の転移酵素をノックアウトした個体の卵に対しても受精が起こるという報告 (Williams et al., 2007) や、ZP3 の糖鎖結合部位に変

異を導入したマウスの卵においても受精が可能であることが報告されており (Gahlay, et al., 2010)、今まで先体反応誘起の主体と考えられていた ZP3 糖鎖よりも 3 つの ZP タンパク質が形成する全体的な卵外被構造が先体反応誘起を起こしていると考えられる。特に ZP2 が構造形成に重要と考えられ、表層顆粒放出に伴う ZP2 の酵素切断が透明帯への精子の結合を無くし、多精を防ぐことが示されている (Baibakov et al., 2007)。先体反応の起こるタイミングに関しても、透明層の外側を包む卵丘細胞が先体反応に関与しているという研究結果も報告されており (Hirohashi et al., personal communication)、個々の観察系によって結果が異なるという事実は、体内受精動物を対象とした研究では *in vitro* 実験系の条件設定が結果に大きく影響を与えていることを示しており、実験設計が結果を左右している可能性が危惧される。

哺乳類精子には、先体反応に先立って **capacitation** という現象が存在する。哺乳類精子は本来体内受精であり、*in vitro* でも射精直後の状態では先体反応を起こすことはできない。メスの生殖管内の分泌液やアルブミンを含む血清中で数時間培養することで先体反応能を得ることができ、その精子の受精能獲得のための変化を **capacitation** という。capacitation の際には、精子膜上のコレステロール量の著しい減少 (Flesch et al., 2001)、 HCO_3^- 、 Ca^{2+} イオンの流入が起こることが知られ (Visconti et al., 1999; Gadella et al., 2008)、それに伴って膜秩序の喪失・再構成が起こる (Tesarik and Flechon, 1986; Cross et al., 2003)。capacitation 自体の機構は完全には解明されていないものの、先体反応に必須であることから、それ自体が先体反応の一部であるとも考えられる。従って、哺乳類への進化の際に、先体反応の過程の一部が **capacitation** として分かれた可能性があり、その起源が

無脊椎動物の先体反応の中に存在することも考えられる。

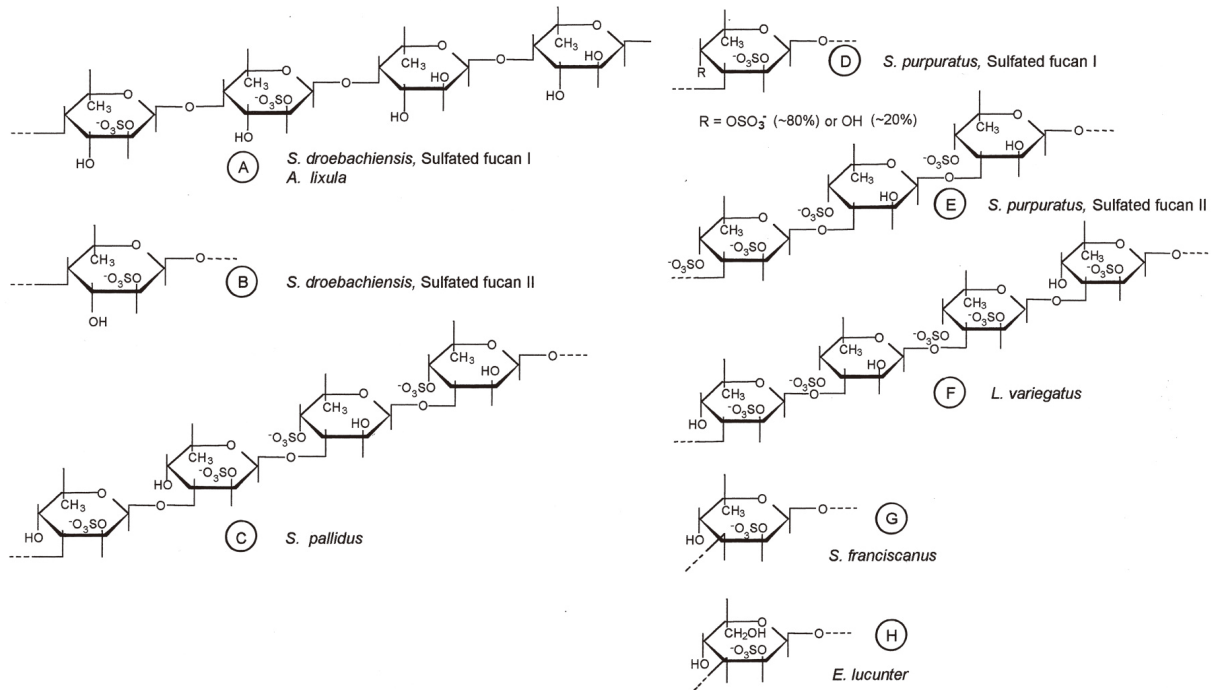


Fig 1-3 ウニ FSP の種特異的構造 (Vilela-Silva et al., 2002 より)

1-4 マヒトデにおける先体反応誘起

本研究では、棘皮動物の中でも先体突起の長さが長く (最大約 20 μm)、先体反応の誘起の有無の観察がウニよりも容易なヒトデ類で、大量に配偶子を得られるマヒトデ *A. amurensis* を用いた (Fig. 1-4)。先行研究より、マヒトデの先体反応にはゼリー層中に存在する 3 つの成分 ARIS, Co-ARIS 及び asterosap が関わっていることが知られている (Hoshi et al., 1994; Matsumoto et al., 2008)。ARIS は 10^4 kD を超える巨大な硫酸化プロテオグリカン様分子であり (Matsui et al., 1986)、高 pH 海水、高 Ca^{2+} 海水中といった実験条件下において単独に先体反応を誘起出来ることから、先体反応誘起の主因子として存在している。生理条件下において、この ARIS の先体反応誘起活性には補因子が必要であり、それらが Co-ARIS, asterosap である (Figs. 1-5, 1-6)。Co-ARIS は硫酸化ステロイドサポニンであり、asterosap は 34 アミノ酸残基からなるペプチド群である (Nishiyama et al., 1987b; Nishigaki et al., 1996)。asterosap はその受容体として 130 kD の Guanylate cyclase が同定されており、精子鞭毛に豊富に存在していることが分かっている (Nishigaki et al., 2000)。Guanylate cyclase に asterosap がすることで cGMP 産生が起こり、それによって下流の cyclic nucleotide dependent K^+ channel が開く。しかしながら、ARIS・Co-ARIS についての精子の受容機構は未だ明らかにされていない (Fig. 1-7)。

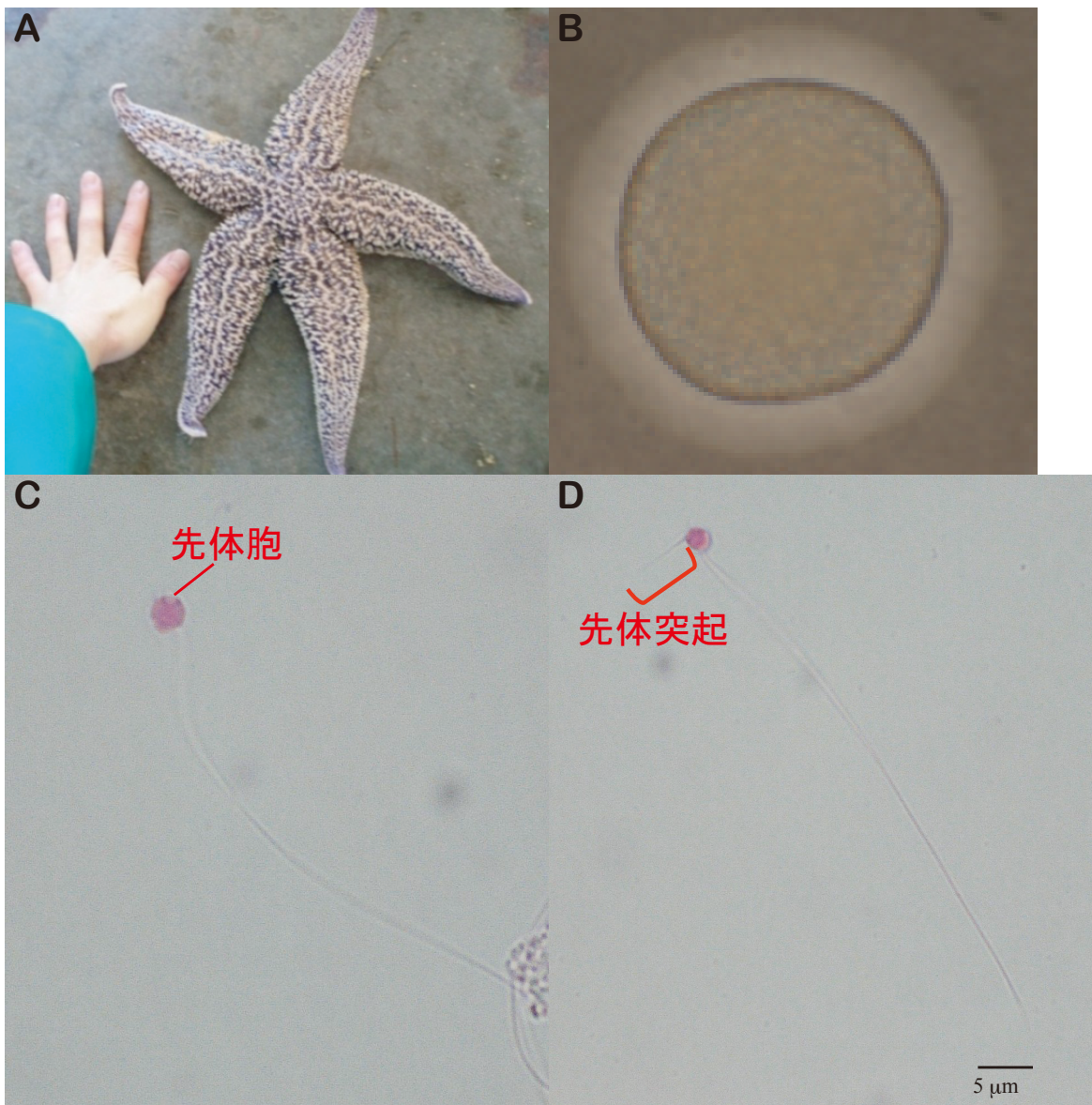


Fig 1-4 マヒトデ及びその配偶子

A. 成熟マヒトデ B. マヒトデ卵及びゼリー層 C. 先体反応前の精子 D. 卵ゼリー処理によって先体反応を誘起した精子



Fig 1-5 Co-ARIS の構造

A. Co-ARIS I

B. Co-ARIS II

C. Co-ARIS III



Fig 1-6 asterosap の構造 (Matsumoto et al., 2008 より)

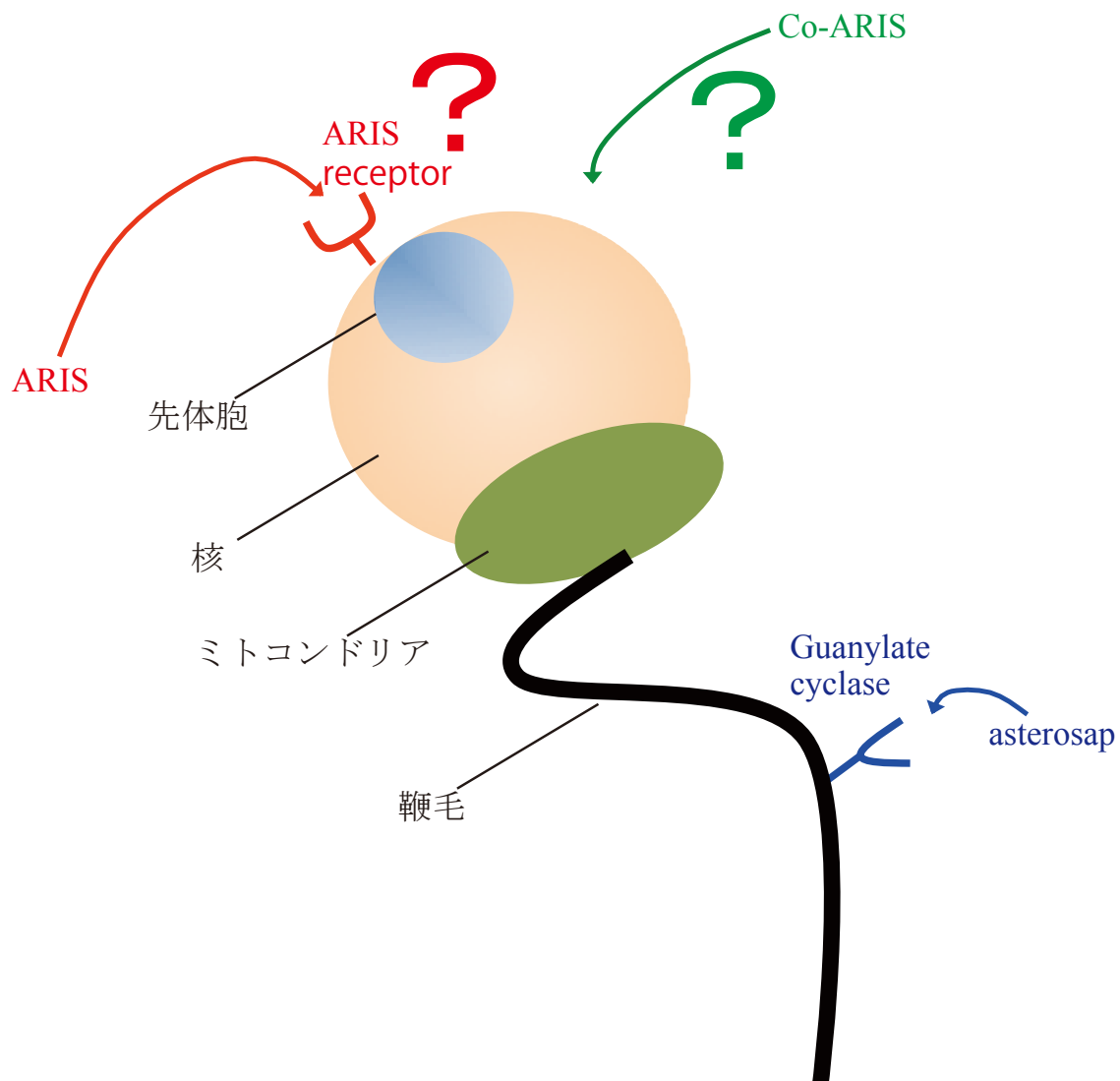


Fig 1-7 先体反応誘起物質群の精子への作用機構 模式図

第2章 ARIS の高次構造と先体反応誘起活性

2-1 緒言

ARIS は見かけの分子量が 10^4 kD という巨大なプロテオグリカン様分子であり、先体反応誘起主因子であるこの ARIS の構造が卵-精子間の特異的な認識機構を担っている。ARIS の活性はプロナーゼ消化によるタンパク質領域の分解を行なっても保持され、また過ヨウ素酸酸化による糖鎖の開環や脱硫酸化などによっては失うことより、硫酸化糖鎖にその活性が存在することが示されている (Matsui et al., 1986)。その最少活性糖鎖の構造については、プロナーゼ消化した ARIS (P-ARIS) に超音波処理を施し、イオン交換クロマトグラフィーで活性画分を精製することで、 $\rightarrow 4$ - β Xyl-(1 \rightarrow 3)- α Gal-(1 \rightarrow 3)- α Fuc-4(SO₄⁻)-(1 \rightarrow 3)- α Fuc-4(SO₄⁻)-(1 \rightarrow 4)- α Fuc-(1 \rightarrow という 5 糖が約 10 回繰り返された直鎖型の糖鎖構造 Fragment 1 (Fr. 1) が得られた (Koyota et al., 1997) (Fig. 2-1)。この Fr. 1 が ARIS と同様に高 pH 海水もしくは高 Ca²⁺海水中で単独で先体反応を引き起こすことから、この Fr. 1 が先体反応活性の本体であると考えられている。

ARIS の活性はその糖鎖 Fr. 1 が担っており、コアタンパク質部分には活性が無いと考えられる。しかしながら、興味深い知見として、単離された Fr. 1 の活性が ARIS よりも低くなるという結果が得られている (Fig. 2-2)。この差が 0.1 ~ 10 μ g sugar/ml 程度の糖濃度の低い領域で顕著であることから、ARIS 分子上の Fr. 1 糖鎖はコアタンパク質によって局所的に集められており、クラスター効果によって低い濃度でも効率よく先体反応を誘起できるという仮説が考えられる。

クラスター効果とは糖鎖を介した認識システムにおいてよく知られる現象であり、糖リガンドとその受容体の弱い結合が、多価の結合サイトの存在によって増強されることである (Lee, 1978; Lee et al., 1984)。本章では、まず、Fr. 1 糖鎖を人工的に高密度化させることで、活性の上昇が起こることを確認し、仮説を裏付けた。また、後半では、コアタンパク質によって形作られる ARIS の構造を原子間力顕微鏡で観察した。ARIS タンパク質によって形作られる高次構造の上に Fr. 1 糖鎖が提示されるというモデルを考え、ゼリー層表面という先体反応誘起の認識の場について議論する。

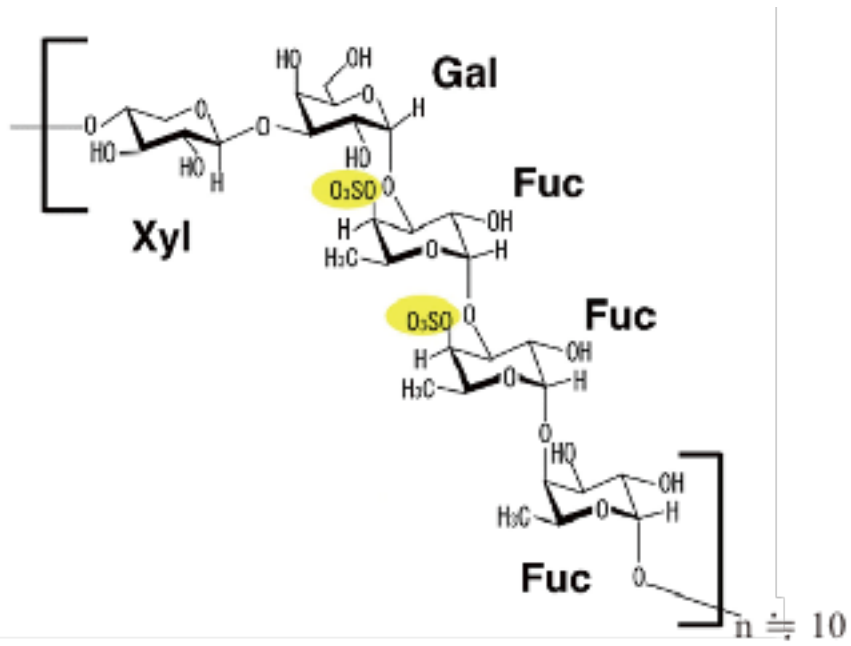


Fig. 2-1 Fr. 1 糖鎖の構造

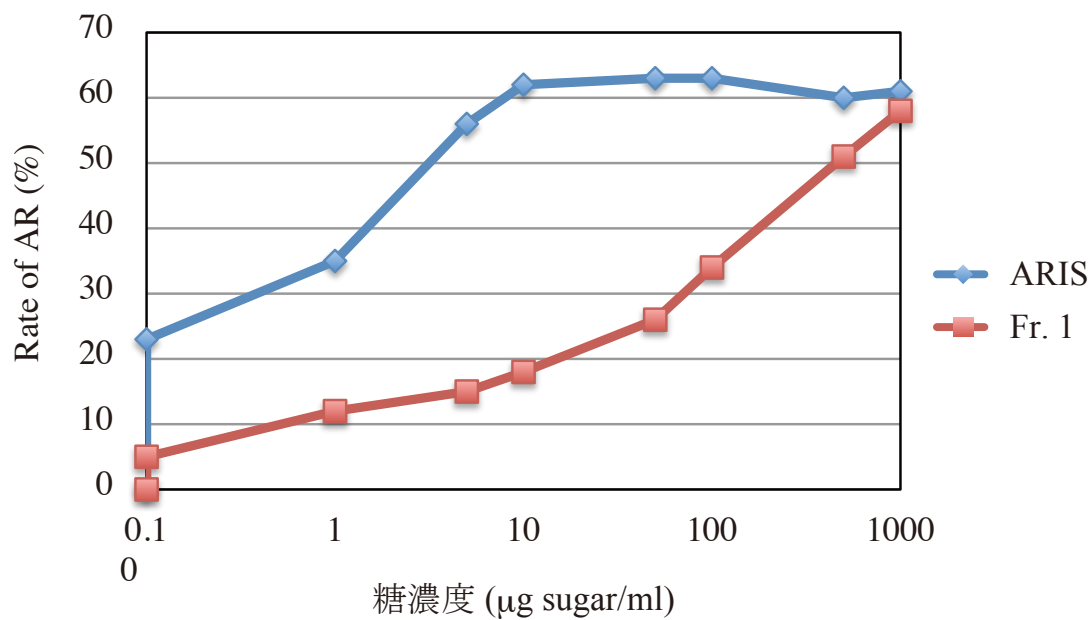


Fig. 2-2 ARIS と Fr. 1 の活性の比較

縦軸: 先体反応率, 横軸: 糖濃度

2-2 方法

本章以下第6章まで、本研究で使用した試薬類は特に断らない限り、和光純薬工業 (Japan) 及び、ナカライテスク (Japan) の特級規格のものを使用した。また、溶解・希釈について特に記載が無い場合は、Elix 3 Water Purification System (Millipore, USA) 及び、Milli-Q Water Purification System (Millipore, USA) を用いて精製した脱イオン水を用いた。

マヒトデ

本研究で用いたマヒトデ *A. amurensis* は、生殖期にあるものを用いた (Fig. 1-4A)。すなわち、大槌湾・東京湾で3月、またはオーストラリアのタスマニア島で8月に採集された個体である。

海水の調整

マヒトデの飼育維持用海水には、ロートマリン (Iwaki Co. Ltd., Japan) を用いることとし、Tomo型海水魚用浮秤 (Tokyo momoki, Japan) によって比重を海水に合わせて希釈したものを使用した。実験には人工海水 ASW (423 mM NaCl, 9 mM KCl, 9 mM CaCl₂, 25 mM MgSO₄, 23 mM MgCl₂, 10 mM EPPS-NaOH, pH8.2) を使用した。

卵ゼリーの採集

先行研究に従って行った (Ikadai and Hoshi, 1981)。成熟した雌マヒトデより卵巣を摘出し、1 µM の 1-MA (Sigma-Aldrich Co., USA) / ASW に 3 hr 程度浸し、

卵成熟・放卵を誘起した (Kanatani, 1973)。十分な放卵を確認した後、茶こしとガーゼを用いて漉すことで成熟卵懸濁液が得られ、沈殿を待って上清をアスピレーターで除き、ASW を加えて攪拌するという形で2度洗浄を行った。最後の洗浄後、卵と等量程度まで ASW を加え、攪拌しながら 0.1 N HCl / ASW を加えることで pH を 5.5 まで緩やかに下げた。pH 5.5 に達し、攪拌の手応えが変化することを確認した後、直ちに 0.2 N NaOH / ASW を攪拌しながら加えることで pH を 8.2 に戻し、2,000 g, 5 min の遠心によって卵を除いた上清を得た。これをさらに 10,000 g, 30 min で遠心し、細胞片の取り除かれた上清をゼリー溶液 (卵ゼリー) として用いた。

ARIS の精製

先行研究に従って行った (Hoshi et al., 1994)。マヒトデ卵から採集されたゼリー溶液を、Sephacryl CL-4B 担体 (GE Healthcare, UK) を用いたゲル濾過クロマトグラフィー ($\phi 4.5 \times 68$ cm; 0.1 M NaCl, 15 mM Tris-HCl, pH8.2 で緩衝化) で分離し、糖に富む素通り画分を脱イオン水で透析後、凍結乾燥し、粗 ARIS サンプルとした。透析は、透析膜 Seamless cellulose Tubing 30/32 もしくは 18/32 (Viskase Co. Inc., USA) を用い、凍結乾燥は Bio Freeze BF-3 (Ray & company Inc., Japan) を使用した。その後、最低限の脱イオン水に溶解した粗 ARIS を DEAE-Toyopearl 担体 (東ソー株式会社, Japan) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー ($\phi 3.0 \times 53$ cm; 0.1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH8.2 で平衡化) によってさらに精製した。50 mM Tris-HCl, pH 8.2 緩衝液中での NaCl 濃度勾配 (0.1 M \rightarrow 1 M) で溶出を行い、各溶出画分の糖濃度を後述のレゾルシノール硫酸法によ

って測定し、そのピーク付近を再び透析・凍結乾燥したものを ARIS サンプルとした。

還元糖の定量

resorcinol 硫酸法を用いて、L-fucose (L-Fuc) 換算の糖濃度として測定を行った。試料溶液 20 μ l に 6 mg/ml resorcinol (関東化学, Japan) 水溶液を 20 μ l 加え、さらに 75%硫酸を 100 μ l を加えた。よく混合した後、85°C で 30 min 反応させ、450 nm の吸光度より、L-Fuc 溶液からの検量線を元に糖濃度を算出した。糖濃度の単位は sugar g/l と表記する。

ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は Laemmli の方法 (Laemmli, 1970) に従った。Separating gel は 0.1% SDS, 0.375 M Tris-HCl, pH8.8 溶液に、Stacking gel は 0.1% SDS, 0.375 M Tris-HCl, pH6.8 溶液にそれぞれ Acrylamide 溶液 (Acrylamide : Bisacrylamide = 29 : 1 で水溶) を適当な濃度で混合し、TEMED と 10% APS を加えることで作成した。泳動 buffer は 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS 溶液を使用し、泳動用サンプルは、2×sample buffer (20% glycerol, 10% β -mercaptoethanol, 0.4% SDS, 0.0001% BPB, 125 mM Tris-HCl, pH6.8) と等量混合してからアプライした。泳動は電源装置 myPower500 (Atto Co., Japan) を用いて 15 mA の定電流で行い、BPB がゲルから流れ出るまで続けた。タンパク質分子量マーカーは Prestained Protein Markers (Broad Range) for SDS-PAGE (ナカライテスク, Japan) を用い、より精密な分子量測定には Protein Markers (10×) for SDS-PAGE (ナカライテスク, Japan)を用いた。

また、CBB 染色には Rapid Stain CBB Kit (ナカライテスク, Japan)を用いた。

P-ARIS の精製

卵ゼリー溶液に 2 倍量の EtOH を加え-30°C で一晩放置した後、4°C, 15,000 g, 30 min 遠心して、白色沈殿を得た。この沈殿の重さを測定し、15 mg/ml となるように 5 mM Tris-HCl, pH 8.2 溶液に溶解し、Actinase E (Kaken pharmaceutical Co. Ltd., Japan) および NaN₃ を 0.3 mg/ml, Toluene を 2.5 ml/l になるように加え、さらに 24 hr ごとに Actinase E を同量追加しながら、37°C で 96 hr プロナーゼ消化を行った。100°C, 20 min で湯浴することで同酵素を失活させた後、4°C, 15,000 g, 30 min で遠心し、上清を集めた。集めた上清をロータリーエバポレータ NVC-2000 (Tokyo rikakikai, Japan) によって Sepharose CL-4B 担体 (GE Healthcare, UK) を用いたゲル濾過クロマトグラフィー (φ4.5 × 68 cm; 0.1 M NaCl, 15 mM Tris-HCl, pH8.2 で緩衝化) で分離し、糖に富む素通り画分を回収した。これを脱イオン水で透析した後、凍結乾燥し、粗 P-ARIS サンプルとした。その後、最低限の脱イオン水に溶解した粗 P-ARIS を DEAE-Toyopearl 担体 (東ソー株式会社, Japan) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー (φ3.0 × 53 cm; 50 mM Tris-HCl, pH8.2 で平衡化) によってさらに精製した。50 mM Tris-HCl, pH 8.2 緩衝液中での NaCl 濃度勾配 (0 M → 1 M) で溶出を行い、各溶出画分の糖濃度を前述の resorcinol 硫酸法によって測定し、そのピーク付近を再び透析・凍結乾燥したものを P-ARIS サンプルとした。

Fr. 1 の精製

P-ARIS 30 mg を脱イオン水 10 ml に溶かした液体を、超音波破砕機 Branson Sonifier 250 (Branson Ultrasonics Corporation, USA) を用いて氷上で超音波破砕処理 (Duty cycle 50%, output 5, 10 min × 3) した。それを DEAE-Toyopearl 担体を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー (φ3.0 × 53 cm; 脱イオン水で平衡化) にアプライし、脱イオン水中での 0~1.0 M NaCl 濃度勾配で溶出して精製した。resorcinol 硫酸法による還元糖の定量において糖濃度ピークとなる画分を集めて脱イオン水で透析、凍結乾燥して Fr.1 サンプルとした。

dry sperm の調整

雄のマヒトデから精巢を取り出して外側についた水分を濾紙で吸い取ってから氷上のシャーレに取り、自然に滲み出た精子を dry sperm として用いた。

先体反応率の測定

氷上にて、海水 1 ml に dry sperm 10 μl を加え、軽く攪拌して精子懸濁液を準備した。5 min 静置後、ASW に溶解した検定試料 80 μl に、20 μl の精子懸濁液を加えて軽く攪拌した。5 min 反応後、20 μl 5% glutaraldehyde / ASW を加え、5 min, on ice で固定した。最後に 0.5% erythrosine / 70% ethanol 溶液を 3 μl 加えて精子を染色し、Nomarski 型顕微鏡を用いて 1000 倍で精子を観察した。先体突起のはっきり見えたものを「先体反応した精子」とし、200 精子中の「先体反応した精子」を数えて先体反応率を出した。

金コロイド Fr. 1 の作成

Au-Fr. 1 の作成は酸化金の還元反応で行った。まず、0.04%の Fr. 1 溶液に 1/20 量の 0.02 M hydrogen tetrachloroaurate tetrahydrate 溶液を加えた。さらにそこに 1/20 量の 0.04 M NaBH₄ 溶液を加えると同時に激しく混合した。最後に 0.22 μm Millex-GP filter unit (Millipore, USA) でフィルター濾過を行い、Au-Fr. 1 とした。

抗体の Fab fragment 化

Fab 作成は記載に従って行った (Harlow and Lane, 1988)。まず、100 mM cysteine, 2 mM EDTA, 200 mM sodium acetate-acetic acid, pH 5.5 溶液 100 μl と 0.5 μg/ml 抗 Fr. 1 抗体溶液 100 μl を混合し、そこに 0.5 mg/ml papain を 1 μl 加えて、37°C で 12 hr 湯浴した。その後、反応を停止させるために iodoacetamide を終濃度が 75 mM になるように加え、室温で 30 min 静置した。SDS-PAGE にて、Fab, Fc 両フラグメントの生成を確認し、最後に Protein A カラム Affi-Gel Protein A MAPS II Kit (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) を用いて Fc フラグメントを吸着・除去し、抗 Fr. 1 抗体の Fab フラグメントを精製した。

AFM 観察

サンプルは天然マイカ (The Nilaco Co., Japan) 上で観察を行った。まず、サンプルに 1/9 量の 100 mM MgCl₂ を加えることで、10 mM MgCl₂ を含むように調整した。そして、約 1 cm 四方のマイカ表面を劈開し、1 ml 脱イオン水で 5 回すすいで洗浄した後、10 mM MgCl₂ を 20 μl 滴下し、N₂ ガスで乾燥させた。そこへ試料を 20 μl 滴下し 5 min 静置した後、1 ml 脱イオン水で 5 回すすいで洗浄し、

再び N₂ ガスで乾燥させ、観察時までデシケーターで保存した。AFM 観察は AFM SPI3800 (Seiko Instruments Inc., Japan) を使用し、コンタクトモードで行った。探針は OMCL-TR800PSA (Olympus Optical Co., Japan) を用いた。走査周波数は 0.5 ~3.0 Hz とし、得られた画像は Gwyddion 2.10 (<http://gwyddion.net/>) を用いて傾斜補正、ノイズ補正を行い、同ソフトを用いて解析した。

動的光散乱による粒子径測定

動的光散乱法は ZETASIZER nano series ZEN3600 (Malvern Instruments Ltd., UK) を用いて行った。サンプルは 1,000 g, 15 min 遠心後の上清を使用し、プラスチックキュベット (Sansyo, Japan) に入れて測定を行った。

2-3 結果

2-3-1 金コロイド粒子を用いた Fr. 1 糖鎖のクラスター化

Fr. 1 のクラスター化によって、先体反応率が上昇するか否かを試験した。作成した Au-Fr. 1 は表面プラズモン共鳴の極大値が 522.5 nm であったことより、その半径が 30 nm 程度と推定され、また、糖濃度の測定の結果、一つの金粒子あたり Fr. 1 の 5 糖ユニットが 1.9×10^4 個存在しているという結果になった。Fr. 1 が 10 ユニットずつから成ると仮定すると、一つの Fr. 1 糖鎖が占有する面積は 6 nm^2 となり、十分に高密度化されていると考え、先体反応アッセイを行った。

0.1 $\mu\text{g sugar/ml}$ の濃度における先体反応誘起率で Au-Fr. 1 を ARIS, Fr. 1 と比較すると、Au-Fr. 1 は Fr. 1 よりも有意に高い先体反応誘起率を示し、むしろ ARIS の活性の方に近かった (Fig. 2-3)。金コロイドの影響についてのコントロールとして、heparin sulfate の金コロイド複合体 (Au-Hep.) や chondroitin sulfate の金コロイド複合体 (Au-Chon.) を作成して先体反応アッセイを行ったが、これらの金コロイド複合体は先体反応誘起能を示さなかった。よって、Fr. 1 から Au-Fr. 1 への先体反応誘起能の変化は、Fr. 1 のクラスター化特異的なものであると考えられる。

Au-Fr. 1 は精子との結合性も強く持っており、顕微鏡観察中に Au-Fr. 1 に凝集する精子が多く見られ、また先体反応を起こしていた (Fig. 2-4A)。一方で Au-Hep. や Au-Chon. にはそのような精子はほとんど見られなかった (Fig. 2-4B)。

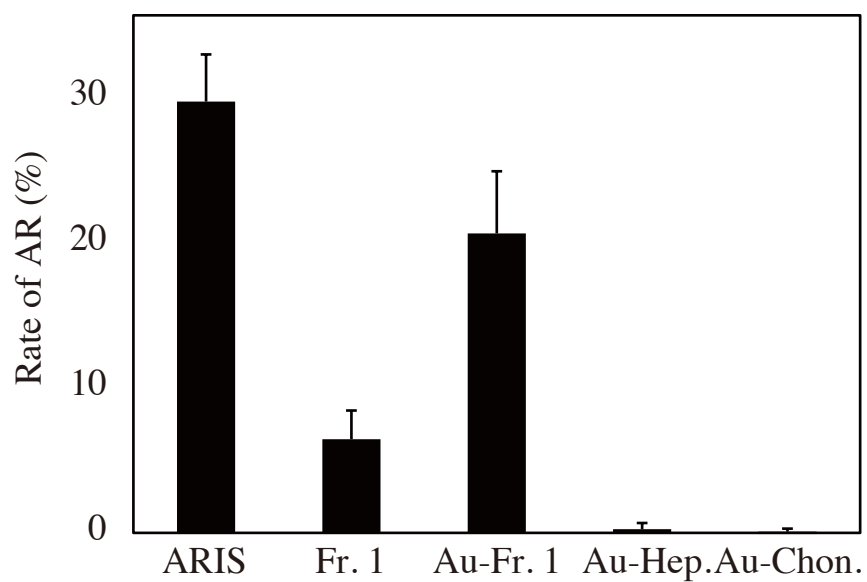


Fig. 2-3 金コロイド粒子によるクラスター化の効果

縦軸: 先体反応率, n=6, bars: SD

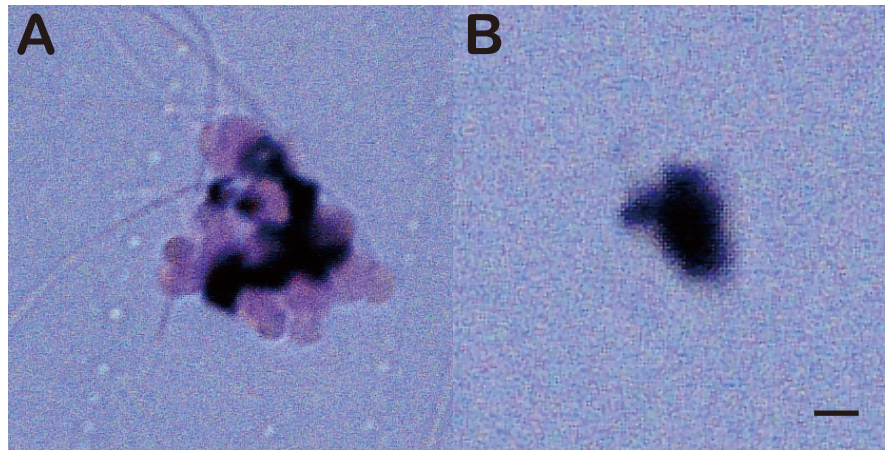


Fig. 2-4 精子と混合後の金コロイド粒子

A. Au-Fr. 1 (紫色) に結合した精子 (ピンク色)。

B. Au-Hep.粒子。精子と混合して観察したが、精子の粒子への結合は見られなかった。

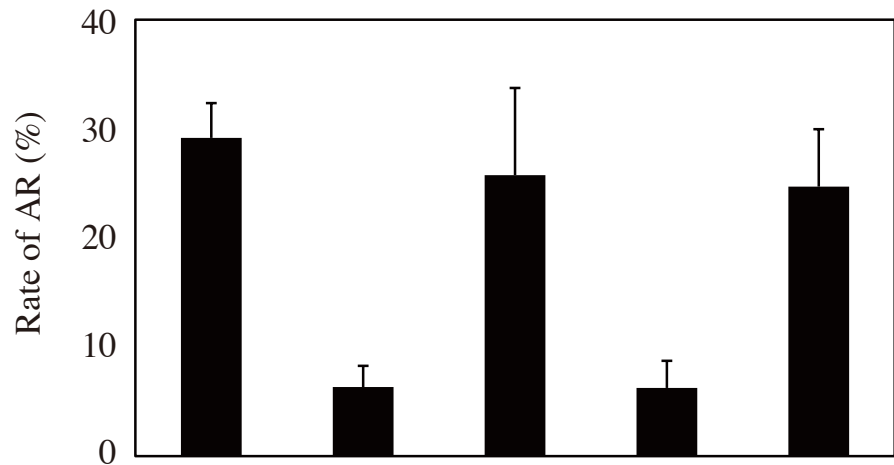
bar: 2 μm

2-3-2 抗 Fr. 1 抗体を用いた Fr. 1 糖鎖のクラスター化

抗 Fr. 1 抗体マウス IgG は 2 価で Fr. 1 に結合することで架橋が可能であり、また Fr. 1 は 5 糖の繰り返しから成るため多価のエピトープを有していると考えられる。従って、抗 Fr. 1 抗体の添加によって Fr. 1 が集合体を形成することが予想される。

Fr. 1 に抗 Fr. 1 抗体を添加した場合の先体反応誘起活性を試験した結果、金コロイド粒子を用いて Fr. 1 糖鎖をクラスター化した場合と同様に、先体反応率の上昇が見られた (Fig. 2-5)。先体反応率は ARIS と比較しても有意差が見られない程であり、抗 Fr. 1 抗体によるクラスター化が Fr. 1 の活性上昇を引き起こすことが示唆された。

papain 消化によって生成した 1 価の抗体 fragment である Fab を添加した場合にはこの先体反応誘起活性上昇が見られず、2 価の抗体による架橋が活性上昇に関わっていることを示唆している。さらに、抗マウス IgG(F(ab))抗体ヤギ IgG (Bethyl Laboratories Inc., USA) を用いて、抗 Fr. 1 抗体マウス IgG の Fab フラグメントを架橋化すると、再び先体反応誘起活性が ARIS と同程度まで上昇することが、抗体によるクラスター形成が Fr. 1 の先体反応誘起活性を向上させていることを裏付けている。



ARIS	+	-	-	-	-
Fr. 1	-	+	+	+	+
Ab.(Anti-Fr. 1)	-	-	+	-	-
Fab.(Anti-Fr. 1)	-	-	-	+	+
Ab. (Anti-Fab.)	-	-	-	-	+

Fig. 2-5 金コロイド粒子によるクラスター化の効果

Ab.(Anti-Fr. 1): 抗 Fr. 1 抗体マウス IgG

Fab.(Anti-Fr. 1): 抗 Fr. 1 抗体マウス IgG-Fab フラグメント

Ab.(Anti-Fab): 抗マウス IgG(F(ab))抗体ヤギ IgG

縦軸: 先体反応率, n=6, bars: SD

2-3-3 AFM による ARIS 高次構造の観察

前項までにおいて、金粒子・抗体をそれぞれ用いて、Fr. 1 糖鎖をクラスター化することで、より効率的に先体反応誘起できることを示した。ARIS 上の Fr. 1 糖鎖もコアタンパク質によってクラスター化されていることが考えられ、本項では、ARIS の構造に関する議論を深めるため、原子間力顕微鏡を用いて直接的に ARIS の構造を観察することとした。

ARIS, P-ARIS, Fr. 1 のとる構造を濃度を変えながら AFM 観察を行った結果を Fig. 2-5 に示す。観察の結果、2 種類の繊維が観察され、一つは直径 2 ~ 5 nm 程度（太い繊維）（Fig. 2-6, 赤矢印）、もう一つは直径 0.5 ~ 1.5 nm 程度（細い繊維）（Fig. 2-6, 青矢印）のものであった。太い繊維は ARIS, P-ARIS で見られ、Fr. 1 で見られなかった。一方で、細い繊維は 3 種のサンプルで共通に存在していた。P-ARIS で見られた太い繊維は ARIS のものよりも短く断片化しており、また細い繊維は太い繊維に結合して存在しているように観察されたことから、従って、太い繊維が ARIS コアタンパク質であり、細い繊維が糖鎖部分であることが予測される。

太い繊維は 1 ~ 5 $\mu\text{g sugar/ml}$ にかけて ARIS の観察において濃度依存的に互いに結合し、ネットワーク状の構造を形成した。特に 50 $\mu\text{g sugar/ml}$ を超えると全ての繊維が結合してマイカ表面一面に広がっているのが観察された。また、細い繊維も、Fr. 1 の観察においては 50 $\mu\text{g sugar/ml}$ を超えると、集合体を形成した。

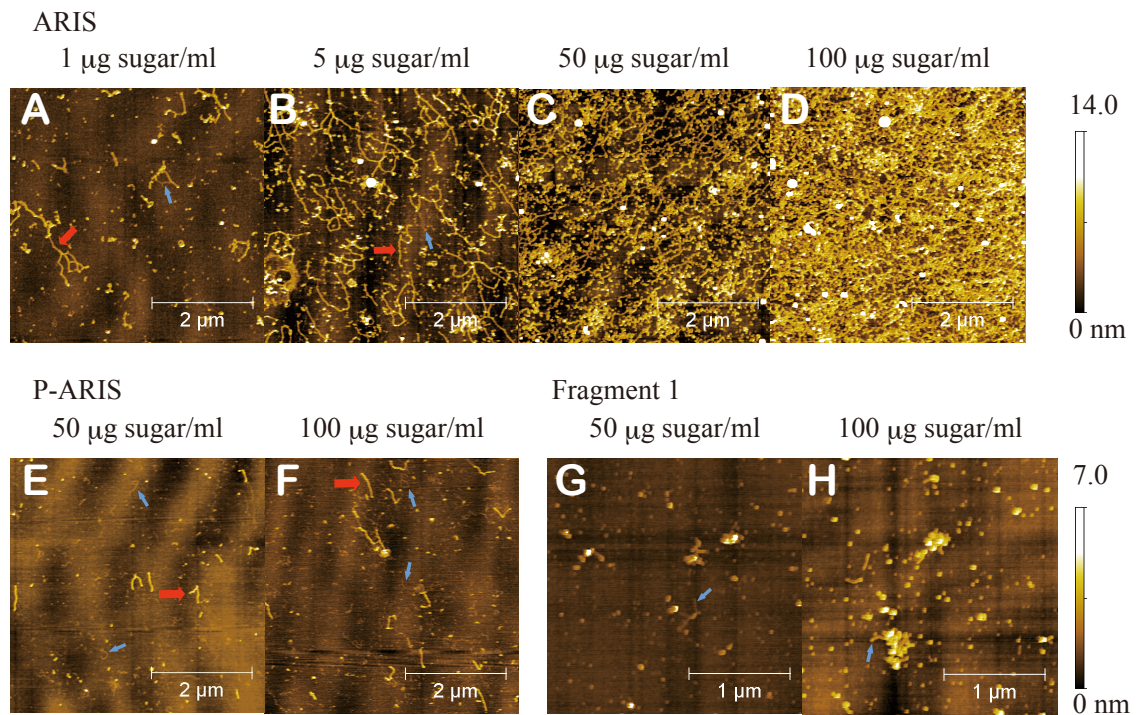


Fig. 2-6 ARIS, P-ARIS, Fr. 1 の AFM 像

AFM 観察結果は色の濃淡で高さを表している。(右端の bars)

A-D: ARIS の AFM 観察像 (それぞれ 1, 5, 50, 100 µg sugar/ml)

E-F: P-ARIS の AFM 観察像 (それぞれ 50, 100 µg sugar/ml)

G-H: Fr. 1 の AFM 観察像 (それぞれ 50, 100 µg sugar/ml)

赤矢印: 太い繊維, 青矢印: 細い繊維

2-3-4 動的光散乱を用いたクラスター形成の解析

AFM 観察によって ARIS や Fr. 1 が濃度依存的に構造形成をすることが明らかとなった。本項では、動的光散乱を用いて、ARIS、P-ARIS 及び Fr. 1 の集合体形成をより定量的に測定することを目指した。

動的光散乱は、ブラウン運動の自己相関から粒子径を算出するという原理上、存在する粒子径がある程度均一である必要性があり、また粒子が液中にある程度の密度で存在していなければならない。今回、ARIS に関しては、5 ~ 10 μg sugar/ml の濃度域で、P-ARIS に関しては、1 ~ 100 μg sugar/ml の濃度域で、Fr. 1 に関しては、200 ~ 400 μg sugar/ml の濃度域での信憑性のあるデータをとることができた (Figs. 2-7, 8, 9)。ARIS は、粒子径に関してほとんど濃度依存性が見られなかったことから、5 μg sugar/ml の濃度から既に複合体を形成していると考えられる (Fig. 2-7)。P-ARIS についても、濃度依存性がほとんど見られず、同様に、1 μg sugar/ml の時点で既に複合体を形成していると考えられる (Fig. 2-8)。P-ARIS の形成した粒子が ARIS よりも小さな粒子径となったのはコアタンパク質の分解による影響と考えられ、AFM の観察の結果と一致した。ARIS、P-ARIS サンプルが、それぞれ 5 μg sugar/ml 以下、1 μg sugar/ml 以下で信憑性のある測定結果を得ることができなかつた理由は、粒子形成が起きているものの、その絶対的な数が少ないためにブラウン運動観測の Count が十分に得られなかつたためである。Fr. 1 糖鎖の測定結果は、一方で濃度依存性を示しており、200 ~ 400 μg sugar/ml という高濃度において、Fr. 1 が複合体を形成するということを示唆している (Fig. 2-9)。Fr. 1 についても、200 μg sugar/ml を超えるまで信憑性のある測定結果が得られなかつたが、これもやはり、ブラウン運動観測

の Count が十分に得られなかったためであった。精製した Fr. 1 は、コアタンパク質を除去し、また超音波処理をしているため、同じ糖濃度でも ARIS よりもかなり小さいと考えられ、粒子径も ARIS, P-ARIS と比較して小さい値をとっている。

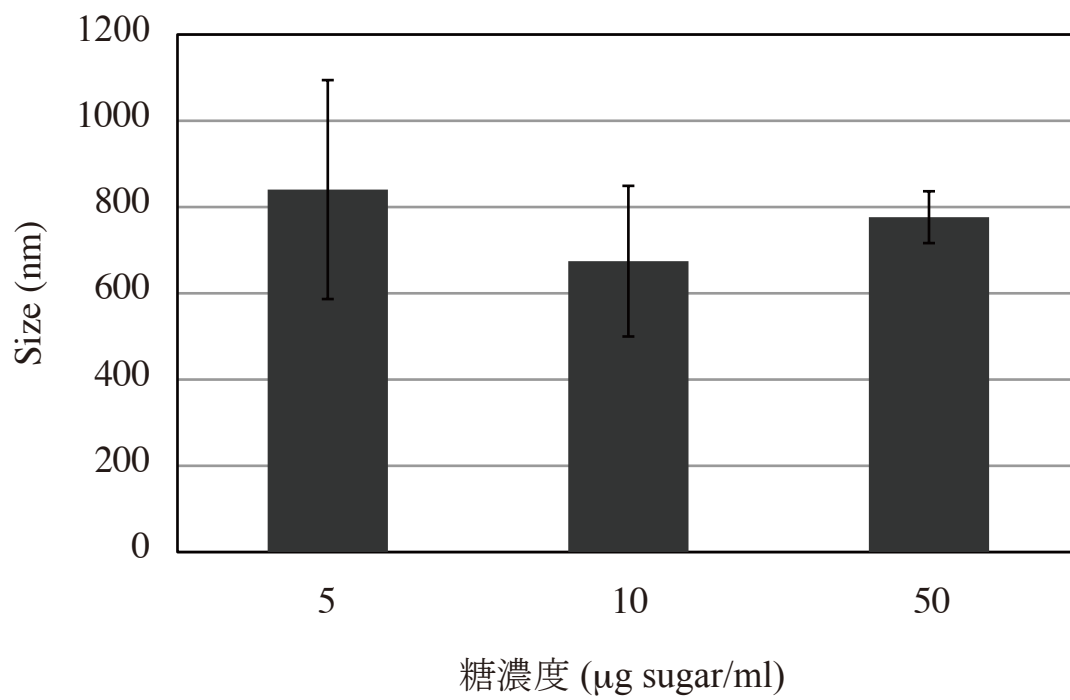


Fig. 2-7 ARIS の動的光散乱測定結果

縦軸: 粒子径, 横軸: 糖濃度, n=6, bars: SD

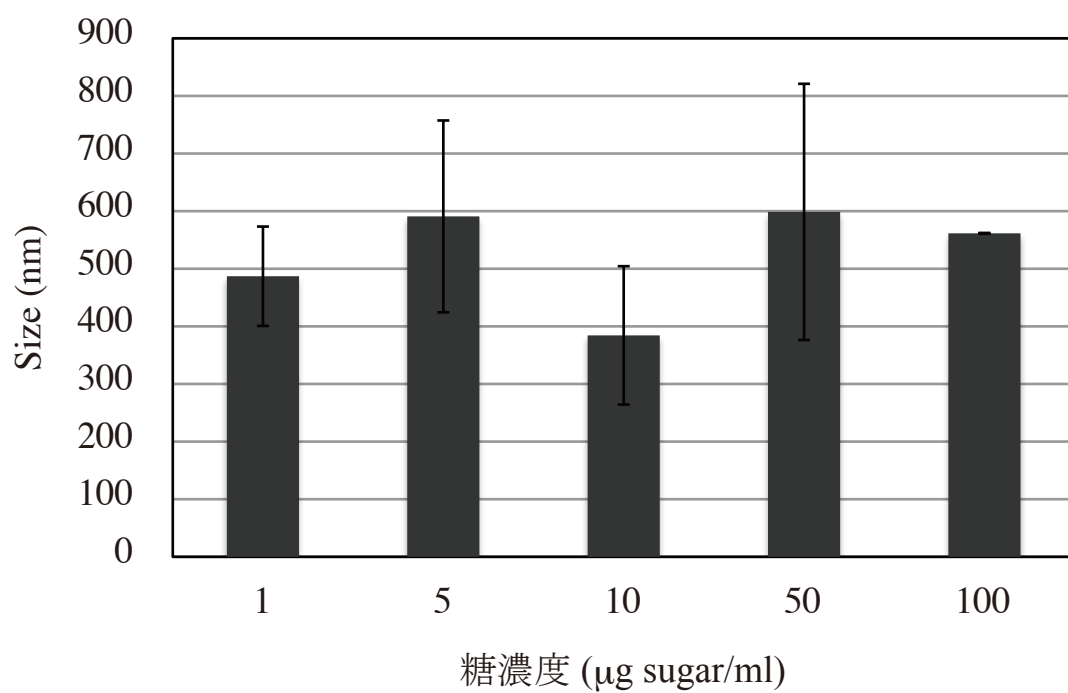


Fig. 2-8 P-ARIS の動的光散乱測定結果

縦軸: 粒子径, 横軸: 糖濃度, n=6, bars: SD

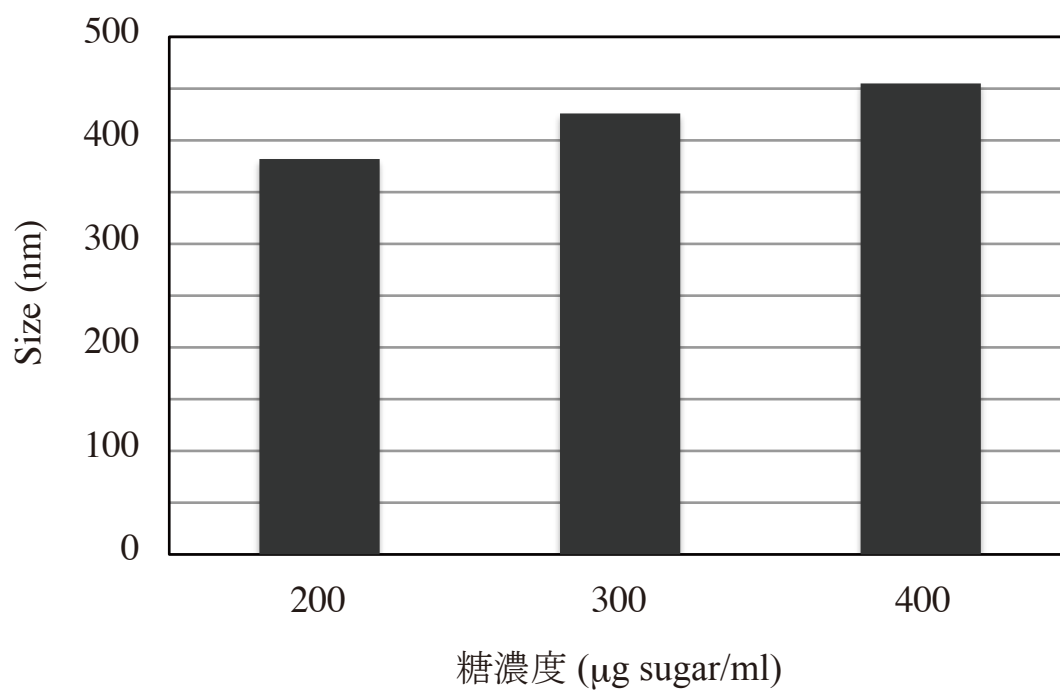


Fig. 2-9 Fr. 1 の動的光散乱測定結果

縦軸: 粒子径, 横軸: 糖濃度

2-4 考察

金粒子によるクラスタリングにおいても、抗体を用いたクラスタリングにおいても、Fr. 1 の先体反応誘起活性の上昇が見られたことは、Fr. 1 が ARIS の状態でもクラスター効果によって強い活性を発揮していることを示唆する。

AFM で見られた太い繊維はコアタンパク質であり、細い繊維が Fr. 1 糖鎖であると考えられる。ARIS の観察において太い繊維が濃度の上昇と共に互いに結合していったという観察結果は、ARIS コアタンパク質が相互作用して重合していく様を示している。また、太い繊維に対して細い繊維が複数結合している像が見られ、これはコアタンパク質に複数の Fr. 1 糖鎖修飾サイトが存在し、Fr. 1 糖鎖が高密度化された状態が作られていることを示している。

ARIS において、AFM 観察時に太い繊維が相互作用をしてマイカ全面に広がっていった $1 \sim 5 \mu\text{g sugar/ml}$ という濃度は、先体反応率も格段に上昇する濃度である (Fig. 2-10, 茶四角)。従って、構造形成が活性に関わっていることが示唆された。また、Fr. 1 糖鎖の AFM 観察においても、 $50 \mu\text{g sugar/ml}$ を超えると細い繊維が複合体を形成し始めることが示された。 $50 \mu\text{g sugar/ml}$ 程度の濃度から Fr. 1 糖鎖の急激な先体反応率上昇が起こるため (Fig. 2-11, 茶四角)、構造形成が直接的に先体反応活性に関わっていることが支持された。自己集合体構造をとることで、Fr. 1 糖鎖がクラスター化された状態になり、活性の上昇がみられると考えられ、金粒子・抗体を用いた研究の結果と一致が見られた。

動的散乱光散乱において、ARIS, P-ARIS はそれぞれ 700 nm 前後、 500 nm 前後の粒子径を示して、濃度に非依存的であった。この濃度において、先体反応率がプラトーに達しているのは (Fig. 2-1)、複合体の大きさが一定で停止していること

が理由と考えられる。これは、AFMのような2次元に押しつけた形でない場合は、ある程度のサイズで複合体の成長が止まることを示している。ただし、天然においては卵という球面の上に固定された状態なので、AFMの観察結果が自然界の状態を表している可能性が高い。一方で、Fr. 1の粒子径は300 nmから500 nm程度まで、濃度依存的に増加が見られた。測定した200 ~ 400 µg sugar/mlという濃度は、Fr. 1の先体反応率がまだ濃度依存的に上昇している過程であり、複合体が濃度依存的に成長することで、クラスター化が進み、より効率よく先体反応誘起が行えるようになっているからであると考えられる。Spring 8におけるX線回折実験より、Fr. 1が平行二重螺旋構造をとることが示唆されていることから (Matsumoto et al., unpublished)、弱い相互作用によってこのような構造体を形成している可能性がある。コアタンパク質同士の強い相互作用とFr. 1糖鎖同士の弱い相互作用が組合わさることで、ARIS全体の構造が構築されていると考えられる。

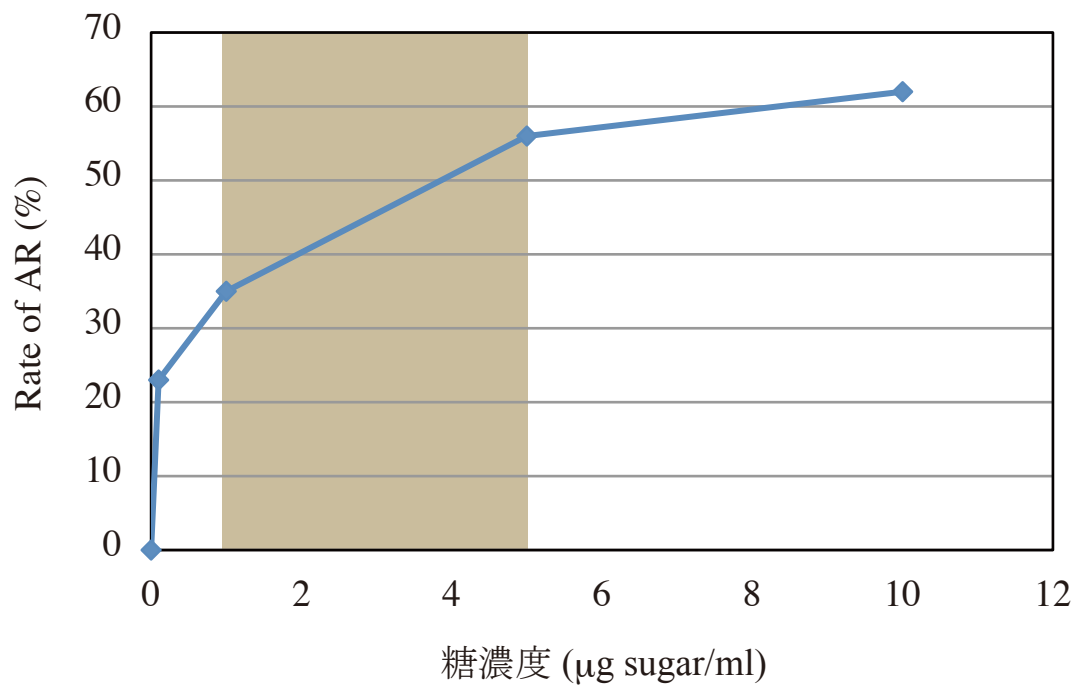


Fig. 2-10 ARIS の先体反応アッセイ結果

縦軸: 先体反応率, 横軸: 糖濃度,

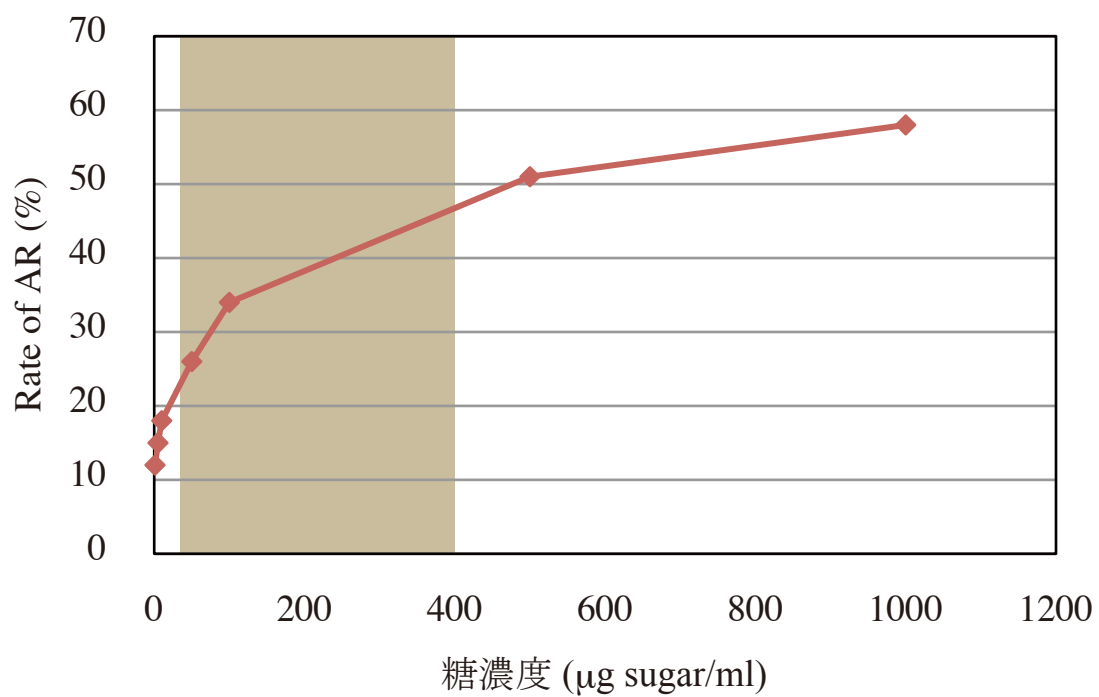


Fig. 2-11 Fr. 1 の先体反応アッセイ結果

縦軸: 先体反応率, 横軸: 糖濃度,

第3章 マヒトデ ARIS タンパク質の同定

3-1 緒言

ARIS の活性はその糖鎖 Fr. 1 が担っており、コアタンパク質部分には活性が無いと考えられてきたが、前章においてコアタンパク質によるクラスター化が ARIS の高い先体反応誘起能を保つために必要であることが示された。また、AFM 観察結果は ARIS コアタンパク質が相互作用することで高次構造を形成していることを示唆しており、ARIS コアタンパク質について解析を行うことで、ARIS の構造形成機構について、またゼリー層全体の構成が明らかになると考えられる。

卵外被構造形成機構について、マウスでは詳細に解明が成されており、ZP1, ZP2, ZP3 タンパク質は ZP domain を介して網状構造を作ることが知られ、ZP2-ZP3 のヘテロダイマーのポリマーを ZP1 が架橋すると考えられている (Greve and Wassarman, 1985; Wassarman, 1988)。ZP domain の N 末端側は特に ZP-N と呼ばれ、方向性を持って結合することで繊維状のポリマーを形成する役割を担っていることが X 線結晶構造解析を用いた研究から示されている (Monné et al., 2008)。

ARIS タンパク質部分については、Fr. 1 糖鎖が Ser/Thr 残基を介して O-結合型糖鎖として存在していることが知られているが (Muramatsu, 1965)、一次配列どころか構成成分も未知である。本章ではその構造を明らかにするために、SDS-PAGE による解析を行い、ARIS がいずれも Fr. 1 糖鎖を有する 3 つのタンパ

ク質から構成されることを示した。また、その配列を決定し、3つのタンパク質に共通する ARIS domain、AR-N 及び AR-C を見出した。この ARIS domain の配列はデータベース検索によって他の動物種にも保存されていることが明らかになったが、その機能は未知であり、新規の報告となる。

3-2 方法

マヒトデ, 海水の調整, 卵ゼリーの採集, ARIS の精製, 還元糖の定量,

第 2 章参照

ポリアクリルアミド電気泳動

タンパク質の SDS-PAGE は第 2 章参照。

Native-PAGE の際は、25 mM Tris, 192 mM Glycine 溶液を泳動 buffer とし、sample buffer には 20% glycerol, 0.0001% BPB, 0.0001% XC, 125 mM Tris-HCl, pH6.8 溶液を用い、XC が流れ出るまで泳動を続けた。

核酸の電気泳動は、泳動 buffer として TAE (2 M Tris-HCl, 1 M acetic acid, 50 mM EDTA (pH 8.0)) を用い、低分子量の場合は 5% acrylamide (Acrylamide : Bisacrylamide = 29 : 1) を APS, TEMED で固めたものを使用し、高分子量の場合は 1% Agarose-LE (ナカライテスク, Japan) / TAE を用いた。Acrylamide ゲルの場合は SDS-PAGE と同様の装置で 200 V, 20 min 泳動を行い、Agarose ゲルの場合は、サブマリン型電気泳動装置 Mupid-2plus (Advance Co. Ltd., Japan) を用いて 100 V, 30 min の泳動を行った後、Ethidium bromide (Nippon Gene Co. Ltd., Japan) もしくは、Cyber green (life technologies, USA) で検出を行った。また、塩基対サイズマーカーとして、1kb DNA ladder (life technologies, USA) を用いた。

PAS 染色

PAS 染色のためには、SDS-PAGE を行ったゲルを、セミドライ式ブロッティ

ング装置 Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)を用いて PVDF membrane Hybond-P (GE Healthcare, UK)に転写した。転写には、Transfer buffer (48 mM Tris, 39 mM glycine, 20% methanol) を用い、20 V, 30 min の条件で行った。転写後の membrane をまず 0.5% sodium periodate 溶液で 2 hr 振盪し、その後 0.5% di-sodium hydrogenarsenate, 5% acetic acid 溶液で 30 min 振盪、0.1% di-sodium hydrogenarsenate, 5% acetic acid 溶液で 20 min 振盪 × 2、さらに 5% acetic acid 溶液で 10 min 振盪した後、Schiff's reagent solution (ナカライテスク, Japan)に浸けて一晩振盪した。最後に、0.6% sodium pyrosulfite, 0.1 M HCl 溶液に浸し、検出を行った。

Western Blot

PAS 染色と同様な方法でゲルからタンパク質を転写後、5% skim milk / TBS-Tween (150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) に membrane を 1 hr 浸して振盪し、ブロッキングを行った。その後、0.2 µg/ml 抗 Fr. 1 抗体マウス IgG, 5% skim milk / TBS-Tween に membrane を移し、4°C で一晩振盪した。十分量の TBS-Tween で 10 min × 3 回洗浄を行った後、HRP 標識抗マウス IgG 抗体ヤギ IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA), 5% skim milk / TBS-Tween に浸して 30 min 振盪した。再び十分量の TBS-Tween で 10 min × 3 回洗浄を行った後、ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, UK) にて酵素反応を行い、ゲルアナライザーMolecular Imager FX (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) で検出した。

ARIS の脱硫酸

1 mg/ml ARIS 溶液を大過剰の 0.1 M pyridinium acetate-acetic acid, pH 5.4 に対して 4°C, 2day 透析した。凍結乾燥後、塩を 10 mg/ml になるように 10% MeOH / DMSO に溶解し、50°C, 12 hr 湯浴を行った。その後、反応液を 0.1 N NaOH で滴定して pH 9 程度にし、再び凍結乾燥した。最小限の脱イオン水に溶解後、最後に Bio-Gel P-2 担体 (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) を用いたゲル濾過クロマトグラフィー ($\phi 1.1 \times 5$ cm, 脱イオン水で緩衝化) を行い、素通り画分を回収、凍結乾燥したものを dS-ARIS サンプルとした。

N 末端配列解析

PAS 染色・Western blot の場合と同様にゲルから membrane に転写をし、Rapid Stain CBB Kit、及び Rapid CBB Destain Kit (ナカライテスク, Japan) を用いて目的タンパク質バンドを染色し、切り出した。Membrane 片は Rapid CBB Destain Kit を用いて完全に脱色し、脱イオン水で十分に洗浄した。その後、北海道大学共用機器管理センター委託分析部門へ送付し、自動アミノ酸配列分析器 Procise 492 (Perkin Elmer Inc., USA) による N 末端アミノ酸シーケンシングを行った。

hydroxylamine 分解

Crimmins らの記載に従って行った (Crimmins et al., 2005)。まず、電気泳動後に目的領域を切り出し、ゲル片をアセトニトリルに 15 min 浸した。その後、なるべく全てのアセトニトリルを取り除いてから、ゲル片を遠心エバポレーターで乾燥させた。乾燥状態のゲル片に hydroxylamine 溶液 (20% Hydroxylamine

Solution (Sigma-Aldrich Co., USA), 2 M NaOH, 2% Na₂CO₃-HCl, pH 9.0)を浸る程度に加えて、40°C で 5 hr 反応させた。分解後のゲルは SDS-PAGE sample buffer に 5 min 浸した後に、再び SDS-PAGE にかけた。

マヒトデ卵巣からの RNA 抽出と cDNA 合成

まず、摘出したマヒトデ卵巣を、氷上で冷やした 10 ml の D-solution (4 M guanidine thiocyanate, 0.5% sodium N-laurylsarcosinate, 25 mM sodium citrate, pH 7.0 / DEPC 水) に浸した。DEPC 水は、0.1% DEPC / 脱イオン水をオートクレーブ BS305 (TOMY SEIKO Co. Ltd., Japan) で 120°C, 3 hr 処理して作成した。卵巣組織をポリトロンホモジナイザーPT2100 (Ishii Laboratory Works Co. Ltd., Japan) で破碎した後、10 ml の飽和 phenol, 666 µl の 3M NaOAc pH 4.5, 2 ml の CHCl₃ を加えて混合し、15 min 氷上で静置した。その後、8,400 g, 20 min の遠心を行い、その上層を等量の 2- propanol と混合し、-30°C で 1 hr 置いた。8,400 g で遠心後、今度は沈殿を回収し、5 ml D-solution, 70 µl β-melcaptoethanol を加えて激しく混合することで溶解し、再び等量の 2- propanol と混合し、-30°C で 1 hr 置いた。そして、8,400 g で遠心した沈殿を乾燥させてから、300 µl の DEPC 水に溶解し、30 µl 3 M NaOAc と 1 ml 100% ethanol を加えてよく混合した後に、-30°C で 15 min 静置した。その後、15,000 g, 30 min の遠心後に上清を捨て、80% ethanol を加えてよく混合し、再び 15,000 g, 10 min の遠心を行った後に上清を捨てて乾燥した。最後に、100 µl の DEPC 水に溶解し、マヒトデ卵巣 total RNA サンプルとした。保存は-80°C で行った。

得られた卵巣 total RNA から、ReverTra Ace (Toyobo Co. Ltd., Japan) を用いて

cDNA 合成を行った。また、合成前には RQ1 RNase-Free DNase (Promega, USA) で処理をしてゲノム DNA の混雑物を除いた。

ARIS 遺伝子配列の決定

まず ARIS1 と 3 について、N 末端及び、内部配列から縮重プライマーを設計し、Quick Taq HS DyeMix (Toyobo Co. Ltd., Japan)を用いた PCR 法 (denature: 95°C, annealing: 40-50°C gradient, elongation: 68°C; 30 cycle) によって増幅した。サーマルサイクラーは iCycler (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) を使用した。プライマーの配列は Table 3-1 のように設計し、オリゴヌクレオチドは Greiner bio-one (Germany) に合成を委託した。

RACE 法による ARIS1, 2, 3 の全長配列取得に際しては、SMART RACE cDNA Amplification Kit (Takara Bio company, Japan) を使用して、マヒトデ卵巣 total RNA から RACE 用のテンプレート cDNA を合成し、Advantage 2 PCR Kit (Takara Bio company, Japan) を用いて、タッチダウン PCR 法(denature: 95°C, annealing: 72°C gradient, elongation: 72°C; 5 cycle → denature: 95°C, annealing: 70°C gradient, elongation: 72°C; 5 cycle → denature: 95°C, annealing: 68°C gradient, elongation: 72°C; 25 cycle)により増幅した。使用したプライマーは Table 3-2 の配列であり、オリゴヌクレオチドは Greiner bio-one (Germany) に合成を委託した。

塩基配列決定は Sanger-dideoxy 法で行い、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (life technologies, USA)、及び ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (life technologies, USA)を用いて行った。

配列データの登録

ARISI, 2, 3 遺伝子の塩基配列、及び全長アミノ酸配列は DDBJ のデータベースに登録した (<http://sakura.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>)。アクセッション番号はそれぞれ AB602892, AB602893, AB602894 である。

配列解析

塩基配列・タンパク質配列共に、GENETYX software (GENETYX, Japan) を用いて解析を行った。相同性検索には、BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を使用し、domain 検索には InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>), Psi-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 及び、TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) を用いた。

Table 3-1 縮重プライマーの設計

プライマー名	配列
ARIS1-forward	GCNTTYGGIGAYAAAYATGGA
ARIS1-reverse	TTRTGRTCICCDATNCC
ARIS3-forward	GSNTTYGGIGAYGAYAT
ARIS3-reverse	TTRTTRTCICKRAANCCRTC

Table 3-2 RACE 用プライマーの設計

プライマー名	配列
ARIS1-5R	GGAAGGGCTGGAAGTCGAGGATCCAGAC
ARIS1-3R	GCGAAGGTCACCCCGAGTGTTTTACCG
ARIS2-5R	GTNACYTTRTCRTCDATNGTYTGNCRAANGC
ARIS2-3R	GCNTTYGGNCARACNATHGAYGAYAARGTNAC
ARIS3-5R	TTAGTTGTCCGTCCAGCTCATTGACAGG
ARIS3-3R	CAAAGGATTCCTTCGATGTCGAAAGCGG

3-3 結果

3-3-1 電気泳動による ARIS 構成物質の解析

ARIS の根本的な構成物質を明らかにするため、まずは電気泳動による解析を行った。精製した ARIS に対して 7.5%ゲルで SDS-PAGE を行い、CBB 染色でタンパク質の検出を行ったところ、145 kD, 127 kD, 105 kD の 3 本のバンドが検出された。PAS 染色によっても同様に検出されることから、これらのバンドは糖タンパク質から成ると考えられる (Fig. 3-1A, 赤矢頭)。

先体反応誘起活性を担う Fr. 1 糖鎖がどのタンパク質に存在しているのかを調べるため、抗 Fr. 1 抗体マウス IgG を用いて Western Blotting を行くと、3 つ全てのバンドが検出された (Fig. 3-1A)。つまり、3 つの糖タンパク質はどれも Fr. 1 糖鎖を有しており、従って先体反応誘起能を持つと考えられる。また、巨大分子 ARIS は 3 種類の Fr. 1 修飾された糖タンパク質が複合体を形成することで構成されていることが示された。以後、これらのタンパク質を分子量の順に ARIS1, ARIS2, ARIS3 と呼ぶこととする。

これまで ARIS の精製には複数個体のマヒトデ雌から採集したゼリー層を用いていたため、ARIS1, 2, 3 は異なる個体由来のものである可能性もあった。しかしながら、1 個体由来の卵からゼリー層・ARIS を精製しても、やはり 3 つのタンパク質が検出されたため (Fig. 3-1B)、それぞれの個体が 3 つの ARIS1, 2, 3 を有していることが確認された。

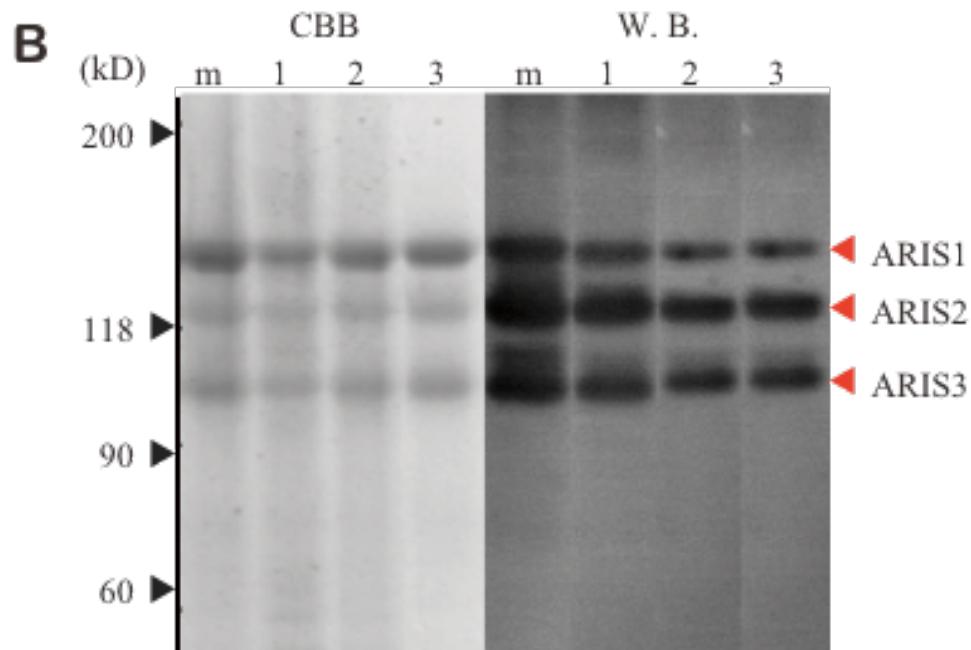
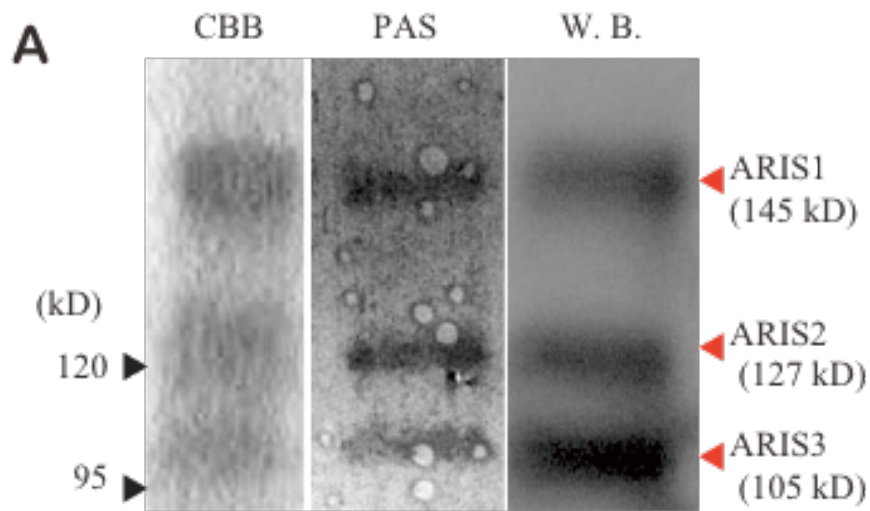


Fig. 3-1 ARIS の電気泳動による解析結果

A. CBB 染色, PAS 染色, 抗 Fr. 1 抗体を用いた Western Blotting によってそれぞれ検出を行った結果。

B. ARIS 構成物質の個体差の解析結果。1-3: 個体 No. m: 個体 1-3 から調整した ARIS の混合物。

全ての結果について 7.5%アクリルアミドを用いた。

3-3-2 Native-PAGE を用いた ARIS の性状解析

ゲル濾過クロマトグラフィーにおいて、ARIS が単一の物質として、また高分子量の大きいボイド画分として得られることから、ARIS を形成する 3 種のタンパク質は何らかの相互作用をし、巨大な複合体を形成していると考えられる。SDS-PAGE によってその分離が観察されることから、SDS による分子の変性や β -mercaptoethanol による還元がタンパク質間相互作用に影響している可能性があると考え、 β -mercaptoethanol による還元を除いた SDS-PAGE、及び SDS を用いない Native-PAGE による解析を行った。

β -mercaptoethanol による変性を行わずに SDS-PAGE を行うと、3 つの ARIS タンパク質の移動度はどれも減少した (Fig. 3-2A, 赤矢頭→青矢頭)。しかしながらバンドの数が変化しなかったことは、分子間の disulfide 結合が存在しないことを示している。移動度の減少は分子内 disulfide 結合の存在を示唆しており、SDS による変性後も各々の 3 次元構造が残り、見かけの分子量が大きくなったと考えられる。

Fr. 1 糖鎖は負に帯電した硫酸基を持つため、Fr. 1 で修飾された ARIS タンパク質は SDS に依存しない電荷が多く存在することが予想される。Native-PAGE 法によって、この Native な電荷のみによって電気泳動を行ったところ、ARIS は 3 つの分子に分けられた (Fig. 3-2B, lane 1 青矢頭)。ゲルの上から順に N1, N2, N3 と名付け、切り出して、SDS による変性を加えて再度電気泳動を行うと、N1, N2, N3 はそれぞれ ARIS2, ARIS1, ARIS3 と同じタンパク質であったことが示された (Fig. 3-2B, lane 2-5, 赤矢頭)。つまり 3 種のタンパク質の解離には SDS の関与は無く、ただ電気泳動によってゲルを通過することが解離を引き起こしている

考えられる。従って、3つの ARIS タンパク質は非共有結合的な弱い相互作用によって巨大な複合体を形成していると推測される。

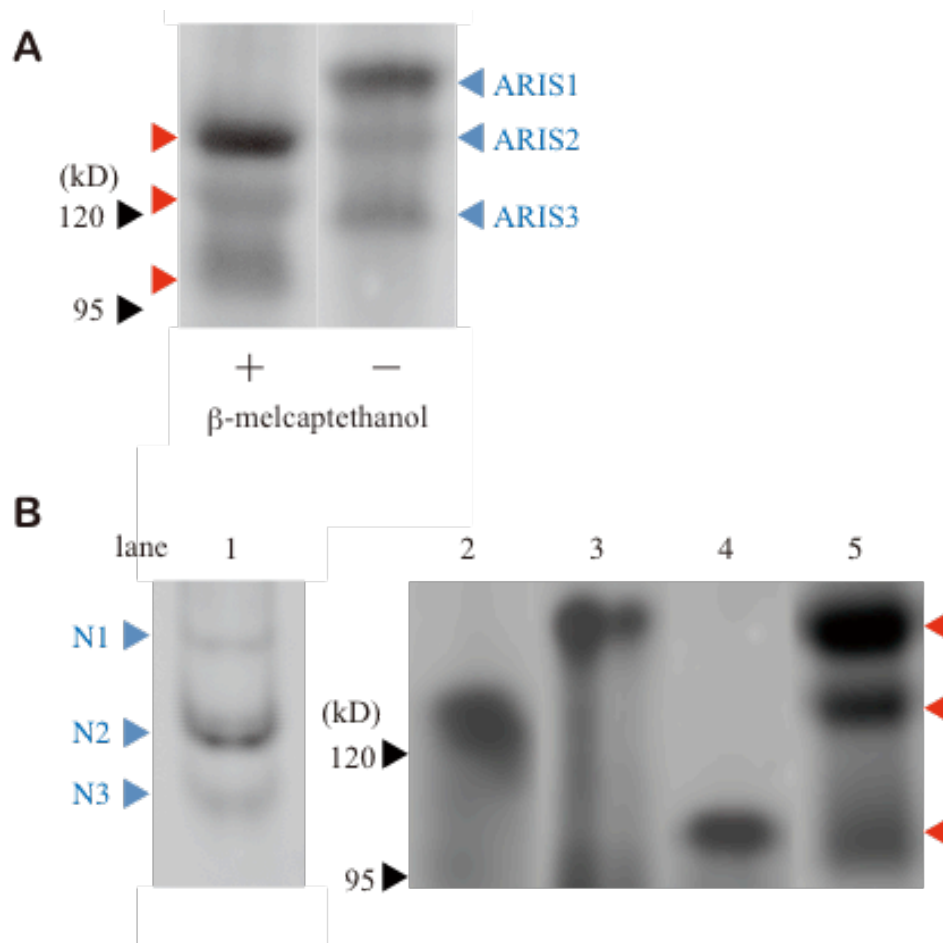


Fig. 3-2 ARIS の SDS-PAGE, Native-PAGE による解析結果

A. β -mercaptoethanol 存在下、非存在下における SDS-PAGE 結果。

B. lane 1: Native-PAGE 結果, lane 2-4: それぞれ N1-3 の SDS-PAGE 結果, lane 5: ARIS の SDS-PAGE 結果。

全ての結果について 7.5%アクリルアミドを用いており、検出は CBB 染色で行った。

3-3-3 脱硫酸化 ARIS の解析

Fr. 1 糖鎖が ARIS の活性を担っているという根拠の一つに、脱硫酸化された ARIS が活性を失うという報告が存在するが、脱硫酸化反応の際に ARIS のタンパク質部分が intact な状態であるかは疑問が残っていた。本節では、脱硫酸処理によって ARIS のタンパク質部分が分解されていないことを確認し、その活性をみることで、ARIS タンパク質部分が先体反応誘起に関して直接的な活性を持たないということを証明する。

先行研究 (Koyota et al., 1997) より、反応温度を調節することで、Fr. 1 の 1 ユニットの持つ 2 つの硫酸基のうち、片方だけを選択的に脱硫酸化することができる。この穏やかに脱硫酸化された ARIS を dS-ARIS と名付け、使用することとした。SDS-PAGE により確認をすると、dS-ARIS は intact な ARIS とほぼ同様なサイズの 3 本のバンドに分離され、濃度の減少もほとんど見られなかった (Fig. 3-3A)。一方で、抗 Fr. 1 抗体を用いた Western Blot ではこれらのバンドが検出されず、Fr. 1 糖鎖が特異的に破壊されたということが確認された (Fig. 3-3B)。

Native-PAGE で解析を行うと、移動度の差が明確に見られ、dS-ARIS は ARIS と比較して移動度が減少していた (Fig. 3-3C)。dS-ARIS では Fr. 1 の片方の硫酸基が失われたことにより、ARIS1, 2, 3 それぞれの総電荷が減少したこと起因すると考えられる。

最後にこの dS-ARIS の先体反応誘起活性を調べたところ、ほとんど活性が無いという結果が得られた (Fig. 3-3D)。つまり、タンパク質部分が直接的に活性に影響しないということが強く支持された。

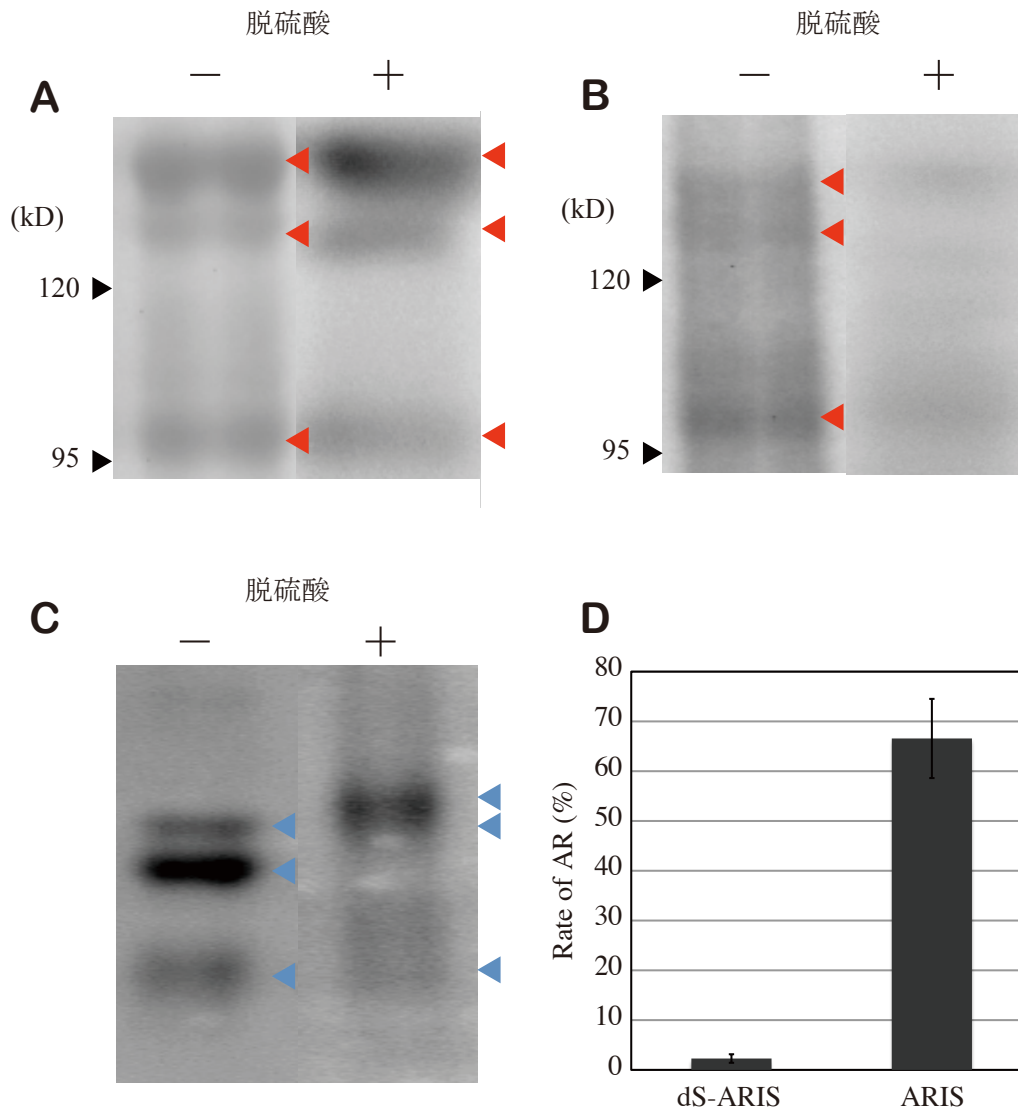


Fig. 3-3 脱硫酸 ARIS の泳動結果と先体反応活性

A. dS-ARIS の SDS-PAGE 結果。 **B.** dS-ARIS の Western Blot 結果。 **C.** dS-ARIS の Native-PAGE 結果。

D. dS-ARIS を用いた先体反応 assay 縦軸: 先体反応率

3-3-4 ARIS のアミノ酸配列解析

ARIS を構成する 3 つの ARIS タンパク質の実体を知るため、エドマン分解による N 末端アミノ酸配列シーケンシングを行い、部分アミノ酸配列を得ることとした。N 末端アミノ酸配列は Table 3-3 のような結果となり、BLAST を用いたホモロジー検索を行っても類似タンパク質は見出せなかった。

そこで、次にタンパク質内部のアミノ酸配列を得ることを考え、glycine 残基 – asparagine 残基間のペプチド結合を選択的に切断する反応である hydroxylamine 分解を行った。その結果、ARIS1, 2, 3 それぞれが hydroxylamine 分解によって複数の断片を生成することが示された (Fig. 3-4, 橙矢頭)。この得られた断片 ARIS1a, ARIS1b, ARIS3c (Fig. 3-4, 赤四角) の N 末端配列をシーケンスすることで、ARIS タンパク質の内部アミノ酸配列が得られた (Table 3-3)。これらの配列は N 末端に asparagine 残基を有しており、hydroxylamine 分解によって特異的に得られたと考えられる。

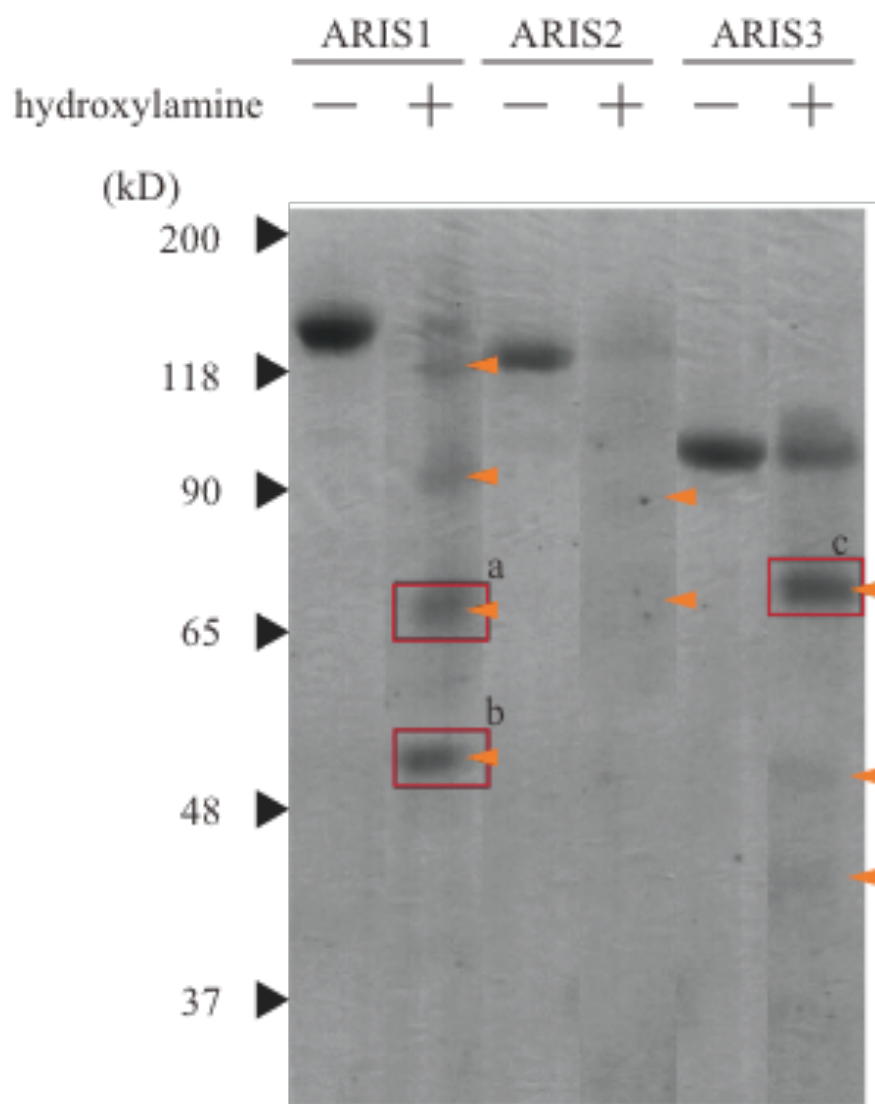


Fig. 3-4 ARIS1, 2, 3 の hydroxylamine 分解結果

橙矢頭: hydroxylamine 分解によって生成した断片。

赤四角: エドマン分解のために十分な濃度が得られたバンド (ARIS1a, ARIS1b, ARIS3c)。

15%アクリルアミドゲルを用い、検出は CBB 染色で行った。

Table 3-3 N 末端アミノ酸配列シーケンシング結果

ARIS1	NH ₂ -AFGDNMDDK
ARIS2	NH ₂ -AFGQTIDDKVTDF
ARIS3	NH ₂ -GFGDDI
ARIS1a	NH ₂ -GXXLVAE
ARIS1b	NH ₂ -GIGDHN
ARIS3c	NH ₂ -GDGFRDNKIT

3-3-5 *ARIS* 遺伝子・*ARIS* タンパク質全長配列決定

部分アミノ酸配列が2カ所以上得られれば、縮重プライマーを設計し、PCRによって挟まれて増えてくる領域のクローニングは容易である。よって、まずTable 3-3の部分アミノ酸配列を元に、縮重プライマーを設計し、*ARIS1, 3*をコードする遺伝子断片をクローニングした。さらにRACE法を用いて、*ARIS1, 2, 3*をコードする遺伝子の全長配列を取得し、*ARIS1, 2, 3*のタンパク質配列も決定した(Fig. 3-5, 6, 7)。

得られた配列に対して、既知domainの探索を行うと、Signal peptide領域 (Fig. 3-8A, 紫下線; Fig. 2-8B) と Transmembrane領域 (Fig. 3-8A, 水色下線; Fig. 3-8B) が3つのタンパク質に共通に見られた以外には、*ARIS1*のみにFA5/8C domain (Coagulation factor 5/8 type C domain) (Fig. 3-8A, 緑下線; Fig. 3-8B) と Kringle domain (Fig. 3-8A, 黄下線; Fig. 3-8B) が存在したのみだった。しかしながら、3つの*ARIS*には全域に渡って相同性があり、serine, threonine (Fig. 3-8A, 赤字), cysteine (Fig. 3-8A, 青字) 残基が特に保存されていた。*ARIS1*の2つの既知domainを挟んで、N末端側をAR-N domain (Fig. 3-8A, 赤下線; Fig. 3-8B), C末端側をAR-C domain (Fig. 3-8A, 青下線; Fig. 3-8B) と名付けた。

組織別の発現解析を行うと、精巣や肝臓では*ARIS1, 2, 3*の発現は見られず、卵巣特異的に発現していると考えられる(Fig. 3-8C)。

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 RAGCAGTGGTATCAACGCGAGGTACGCGGGGATTCATTTGGCCGCCCTGCCRAGCTGTGTGGTTTTCTGARAGCCGTCTGTTGTCGAGATTGTC

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 CGGTTTTAATAGTGGTTGCTTTTTTCACGATTCARTTGCATAGTCTATAAATGAGTATACGCGACTGACTTCAARTAGGCTGAGCTCGAARACGTAAGAG

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 CTTGTAATTTCTAGCTCAGAGGTTCTATTTAATCCGAAAGGTCGCCGCCGACTACGAGATGTTGGTACTTCGCTATGCTGCTGCCTGGTGGTTC
 M L V T S L C C C L V V L

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 TGGGTTTGGCGACGCCGGAGCCCGGGCAGCGTTTGGTGACACATGGACCATGGAGAGACGACCTTTGAGAGATGGGAAAGCCACGGTCGACGT
 G L A T P G A R A R A F G D N M D H G R D D L F E K M G K A T V D V

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 GTTGACATCGTAGCGGTCAAGTACAGCTGGATGTAGCATTAGAGAGACCCATCGGACAGATGAGTCTGGATCCTCGACTTCAGCCCTCCACAC
 F D I V D G Q V Q L D V A L E D T I G Q D E V W I L D F Q P F Q H

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 AACATAAATCTAATCGACCGATTCATTGAGAAATGGAGGCAGCTTGGTGGCCGAGATACAGGACCTGTTCAARTGTCTTTACCACTCTGCCATTTG
 N N K S N R P V I Q E N G G S L V A E N T G T C S N V F T T L P F D

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 ATTCGAGTACAGGTTTCTACAAAGATTCCTACACCCCACTATCCAGGACCAATCATTTGTTCTTACTACGAGACAGGGTCTGAARTCATTCACA
 S S T G F Y K D S Y T P N Y P G T K S L F S Y V E T G S E I I Q Q

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 AGGCGACATGAGAAATACGAGAGGATCACATCAGCTTTTATGGGTTCAATGGACACCTGTTCAACTGTAAAGACAGCAGCATGAARACAGTCTGGGAGAA
 G D M R I R E D H I T F M G S M D T L F N C K D S D D E T V W E K

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 GAGGTGACTGCTGATGCCATTGAGTTCARTGCGACACTGTACATGACCAACGTACGGCCTCAGGGAGTGGARCCATCCGGACACAGCCTATGTTCA
 E V T A D A I Q F N A T L Y M T N V R P Q G S G T N P E P A Y V Q S

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 GCTTTGCTATACTGTACTGGAGGTTGCTCAGAGTGCACCTTTACGATTTCTAGTTAGTTCTACTGAGCGGTTACAGCCATCTTTGAGTTCGCTATTGT
 F A I L Y W R L L R V A L S R F L V S S T E R L Q P I F E F A I V

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 CGAGGCTGTATCTAARTGACGATGAGGAATATGGGTTTGACAGGTCAGAGCCGAGGTGCAGATTGCCTTCCGCACCGTACGAGACACCAACAGGT
 E A V Y L N D D E E Y G F D R S R A E V Q I A F R T V T D N T N G

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GAGCTGATCTCTGTCTACAGATCAACACTCTGGTGTATGATCCAGCTGATAGTGTATAAGTGAATCAGCCACGTCAGAGAACCCCGAGCAGTGGAT
 E L I S V Y K I N T L V Y D P A D S V I S E I S H V K R T P S S G C

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 GCGACAAACCGCTTGGTGTGAGAGCAGTAAATCATCGGCGATGGTTTAAATACGGCATCTTCCATTGGTTGGAGGTAATAGTCTGGAGTACAGCCC
 D K P L G V E D S N I I G D G L I T A S S Y W L E G N S L E Y S P

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 CGATAAAGGTAGATTGACGCCAAGGCTGTGAGACCATCAGCGTGGGATGTGGATGGCTGGTTCAACCGTCGACCAATGGATACAGGTGGAATCCCA
 D K G R L N A K A V E T I S A G M W M A G S T V D Q W I Q V E I P

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 TCTGATAATCTGTGGGTTGCCGAGTCAATGACCCAGGGTTTGGAAACAGGACATCAACATGTGGGTTAGAGAGTTTTATGTTGGCTACCAAGTTGGCG
 S D N L W V S G V M T Q G F G N E D I N M W V R E F Y V G Y Q V G V

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
TTGGCACATTTAACCTGTTCTGAATTCGCAGGAGCTACACATATATTCACCGGGACTATGACAGTCATACTATCGTACCATTACTTGGATGCACC
G T F N P V L N S A G A T H I F T G N Y D S H T I V T N Y L D A P

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
TGTTTCCACGGATGCARTCCGTATATACCCACGGATTTGAGAACACATGGCTCTACGATTTGAGTTGTTAGTATGCGAAGGTCACCCCGAGTGT
V S T D A I R I Y P T D F E N N M A L R F E L L V C E G H P E C F

1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
ACCGATGCCARTGGACGGATTATCGTGGCAGTGCACCAACGGTGTCCGGGACGACTTGTACAGATGGTCTAGTCAGGACCCACATGCATTCC
T D A N G T D Y R G T V H Q T V S G T T C Q R W S S Q E P H M H S F

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
TTAGTTGGGAGARTGACAGAGACACCGGATCGGCGATCACAACTTCTGCAGAACCCCGACGGCCAAACCCACCCCTGGTCTACACCTCGATCCCT
S W E N D R D N G I G D H N F C R N P D G Q T Q P W C Y T L D P L

1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
GTCACCGATGGAGTTTTGCGATGTGGGAGCAGCGCCGTTTCCCTGTGACCAATACCCGACCCGAGCAGACCCCGAGCTTTACGTCACCTATTACGCA
S P M E F C D V G A A A V S C A P I T A P E A D P E L Y V T Y V A

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
CCGACTGCACCTTCACTGAGTGGGAGCAATCCTGCACACAGAGCTGGTTATTTGGTGGTTCTAGAGTGGACACTACAGCTGCAGTTACAGATGC
P Y C N F T E W E Q S C T Q S W L F V V V L E V D T T A A V N R M P

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
CAATAGACGCTACAGGGGAGTTCACATTTGAGTTTGGAGCGTACACCTGTCCATACARTGACCCGCTCTGCGTGCAGCAAGTAGATGTCCCTAATGCTAT
I D A T G E F T F E F E T Y T C P N N D R S A C S K V D V P N A I

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
CATATCCACGAGATCACTCTGCARACACCGTGGAGATTGTTGACGATGTTAAGACAGCCCAAGGATTTACTTGAAGAAAGTGCATGGGGAGATCCA
I S H E I T L Q T T V E I V D D V K D S P R I Y L K K V H G E D P

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
ACAGTAGATATTCGAGATGGGTACCGACCTGGCGTCTCTCATCTTGAACCGGTGACCGTTGATACGCATTTCTCCAGAGTTTCTGAGGACCAACCTGC
T V D I R D G Y R P G V S H L E T V T V D T H F F P E F L R T N L Q

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500
AGCTAGAGTTGACCTGTTTCATGGTGTGCATCGGCCGAGAGTTTAGAGATACCCGATGGCTGCCTTGGGGCTCCAGTTGACAGTCCACACAGCTTA
L E L T L F M V C I G R E F R D T P D G C L G A P V E Q S Y T A Y

2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600
CGTTTCCCCCGAGTTTCTGTACCGTTTGGACCCGACCAATAGCCACTCACCCCGACAGCATTGCCACATCCCCACAGTCCCTCGAGTCACACGACTAC
V S P E F L Y R L S T D N S L L T P D S I A T S P Q S L E S H D Y

2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700
ATCCACAGCGAAGAAATCCATCGCTCGCTCTTGTCAACAGGCTCTCTGCCATGTCCAGGGAGTACACCATACAGACGCTTTCAGGCTGGTAGAGC
I H S E E I H R S L F V N K A L S A M S R E Y T I T N V F R L V E R

2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800
GGACTGACCGAACAAAGAGGGACATCCACACGACGCGATGTCAGGACAGGATTAACGACCCCATCGCCGTGCATCAGGCCATTTATTTCAAGGGATGCCC
T D R T K R D I Q R R D V K D K I N D P I A V H Q A I Y F K G C P

2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900
GCCGACTCCACCCAGTGGCCAGGCTACGCTCGCTCTGCGACACAGGGAGAGATGTTTCCGAGACTAATTTCAAGTGCAGAGATCTACAAAA
P N S T H V A K V Y A C V C D N K G E M Y S E T N F K C E R S T K

2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
GGGATCGTGTACGAGGAGGGTGTACCCCTCGGATGATCGCGAATCCTCAGATGGCGAGATTCARAGGAGGAGGAGAAAGGGAGGGAGTGGTTC
G I V Y E E G V P S D D A E N P Q D G G D S K E E G R K G K G V V L

3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100
 TACGCGCCGTTTTATCCACTACTAGTCTGTCTGTTGGTCTCGCCGTACTTCTAGCTGTAGCTTTGTAATGGCTCTCCTCCATTCAACCAACCAATCGG
 T A V L S T T S L S V G L A V L L A V A L *

3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200
 ACAGAACAGCTAAATCCCACCTTAGGTCCCACAGTCTGCTTGTGGTCTCTCCATCCTTCTAGCTTTGACATTGTGCATCGTTCTCAATCCGTTCAAC

3210 3220 3230 3240
 CAATAGCAATTA

Fig. 3-5 *ARIS1* 遺伝子・ARIS1 タンパク質の配列

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 AAGCAGTGGTATCAACGACAGATACGCGGGAGAGTCCAGCTAGTCGCCATACTGGAGGTTGTCCATCGACTGAGCTCTCATACGTCTTGTGTTGTARAC

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TTGGCACGCAGAGCAGCAGCGTGTAGAAATCCACGGCTTAAGCACATAGATCAGCAACCATGGCCGTCCTCAACTCGAGACTTACTTCTTTCTAACCCCT
 M A V Q L E T Y F F L T L

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 CTCACGTTCCGCATACTCCCCGGGGAATCTGAGGAGCTTTCCGGCCAAACCATCGATGACCAAGTGACAGATTTTCGCTTCAAGATATGGGGGAGCCCT
 L T F A I L P G E S E A A F G Q T I D D K V T D F R F K N M G E A Y

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 ATATACCAGAGTTTGAGATAGTGCACAGCAAGCCAACTTCGAAGTCGTTTTGGAGGACACACTAACCAGAGCCGAGTATTGGGTGGTAGACTTCGAGCC
 I P E F E I V D S K A N F E V V L E D T L N E A E Y W V V D F E P

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 GTATACATGATAGAACACTGCTGTAGATCCATACACTGGGGATATCAACCCAGACACACTGGTGATGTTCTAATGTCATGTTTGTATGCACCGTAC
 Y N M N K N T A V D P Y T G D I N P D N T G E C S N V M F D A P Y

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 AATCAGCAAGACGTGGCTGCTGGATACTTTCAGTGATGTCGGCACTTCATATCTCGTACGTCGAGCATTCTAGATACCCAGAGCAATGGAGACAGTG
 N Q Q D V A A G Y Y F S D V G N F I S R N V S I L D D Q S N G D S V

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 TACATAGCGTCTCTTCACTAGTTACGTCGAGGACAGTCCCTTCACTGATATTGACAGCGATGGTGTGATATACAGAGCCGAGATTATATCTTATCATT
 H K R L F T S Y V R G Q S F T D I D S D G V N I Q R R D Y I L S F

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 CAACCAAACTTTGGGTTCTTTTCAACTGTACAACACCATGGGAGAAACATCTGGAGTTTTGCAAAATACACCCAGACCCATTGAGTTCGGATCCACA
 N Q N F G F F F N C T N T M G E N I W S F A N T T D T I E F R S T

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 ATTTACTTTACGAATGTTCCAGCCAGTGGATCCAGCAGATGGTACAAAGGGTATGTCCTTGGGTCACATCAATGTGGATCTTATATACCGTCTAAACAGAG
 I Y F T N V R P V D P A D G T K G M S W V T S N V D L I Y R L N R V

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 TTGCCATCGTTAATTCATTGTCAAGTCCACCGCTCTGGTGAACACAGTACTGGACTTTGTTATCATTGAACCATACTTTGATGCTCAGGGAGATCCTGA
 A I V N F I V S S T A L V K P V L D F V I I E P Y F D A Q G D P E

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 GCCAAACAGAGCGTCAATTTGAGATTCATTCAGACCACCATAGATCAGCCGGTGGTGAACACTGGCACTGTACAATGCACATCACTTCAATATATT
 P N R A S I E I Q F Q T T I E S A G G E L L A L Y N A T S L Q Y I

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GCACGAGACCAAGTTGCAGGTGAARATAGCAGTCTCAATTTGGATCTGGACTATATCTATCCGGACGGCTCACAAACAGTGTCAATACGTAGAAACCCGACA
 A R D Q V A G E N S S L N L D L D Y I Y P D G S Q Q C Q Y V E T D K

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 AATGCCGACAGACCTGGCTGTTCAATTCGTTATTGATCTAACCCTGGGAATCGTTGAGAAAGTACTTGCCTATCGATGCACAGGTACCTTTAAATTCGG
 C R Q T W L F K F V I D L N V G I V E N D L P I D A T G T F K F R

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 GTTTCCAAACACCAAGTGTGTCGACGCGACCGAGGCCAACCCAAAGTATTGCGTTGACCTAGGCCTTGACCCCTTCCACCATCTCTCTTGAAGGTCACCATA
 F A K H Q C V D A T E A N P S D C V D L G L D P F T I S L E V T I

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 CAGACGGTTGTACAGTTGTGACGCAACGAAAGACAGCCCGACCGTCAATTTGGTCTCCATGAGCGGCGCGAATGGAGAGGATCTACGGGGTGGTGTGCG
 Q T V V Q V V D A T K D S P T V I L V S M S G A N G E D L R G G V D

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
 ACCCCCAACACGTTGGAGTTAATCACCTTGAAGATGTCAATATCGTAGTCAATACACTCCCGAGTTCCTGCGAGTGATTTTGACCTTGATTTGACCCCT
 P P T R G V N H L E D V N I V V K Y T P E F L R S D F D L D L T L

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 CTTTCATGGTGTAGGAGGATAAACAACACTCCCGAGGGGATGTCTGGATGTAGAGATCAGTACCGTTATGTGGCTACCAAGTGAGTTCTTCAGA
 F M V C K E D K T N S P G G C L D V E I S N R Y V A Y Q S E F F R

1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 TATGCATACGTGGCAGTAGAGGAGGAGAGTAACTTTACACACACACCGATCTTGATGATGATAAATCTGTACAGAGCCTCACACCCACACGCATACG
 Y A Y V A V E G G E V T S Y N T T D L D D D N T V Q S L T T N A Y D

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
 ATTGGCAATGAAGTGTACATATAGGGTTCACCAACACTGCCCTGTCCCGAGAGGTTGTCTACAGATCAGTACAGTCTTCAGACTAATCGAGAA
 S A N E V Y N I G F T N T A L S Q E R L S Y T I T T V F R L I E K

1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 GCCAGGTAGAGACGACGAGCTAACCAACCCCAACACACAGATGTTCTCAACAGATTCGGTGGGATGGGTGGGATAGCTGGTCTGGTCCCGTACGGACCC
 P G R R R R A N Q P Q Q Q M F S T R F G G M G G I A G L V P Y G P

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 CCAAGACCCGAGAAAGACGTGGTATCATGAGCGCCGCGCACTACCACAAGGTCAATTTGTCGAGATGACGTTTACGGGTGCCCTGAAACTCGACTT
 P R H R E R R G I M S A A A L P Q G H F V E M T F N G C P E N S T F

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
 TCTCACCAGCAGCTACCACTGCGAGTGCACCGTGTGCGAGAGACGTACAGCAAGAGACCTTCACATGCCAAGGATCCAGTCACTTGGCCCGATCA
 S P A S Y H C E C N R V G E T Y S K E T F T C Q G S K S L A P D Q

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
 AGAATCATCAATGTTAGAGCAAGGTGCCAGACTCCAGTGGGGCTCCCTCTATTGTTGCTAATACGCCCTCTTTGTTGATTTTATAGTGTGATT
 E I I N V R D K V P D S S G A P S I V A N N A L F V C I F I V S I

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 CTTATTATGTATGTAATAATATTGCGACAGACTGTACACAGTATAAATGTACACTTAATGGTATATATTTATAGAGGTTTATTCACAGTAAACATA
 L I M Y V K *

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500
 GTTCATAGTTTATATACTTTTGGCACGACGCACTCTAATCTTACACAGAAATCTAATTTAGTTTATTTTATGGCTATTGTTGTCACCCCAAAAAA

2510
 AAAAAAAAAAAAAA

Fig. 3-6 *ARIS2* 遺伝子・*ARIS2* タンパク質の配列

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 AAGCAGTGGTATCAACGTAGAGTACACGGGGATTTCTGTTTAGGGCGTAGCTCGATTGAGGAGTTTTCTTTCTGTTGATTCTTTCTGATGTTTTTTGATA

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 GTGTAAATTATTATCAGTCGGTCTGAGGCAATTTTTGCAAGGTGACGGGAGATGTTTTTCTACGGTGGTATGGCTAGGCTGTTCTTTGGGCTCGTGT
 M F F Y G G M A R L F F G L V L

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 TGGTGGTCTGCTCGTCAGARTGAGTAGAGCGGGCTTCGGTGACGACATTTTACAGACACGAGATACAGATTTCGCAARTATGGGCGAGTCAAAA
 V V L L V R M S R A G F G D D I S Q D N E D N R F A N M G Q V T K

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 GGATTTCGTTGATGTCGAAAGCGGGCTGGTACCCCTGCAGCTCAATGTGCAGACACTGAGGGATCAAGGAARTCTGGATTCTGGACTTCCACCTTAC
 D S F D V E S G V V T L Q L N V Q D T E G I K E I W I L D F Q P Y

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 AGATTCAATATAGATGCATGCCTGTCATGAGCTGGACGGACACTATGATGACCCAGACGAGTGAATGTTCAAGTGTGACGAGACAGCATCTTGGAA
 R F N I D A M P V N E L D G Q L M M D Q T S E C S S V Y E T A S W N

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 ATGACTACTTCAATGACACGACTTCACTGATAGGATTCAACAGGACTAGCCTCAAGAAACTCTTCACTCAGTTCACCTCGAGGATCACTAATGGAGA
 D Y F N D T Y F T D K D S T G L A S K K L F T Q F T R G S L N G D

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 TGGTTTTGAGACACACAGATCACCTTCACTGGGGATATGGGGTTATTCTTTACCTGCAGGACTCTATCAATGAGATTTCATCTGGCAARTGACGGAC
 G F R D N K I T F T G D M G L F F T C K D S I N E D F I W Q M T D

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 ATTACCGACGACGAARTCGAGTATCGCACCAACTGTACCCACCAATGTGACACCAAGAGCCCACTTGTATCTACTGGAGGATATCTTTTGTGCAAT
 I T D D E I E Y R T K L Y T T N V R P K D P L V S T G G I S F V Q S

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 CGCACATTGAGTTGATTTGGAGACTGTCTCGCTCCGCTGACAAAGTTCCCTCATCAGTTCCACTGCTCTTATCAGACCCATCCTTGAGTTTGCACGAGT
 H I E L I W R L S R S V L T K F L I S S T A L I R P I L E F A R V

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 GACTGCCGTCTACGATGCCCTGGATAGAGCTGTCCCAACACAACTGCATTACACATAGGGTTCCGTAATGTGGTGCAGCTCTGATACCCAGATGTTATCT
 T A V Y D A L D R A V P T Q S A L H I R F R T V V D S D T Q M L S

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 TATACACGGACAGTCTGGTCTACGACCCCGATATACAAACCATGGCATCAATGCGATTGACTATCAACACAGACGGTACTCTGGATGCTGCACCCAGACT
 Y N T D S L V Y D P D N T N H G I N A I D Y Q P D G T L D A R A P D C

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GTGAGTTTAAACTTGATGAGGAACTCAAAACCCAGCTACAGTGCCAAACAGACCTGGGAGTTCAAACTGGTCTTGTGATGTTGGATACATCAGGTCAGTTGA
 E F K L D E G T Q T Q L Q C Q Q T W E F K L V L D V D T S G Q V D

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 TAACAGATACCCGTTGATGCCAGTGGACATTTGAGTTTTACTTCACTCTCTATGGATGTGAAAGACCAACAAATGAGTTTGATAAAGCCACTTGTCAA
 N R I P V D A S G T F E F Y F T L Y G C E K T N N E F D K A T C Q

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 CAAGTGGGAACGGATCCAGCCAGATCTCTGCTCTGATTACARTCCAACGACAGTGTATTATCAAGATATGGAAGACGACCAAGTGACCATCATCCTAC
 Q V G T D P A K I S A L I T I Q T T V F I Q D M E D D Q V T I I L Q

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 AGTCACTTACTGGTCTGAAATGAGACCCGAGTTACGGGACCGGTTCCAGAGGTGTGGCTCACAAAGAGACCGTTGACCTCAAGGTCAGTTCTCACCC
 S L T G A E N E D P S Y G T G S R G V A H K E T V D L K V K F S P

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
 AGCCTTGCAGGAGGGACTATGATCTAGATCTACTTTTGTTCATGGTGTGCAGGGAGAGAGTACGCCAGCGATACTTATGCCAGGGCTGTTTAGAG
 A L L R K D Y D L D L L L F M V C K G E E Y A S D T Y A Q G C L E

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 GCACCCGTGATGATCGTTACGTGCCCCACCGAGATGGTTCATTTAGTTTCATACCAGGGTAGCAATGAAATGGCACACACTCCTTGATGATACA
 A P S S D R Y V A H R D G S F S F I P R V S N E N G T T L L D E Y N

1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 ACTCCAGCCATGTGGCAGAGGACACGTATCACCCATTAGAGAGTCAAGATACTTGCSTGAGATGAATCTGGACAGGGCTGGCAGTTCTGTGCATCA
 S S H V A E D T Y Q P L E S Q E Y L R E D E S G Q A L A V P V H Q

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
 GTCRAAATTTGTGACGTCGCCCTCTCTGGAGAATCGGCCGTCTATACCATCACTACAGTCTACCGACTCGTAGAGCGGCTGCAGGTACCACCTCCGTAG
 S K F V N V A L S G E S A V Y T I T T V Y R L V E R L Q V P L R K

1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 CGAAGGGCAACCTACCAAGATGCACGACGTCACTACTCCAGAGCGTATGGGACGGACAGGACAGGAAATCCACCGCACATCATCGAGCGAC
 R R A T L P K M H D V I L S K S V W G R T R T G K S T G T I I E R H

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 ACAGCCGGGATGTTGAGACAGCGCGAGAGACACCCACGGTCACGCCGTTCCGTTCCAGACCATGGGATGTCCGGAGGATTCGGAGCACATCCAGGAGGA
 S R D V E D S A R D T H G H A V P F T T M G C P E D S E H I Q E E

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
 ATTGACTGCAGATGTCGGTGGCAAGAGTACAGCTTGAAGACATTCGAGTGTCTGGAGCCAGGAGCCGAGGTGGATGTAGAGGAGGAGACTAATGAG
 L D C R C P V G K E Y S L K T F E C L E P G A E V D V E E E T N E

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
 GTCCAGGAGGAGACCAACGACGACGAGAGCGACCTCAGAAACCCAGGCTCTAAGACAGGAATGGCTCCTGCCACTAGCTGCACCTTGTGGCTCATAGTGA
 V Q E E T N D D E D D L K K P G S K T G M A P A T S C T L W L I V T

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 CAGCTAACGCCATCATTGTCCCTATGAGATGCATTGATAGAGACCTATTAATTTATAGACACTTACACNGAGAGTCAACGGGCACCTCCAGAGTTGC
 A N A I I V L M R M H *

2410 2420 2430 2440 2450
 GCCAAACCAARTAGATTTAGAGCGGCTCGGGTTCGTCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 3-7 *ARIS3* 遺伝子・*ARIS3* タンパク質の配列

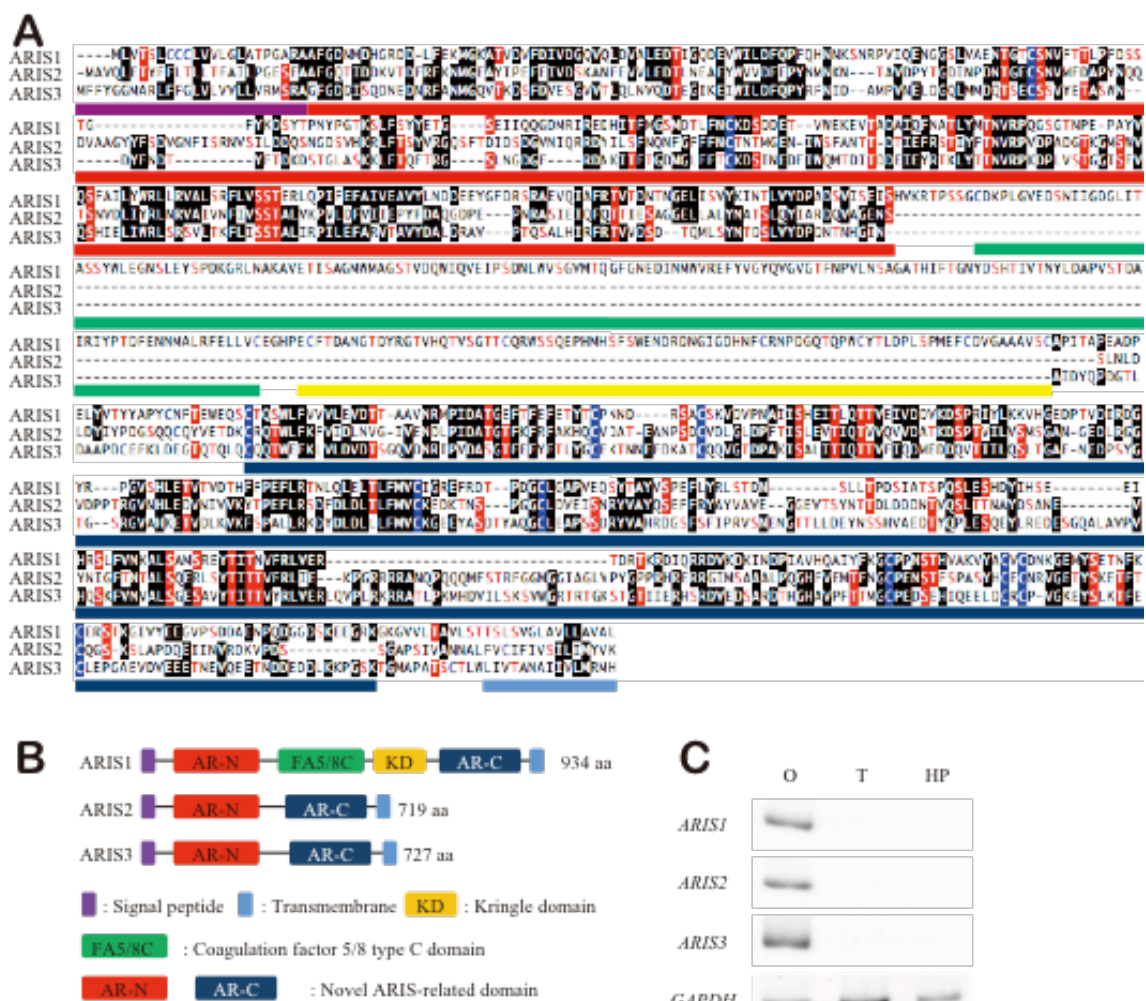


Fig. 3-8 ARIS タンパク質・遺伝子の解析結果

A. ARIS1, 2, 3 のアミノ酸配列比較。紫下線: Signal peptide 領域, 赤下線: AR-N domain, 緑下線: Coagulation factor 5/8 type C domain, 黄下線: Kringle domain, 青下線: AR-C domain, 水色下線: Transmembrane 領域。赤字: serine, threonine 残基, 青字: cysteine 残基。**B.** 3つの ARIS タンパク質の domain 構造。**C.** ARIS 遺伝子の発現解析。O: 卵巣, T: 精巣, HP: 肝臓。

3-3-6 ARIS 類似遺伝子の探索

BLAST を用いたデータベース探索より、3つの ARIS 遺伝子とそれぞれ類似した遺伝子群が見つかった (Table 3-4)。棘皮動物門に属する *Patria miniata* (ヒトデ綱), マナマコ *Apostichopus japonicus* (ナマコ綱) を始めとして、脊索動物門-頭索動物亜門の *Branchiostoma floridae* や有櫛動物門の *Pleurobrachia pileus* から ARIS1, 2, 3 それぞれに類似した遺伝子が発見され、動物界の中で有櫛動物から頭索動物までの幅広い範囲で ARIS 遺伝子が保存されたものであることを示唆している。また、これらの遺伝子の ORF はどれも AR-N domain と AR-C domain を含んでおり、2つの新規 domain の保存性も確かめられた。しかしながら、これらの遺伝子産物の機能は全て未知であり、マヒトデにおいて発見された、先体反応誘起物質 ARIS におけるプロテオグリカンのコアタンパク質という機能は新しい知見でとなる。

ARIS1, 2, 3 それぞれに対応する相同遺伝子が存在するようであり、マヒトデ以外の動物においても複数の ARIS 遺伝子が存在していることが示唆された。

Table 3-4 相同性検索によって得られた ARIS 類似配列

	Database ID (e-value)					
	<i>ARIS1</i>		<i>ARIS2</i>		<i>ARIS3</i>	
<i>Pa. miniata</i> , Ovary, EST	gb Ex453272.1 gb Ex453780.1	(2e-66) (5e-49)	gb Ex453212.1 gb Ex453426.1	(2e-121) (1e-28)	gb Ex453426.1 gb Ex453212.1 gb Ex453177.1	(9e-87) (8e-57) (1e-56)
<i>Ap. japonicus</i> , Regenerating Intestine, EST	gb DY625277.1 gb DY624999.1	(6e-52) (6e-43)	gb DY625177.1 gb DY624999.1 gb DY625100.1	(3e-28) (2e-25) (0.016)	gb DY625177.1 gb DY624999.1 gb DY625100.1	(1e-19) (2e-15) (3e-4)
<i>Br. floridae</i> , Genome	gb ABEP02005790.1 gb ABEP02005788.1 gb ABEP0214901.1	(5e-22) (8e-20) (2e-19)	gb ABEP02003667.1 gb ABEP02002508.1 gb ABEP02006590.1	(3e-11) (2e-6) (2e-6)	gb ABEP02006590.1 gb ABEP02002508.1	(2e-11) (2e-6)
<i>Pl. pileus</i> , Whole, EST	emb CU424142.1	(0.01)	emb CU422317.1 gb FP992593.1 emb CU424142.1	(5e-8) (0.005) (0.006)	emb CU422317.1 emb CU421302.1 emb CU416679.1	(2e-9) (6e-6) (7e-6)

3-4 考察

ARIS は見かけの分子量が 10,000 kD を超える超巨大分子であるが、その構成要素である ARIS タンパク質、ARIS1, 2, 3 は 100 kD 前後の分子であった。Native-PAGE による解析の結果、ARIS1, 2, 3 は非共有結合によって複合体を作ることが示唆されたが、この巨大分子 ARIS がどのような機構で形成されるのかはまたわからない。しかしながら、3つのタンパク質に保存された ARIS domain、AR-N, AR-C の関与している可能性は高い。BLAST 検索から得られた ARIS 類似遺伝子群もこれら ARIS domain を有しており、機能的に保存されたユニットであることが期待される。また、3D-Jigsaw (<http://www.bmm.icnet.uk/~3djigsaw/>) を用いた domain フィッシングを行うと、AR-N が C-cadherin の untangling desmosomal knots と類似する構造であることが示唆されることから、ARIS domain の構造形成への関与が支持される。

Native-PAGE において、ARIS は分子量順ではなく、移動度の少ない順から ARIS2, ARIS1, ARIS3 と並んだ。ARIS2 が最も移動度が少なかった理由として、Fr. 1 糖鎖等の負電荷が少ないためと考えられる。実際、ARIS2 と ARIS3 はアミノ酸配列から予測される分子量がそれぞれ 80.2 kD と 81.8 kD とでほぼ同じであるにも関わらず、ARIS2 の方が SDS-PAGE でも移動度が少なかったことは、ARIS2 と ARIS3 の間には電荷、もしくは修飾後の分子量に大きな差があることを示している。ここで、脱硫酸 ARIS の SDS-PAGE 結果が intact な ARIS とほとんど変化が無かったことから、糖鎖の電荷以上になんらかの修飾の差も存在すると考えられる。ARIS2 と ARIS3 は domain 構成において差がないにも関わらず、このような違いが存在することは非常に興味深い。それぞれの ARIS タンパク質

に存在する Fr. 1 糖鎖の結合サイトやその他の修飾サイトを今後解明していく必要があると考える。AFM 観察の結果からは、タンパク質部分に糖鎖が複数結合している像が見られており、ARIS コアタンパク質である ARIS1, 2, 3 それぞれに複数の Fr. 1 糖鎖修飾サイトが存在し、Fr. 1 糖鎖が高密度化された状態が作られていると考えられる。

今回既知 domain として発見された FA5/8C domain はもともと凝結因子 V と VIII の C 末端側の保存領域として発見されたものである (Toole et al., 1984; Jenny et al., 1987)。凝結因子の結合部位として知られており、負に帯電したリン脂質や von Willebrand 因子との結合が知られている (Pratt et al., 1999)。注目すべき機能として、endo- β -1, 3-glucanase の FA5/8C domain のグルカンへの結合が知られ (Cheng et al., 2009)、FA5/8C domain が galactose binding-like superfamily に属することから、糖への結合が基本的な機能とも予測出来る。もう一方の既知 domain である Kringle domain もやはり結合 domain として知られ、fibrinogen や prothrombin、urokinase-type plasminogen activator、hepatocyte growth factor 等の相互作用に関わっている (Patthy et al., 1984; Donate et al., 1994)。従って、FA5/8C domain, Kringle domain が、互いに、または AR-N, AR-C と結合性を示す可能性が示唆され、ARIS の構造形成に重要な役割をしている可能性は高い。前章の AFM 観察において、ARIS コアタンパク質が濃度依存的に重合した様相を呈し、さらに所々に架橋構造が見られることがこれを支持している。

哺乳類における ZP domain のように、ARIS1, 2, 3 に共通して保存されている AR-N, AR-C domain がポリマー形成に関わり、形成された繊維を ARIS1 の 2 つの既知 domain が架橋することで、高次構造を形成している可能性がある。脱硫

酸 ARIS や、hydroxylamine 分解した ARIS を AFM 観察することで、その構造変化からさらに詳細な ARIS の構造形成機構が解明されると考えられる。

第4章 ARIS domain の動物界における広がり

4-1 緒言

前章において ARIS タンパク質のアミノ酸配列を決定し、その配列を用いた BLAST 検索の結果、相似のタンパク質配列をコードする遺伝子が広い生物から見つかった。特に AR-N domain と AR-C domain は広く相同性を持って保存されており、偶然ではなく何らかの機能が存在することで、配列の保存性があると考えられる。

脊椎動物では ZP domain を有する ZP タンパク質群が卵外被に含まれるものとして広く保存されている (Wong and Wessel, 2005)。本章では、マヒトデ ARIS において発見した AR-N, AR-C domain が、脊椎動物における ZP domain のように、無脊椎動物の受精において保存されていると考え、先体反応誘起物質・ARIS 遺伝子の解析をまずは他のヒトデ類で行い (Fig. 4-1)、棘皮動物全般、さらには後口動物や有櫛動物にまで広げて行った (Fig. 4-2)。最後にそれらを踏まえ、受精の先体反応誘起認識システムの進化について仮説を立てて議論する。

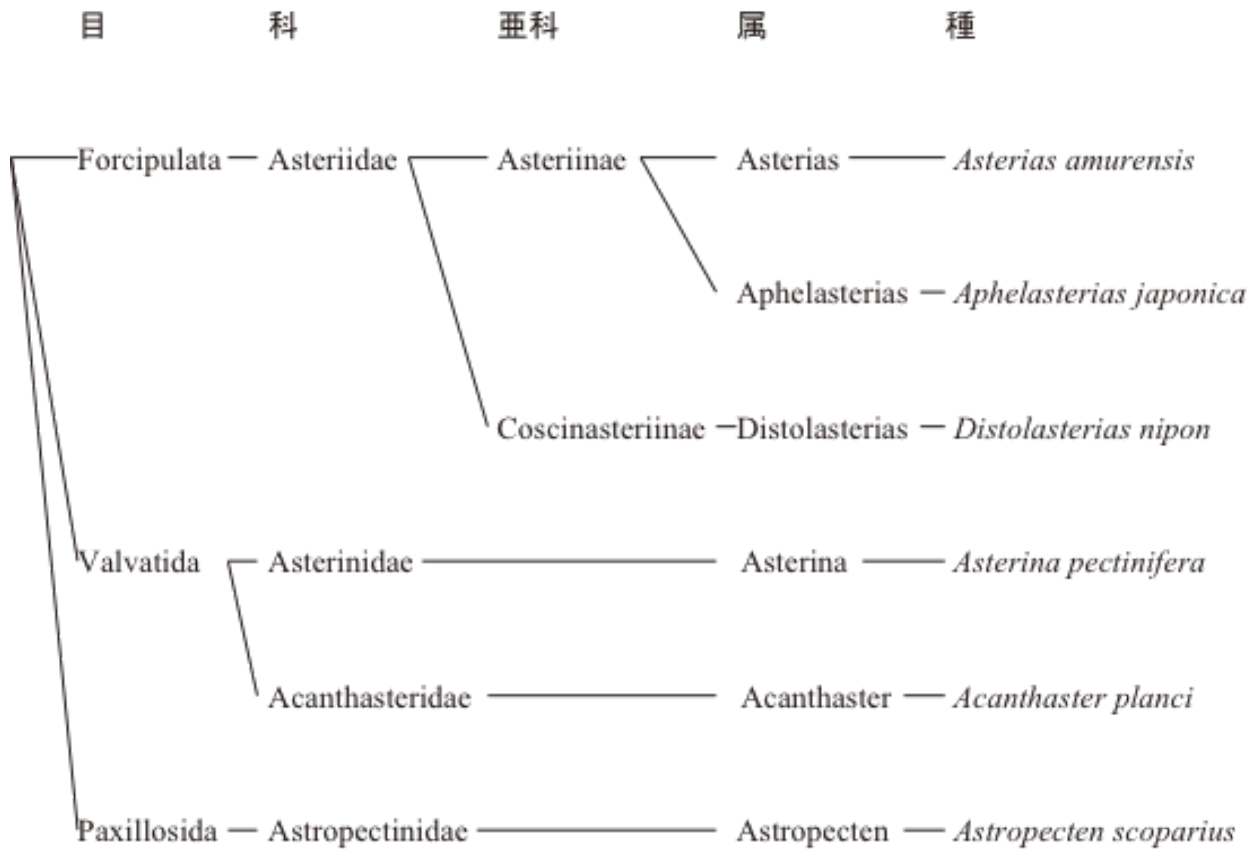


Fig. 4-1 本研究に用いたヒトデ類の関係図

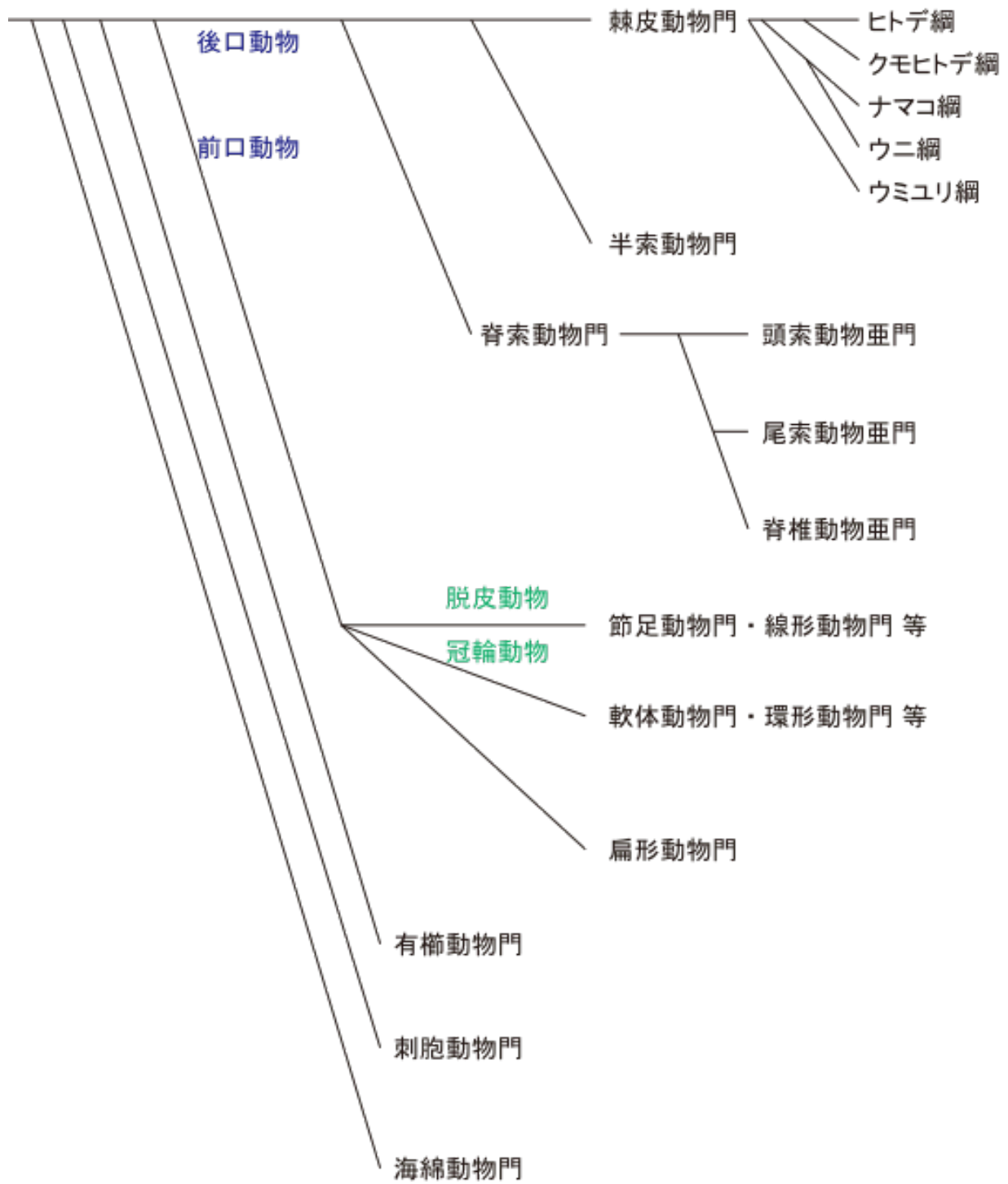


Fig. 4-2 動物界の系統的關係図

4-2 方法

動物

ニホンヒトデ *Distolasterias nipon*、エゾヒトデ *Aphelasterias japonicus*、マナマコ *Apostichopus japonicus*、ツガルウニ *Glyptocidaris crenularis* は陸奥湾から、イトマキヒトデ *Asterina pectinifera*、モミジガイ *Astropecten scoparius*、ニッポンウミシダ *Oxycomanthus japonicus*、ムラサキウニ *Anthocidaris crassispina* は東京湾から、ニホンクモヒトデ *Ophioplocus japonicus* は伊勢湾から、オニヒトデ *Acanthaster pulanci* は瀬底島から、シモダギボシムシ *Balanoglossus simodensis* は鍋田湾から、カブトクラゲ *Bolinopsis mikado* は館山湾から採集したものを用いた。

dry sperm の調整

第2章参照

海水の調整, ゼリー層の採集, ARIS の精製, 還元糖の定量, ポリアクリルアミド電気泳動, 電気泳動ゲルの染色, Western Blot, N 末端配列解析

第3章参照

先体反応の観察

ウニの精子における観察法 (Yokota and Sawada, 2007) を参考にして行った。
1% glutaraldehyde で固定した精子サンプルを 1500 g, 15 min の遠心で回収し、
0.05% Triton X-100, 0.2 units Alexa Flour 488 phalloidin (life technologies, USA), 1

mg/ml BSA, 20 mM glycine / PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH7.4) に懸濁し、遮光状態で on ice, 2 hr 静置した。最後に蛍光顕微鏡を用いて、G 励起の画像を観察し、アクチン性の突起の有無を確認した。

RNA 抽出と cDNA 合成

摘出した組織から、Sepasol - RNA I Super (nacalai tesque, Japan)、もしくは、Trizol Reagent (life technologies, USA) を用いて total RNA を精製した。得られた total RNA から、ReverTra Ace (Toyobo Co. Ltd., Japan) を用いて cDNA 合成を行った。また、合成前には RQ1 RNase-Free DNase (Promega, USA) で処理をしてゲノム DNA の混雑物を除いた。

ARIS 類似遺伝子の探索

ARIS 類似遺伝子の探索には、以下の縮重プライマーを用い、Quick Taq HS DyeMix (Toyobo Co. Ltd., Japan) を用いた PCR 法 (denature: 95°C, annealing: 40-50°C gradient, elongation: 68°C; 30 cycle) によって増幅した。サーマルサイクラーは iCycler (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) を使用した。プライマーの配列は、ARIS1 用に ARIS1aF, ARIS1bF, ARIS1cF, ARIS1dF, ARIS1bR, ARIS1cR, ARIS1dR, ARIS1eR を、ARIS2 用に ARIS2aF, ARIS2bF, ARIS2cF, ARIS2bR, ARIS2cR, ARIS2dR を、ARIS3 用に ARIS3aF, ARIS3bF, ARIS3cF, ARIS3cR, ARIS3dR を設計し、オリゴヌクレオチドは Greiner bio-one (Germany) に合成を委託した (Table 4-1)。

配列データの登録

ARISI, 2, 3 類似遺伝子群は、及びそのアミノ酸配列は DDBJ のデータベースに登録した (<http://sakura.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>)。それぞれのアクセッション番号を Table4-2 に示す。

配列解析

塩基配列・タンパク質配列共に、GENETYX software (GENETYX, Japan) を用いて解析を行った。相同性検索には、BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を使用し、domain 検索には InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>), Psi-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 及び、TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) を用いた。ゲノム情報からの遺伝子領域の抽出には GeneScan (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) を用いた。

系統解析は、Phylip software (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/getme.html>) を用いた最尤推定で行い、bootstrap 回数は 100 回で行った。

Table 4-1 *ARIS* 類似遺伝子探索用縮重プライマーの設計

プライマー名	配列
ARIS1aF	TGGGTNYTNGAYTTYCARCCNTT
ARIS1bF	AAAYACNACNYTNTAYATGACNAAYGT
ARIS1cF	TAYATGACNAAYGTNMGNCC
ARIS1dF	CCNATHGAYGCNACNGGNAAY
ARIS1bR	ACRTTNGTCATRTANARNGTNGTRTT
ARIS1cR	GGNCKNACRTTNGTCATRТА
ARIS1dR	RTTNCCNGTNGCRTCDATNGG
ARIS1eR	CKNARRAAYTCNGGRAARAA
ARIS2aF	TGGGTNGTNGAYTTYGARCCNTAY
ARIS2bF	ATHACNATHCARACNGTNGTN
ARIS2cF	GNGGNGTNAAYCAYYTNGAR
ARIS2bR	NACNACNGTYTG DATNGTDAT
ARIS2cR	YTCNARRTGRTTNACNCCNC
ARIS2dR	RTANACNGTNGTDATNGTRTA
ARIS3aF	TTYGCNAAYATGGGNCARGTNAC
ARIS3bF	TGGATHYTNTTYCARCCNTAY
ARIS3cF	CAYATHGARYTNATHHTGGMGNYT
ARIS3cR	ARNCKCCADATNARYTCDATRTG
ARIS3dR	ACNGTNGTYTG DATNGTDAT

Table 4-2 *ARIS* 類似遺伝子群のアクセッション番号

遺伝子名	アクセッション番号
<i>ApjARIS1</i>	AB602895
<i>ApjARIS2</i>	AB602896
<i>ApjARIS3</i>	AB602897
<i>AspARIS1</i>	AB602898
<i>AspARIS2</i>	AB602899
<i>AspARIS3</i>	AB602900
<i>AcpARIS1</i>	AB602901
<i>AcpARIS2</i>	AB602902
<i>AcpARIS3</i>	AB602903
<i>AtsARIS3</i>	AB602904
<i>BsARIS3</i>	AB602905
<i>MLARIS</i>	AB602906
<i>OxjARIS1</i>	AB602907
<i>OxjARIS2</i>	AB602908
<i>OxjARIS3</i>	AB602909
<i>AhjARIS1</i>	AB603742
<i>AhjARIS2</i>	AB603743
<i>AhjARIS3</i>	AB603744
<i>DnARIS2</i>	AB603745
<i>DnARIS3</i>	AB603746
<i>OpjARIS3</i>	AB603747

4-3 結果

4-3-1 ヒトデ綱における ARIS

マヒトデで発見した ARIS による先体反応誘起系の動物界の中での共通性を明らかにするため、他の動物における先体反応誘起物質を解析することとした。以後、区別のため、本章においてはマヒトデの ARIS を AaARIS と呼び、3つの ARIS タンパク質も AaARIS1, 2, 3 と表記する。

まず、マヒトデと同じ Asteriidae 科に属するものの、マヒトデと先体反応が交叉しないニッポンヒトデ *D. nipon* を用いることにした (Fig. 4-1)。マヒトデ同様に卵ゼリーを解離して回収し、クロマトグラフィーの糖に富む画分として先体反応誘起物質を精製することに成功した (Fig. 4-3A)。このニッポンヒトデ ARIS (DnARIS) を SDS-PAGE によって解析すると、マヒトデの場合 (Fig. 3-2) と同様に3つのバンドが観察された (Fig. 4-3B)。PAS 染色で検出されることから糖タンパク質であると考えられるが、抗 Fr. 1 抗体を用いた Western Blot によって検出できなかったことから、Fr. 1 糖鎖とは違う構造の糖鎖によって修飾されていると考えられる (Fig. 4-3B)。糖鎖の違いで先体反応の特異性が生み出されているという仮説を支持する結果が得られた。

次に、ヒトデ綱ではあるが、マヒトデやニッポンヒトデの属する Forcipulatida 目とは異なる Valvatida 目に属するイトマキヒトデ *Asterina pectinifera* を用いた (Fig. 4-1)。ニッポンヒトデ同様に、マヒトデで用いられる手法を用いることで、卵ゼリー・ARIS の精製に成功した (Fig. 4-4A)。得られたイトマキヒトデ ARIS (AspARIS) を SDS-PAGE で解析すると、やはり3つのバンドが観察され、PAS 染色で検出されたことから、糖タンパク質であると考えられる (Fig. 4-4B)。ま

た、抗 Fr. 1 抗体を用いた Western Blot によって検出できなかったことから、Fr. 1 糖鎖とは違う構造の糖鎖によって修飾されていることが示された (Fig. 4-4B)。

DnARIS1, 2, 3 及び、AspARIS1, 2, 3 のエドマン分解による N 末端アミノ酸配列解析を行った結果を Table 4-3 に示す。AaARIS1, 2, 3 の結果 (Table 2-3) とそれぞれかなりの類似が見られ、DnARIS と AspARIS に見られたタンパク質群は AaARIS1, 2, 3 と相同なタンパク質と推測される。卵巣 RNA より作成した cDNA から *ARIS* 相同遺伝子をクローニングすると、*AaARIS1, 2, 3* 遺伝子に対応した遺伝子、*DnARIS1, 2, 3* (Sakaya H., in preparation) 及び、*AspARIS1, 2, 3* (Fig. 4-5) の断片がそれぞれ得られた。また、*AspARIS1, 3* については、RACE 法によって全長配列を決定した (Fig. 4-5)。その ORF のコードするタンパク質の N 末端アミノ酸配列は AspARIS1, 3 のエドマン分解による N 末端アミノ酸配列解析結果と一致し、2 つが同一のものであることが示された。

他のヒトデにおいても、卵巣 RNA より作成した cDNA から *ARIS* 相同遺伝子のクローニングを行った結果、Forcipulatida 目 Asterozoa 科 Asterozoinae 亜科のエゾヒトデ *Ah. japonicus* より *AhjARIS1, 2, 3* が (Sakaya H., in preparation)、Valvatida 目のオニヒトデ *Ac. pulanci* より *AcpARIS1, 2, 3* (Fig. 4-6) が得られた (Fig. 4-1)。また、マヒトデともイトマキヒトデとも異なる Paxillosida 目に属するモミジガイ *At. scoparius* より *AtsARIS3* が得られ (Fig. 4-7)、ヒトデ綱内において *ARIS* 遺伝子が保存されたものであることが明らかとなった。

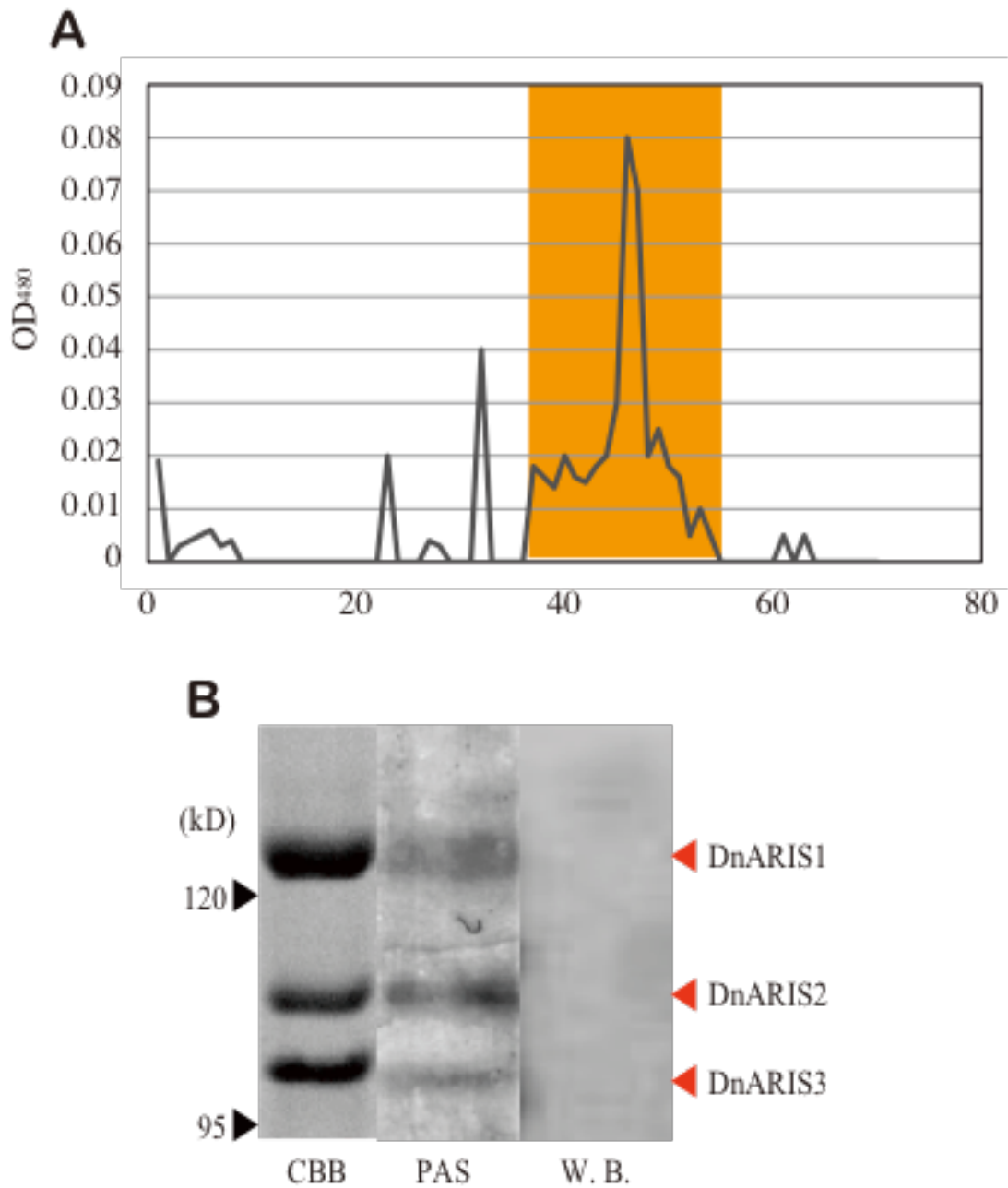


Fig. 4-3 DnARIS の解析結果

A. DnARIS のゲル濾過クロマトグラフィー結果。縦軸は糖濃度、横軸は画分番号。 橙色の画分を回収した。 B. CBB 染色, PAS 染色, 抗 Fr. 1 抗体を用いた Western Blotting によってそれぞれ検出を行った結果。7.5%アクリルアミドを用いた。

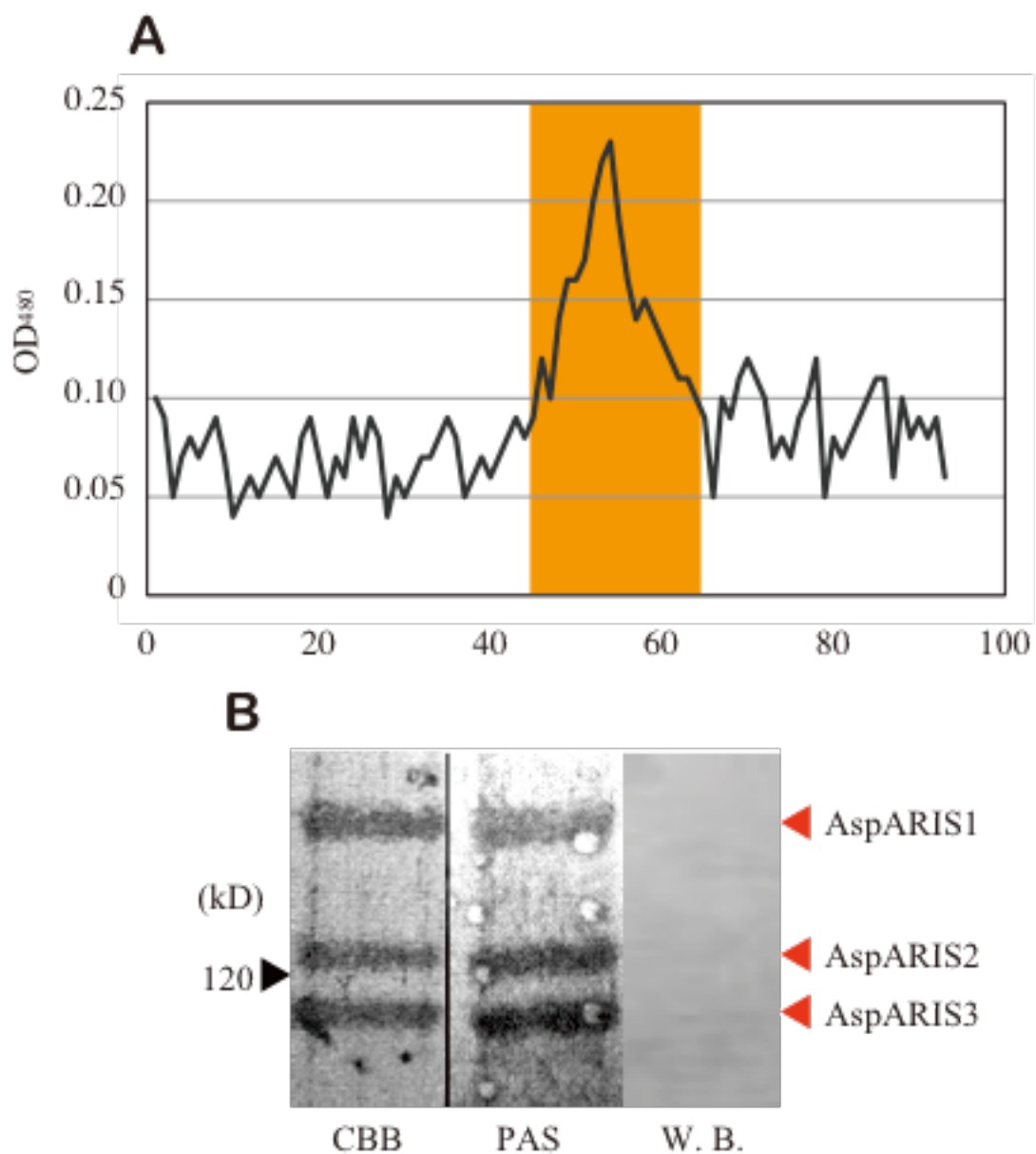


Fig. 4-4 AspARIS の解析結果

A. AspARIS のゲル濾過クロマトグラフィー結果。縦軸は糖濃度、横軸は画分番号。 橙色の画分を回収した。 **B.** CBB 染色, PAS 染色, 抗 Fr. 1 抗体を用いた Western Blotting によってそれぞれ検出を行った結果。7.5%アクリルアミドを用いた。

Table 4-3 DnARIS, AspARIS の N 末端アミノ酸配列シーケンシング結果

DnARIS1	AFGDNMDHGIDD
DnARIS2	AFGQTINDKV
DnARIS3	NFGDDISEDNED
AspARIS1	AFGDVNLHGKDD
AspARIS2	AFGQEVDDKVTD
AspARIS3	AFGDDISQDNED

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 CTGTGCGCAGAAATTCGACTTGCNTGTGGTGAGGCGTGGTGCCTTCTGCTCTCTGCCAAAGTCCGCTGCTCGCAATGGTCTGCCGTACTCATGTTATC

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 GGGACTAGATTTTCAGCGATTGTTACCCCTCGTATTTTCAARTCTTCCCTGCTCCGATCTGTATGAAAGTCGTGGACAGTCTGTCCGTTAGGGGTACTRAA

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GTTGACTCAGACCGGACCGCTTCGAGGCGGGTTTTCTGTGACTCCGAGAACATGTCCGTGAGCGGGTTGTGTGCCTGTTGGAGCTGGGTCTGGCGACGC
 M S V S G L C C L L E L G L A T P

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 CTAGCGCCAGGGCAGCATTTCGGTGTATGTGAACTCCACGAAAAGATGACTTTGTTGAAAAGATGGGGCAGGCAGGGTTGAAAAGTTCGAARTTGAAAA
 S A R R A F G D V N L H E K D D L F E K M G Q A R V E K F E I E N

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 CGGTCAAGTTTCCCTGGAGCTTCTATTGGAGAACACGCGAGGGCCAGATGAGGTCTGGGTCCCTTGACTTCCAAATTTTGACCACAGCAATACAGATCC
 G Q V S L D V L L E N T Q G Q N E V W V L D F Q N F D H S N N K S

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 CTTACGCTGTGGTGAGGACGGATGGGGTAACTGGTCGACAGACACGCGGGGACCTGCTCCAGTGTCTTTACCACAGTGCCGTATCACTCTGCAAAATG
 L Q P V V R T D G G K L V A E H A G T C S S V F T T V P Y H S A N G

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 GTTCTACAAATGACGGCTTTATTCTGTCCACCTGGGACAAATCGCTGTTCAACACCTTTCACTCGAATGCACACTTATCCAGAGGGAGACATGCA
 F Y N D G F I P V P P G N K S L F N T F Q S N A T L I Q K G D M Q

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 GGTCAAGGGAGCCGCTTTCAGTTTGTGGCTCGATAGACCCATGTTTGATTGCAAGACTAGTGTATGATGACCGTCTGGCAGAAAAGGTCACACCT
 V R E D R L Q F D G S I D T M F D C K T S D D M T V W Q K K V T P

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 GAAACCATTTGAGTTCAACACACACTCTACATAACCAACGTCGACCCCAAGGACCCAGTTCCAAACCCGGAGCCGGCATATGTTCAAGATTTATGCATCT
 E T I E F N T T L Y I T N V R P Q G T S S N P E P A Y V Q S Y A I L

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 TATACTGGCGTCTGTTGCGTGTGCACTGTCAAGGTTCTTGATTAGCTCAACAGAGAGACTCAGGCCTATCTTTGAGTATGCCATCGTAGGCGCTGTCTA
 Y W R L L R V A L S R F L I S S T E R L R P I F E Y A I V R P V Y

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 TCTGATGATGACGAGCAATATGGATTTGACAGGGAGCGTGCAGAGGTTGAGATTGCATTTCTGATCCCTGACCAATCACCCAAACGGGCGCTGATATCC
 L N D D E Q Y G F D R E R A E V E I A F R T L T N H P N G S L I S

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GTCTACAGGGTGAATAGTCTGACCTACGACCCCTGCAGATCTCCTCGGCACACACAGATTGGTCAATACAGATGATACCCACCAAGGTTGTGACTTGC
 V Y R V N S L T Y D P A D L L G N N K I G H I R M I P T R G C D L P

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 CCCTCGGTGTGGAGGATGGTACCATCGTGGACAAATCAGATGACCTCCTCATCTTTCTGGTTGAATAGTGCAGGATACAGCGCTCCAAAGGGGCGACTAAA
 L G V E D G T I V D N Q M T S S S F W L N S A E Y S A S K G R L N

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TGCTCAACCCATTGACGCTTCTCGGCTGGTGCCTGGTTGGCTGCCGATGCCGATCTCAATCAGTGGATACAGGTTGGATTTGCTTACCCTCAAGTGGGTTG
 A Q P I D A F S A G A W L A A D A D L N Q W I Q V D L L T L K W V

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 TCGGGGTTACTGACTCAAGGTTACATTTCTGGAGGAATTTGTTATGTGGTARCAAGGATACAGCGTGTCTACAGCACCGAGGCTGCTGGTGGCTTGACTA
 S G V L T Q G V I L E E I V M W V T R Y S V S Y S T E A R A G G L T T

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
CTCTCGTTAATGGATCTGGTGTGCCAGTCAATATTTGAGGGCAACTTTGATAGTCGGACCATCGTGTCCARTCACTTTGACGAGCCCGTTTTGGCCCGAAG
L V N G S G V P V I F E G N F D S R T I V S N H F D E P V L A R R

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
GATCCGCATCTTGCCACAGGARTGGGCCGATGGCATAGCCATGGGARTTGGCTGCTTGGATGTGACGCTCATACTGARTGCCACACGGACGCCAATGGA
I R I L P Q E W A D G I A M G I E L L G C D A H T E C H T D A N G

1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
ACGACTACCGAGGACAGTTTCTGTCCCGAGTCTGGCGAGACCTGCCAGCGCTGGTCAGCTCAAGAACCCACCCATTTCCTTTACCCAGAGGACT
T D Y R G T V S V T E S G E T C Q R W S A Q E H H T H S F T P E D Y

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
ACGCCGATTACGGCATTGGCGACCACCACTTTTGGCCGARTCCAAACCACTCCACGCAACCGTGGTGTCTACACTCGATCCCAACCGTCCCACTGGATT
A D Y G I G D H N F C R N P N N S T Q P W C Y T L D P N V P T G F

1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
TTGCGATGTTGGCGCAGCGCAAGCGTGTGCACCCCTAACGTGGCAGCAARTGAGCCCAAGTCARTTCTACGCCAATTACGCACCCCTACTGCACTTCCAC
C D V G A R A Q A S C T P N V A A N E P S Q F Y A N Y A P Y C N F T

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
GAGTGGGAGATTACTGTACGCGCGCTTGGGTGTTCCATTGGTTCGGAGGTAGACATTACAGGAGCAACCAACAGGATGCCTATTGATGCTACAGCGC
E W E N Y C T Q R W V F T L V L E V D I T G A T N R M P I D A T G E

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
AGTTTACATTGAGTTCGACACGATGACTGTCCCAACACGACCGCTCCCAATTGTCGACGATTGGAAATCCGGAGGCCATTGTGCCATGAGATCAC
F T F E F D T Y D C P N N D R S N C R R L E I P E A I V S H E I T

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
CTTGCGACTACGGTGGAGTTGTGGATGACACCAAGGATAGTCCCGGATTTACTTGAGGAAGTGCATGCATCGGACCCATCCATTGACATCAGGGAT
L Q T T V E V V D D T K D S P R I Y L K K V H A S D P S I D I R D

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
GCGTTCACCTGGTGTCTCATCTTGAGCCGGTTATCCGTGGATACGCATTTTTTCCCACCTTTTTCTGCGAGACAGCTGGAGACGGATTGACCGTGT
A F N L V F L I L S R L S V D T H F F P L F L R D K L E T E L T L F

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500
TCGTGGTGTGCTCGGCAAGGARTACCACTCGGGCGACGGTTCCTGACTGCACCACCAAGAGTACCTACACAGCGTATGCTCGCCAAATTTCTACTA
V V C V G K E Y N S G D G C L T A P P E S T Y T A Y V S P N F Y Y

2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600
CCGTTTGTACCCGGCCCATCCAGTACACAGACCTCTATGCTGATGACATCGCCACTTCTCCTCAACTCTAGATTACACACCTACATCCATGCCAGT
R L Y T G P S Q Y T D L Y A D D I A T S P Q T L D S H T Y I H A S

2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700
GAATCCACCGCACGGTCTTACCAACAGGGCTCTGTCCGCCACATCCAGGGAGTATACCATCTCTAGCGTCTTACGGCTGGTGGAGCGGACTGCCCGAC
E I H R T V F T N K A L S A T S R E Y T I S S V F R L V E R T A R R

2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800
GGAAAAGAGACATCCTCCGGCGAGACGTGGAGACAGATCGATGAGCCCATCATCGTACATCAGACGTTTCTCTCAAGGGCTGTCGGTAAACTCCGT
K R D I L R R D V E D K I D E P I I V H Q T F L F K G C P L N S V

2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900
CCACGACCCGACGACCGTGCCTGCATTTGCAACGACGAGGGGAGGAGTATTGAGTGAACCTTCAGTGTGTGACGTCARACCCCGCATCTTAAT
H D P Q N R A C I C N D E G E E Y S S E T F E C V Q S N P R I L N

2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
GAGGAACAGACCCAGTCCGCAATGCAAGGAGTCCAGGAGAAAGCAGTGTCCAGGTGGCAATTCAGACGCGGCCATGATGGCAACGGTCCATGTCCC
E E T R P V D N A G S P G E S S D P G G N S D S G H D G N G S M S L

```

3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100
TCCATTTGCCTACATTCGTGCTACAGCCCTAATCTGCATCTTCATACTGAGATCTGTTTTGATCTAAGTGTTTNCARTGACCANAACCTCAAAAANGN
H L P T F V L Q R L I C I F I L R S V L I *

3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200
ATTGTGCCAAATAACTANCGAGATGTCNTTCCCCTGCTATAGTTNCCATACATGTTTGATGTTATGNTAARTTCCGNTACACTTAACCAAAANGAGT

3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300
NAATTGAGGNATNGCTNATNGCATTGTAACACCATCNCACAAARTGGTTTAGTTGATATTAGGCGATCAGGTATTAARTACTGGTCTCATTTTCGC

3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400
TGAATTTCTTCTTCTTTTGGACTCAAACTTGTGACGTTTTTCATTTGTTTGCTTCATAGGAGCGTTTCTAAATATTGCTAARTATTTTGGGCACCTT

3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500
TTGAGGAATGGAAATTTGGCGAGCTGCNCAATGATTGCCNCAGCAATATGATTTGAAAAATCTATTTATTCAAARAGGAATATTTATATTAGATATAT

3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600
TTATTGAGAGCAGTTCTATATTACATGTTTATTTATTACTTTTGTATTGTGATCAAATTTTGTAGTAGCGGACAGCAATAGCCATAGTTTATATATC

3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700
CCTATTTTCCACTTATGTTGCACTTTTGTGTTTGAAGCATAGAAAAAATGCCAAAATATATATTTAAAAAGTATTGTAATATTTTGCAGCGGTA

3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770
TGTTTTNTCTTGATTTTGGATGTGACATATAAAAAAACTGCATTTTCAAAAAA

```

Fig. 4-5A *AspARIS1* 遺伝子・*AspARIS1* タンパク質の配列

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 CTGGATTTTCGTATCATTGACCTGTATTTCCCGACCGCAGCAGCGACTGTTCCCGATCAGGAGAAAGCTTCCATCGAGTTGCAGTCCAGACCCATTG
 L D F V I I D L Y F P T A T P T V P D Q E K A S I E L Q F Q T T I E

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 AGTCGACCAATGGTGGTTACTGTCCCTGTTGAAACAGCAGTCCCTTCAGTACCTGCCAAGAACACACAGCCAGAGCTTCATTAAATTTGACTTGGG
 S T N G E L L S L L N S T S F K Y L P K N N T A K S F I N F D L G

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 CTACAAATTTCCACACGGTACCCAGAGTGCCTATACACGGGACTGCAGATGTGCAAAATTTGGAAATTTCACTTTGTTCTCGATCTTGACGTGACG
 Y N F P N G T Q E C Q Y T G T A R C R Q I W N F N F V L D L D V T

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 GTCACGTGATGACGACATGCCATTGACGCCACAGGTACGTTTCAGTTCACGTTCCGCAAGTACCCAGTGCACAGATCCACGGAAAGACCCCTGTCGACT
 V T D D D M P I D A T G T F Q F T F A K Y Q C N D P T E K N P V D C

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 GCACACCAATGAAATGGATCCCTGACGATCTCCCTGGAGGTCACAAATACAGACCGTGGTACAGTCTGGATAGCACAGGATAGACCGGTATCCCA
 T P M N V D P L T I S L E V T I Q T V V Q V V D S T K D R P V I Q

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 GCTTATCTCTCACGGGCGCCACGGGGAGATCTGCGCCTGGGCGGGGACCGGCGTGGAGTCAACCACTTGGAGGACTGTGAGCATCGTAGTCCAGTAC
 L I S L T G A N G E I C A W A G T G V E S T T W R T V S I V V Q Y

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 ATTCCCGAATTCCTCCGACGAGACTTCGATCTCGAGCTGACTCTCTTTATGGTGTGCAGACTGTGATACAGAAATCCACTAGTTTAAATGAATCGTGG
 I P E F L R R D F D L E L T L F M V C K T V V Q E S T S Y N E I V G

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 GTTGTCTGCAAGTATCGCAGGCTCAGCGCTACGTCGCCTATCTCAGCTCCGACTTCTATTACACTGTGAGGGGAACTGACGCGCGGGACACCCACGAC
 C L Q V S Q A Q R Y V A Y L S S D F Y V T V E G T D A A G Q P T T

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 CTTCACTGGGGCCCAAGTACCTGGCTGGGGACACAGGTTCAAGACCTATCCACGAACTCCTACGACTCGGTCAATGCGGTGTACACATGGGTTTC
 F T W G P S D L A G D N K V Q T L S T N S Y D S V N A V Y N M G F

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 CTGAACACGGCGTTGTCGCAAGGAGCGGCTGACCTACCCATCACCACCGTGTTCGTCTGGTCCAGAAAGCAAGTTGGGCGCATGCGGAGCGGAGGATCG
 L N T A L S Q E R L T Y T I T T V F R L V Q K Q V G R M R R R G I A

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 CCGCTCCGACCCAGGAGATGGTAACCGGTCCTCGCACCGGCGACGATCCTTCGACGCTCTGCCCTAATCAACTTTTCGATGGTACGTTATGCGCCTACC
 A P T Q E M V T G P R T G D G S F E R L P *

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 CATGGTCTGTAACGGGTACCGGAAATCAGGGTTCGATTCGGGAGGGGAGCTTGAAACCGGNTACCACATCCAAAGGAGGCGAGGGCGCTGCAAAATTA

1210 1220 1230 1240 1250
 CCCATCTCCCGACATCGGGGAGGTAGTGACAAAAA

Fig. 4-5B *AspARIS2* 遺伝子・*AspARIS2* タンパク質の配列

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GAATTCCTCGAGCACTGTTGGCCTACTGGGTCATTGCAGATCCRAATTTAGTTCGGGCGTGGTTACGAGTACAGTTATATCGAGTCCGTATACATGCCCA
 M P N

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 ACATTTACGGTGCAGCTGAGCTTGGTTCCCGGGCCAAACGATGAAATTCGCCGGTATGTGGTTCCTTTGGCGCTTGGTGTCTGGAAAGACTCTCCGG
 I Y R A R E L G S P G Q T M K F A G M W F L C A L V L L E R L S G

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 AACACTGGCCGCTTTTGGAGATGATATTTGCAGGATACGAGACACAGATTCGAGTCATGGGCCAAGTACCAGGATACCTTCGATGTACAAAGT
 T L A A F G D D I S Q D N E D N R F A V M G Q V T K D T F D V Q S

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 GGAAACGTCACCCCTACAGCTGAAATGTGCAAGACACGGTAGGCACCATGGATTTCTGGCTTCTTGACTTCCAGAAATACAGATTTAATCTGGATGCTTTGC
 G N V T L Q L N V Q D T V G T M D F W L L D F Q E Y R F N L D A L P

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 CTGTGGATGAATCCACTGGAAATGTTGATGAAGGATAGAACTTCTGCTTCTCCARTGTCTACGAGATGCTACTGGACTACCTTCTTACACGACAGTTA
 V D E S T G M L M K D R T S A C S N V Y E D A N W T T F F N D S Y

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 CATCCAGAACGCGAGGAGGGGCTCTTGGCAACAAAGTCTCTTTACACAATTCAGAGGGGAGAGTGAACAGTGTGGCATCATGCAACACACAAA
 I Q N A G R G S L A T K S L F T Q I Q R G E V N S D G I M R N N K

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 CTCGTCTTCCAGGTGACATGGCGACTTTCACCACTGCAAGGATTCAGTGACGAGGATTCATCTGGGAGATGACAGCTGTCACTACTGATGAGATTG
 L V F Q G D M A T F T N C K D S S D E E F I W E M T A V T T D E I E

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 AATACCGAACAGTATATGCAACCAACATCAGACCAAAAGACCCCTCAGACCCATTGGGAGGCATCTCATTTTGGCAGTGCACATTTGAGTTGATTTG
 Y R T K L Y A T N I R P K D P Q D P L G G I S F V Q S H I E L I W

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 GAGATCTCCGATCAGTCATGGCCAGTTCTTGATCAGTTCACCTGCTCTGATCAGACCCATCTTGGAGTTTGGTCCGAGTCTCGGCTGTTTATGATGAT
 R I S R S V M A K F L I S S T A L I R P I L E F A R V S A V Y D D

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 CAGGGTAGAGCTGTACCCACCCAGTCAGCACTCCATATCAGGTTTCGAAACAGTGGTTGATGAGATGATCAARTGGTCAAGTTATGAAACACACAGCATAA
 Q G R A V P T Q S A L H I R F R T V V D E D D Q M V S Y E N N S I T

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 CATACATCCAGAAACGTCACCCATGGCCTGAATACAGTCCCTTACCACCCAGTAGGGACACTAGATGCATCACCAGCCATGGTATTTCTGACTAGATGA
 Y I P E N V N H G L N T V L Y Q P V G T L D A S P P W Y F V L D E

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AGGAACTCAACACAAAGACATGTCAACAGACTTGGGATTCAAATGATACTGGATATCGATGCATCAACCCAGTTGACATCGAGTACCCATCGAT
 G T Q T Q R Q C Q Q T W E F K M I L D I D A S T Q V D N R V P I D

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 GCTAGTGGAACTTTGATTTCTTACATGCCCTACAGGTGTGGCCTTGTGAACTGACAAACCTGAACTGACAACTTGTGTGGCAATGAGTGTGGGCC
 A S G T F E F L Y M P Y R C G L V N L T T L N L T T C V A M S V G P

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 CAGCCAGATCTCAGCATTATCACCATCCAGGCTACAGTGTGTTGACAGATGAGAGAGATGATCAAGTCAACCATTAATCTCCTCCCTGACTGGCCG
 A K I S A L I T I Q A T V F V Q D E E D D Q V T I I L H S L T G A

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 AAGCAACGAGGATCTCAGCTATGGTACAGGATCCAGAGGTGTAGCTCACAGGAGTATGTTGAACAGAGGTTAATCTCCTCCCTGCTGGCAAAA
 S N E D L S Y G T G S R G V A H K E Y V E L R V K F S P A L L R K

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
 GATTATGCACCTATATCTGCTACTCTTCATGGTGTGTAAAGGGGAGGATATGCCAGTGGAGATTTTTACAGGGATGCTACAGCCCTTCTACAGATC
 D Y D L Y L L L F M V C K G E E Y A S G E F L Q G C L Q A P S T D R

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 GCTACATTGCACACCTGGATGCAGCTTTAACTACATCCCTCGCATCACTGATGAGATGGACAGTGGTTCTCCTGGATCCCTACAATACTAGTCATGT
 Y I A H L D A S F N Y I P R I T D E N G T V V L L D P Y N T S H V

1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 GCAAAATGACTATGTGCAAACTTAGATCAACAGGAGTACTTGCCTACAGATCTGGAGAGACTCTTGCAATTCCTGTGCATCGATCCACCTTCTACAC
 Q N D Y V Q N L D Q Q E Y L R T E S G E T L A I P V H R S T F Y N

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
 GTTGCACTCTCCGCCAATCTGACATCTACACCATCACGGTAGTCTCCGACTCGTCGAGCTCCAGGAGAAACGAGAGCAGCCTTGCCACACATGC
 V A L S A E S D I Y T I T V V F R L V E A P G R K R R A A L P H M Q

1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 AAGACATCGTCCCTAGCTAAAGTGTGGTTGGCCATGCAGGATAGGCAGAACACTGGTACGATCATCACCCGTCATTCCTCGTGTGGAGATAGCGT
 D I V L A K S V V G H A G I G R T T G T I I T R H S R D V E D S V

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 ACAAGACACTCACGCCAATAAATCCCTTCTGTCTTTGGGATGTCCGGAGGAGCCACACATGTACTTGAGGACTAGATTGCAAGTGGCCAGCAGGA
 Q D T H A N K I P F L S L G C P E E A T H V L E E L D C K C P A G

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
 ATGATGTATGACTTGAATTCCTTCACTGTGAGGCAGCATCAATCTTGAAGATGTCAAGAGAGTGAATAATGATGATCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT
 M M Y D L N S F N C E A R A S I L E D V K E V K N D D Q V S D P K E T

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
 CAGCCAGTGTGAACACAGTGTCTGCTGTGTGCTCATTGTGCTTGCARATTCAGTATTTCTCTTGTGAAATTAATGATTTGAAATATGGAA
 A S A E H S A C S V L L I V L A N S L I F L L L K N *

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 AATGACGGAAAGAAATTTGAAATGTTCACTGTGACAGACCTAATTCATCCACAGATTACCTGAATCAGAAACCTTTACTAATTTGCATGACGAGA

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500
 ATATTGAACCCAGCTAACAATTTTCAAGCAGTAATACAGGATCACACAACGTTTGAGAGGTTTAAATCAATACTTGTGGCAATCACAGATTGT

2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600
 GGAAATTAATTTCTGCCCACTTTTCATTAACCTGCGACCCACATTTACTTATTAACAATACACTCAGTTAGGATCAAGTGTGTCACAAAGTAATCTACAG

2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700
 TTATGAGTARCCATTTTCAAGACTGGTCTATAAATATAACAATTTATGGAGATCCATACGACTAGGTCATCAATGGCTTTCGGATCTCGGTCAATCTT

2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800
 TAAATGTCTTTCATGTTGCCGTCATAGATGACTAAAGTGATATTGCAGTATACATAGTTGAGATTTGAATGAAATTTATCCTGAATTTTCATCCATT

2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900
 TTCAGCTAATGTTGAGATATATCTTAGTAAAGGCTTTACTTTTCATTTCCAGCAATTAACCTTCCAAAGATTTTAAACAATGAAATTTATTCCT

2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 AATATAGCTTTATGCAATTAATCTGTTACTGATCATTAAACAGTTTGTGTGTTCTTAAAGTGTATATAAATCATTAAATCGGAGTAAATGTG

3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100
CAAGGTTTGGTCAAAAATTAATGAAAAAATGC TTTAGTTATTCGATTTCATAATTAATTCATTATTTGTATTTGGA
CTCAATGTTTT
3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200
GGTGATTGTCTACATGCCTGTTACATCAAGTAACTAGCAAGTTTTAACTACATTTGCACCTTCTCAATCACTCAG
TTCGACCTCATTTAAATTTG
3210 3220 3230 3240 3250 3260
GATGATTGGAGAGATATATATTAATTTACCAAGCATTGCCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 4-5C *AspARIS3* 遺伝子・*AspARIS3* タンパク質の配列

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 CCTACGCCCTCTGTACTGGAGGTTGTTGCGTGTGGCTTTGGCGAGGTTCTTGATAGTTCAACAGAACAACTGAAGCCGATCTTCGAGTATGCCCTGGT
 Y A V L Y W R L L R V A L A R F L I S S T E Q L K P I F E Y A L V

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 GAGGCCGTGTATATCTAATGATGACGAGGAGTATGGATTTGACGGGGATCGAGCGGAGTGGAGCTTGCCTTTCGCACCCGACAGCGCACCCCAACGGC
 R P V Y L N D D E E Y G F D G D R A E V E L A F R T L T A H P N G

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 AGCCTCATATCGGTCTACAGGGTGAACAGTTTGGAGTATGACCCCTGCTGATCTGCTTGTGGCACACAGCTTGGACACATCAAGATGATACCCACAGGG
 S L I S V Y R V N S L E Y D P A D L L V G N K L G H I K M I P T R G

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 GTTGGCCTCTCCCTTGGTGTGGAAATGGCACCATCTCTGATCCAGCTGTGCTCCTCATCTGTCTGGTTGAACAGTGCAGAGTACAGTGCACCCCA
 C H L P L G V E N G T I S D S Q L S S S S V W L N S A E Y S A P K

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 GGCTCGGTGATGCCCAACCAATCGATGCTGTCTGCTGGGGCCCTGGTTGGCCGGCACTATTGACGCCAATCAGTGGATACAGGTGGATCTACTAACG
 A R L N A Q P I D A V S A G A W L A G T I D A N Q W I Q V D L L T

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 CAGACATGGGTGCAGGACTACTACCCAGGTTACATTTACCAGGCACTGTTATGTGGGTTACAAAGTACAGCGTCTCTCACAGCGCTGAAGCTGCCG
 Q T W V S G V L T Q G V I Y Q D T V M W V T K Y S V S H S A E A A G

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 GCAGCTGTCTCCTGTCTTCATGAGTCTGGCGTGAATGCTGTACCAGTCTGATTTGCTGGGAACTATGACAGTGAAGACTATTGTCAAAAACACTCTTGA
 S L S P V F N E S G V N A V P V V F A G N Y D S E T I V K N Y F D

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 CGATCCCATTTTGACCCAGAGGATCCGCATCTTACCCCAAGAGTGGTCCAAATGGCATAGCCATGCGAATTGAGCTTCTTGATGTGACACCCCACTGAG
 D P I L T Q R I R I L P Q E W S N G I A M R I E L L G C D T H T E

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 TGTTACACCGACTCCAAATGGAGAGGACTACCGGGGAACAGTTTCGGTCAACAGAGTGGGTTGAGACCTGCCAACGCTGGTCTGCTCAGGAGCCCCACCCC
 C Y T D S N G E D Y R G T V S V T E S G E T C Q R W S A Q E P H T H

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 ATTCCCTCACCCCGAAGACTATGCCACCGCGGATCGGCGACCAACTTCTGCCGAGTCTGGATARTGCCACCCGGCCCTGGTGTACACACTCAA
 S F T P E N Y A H R G I G D H N F C R S L D N A T R P W C Y T L N

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 TCCCAGCATGCCCATTTGGCTTCTGTGATGTTGGAGTGGCACAGGTGCTTGCACACCTAATGTGACAGAGATGCTCCAGCAACTTCTATGCCAATTAT
 P S M P I G F C D V G V A Q V S C T P N V T R D A P S N F Y A N Y

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GCACCCACTGCAACTTACCCAGTGGGAGAACTACTGCACGACGCTTGGGTGTTTGTACTCGTTCTGGAGTGGACTCCTCAGGAGCCCAATAGAA
 A P Y C N F T E W E N Y C T Q R W V F V L V L E V D S S G A T N R M

TGC

Fig. 4-6A *AcpARIS1* 遺伝子・AcpARIS1 タンパク質の配列

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 TGGTGAAGCCCGTGTGATTTTGTGATCATTGACTTGTATTTCCCGCCGGCANCACCGACTATTCGGATACCAAGAAAGTTTCCATCGAGATGCAATT
 V K P V L N F V I I D L Y F P P A X P T I P D T K K V S I E M Q F

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 CCAGACCACCATTTGAGTCGCCAARTGGTGAAGTTGTTGGCGTTGTACACACGACCTCGTTTAAATACCTGCCAAGATGAARCCGACGACCTTCATC
 Q T T I E S P N G E L L A L Y N S T S F K Y L P K N E T A A S F I

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 AACTTCGACTTGGGCTACGACTTTCCGARTGGCACCACACAGTGCCAATACGTGGGACCCGACAGATGCCGACAGATTTGGATTTCACTTCGTTCTCG
 N F D L G Y D F P N G T Q Q C Q Y V G T A R C R Q I W N F N F V L E

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 AACTAGAGTGGTGGTCCACAGATGACGACATGCCAATTGATGCCACAGGTACTTTCAAGTTTTGTTCCGACAGTACCAGTGCATGATCCACGGAGAA
 L D V V V T D D D M P I D A T G T F K F L F A K Y Q C N D P T E K

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 GAAACCGATCGATTGATCGAGATGAACGTGGATCCTCTGACATTTCCCTCGAGTTACAAATACAGACTGTTGTTCCAGGTGGATAGCACCTCAGAT
 K P I D C I E M N V D P L T I S L E V T I Q T V V Q V V D S T S D

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 ACCCCGACTATTCAGCTTGTTCCTACTCCCGGCAATACGGGGAGATCTGCGGAGCGGGGAGGGAGACGAGGCGTCATCATTTGGAGCCTGTACGCA
 T P T I Q L V S L T G N N G E D L R S G G G R R G V N H L E P V S I

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 TCGTCGTTCACTATTCACAGATTCCCTCCGGAGAGACTTTGATCTAGAGTTGACCTCTTCATGGTGTGCAAGTCCAACTTGCTTAGCTCGGATGCAGG
 V V Q Y F P E F L R R D F D L E L T L F M V C K S N L L S S D A G

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 GTGTCTCAGTGTCCGACGGCTCAACGCTACGTGCGCTACTCCARTGCCAATTTCAAGTTGCGCGTCCAACTGATAACACAGGTTGACTCCACGACTGTT
 C L S A P Q A Q R Y V A Y S N A N F Q F A V E T D N N G D S T T V

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 ACCTACGACTCGAGTAGCCTGACGACGACCAACAAAGTGCAGAGGCTCACGACAAACGCGTACGACTCGACCAACGAGGTTTACACATGGGTTTACCA
 T Y D S S S L T N D N K V Q K L T T N A Y D S T N E V Y N M G F T N

910 920 930 940 950 960
 ACACAGCGTGTGCGACGGACCGGTTGACGTACACATCGCAACCGTGTACCGGCTGATCG
 T A L S Q D R L T Y T I A T V Y R L I

Fig. 4-6B *AcpARIS2* 遺伝子・*AcpARIS2* タンパク質の配列

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GTGCAGTCGCACATTGAGTTGATTTGGAGATATCCAGATCAGTCTTGGCCAGTTCTTAAATCAGTTCCTACTGCCCTGATAAACCAGGACTGGAGTTG
 V Q S H I E L I W R I S R S V L A K F L I S S T A L I K P V L E F A

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 CTAGAGTGTCCGGCTGTTTATGACGACAGAACAGAGTTGTACCAACCCAGTCAGCACTCCATATCAGGTTTCGGACTATTGTCGATGCAATGATCAGAT
 R V S A V Y D E Q N R V V P T Q S A L H I R F R T I V D A N D Q M

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GGTCAATTATGAGACACACAGCATTACATATTTACCAGAAATGTCACCATGCTCTGAATACGATTGCTACCAACCCAGTGGGCATACACTAGATGAGGCA
 V N Y E N N S I T Y L P E N V N H A L N T I V Y Q P V G I L D E A

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 CCAGCTTGTGATTTTGTATTAGATGAGGAACTCGAACACAGATGCAGTGTCAACAGGCTTGGGAGTTTAAAGATGATACTGATATAGACACATCCACCC
 P A C D F V L D E G T R T Q M Q C Q Q A W E F K M I L D I D T S T Q

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 AAGTGGACAATCGAGTGCCTAATTGATGCTAGTGGACATTTGATTTCTTTACATGGCTTACAGATGTGGCCTGGAGACACACACTCTGATGTTTCATC
 V D N R V P I D A S G T F E F L Y M A Y R C G L E N N T L N V S S

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 TTGTATTGCAATGAGTGTGACCCAGCCAGATCTCGGCATTGATCACTATTACAGACACAGTCTTTGTACAGATGAGGAGAGAGCCAGTCATATC
 C I A M S V D P A K I S A L I T I Q T T V F V Q D E E E D Q V I I

610 620 630 640 650 660 670
 ATACTCCATTCACTGACAGGTGCANGCAATGAGACCTCAGCTATGGCACGGGATCCAGAGGTGTAGCTCACAGGGAG
 I L H S L T G A X N E D L S Y G T G S R G V A H K E

Fig. 4-6C *AcpARIS3* 遺伝子・*AcpARIS3* タンパク質の配列

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 TTCGCAATATGGCCAGGTCACCAAGGATGATTTGACGTAGAGATGGACAGGTCACCCCTACACTAACGTCCTCCAAAGGCGAGTCGGCACCAGGAGA
 F A N M G Q V T K D V F D V E N G Q V T L Q L N V Q K A V G T K E I

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TCTGGATCCTGGACTTCCAGAGTACAGGTTCAATTTGGATGCCCTGCCAGTGGATGATTTACAGGACCCCTGAGGATGGATCGACCTCTGACTGTTC
 W I L D F Q E Y R F N L D A L P V D D L T G T L R M D R T S D C S

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 CAGTGTTTACGAGACCGCCGGTTGGACACCTACTTCAGCTCCACATACCTTTGATGACAGACCTCCGATGACCTGACAAAAAGAGTCTTTTACAGGC
 S V Y E T A G W N T Y F S S T Y F D D K T S D D L N K K N L F T S

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 TTCGAAAAGGCCAACATGGATGATGACGGCATCATGAGGATGACAGATCATCTTCACTGGGACCATGGATACCTCTTTGCTTGCATGGATCCCAATG
 F E K G N M D D D G I M R N D K I I F T G T M D T F F A C M D S N D

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 ATGAGAAATAGATCTGGGAGCTGACCAGCGTCACGGCCGATGAGATCGAATATCGGACCAAGCTCTATGCCACAACGTCGGACCTAAGATCCCGATGA
 E N K I W E L T S V T A D E I E Y R T K L Y A T N V R P K D P D D

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 TGCAGCTGGAGGTGTGTCATTTGCGAGTCTCATATTGAGTTGATCTGGCGCATATCCCGACGGCACTGGCCAGTTCTTGATCAGCTCCACCGCCCTG
 A T G G V S F V Q S H I E L I W R I S R T A L A K F L I S S T A L

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 ATCCAGCCTATCCTTCAGTTTGCCCGTGTGTCACAGTGTACGACCAAGGATATCAGCCTGTTCCCTGACACAGCTGCCCTTCACATCAGTTTCGGACAG
 I Q P I L Q F A R V S T V Y D Q D N Q P V P E Q A A L H I K F R T V

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 TGGTTGATGACGCAATCAACGCTCAGCTACGTGCCAGGCAGCATCTCCATATAGCCTAACCTGATGTCCCGAGCACAGTCTGGATCAGATGGTTTA
 V D D A N Q T L S Y V P G S I S Y K P K P D V P E H S L D Q M V Y

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 CCAGCCCCAGGGGGAATTGAGAAATGCTCCCGAATGTGACCTGCGTCTCGATTTGGGACCTTAACCCAGTCCAGTGCCATCAGACCTGGGAGTTCAAG
 Q P P G G I E N A P E C D L R L D L G T L T Q V Q C H Q T W E F K

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 GTATCCTCAATGTAGACACCTCGACCCAGTAGACACAGGGTACCAGTCGATGTCAGTGGACCTTTGATTTTCTCTACAATACCTTTACGCTGTACCG
 V I L N V D T S T Q V D N R V P V D V S G T F D F L Y N T F S C N D

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 ACACRACCGACATCGCCACTTGCCAGCTCATTGACATTGAGCCGTCCAAATCTCTGCTCTCATCACATCCAAACCCCGT
 T T D I A T C Q L I D I E P S K I S A L I T I Q T T

Fig. 4-7 *AtsARIS3* 遺伝子・*AtsARIS3* タンパク質の配列

4-3-2 棘皮動物門における先体反応誘起物質

前項において、ARIS タンパク質はヒトデ綱において、先体反応誘起物質を形成する共通の分子として保存されていることを発見した。ヒトデ綱は棘皮動物門に属しており、同門には他にクモヒトデ綱・ナマコ綱・ウニ綱・ウミユリ綱が存在する (Fig. 4-2)。本項ではこれら棘皮動物門の動物についての先体反応誘起物質を解析した。

まず、比較的個体サイズが大きく配偶子を大量に得られるマナマコ *Ap. japonicus* (ナマコ綱) を用いて、マヒトデ同様に卵ゼリーを解離して回収し、ゲル濾過クロマトグラフィーの糖に富む画分を精製したところ、先体反応誘起能を示した (Figs. 4-8A, 4-9A)。このマナマコ ARIS (ApjARIS) を SDS-PAGE によって解析すると、ヒトデにおける場合と同様に3つのバンドが観察された (Fig. 4-9B)。

ウミユリ綱に属するニッポンウミシダ *Ox. japonicus* も放卵に伴って、大量の粘液として卵外被を放出するため、大量の卵外被の回収が可能であった。得られた卵外被から同様にゲル濾過クロマトグラフィーの糖に富む画分を精製したところ、先体反応誘起能が確認された (Figs. 4-8B, 4-10A)。このニッポンウミシダ ARIS (OxjARIS) を SDS-PAGE によって解析すると、やはりヒトデにおける場合と同様に3つのバンドが観察された (Fig. 4-10B)。

ウニ綱においては、ツガルウニ *G. crenularis* を用いて解析を行い、ゲル濾過クロマトグラフィーによって得られた糖に富む画分 1~4 (Fig. 4-11A, 橙四角) は確かに先体反応誘起能を持っていたものの、SDS-PAGE による解析においては明確なバンドが検出されなかった (Fig. 4-11B)。ウニの先体反応誘起物質である

FSP はタンパク質成分をほとんど含まないとされており (Keller and Vaquier, 1994)、それと一致した結果である。

残る最後の一綱であるクモヒトデ綱については、ニホンクモヒトデ *Op. japonicus* を大量に採集して卵ゼリーの回収を行ったものの、個体が小さく卵の量も限られていたので、更なる精製は行えなかった。しかしながら、卵ゼリーには先体反応誘起活性があることは確認した (Fig. 4-8C)。

マナマコ・ニッポンウミシダからそれぞれ精製した ARIS は十分な量があったので、エドマン分解による N 末端アミノ酸配列解析を行った。得られた配列は AaARIS1, 2, 3 と類似した配列であり (Table 4-4)、*AaARIS* の相同遺伝子が ApjARIS, OxjARIS を構成するタンパク質をコードしていることが強く示唆された。

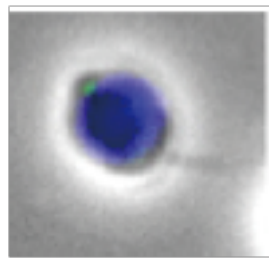
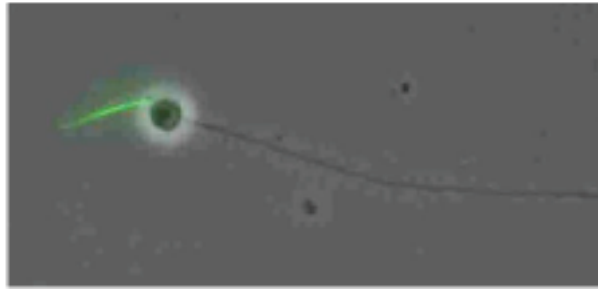


Fig. 4-8 先体反応誘起された精子

A. マナマコ精子, **B.** ニッポンウミシダ精子, **C.** ニホンクモヒトデ精子

青 : Hoechst で核染色 緑 : Alexa-phalloidin で F-actin を染色

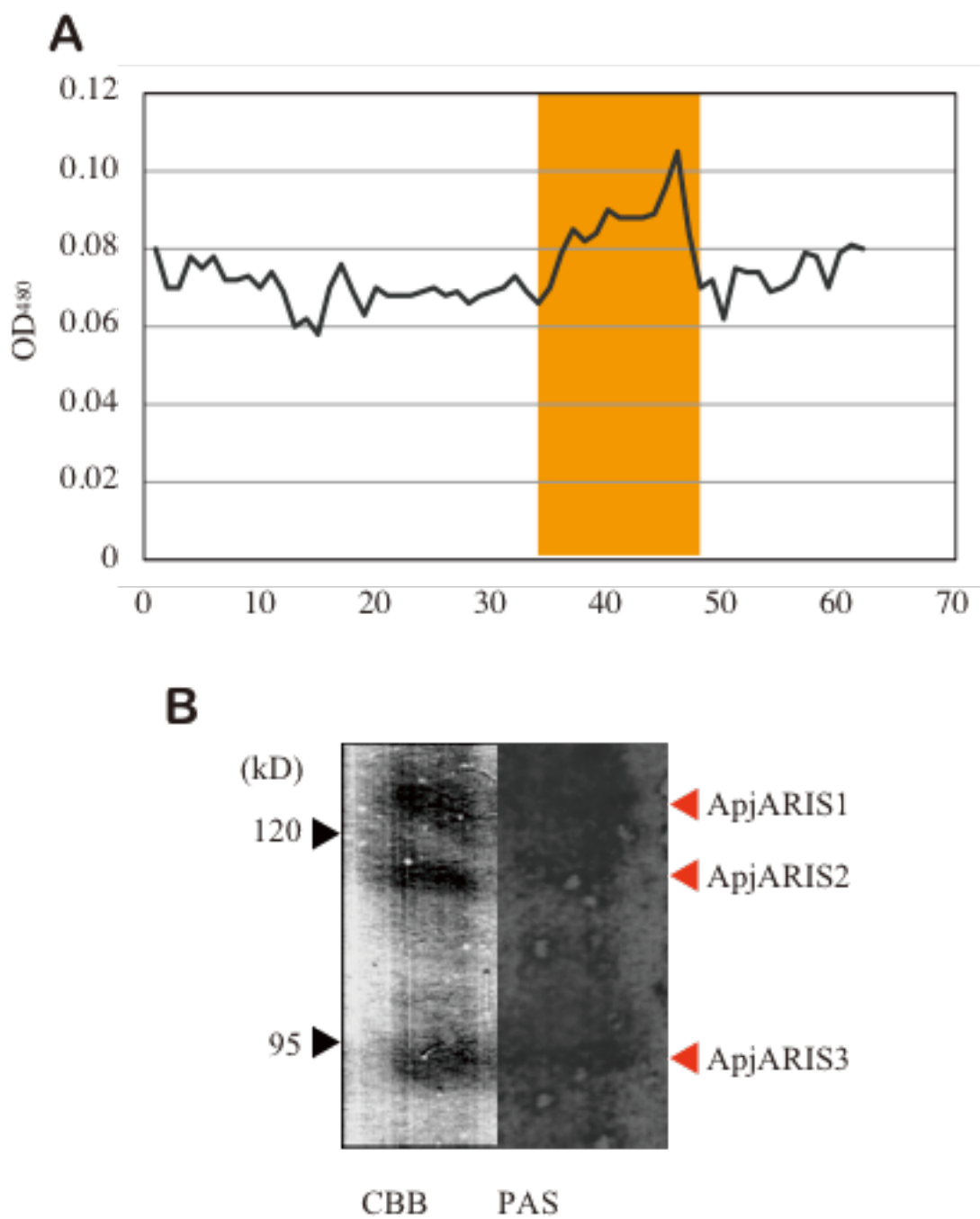


Fig. 4-9 ApjARIS の解析結果

A. AspARIS のゲル濾過クロマトグラフィー結果。縦軸は糖濃度、横軸は画分番号。 橙色の画分を回収した。 **B.** CBB 染色, PAS 染色によってそれぞれ検出を行った結果。7.5%アクリルアミドを用いた。

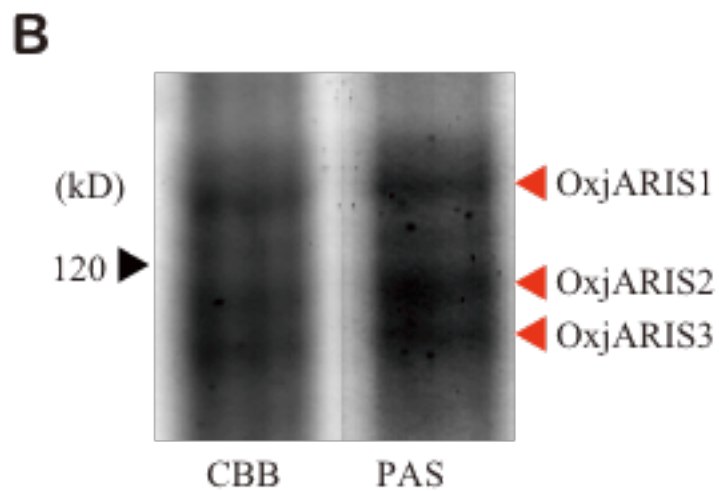
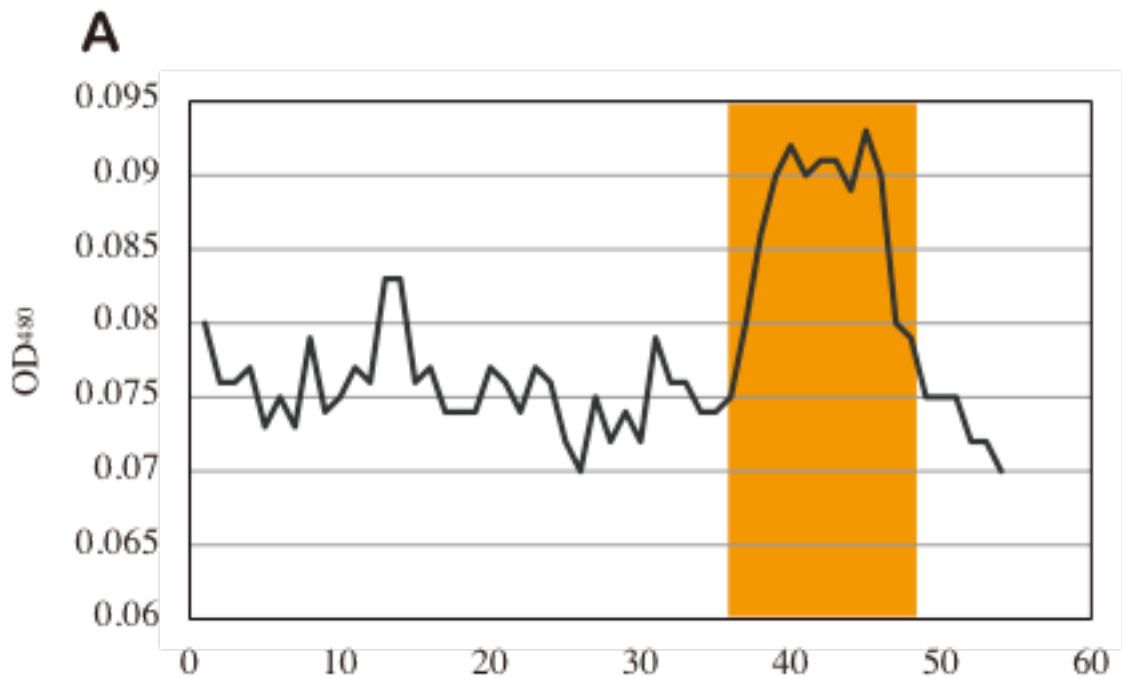


Fig. 4-10 OxjARIS の解析結果

A. OxjARIS のゲル濾過クロマトグラフィー結果。縦軸は糖濃度、横軸は画分番号。 橙色の画分を回収した。 **B.** CBB 染色, PAS 染色によってそれぞれ検出を行った結果。7.5%アクリルアミドを用いた。

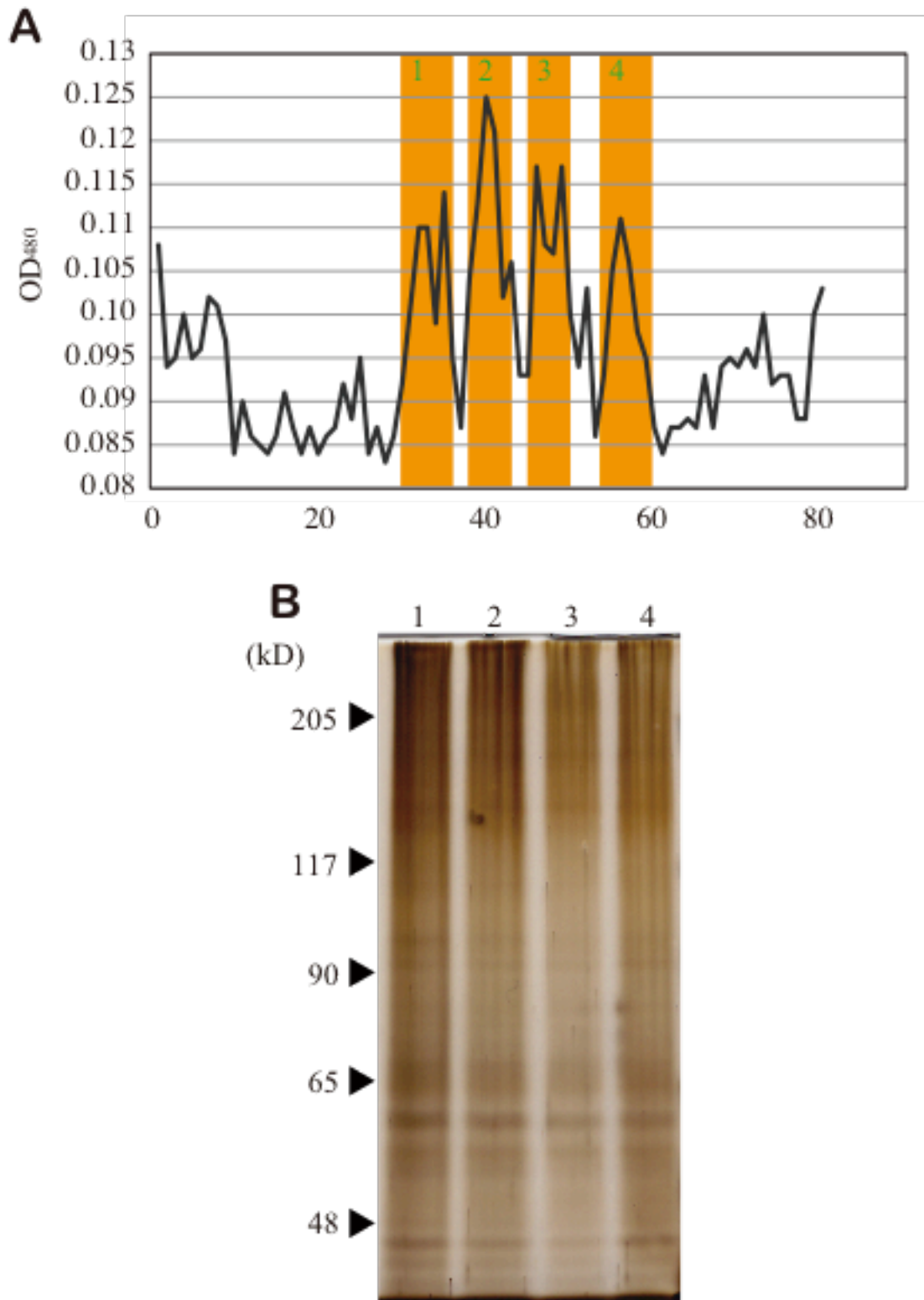


Fig. 4-11 ツガルウニ先体反応誘起物質の解析結果

A.ゲル濾過クロマトグラフィー結果。縦軸は糖濃度、横軸は画分番号。 橙色の画分1~4を回収した。 **B.**画分1~4画分のSDS-PAGE結果。7.5%アクリルアミドを用い、銀染色した。

Table 4-4 ApjARIS, Oxj ARIS の N 末端アミノ酸配列シーケンシング結果

ApjARIS1	YFGKPLAYGQDD
ApjARIS2	QFGASISDEVAD
ApjARIS3	VFGDDISQDNED
OxjARIS1	GFGD
OxjARIS2	AFGDPIDDKV
OxjARIS3	KFGEDISANNED

4-3-3 棘皮動物門における *ARIS* 遺伝子

前項において、マナマコ・ニッポンウミシダにおける先体反応誘起物質 *ApjARIS*, *OxjARIS* が *AaARIS1, 2, 3* 遺伝子の相同遺伝子の産物であることが示唆されたため、これらの動物における *ARIS* 遺伝子を取得し、比較することを考えた。

マナマコは卵巣 EST データベースが存在することから、それを利用することで、*ApjARIS1, 2, 3* の全長配列の取得に成功した (Fig. 4-12)。卵巣 RNA から作成した cDNA を用いて配列の確認を行った結果、一致したので配列は妥当であると考えられる。得られた配列の N 末端配列はエドマン分解による N 末端アミノ酸配列解析の結果と一致したことから、*ApjARIS1, 2, 3* がそれぞれ *ApjARIS1, 2, 3* をコードしていることが証明された。*AaARIS1, 2, 3* と *ApjARIS1, 2, 3* のアミノ酸配列を比較すると、*ApjARIS2, 3* は AR-N, AR-C と C 末端の膜貫通領域という domain 構成で一致するのに対して、*ApjARIS1* は AR-N, FA5/8C, AR-C という domain 構成であり、Kringle domain を欠失した編成となっていた (Fig. 4-13)。

ニッポンウミシダ・ニホンクモヒトデについては、データベースが存在しなかったため、縮重プライマーを用いて PCR 増幅を試みた。結果としてニッポンウミシダから *OxjARIS1, 2, 3* の断片 (Fig. 4-14)、およびニホンクモヒトデから *OpjARIS3* の断片が得られた (Sakaya H., in preparation)。いずれも、その ORF のアミノ酸配列は *ARIS* domain を有しており、*OxjARIS1* は *ApjARIS1* と同様に Kringle domain を欠失した構造となっていた。

ウニ綱については、ツガルウニとムラサキウニ *A. crassispina* の卵巣 RNA から作成した cDNA をそれぞれ用いて *ARIS* 遺伝子の探索を行ったが、相同遺伝子の

発見には至らなかった。ゲノムが完全解読されているアメリカムラサキウニ *Storogylocentrotur purpuratus* のデータベース探索から *ARIS* 相同遺伝子が見つからなかったことから、ウニ類には *ARIS* 遺伝子が存在しないことが強く示唆される。

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 CGGGATTCGGACATTTCTTCGACGGGCATTATTAGTCTATAGGTGTACGTTTCATCTGTTTTCTTTTCAGTTCGTCTAGGTTCTTTCTGTTGTCGCCAAT

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TCTCGAGTGTGCTGTTGCTTCCGTCGATGGATTTTCCGTTTTGTTAACTTTCTTTTGGTACARTGTATCTCATATTACTTCCCCARTCGAGCT
 M D F S V L L T F L L V Q C I S Y Y T S P I E A

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 TACTTTGGGAACCTTTGGCCTACGGTCAGGATGATTTGTTTGCAGATATGGGACAGCAACAGTTCGGGARTTTGACATTACAGACGGTGTGCTTGTAC
 Y F G K P L A Y G Q D D L F D D M G Q A T V R E F D I T D G V V V L

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 TGAATGTGAGACTGAGAACACAGATGGTGAAGAGGAGCTATGGGTGTTAGATTTCCAGAGATATGATTTGGACGGTACCATGGCAGTTGGTGGACGA
 N V E T E N T D G E E E L W V L D F Q R Y D L D G T M A V V V D D

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 TGCCGGTGGTCTCARGGCGGCAACTACTGGTTCATGTTCCAAACATATTTAATGACGCACATATAGCCGCGGATTTTACATGGATRACTTTGAACCACAA
 A G G L K A D N T G S C S N I F N D A T Y S D G F Y M D N F E P Q

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 CCCCCTGGAGTGAAGGATCTATACACTTCATTTCATCAGGGGAAACGGATTTCGATCCGGATACGACATGAGAGTGGATAGTTTATCTTCAATGGTAACA
 P P G V K D L Y T S F I R G N G F D P D T N M R V D K F I F N G N I

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 TCGATGAGCTCTTCGCCTGCCAGATACCAATACAGAGTCTGTTTGGGTGAGGATGTTTACGAGAGATCCATTGATTTAACACACACGCTTTATTTAAC
 D E L F A C Q N T N N E S V W V R N V Y E E S I E F N T T L Y L T

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 CAACGTAGACCCAAATATCCAGACCGAGGTTACATCTCCCATCTTACGTAGAGAGTTATGCTGTCCCTCTACTGGCAGCTTCCGTTTAGCTTTATCT
 N V R P K Y P D R G Y I L P S Y V E S Y A V L Y W R L L R L A L S

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 AGGTTTTAATAGTCTACCAGAGATGAGACCAATCTTTTCAGTATGCTATCGTAAGACCGTTTATTTGGAGATGACCCCGACATGATATCGACC
 R F L I S S T E R L R P I F Q Y A I V K T V Y L E D D P D N D I D R

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 GCTCTAGGGCGGAGTAGAGATGGCATTCAAGACCATCACAGATTCTGACGGTGAACACTATTCTGTTTATAAATATGGTTCGTTAGTATATACATCAGC
 S R A E V E M A F K T I T D S D G E L I S V Y K Y G S L V Y T S A

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 AAACAGCAGGATACTCTCAGCCACATCAGCTACTACCATCGAGAGGTTGTAATACAGCCCTTGGTATGGAAATGGCAATATTTTGGATTCTCAACTT
 N S R N T L S H I K L L P S R G C N T A L G M E N G N I L D S Q L

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AGTGCCCTTCTTCCCTTCGCTTCCCTCGCCTGGTACGGCATTATATGCTCCTCAAATGGTCGCTTAATACTGACACAGGAGATGATAGTGGTGGAGCAT
 S A S S S F A S S P G T A L Y A P Q N G R L N T E Q E N D S G G A W

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 GGATTCAGACTCTGGTGTCTTATCCATACATACAGATCGATCTTCTTGCACCCATCCCATATCAGGCGTGTACGCGAAGGAGAAATCTAGGCTT
 I P D S G D L N P Y I Q I D L L A P I P I S G V I T Q G R N L G F

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TCAGCAGTGGGTGCAAACTTTCCAGTTGCCTACAGCGTTCCAGGTGACCTTGGAACTAGTCACAAACCATGATGATGATACGAAACGTTTCAGTGGC
 Q Q W V Q T F Q V A Y S V P G E P W K L V T N H D D D N E T F S G

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 AACTTCGATTCATCGACTCAGTAGTCAACTATTTTTCCAAACCGAGTGAAGGCTCAGGTTTTACGTATTTTCCCTTTGCATTTTACCAACCAACCATCGT
 N F D S S T Q V V N Y F S N P V K A Q V L R I F P L T F N N Q P S L

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
 TCGTCTGGACTGTTAGGTTGCCAGATGAGACCATAGAGCTTTGGTTGATCTAGACGTRAACCATACACCCCAATCGACTTTACCGAGTACCGTGG
 R L E L L G C P D E T I E A L V D L D V N H T P Q C D F T E Y R G

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 ACAGTGTACTCAACAGTGGTACTTCACTCTGGTACTAATGTTGATGAAGCCAGTGTGACARACGACAGACCAATCGACTGCACTGGTACTTTCAATTT
 Q C T Q Q W Y F T L V L N V D E A S V T N D R P I D A T G N F Q F

1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 AATATGAACCTACAAGTGTTCARACTTACGATGTCATCAAGCACTGTGGATACATGTGACTACTGGAGGTACCAGACGCTATCATATCGCACGAGA
 K Y E T Y K C S N L T M S S S T V D T C E L L E V P D A I I S H E I

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
 TTACACTTCAGAGCACAGTGGAACTCATCGATGCGAGACGATAGTCCGAGGTTGGTTGTGAGCAGGTGTATGGCCGAATATGCAATCAACCTGGT
 T L Q S T V E L I D A E R D S P R L V V K Q V Y G R N N A I N L V

1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 CGGAGGATATAAACCTGGTGTATCTCATCTAGAGGAGTTACCATTGAATAGCTTTCTCCCGAATTTCTGCGGAGCAGCTTACAGTTGGAGCTGACC
 G G Y K P G V S H L E E V T I E I A F F P E F L R S S L Q L E L T

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 CTCTTCATGGTCTGCGTAGGGGAGACTACAATGAGGACCCGGATGGTTGCCTATCGGCTCCGGTGGATGATCGTTACGCTGCTTACATAGCTGATGACT
 L F M V C V G E D Y N E D P D G C L S A P V D D R Y A A Y I A D D F

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
 TCTACTACCAGATGACACCAGGAGCGGAGAGGTCGAGGGTTCCATTCTAAGAATTATGACATCACAGTTCACCACAGGTTACTGTCGGAGCAAGCTA
 Y Y Q M T P R N G E V E G S I L R N Y D I T S S P Q V L S E Q S Y

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
 CGTACCCGATGATGAATATACAGATTAAATTCATCAACAGGCGCTGTCTGGCAAAACCCGAGAGTACACGATATCACCCGCTTTAAGCTGGTCCGAG
 V H D D E I Y R I K F I N K A L S G Q T R E Y T I S T V F K L V E

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 AGGGATCTGAACGCAAGAGAGGGATATCGTTCGAGAGGATTTCAATCTGAATCAACACACCCTCAGATGGCTACAGTACAATACTGGATAAAGGAT
 R E S E R K R R D I V R R D L Q S E S T Q P Q M A T V Q I L D K G C

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500
 GCCCCAAGACAGCACTGCATTACCCCAAGAGCTGGAAATGATGTGTCTGAAGGCTACATTTACTCTGAAGAATGTTGGATTGCATTGTACCACAGT
 P K T A L H Y P K E L E C M C L K G Y I Y S E E M L D C I V P Q V

2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600
 TGAGTTTGAAGACGAGTTAATGAGCCACTGAAGACCAGTTCTTAAACGAGAGGAGGATTCAGATGAARCCGACAGACGGATCTTGCACAGAAAT
 E F E D E V N E P T E R P V L N E K E D S E M K P T D G I L H K N

2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700
 CCCTCGGCAGCAGCCAGCCAAATATTTAATTCATGTTAGCTCTCATTGTGCTACTTTCTTCTATTCAATATTTCTTGTGATAGCTAACTTATCTTCA
 P S A R A S Q Y L N S M L A L I V L L S S I Q Y F L *

2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780
 ATTGTTTCTCTGTCATTTAAACAAATGAGAACTGTGTACAAAAGTAGGTGCACAAATTAATACATAATACAGCAGACTCG

Fig. 4-12A *ApjARIS1* 遺伝子・ApjARIS1 タンパク質の配列

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GAGTATCAACTAARATTTTCAGGACAGCGCTTTACTTTACARATTTAGTTTCCTTGGTGTCTCGAGTTGCATTTTGTTCAGAGATGTTTTCTAGAACGCCCT
 M F S R T P S

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 CTTTCGGTATTTTTGTCCGTGTCGATTCTGTTTTCTGGTGGAGCACGTGCTCAGTTTGGAGCGTCCATCTCCGACGAGGTCGCTGACGAGCGGTTTCGTAA
 F G I F V L S I L F S G G A R R A Q F G A S I S D E V A D E R F R N

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 TGTAGGTCAGGCTTACGTCAGGAATTCGAARATGTTGATGATGAACAAAGTTTACTGTTGTTCTTGAGGACACCGTTGGAGAGAGGAATCTGGGTA
 V G Q A Y V K K F E I V D D E T K F T V V L E D T V G E K E Y W V

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 GTCGACTTTGACCTTACAAATATGAATCTTCAAAATTTGGCAGTGGAGAGATCAACAGGGGATATCATACCAGCAACACCCGGTGAATGTTCCAGTGTGA
 V D F E P Y N M N T S K L A V E E S T G D I I P A N T G E C S S V I

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 TTGGTGAAGGGGGTTCCACACATAGCATTCCGGCCCGGATATTACTTCTCAGATCTAGGCAACTTTGAGGAATGAATATATCCGCTGACGAGATTCT
 G E G G F D H I A F G P G Y Y F S D L G N F E E M N I S R D E I L

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 AATGCCGATCAGAACGACTAAGCGGTTATTTACCCATTATCGTAGAGGGCAACTTACAGTGACACGACATCAGAGGAGAGAACTTCAACGGCAG
 N A D Q N G L K R L F T H Y R R G Q T Y S D N D I R G E E L Q R Q

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 GATTACACACTGGCGTTTGACGGAAATTTCCGATTCTTTTTCAACTGCACCAATTTCCCACTCGCAGTCGATATGGGAATTCAGTACACGACACCAACCG
 D Y T L A F D G N F G F F F N C T N S H S Q S I W E F S N T T Q T V

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 TCGAGTTCAGAACACATACATTTTACCACGTCGCTCCAGTTGATCCCTTGTGGTGGAGGGTTTCATCATGGGTTTCTTCCAGTGTGACTCAT
 E F R T T I H F T N V R P V D P L D G S E G S S W V S S S A E L I

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 CTACAGGATTTCAAGATCGCCATCGTTAATTTTCACTCTCAGCTCTACTGCTCTCGTCAACCAAGTGTGATTCAGTCAATTTGGACCCCTACATTGAG
 Y R I S R I A I V N F I L S S T A L V K P V L D V V I I G P Y I E

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 AATGATTTGCCGATACCGGTAAGCACACGTCGAGATTCATTTTCGACACCCGTTGGAGTCTACAGAGGGAGGCTTTTGGCGTACATACTAGATACTT
 N V L P I P G K A H V E I H F R T T V E S T E G E L L A Y I L D T F

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 TCGAATCAATTCAGTACACACTTACTACGTTGGACCAAGTCTTGGAGGATCGTATGGGACCGTCCATGTTCCCTTGTATGATTAATCAATGATGA
 E Y N S R D N I T T L D Q V L E G S Y G T V Q C S F D V L T Q C E

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 ACAGAGTGGTACTTCAAGCTGGTACTCGATGTGTCGGATCACGTGGCTGAGGATGCCGTTCCAAATCGATGCAACTGGTACTTTCCGCTTTAGTTTCCAA
 Q K W Y F K L V L D V S D H V A E D A V P I D A T G T F G F S F Q

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 TTACACACTGTTCTGACCCACGGGTTCCCCACCTCAACTTGTCCGAAAGGCGATAGATCCATTCTTCATCTCCATGGAGATACCAATCCGACTG
 L H N C S D P T G S P P S T C S E K A I D P F F I S M E I T I Q T V

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TGGTGAAGTGTCTGATAGCGAGAGGGACAGTCCACGATCGAGCTTTTCTCACTTCAGGGAGAAATGGAGATGACCTGAGAGGGGGACTACGAGG
 V E V L D S E K D S P R I E L F S L Q G E N G D D L R G G T N E G

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 CCGGAGAGGCGTTAATCATTTAGAGGAGTTTCATGAAGTACGATATCAGCCCGAATTCCTAAGAGATGACTTTGATTTGAGTATATGCTTTTCATG
 R R G V N H L E E V S M K V R Y Q P E F L R D D F D L K L M L F M

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
 GTTTCARAGACGACAGACCAGAACCGTTGCGGGTTGCTGGATGTGGAGACGCTCACCAGGTACATCGCCTACTACGACACGGATTTCATTTACGAT
 V C K D D K T E N V A G C L D V E T S Q R Y I A Y Y D T E F I Y E Y

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 ACACCACGGACGGCGAAACCGTGACGCGGTTTAACTTGACTGATATTGATCCGATCCGATCCGACCGGGACGCGACACACACAGATGTTAAGTTA
 T T D G E N V T R F N L T D I E S E W N P N G N A T T Q Q M L S Y

1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 CCATGGTTACGATAGGGACCCAGCATCTACCAATGGATTTACCAATAGTGCTCTCACAAGTTCGACTGGATATACAATACACTGTATACGAA
 H G Y D R D T S I Y Q M D F T N S A L S Q V R L E Y T I T T V Y E

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
 CTCATTGAGCAATACAGGGAGGAGAGTCAAGCATTGTTCCCAAGAGGAGAGTGATTTGATGATTTATAACTTTTCATATCGAGACGGAGAG
 L I E A N T R A K R S Q S I V P Q E E S E L M I Y N F H N R E R R D

1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 ACATCTGGACAGCCGTTCCAGGATCTCAGCCCAATACCGTCAAGCTCGAAACCTTGGGTTGTCCCGAAATTCGTGTTTTGAGGACCAACAGTGTATCTG
 I W T A V Q E S Q A N T V S L E T L G C P E N S V F E D Q Q C I C

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 TGTGATAGAGGGGAGGATATGACCTGATACATTCTCCTGTCACCAATGGATCGGAGCAAGTCGTTGACCAATTTGATGAGAGGAAAGTARTAG
 V I E G E G Y D L N T F S C Q P M D A E Q V V E Q I D E E E S N E

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
 AAAGAGGACCGATTCCATCCTCATCTCCATCTCTTATGGCTTCGTGTGCATGTTCCCTCTCTGCTATACTTATCTGTTTACTGTACAAATTAAGTT
 K E E P I P S S S P S L M A S C V M F L S A I L I C L L Y N N *

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
 TCACAGGTGTAGGCCTACTCAACCTACCGTACTGTAGTGTCTCGTCACAGTATTTGAGCTGATCGTTTGACATTAATTAATACCATTTTTT

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 AAGTATTAATGTTGTAAACGTGTGAAGACTTGTCCCTAAGATTGTTTCAAAAGCACGTTTATACATAACCAACTTGGTTCTGCAGTGTCTGAGACA

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500
 CGAATAATTTGATGTTCCGTCTCTAATATTGATTGAATTAATTTATGATGTATTTTGTCTTTCAATTTTCTCTTCAGTGTCTTACGGGGAAAGTG

2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600
 TGTTAARACACCGTTACAACTTTTCGTATTACAGTATCTTAGGTACAGTAACTTCGATGCTTTTTTTGTCACCCACATTTTGGGAAATGTGTTTAC

2610 2620 2630
 ACARTAGACTTTGAGAAATCTGCATTTT

Fig. 4-12B *ApjARIS2* 遺伝子・*ApjARIS2* タンパク質の配列

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GAACATCCTCAGGATRAAGTGTCTTCATGGAGTCTTTAGTTGGGAGTAACTCGCGTCAGTGTGCTCTTCCGTTCCGTTCAARTTCTGTTGGTCTTRA

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TACGTTGACTCTAAAATGGACCGGGTTCTCTCGTTTGTAACTTACTATATTTCTTTCTTTTCTCTCAACGTTCCGCTGTGTTGGTGTATG
 M D A G F S R L L I L T I F L S F F S Q T F A V F G D D

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 ATCTCTCAGATATGAGACACAGATTGCGAARATGGGTCAGGTACGAAACACGTTTCGATATACGGATGGACAGTGGAGCTGATCTTTGATG
 I S Q D N E D N R F A E M G Q V T K N T F D I T D G Q V E L I F D V

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 TTCAGATACTAAGATATCGACGAGTGTGGATTTAGACTTCGAGCCATACCGCTTTGACGAGTTCGCGCTACCCGTTAATGACTGACTGGTGAAT
 Q D T K N I D E L W I L D F E P Y R F D E F A L P V N E L T G E L

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 TATCCTAARACACACTGGTGTATGTTCCAGTGTTCAGAAACGGTACAGTGGACTTTCTTACCGATTCTTACTTTTCGACAGAAATGAGCACACTG
 I L N N T G D C S S V Y E T V Q W T F F N D S Y F R D R N E A Q L

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 TCTACGAGAACTCTTCCAGTCTTTGTCTCCGGGAAATACGACGGAGACGGAAACGACAGACCAGATATTTACAGAGGAACATTCGCTAGTT
 S T K N L F T S F V S G E N Y D G D G I R T D Q I I Y R G T I A S F

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 TCTTTGAGTGTAGAAATCGACGAGGAGCGATGTTTGGGTGCAGACCAACCCAGCAGTGTATGAAATCGAATACAGAACCAAGTATACGCCAC
 F E C K K S D E E S D V W V Q T N T S S D D E I E Y R T K V Y A T

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 GAATGTCCGACCTAAGGACCCAGCTGATATGAGCAGGTGTATCCTTTGTACAGGTATATCGAATATTTGGAGGTTATCCCGTCAAGCCATTTCT
 N V R P K D P A D N E A G V S F V Q S H I E L I W R L S R Q A I S

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 AATTTCAATCAGTTCACCGCCGCTTTGAGCCAGTTATCGACTTTGCTAGAGTTTCTGCTATCTTCGATGGACAGGGGACCTATACCGAGAGAA
 N F I I S S T A V L K P V I D F A R V S A I F D G Q G E P I P E E T

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 CACGACTTCACCTGAGATTACCCACAAATATGGACTCTGATGAACAGATTGTGTGATTAACCTCCAGTGGACCCCAATTTACCCCGATAACCCCTTACA
 R L H L R F T T I L D S D E Q I V S Y N S S G T Q F T P D N P L H

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 CGGTCTTAAGAGATTGTTTATGAGCCACGCCACCCCTTGACGCGAGTCCCGTGTGTGACAGGGCAGTTAGACGTCGGACAGGAACTCAGTTTCATGT
 G L K E I V Y E P T P T L D A R P V C D R Q L D V G T G T Q F Q C

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 CACCAACTTGGAACTTTATTTTTCGTTTGGATATTGATACTGCCTCTCAAAACAAGATTTTGTTCGATCGACGCCAGCGGAACGTTTGTATCTTCT
 H Q T W N F I F V L D I D T A S Q T K N F V P I D A S G T F D F F F

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 TCGATGTGTATAGTTGCGATTTAACACAGAACTGTTAGATAAAGCGAGTGTAAACAATAGATCCAGCTCCCGCTAAGGTCTCTACGCTCATTACCAT
 D V Y S C D L T Q N V L D K A T C N K I D P A P A K V S T L I T I

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TCAGACTACGGTATTATCACAGATAAAGAGGACGCCAGGTGAGCATTTTGTCTGTGTCATTGAAGAGGACCAACAAATGACGAACTCAGTGGTGTGCT
 Q T T V F I T D K E D D Q V S I L L V S L K G A N N D E L S G V A

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 GCGCGTGGAGTGGCTCACAGGAGAGCAGTGCATTCAGGTCAAGTCTCACCTGCTCTTCTCGAAGGATTACGAACTTAGATCTGATGCTGTTTCATGG
 A R G V A H K E D V T L Q V K F S P A L L R K D V D L D L M L F M V

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
 TCTGCARAGGAGACAAATACGCAGGGGAGATTTTCTACAGGGTTGTCTTCAGCACCAATCAGTGAGAGGTACGTGGCACACAGGGCAGTGAGTTCCCT
 C K G E Q Y A G E N F L Q G C L Q A P I S E R Y V A H K A S E F L

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 CTACACTGTGTTGTCCARACAGTGCACAGCGCTAGCCACCTACACGGTTGCTAACTTAACTGATGACTACCTACACACATTGACGTACAGGGGCTATGTA
 Y T V L S N T S T A L A T Y T V A N L T D D Y L Q P L T S Q G Y V

1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 ACTACCGATGAGAGGGGTGAGACTTGTCAAGTTCCCTTACCACGAGCAGCATTAAAAATGTTGCCCTATCTGCCGAATCATCCACTACACCATCACCA
 T T D E E G E D L S V P Y H E A T F K N V A L S A E S S N Y T I T N

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
 ACGTCTACAACTTATCGACAAAGCGCGCAGCAGCGTCGAGTAGCTCCCGAACATTGGATCATTGCGCGCCACGCTATACGGTCTGGTTACATCACCGC
 V Y K L I D K A R R R R R V A P E H W I I A R H A I R S G Y I T A

1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 ATCAGTTACAGTACCCTACATACTTTGACCGACCCAGCGAGATATCGATGACAGTTTAGCCGACTCTCACGGCGCAGACTCTCCTTCGGTCCCGTC
 S S Y S T T T Y F D R P K R D I D D S L A D S H G A R L S F G A V

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 GGGTGTCTGAGGGCGCATGGCACGACGAGATTTGCTTGACTGTATATGCCCGAAATACCATGTACAGTTTACGTCTTTTCATGTGAGCCCGCGC
 G C P E G A W H D E D L L D C I C P E N T M Y S L T S F Q C E P A L

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
 TCGATGACGTGCAGGTCGTCCGACGAGAGGGTCGCCGAGGTCGATAGAGGATCTGATGCTTACGTCAACCTTCTCTTTGTTTTCTGTCTTTGTT
 D D V Q V V A D E E V A E V D R G S D A Y V I K P S L C F L S L L

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
 AATGATTTGCTACGAATCTGGTAAAGACTATTCCGTCAAAATTTCTTTCTAACATCAATGTTTCATAGAATATTTGATTCATTGTTATAGCTTA
 M I C Y E I W *

2310 2320 2330 2340 2350 2360
 CAAGCTTACTGTGTGCCAGTATAAAATTAATTAATTTCAATTTTGGACGGAAATATCAATC

Fig. 4-12C *ApjARIS3* 遺伝子・ApjARIS3 タンパク質の配列

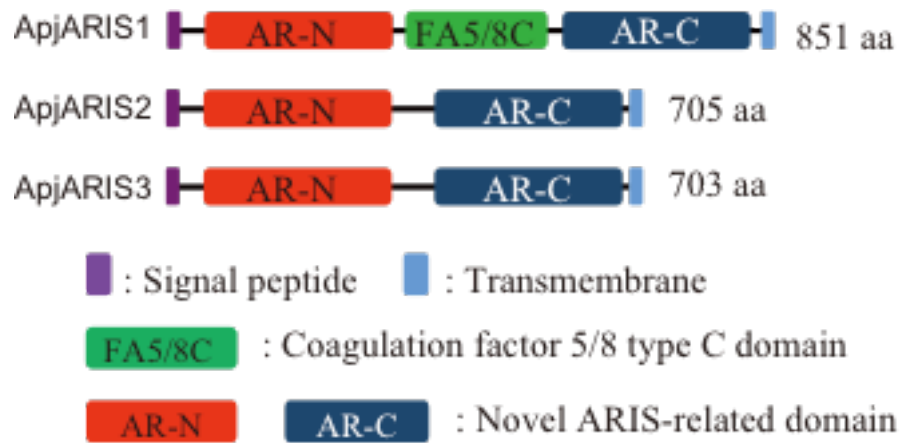


Fig. 4-13 ApjARIS タンパク質の domain 構成配列

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 CAGCCGGAGCAGCATACGCACTAARTACCCGGGTGATTCGGTGAGCTTAGAGACGACACATATCTTTTCTGGCCCGATGATACTCTTTTCGARTG
 A G A R A Y A T K S P G D S V K L R D D T Y S F S G P M N T L F E C

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TGTGACAGTARTGGCGACTGTTTGGCAACAGTCGGTTTTCCCGAGTCTATTCRACTGATACACCCCTTTATATGACTARTGTACGGCCAAACAC
 V D S N G D T V W Q Q S V F P E S I Q L N T T L Y M T N V R P K H

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GATGACGGCAACATCCTACCGACCTACCCAGAACCATGCAGTTCTGTATTGGACATTGATGCGTATCGCCTTATCAGGTTTCTTATTAGCTCACTG
 D D G N I L P T Y T Q N H A V L Y W T L M R I A L S R F L I S S T E

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 AGAGACTTCGACCTATATTCGAGTATGCCGTCGTGAACCAAGTTTTTCATTAACTGACGATCGCAGGTTTGGACAGGTTCCCGTCCGAGGTTGAGCT
 R L R P I F E Y A V V K P V F I N A D E S Q G L D R S R A E V E L

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 AGTGTCCGTACAGTGACGGACTCGGATGGGTACCTTATACCGGTCTACAAACCATTTGTCACTGGAGTACACCCCTGTCAATTTAGACACGGGCTGAGC
 V F R T V T D S D G Y L I P V Y K P L S L E Y T P V N L D N G L S

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 TATGTTTCGATTATACAGACAGCGGCTGTTCTGATCCACTAGGCATGGATCTAATGCCATCCCAACTCGGATATAAGTGCTAGTACATTCCCTCAAG
 Y V S I I P D S G C S D P L G M E S N A I P N S D I S A S T F L Q D

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 ACATCCACCACACACGCCCCGACTAAACGGCCTTTTCAGCCTGGAGTCCATCTGGCGTAGGTGATCAGTACATCGAGGTTAGTTTTCCGACTTCACACAC
 N P P H N A R L N G L S A W S P S G V G D Q Y I E V S F S D F T T

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 GGTAAGTGGACTCGTCACACAGGATTTGCCGTTTCTGAACTTGTTCGCGATATATAAACCTACAAAGTACATACAGCTTTAGTATCCCAATCTTT
 V T G L V T Q G F A V S E L V S A Y I K T Y K V Q Y S F S I P I F

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 ACATTCATTACAGATTCCAATATAGGGAATATTTTTCAATGGCACTTCGACGCGAGGTACACCTGTGCCAACTACTTCGCCGATCCAGTTACAGTAC
 T F I T D S N N E E I I F N G N F D A G T P V P N Y F A D P V T V R

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 GTGCTATCAGGATGTTCCGGACCCGTTGAAACTTTGCARTGTTACGATTCGAGATTCCTGGGTTGCTACCGATATTTGCCTGCTAACAAATAAAGTATT
 A I R I V P D T V E N F A M L R F E I L G C Y R I L P A N N K V L

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 GACGGCACCATCATCGATTTTACCAGTACTCGGGCAGGTGTACACAGCGATGGATTTTTGGTGTGATTTGATGTGGATGTACCCTTGTCCGGGGAC
 T A P S C D F T E Y S G R C T Q R W I F G V V L Y V D V P L S A D

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AGTTCTCAGCCACTCGACGCTACAGGTGAATTCGAATTCGAATTTCTAACGTACACTTGCCTGACATTCGATCTGGCGATAAGGCCACTTGGCAGGCAC
 S S Q P L D A T G E F E F K F L T Y T C P D I R S G D K A T C E A L

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 TTGATATCCAGATGCGATAATTTGCAACCTTGTATCCCTCCAGTCGGTGTGTTGACATAGAGGATGGCGACATTGATACACCCAGAGTATTACTAAGAG
 D I P D A I I S N L V S L Q S V V D I E D G D I D T P R V L L K R

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 GCTGTATGATCTTTGAACCCGAACACTGATCTAAGAGAGGCTTCGCCCTGGCGTATCTCATCTGGAGACTGTCTACGTGGAAAGTCACTTTTTTCCC
 L Y G S L N P N T D L R E G F A P G V S H L E T V Y V E S H F F P

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490
 GAGGTTCTAAGACACCAATTAGAGCTTAGCTTACATTGTTTATGGTTTTGCATGGAGATGATACGAACTAATGATATGGGCTGTTTAGCTGCTCCC
 E V L R Q Q L E L E L T L F M V C I G D E Y E T N D M G C L A A P

Fig. 4-14A *OxjARIS1* 遺伝子・*OxjARIS1* タンパク質の配列

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
CGTGGAGTCACCCACTGGAGACTGTCAGCATCGTAGTCCAGTACATTCCTGAATTCCTCCGGCGAGACTTCGATCTCGAGCTGACTCTCTTTATGGTGT
R  G  V  N  H  L  E  T  V  S  I  V  V  Q  Y  I  P  E  F  L  R  R  D  F  D  L  E  L  T  L  F  M  V  C

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GCAGACTGTCGTACAGAGATCCACTAGTTATATGAATCGTGGGTTGTCTGCAGGTGTCGCGAGCTCAGCGCTACGTGCGCTATCTCAGCTCAGACCT
  K  T  V  V  Q  E  S  T  S  Y  N  E  I  V  G  C  L  Q  V  S  Q  A  Q  R  Y  V  A  Y  L  S  S  D  L

      210     220     230
CTATTACGCTGTCGAGGGAACTGACGCAGAGGG
  Y  Y  A  V  E  G  T  D  A  E

```

Fig. 4-14B *OxjARIS2* 遺伝子・*OxjARIS2* タンパク質の配列

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 TTCCTCATCAGTTCCACTGCTATTATATGGCCGATGGTTGACCATGTACGTGTTCCGCAGTGTTTGTATGAAGTGGAGAGCCAAATCCAGACAGAGCTA
 F L I S S T A I I W P M V D H V R V S A V F D E S G E P I P D R A K

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 AACTCGAAGTTCAGGTTCCACACGGTTGCCGACTCGGAGACACAGATGGCAGTCTACAAGAGGGGCAGTTTAGACTTCCTCCAGAAATATACAAATCA
 L E L R F T T V A D S E T Q M A V Y K E G S L D F L P E N I Q N Q

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 AGTGGTAGATGTTGAAAATTTCCACCTTCCACTATTGAGGGTACACCAGCCTGTCAATTTTCTTCGACAGACAAACGGGACTTCAGAAACAAATGTCAT
 V V D V E K F P P S T I E G T P A C Q F S F D R Q T G L Q K Q C H

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 CAACGTGGGATTTACGATTGTACTCGACATTGATATACCGCTAGTAGACTTCACAAAGAAATACCGATAGATGCTAGTGGTCAAGTTCCGATTTCAAGT
 Q T W D F T I V L D I D I P L V D F T N E I P I D A S G Q F D F K F

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 TCGATCTACGATTGCGACGCGCCAGGCATGACGTTTTAGATACCTCAACGTGCGAAGCTTGTGGATGACGCTGTACCGTTTTCCACTGTGATCACAAAT
 D L Y D C D A P S N D V L D T S T C E L V D D A V T V S T V I T I

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 TCAAACTACAATATTTGTGCGTGATGAGGAGCAGATGCAATTACTATTACTCATTGCATTGAAGGGCGTGAATGAGGATTCATTGAATGTTCCCGAA
 Q T T I F V R D E E A D A I T I I L I A L K G V N E D S L N V P E

610 620
 GCGATTGAGGGTGGCTCACAAAGA
 A I R G V A H K

Fig. 4-14C *OxjARIS3* 遺伝子・*OxjARIS3* タンパク質の配列

4-3-4 その他の動物における *ARIS* 遺伝子

BLAST 検索の結果、棘皮動物だけでなく頭索動物や有櫛動物からも *ARIS* 相同遺伝子が発見された。本節では、棘皮動物門と姉妹群を成す半索動物門、及び相同遺伝子が検索で見つかった頭索動物亜門・有櫛動物門における *ARIS* 遺伝子を解析した (Fig. 4-2)。

半索動物はシモダギボシムシ *B. simodensis* を用いた。成熟卵を持つ個体 (Fig. 4-15) の卵巣 RNA を用いて cDNA を作成し、縮重プライマーで PCR 増幅した結果、BsARIS3 のクローニングに成功した (Fig. 4-16)。得られた断片配列には AR-C domain が含まれていた。

頭索動物はフロリダナメクジウオ *Br. floridae* のゲノムデータベースが存在するので、*ARIS1*, 2, 3 と相同な遺伝子断片の見られた領域からそれぞれ Genescan を用いて、*BrfARIS1*, 2, 3 の全長配列を決定した (Fig. 4-17)。AR-N, AR-C と C 末端の膜貫通領域は 3 つに共通に保存されており、相同遺伝子といえるだろう (Fig. 4-18)。AaARIS1 と比較して *BrfARIS1* は FA5/8C domain と Kringle domain の両方を欠いており、*ARIS1* には進化的に domain 挿入が起こったと考えられる (Fig. 4-18)。

有櫛動物については、データベース検索結果から得られる *P. pileus* の *ARIS* 相同遺伝子の断片をつなぎ合わせることで *PpARIS* のほぼ全長配列が得られた (Fig. 4-19)。さらに、米国 Woods Hole の Marine Biological Laboratory から *Mnemiopsis leidyi* の個体全体から精製した RNA が手に入ったので、cDNA の合成から縮重プライマーで PCR 増幅し、*MIARIS* のクローニングにも成功した (Fig. 4-20)。どちらも *ARIS* domain を含んでおり、有櫛動物において *ARIS* 遺伝子は確かに保存

されていると言えるだろう。また、有櫛動物の受精機構についてほとんど明らかになっていなかったので、カブトクラゲ *Bo. mikado* を用いて卵・精子の観察を行った。その結果、カブトクラゲの卵は棘皮動物や半索動物と同様にゼリー状の卵外被を持つこと、また卵に結合した精子がアクチンの重合を行うことが明らかとなった (Fig. 4-21)。

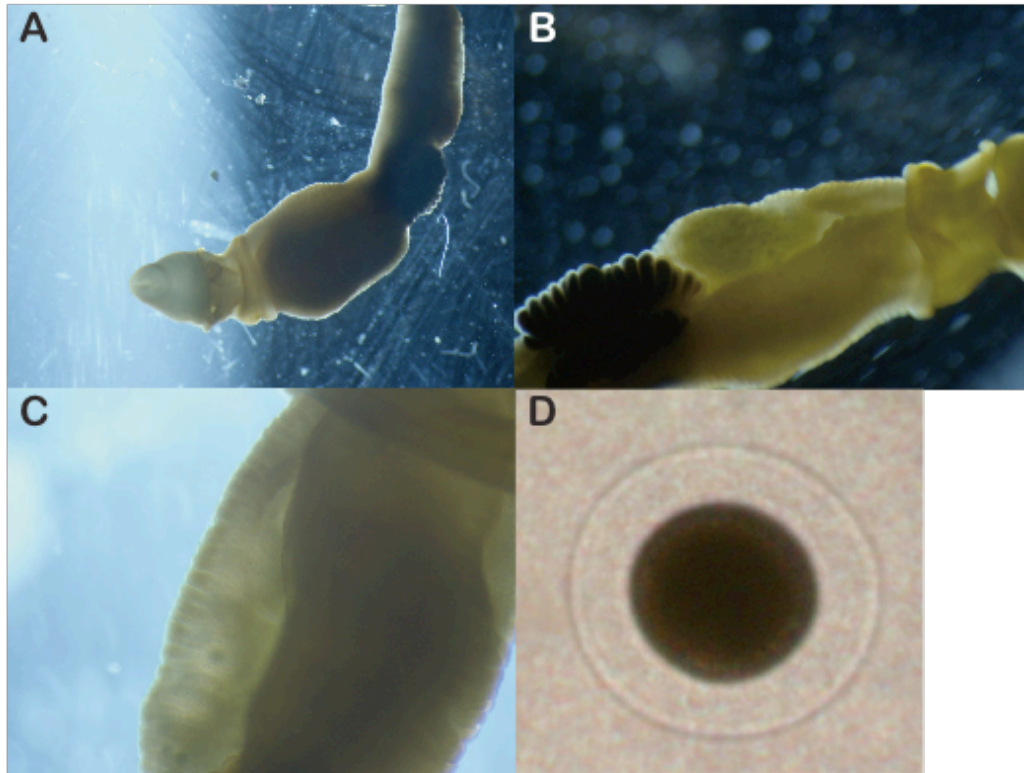


Fig. 4-15 *B. simodensis*

A. B. C. 性成熟した個体, D. 成熟卵

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 ATATGGGCCAGGTTACAGGGAGCGTTCAACGTGACGATGGGCCAGGTCGACATTGAACCTTATAGTCCAGACACCCGACAGTATACAGGAATATGGAT
 Y G P G Y K E A F N V T M G Q V D I E L I V Q D T D S I Q E I W I

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TTTGGATTTTCAGCCGTTCCAGTTCATTAAACGCATTGCCCGTAGATGAACCAACTGGTCAGTTAGATATGTCGAGACTGGGGAAATGTTCCAGCGTC
 L D F Q P F Q F I N N A L P V D E T T G Q L D M S R T G E C S S V

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 TATGAAGATTCAGCCTTCCACATTTCTCCAAGATGATTATTTGCCAGCAAGAAATGCAGCCGAGTTAACGAGTAAAAAACTATTTACATCGTTTGAAA
 Y E D S S F P T F L Q D D Y F A S K N A A E L T S K K L F T S F E R

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 GAAATGACGCGTTAGACAGTGACAAATCGAAGAAACCATAGATATCTACAGCGCGATTTAGAGACTTTCTTCGAGTGCAAAAAATCTGACGGGTCGAC
 N D A L D S D N R R N H K I I Y S G D L E T F F E C K K S D G S T

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 TTCGATCTGGGAGGTTACAGCAGACACAGCCGACGAGATAGATACCGTACCAATTGTACGCCACCACGTCAGCCAGGACACGTCAGATGCCCTCG
 S I W E V T A D T A D E I E Y R T K L Y A T N V R P K D T S D A S

510 520 530 540
 GCTGGAACTCCTTCGTCCAAATCACACATAGAACTCATATGGCGGTT
 A G I S F V Q S H I E L I W R

Fig. 4-16 *BsARIS3* 遺伝子・BsARIS3 タンパク質の配列

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 ATGCCGAGATTGCTCCCGCGTGTACCGTGTGGCTCCTGCTCGGGGCTGCGTCTCCCTGCCCGAGACGCCCGGGGTTGGCCAGCCCGTCAAGCT
 M P R L L P P C T V W L L L G A C V S L P R D A Q A G F G Q P V S Y

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 ACGTCAGGGACGACCCGTTCAAGAGATGGGGCAGGCCACGCTGAAACCTTCGACATCTCGGGAGAGACGCCGTGTTGGGGTTGAGCTTGAGACAC
 V R D D R F K E M G Q A T L K T F D I S G E D A V L G V E L E N T

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 CGTTGGCAGGACGAGGCTGGGTTCTGGACTTCCAGCCGTTGAGACTAACGACACGGGGCTCCTGTGGTGACCAACGTGACGACAGGGACTGCCACG
 V G E D E V W V L D F Q P F E T N D T G R P V V T N V T T G T A T

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 CTCCTGGCAGGCGCACTGGGGATGTTCTAGTGTTTTTCGCACCAGCTCGGCTAACCGTACACATGCTGGTTTCTACGATGACTCCTGGTTCCGGAGT
 L L A E R T G E C S S V F R T S S A N R T H A G F Y D D S W F P E F

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 TCATGACACACCGGAACAGAAATCTTCACCACTACACACGTTGGTGGGTAGCGGCTGGGCACCCATACGGCTGGATAACGTTGTCTTTTCTGG
 M N T T G N K K F F N N Y T R G E V A A G Q P I R L D N V V F S G

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 TCCARTGGCGAGTTTTTACCTGCAAGAACTCAGGACACACTTCTATTTGGGAGAGGCGACACTACACGGAGCAGTTCGAGTACACACCCACACTCTAC
 P M A T F F T C K N Q D N T S I W E R H N Y T E Q F E Y N T T L Y

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 ATGACAAACGTCAGACCGAAGGTTGGACCGTACGGGTCCTACGTCAGAGCCACGCTGTGTTGACTGGCGCTGCTGAGGGTGCCTATATCTAAGT
 M T N V R P K V G P Y G S S Y V Q S H A V L Y W R L L R V A I S K F

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 TTCTCATCAGCTCCACAGACAGATTACGGCGTATTTGAGTACGCCATTGTCAAGGCACATTACGACGCAACCGGATCCTGACTGGACCAAGCCCA
 L I S S T R Q I Q P V F E Y A I V K A H Y D A N G D P D W T K A Q

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 AATAGAGATGGCCTTCAGACCATCATGGATTCCGACAGTTACCTGATGGCTGCCTACCGATCTACTCCCTGGTGTAGGACCCACTCAACACACACAC
 I E M A F K T I M D S D S Y L M A A Y R S N S L V Y E P L N N N N

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 TCCCTACATAGCGTCATCAATGAACCATCTACACGACTCGTCCCTGCCACGATATGGCGGCTGTAGTTCTGGCTGTGACTTTACTGACAGGTTGG
 S L H S V I N E P S Y N D S S P A H D M A A V V P G C D F T D K V A

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 CGCCTGGACTGTGTACAGCGATGGTTCTCCACATCGTACTCAGCGTGTGAGTTCGGAAAGACGTCAGAAACGGCGAACCAATCGATGCTACTGG
 P G L C V Q R W F F H I V L N V F E V G K N V R N G E P I D A T G

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 ARACTTTATCTTCAGTACCTTTATCTGCATGCCGACATGACTGACAGCATTATGAGCACCTGTTCAATCATGACGGTTGCCGACCGGAGATTCT
 N F I F K Y L Y L Q C P N M T D S I M S T C S I M T V A D A E I S

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 GCTCAGATCCCTGCAGACAGTAGTGGAGGTCACAGACGACAAATACGACACCCAGGGTGGAGGTGAGAACCGTGTACGGAGTAGACCCGTCACGTA
 A Q I T L Q T V V E V T D D N N D N P R V E V R T V Y G V D P S R D

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 ACTTGCAGGGCGGGTACCCCCGGGGTGTCTCACCTGGAGGAGGTTACCTTGGAGACGCACTTCTCCAGAGTTCTGCCACAGACTACAGATGGA
 L Q G G V P P G V S H L E E V T L E T H F F P E F L R T R L Q M E

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 GCTGACCTGTTCTGGTGTGCTTGGGAAACAGTACTCCACGGCTTCGATCCAGATGTTGCCTGAGGGCGCCACGACAGCCGTTACTCTGCGTAC
 L T L F L V C V G E Q Y S T A S Y P D G C L R A P T T D R Y S A Y

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
 GAACATCCTGACTTCAGGTACGAGGGACAGGATGAGGGAGGGAGTCCGGTTACGTACACTGCRGACGACATCGAGGGCGCCATGCAGTCCATTATCCTACA
 E H P D F R Y E G Q D E G G S P V T Y T A D D I E A P M Q S L S Y N

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 ACGGCTATGTGGCGGATAGAGGGTCCATCAACTAAGTTTCGTGACAGAGCTCTGTCCGGAGTGTCCGAGACCTACAGTTCCAGTGTCTCCGTCT
 G Y V A D R E V H Q T K F V N R A L S G V S E T Y T F T S V F R L

1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 CACCGCGCTGGAGGGCAGGAGAAACGGCGGGTCCAGCGAGACATCATGGTCRAAGCGGCTGTTCTCAGGGTATCAGCCACGCTTACTATTCCCGGC
 T A L E G R K K R R V Q R D I M V K A A V P Q G I S H A L L F A G

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
 TGTCCAGAAATTCGACCTTTGTGCGAGAACCCCTAGACTGTGTCTGCACAACTTTGGAGAGCCCTACAGTACCAGACGTTCCGCTGTGAGCGGGCC
 C P E N S T F V R E T L D C V C T N F G E A Y S T K T F R C E A G L

1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 TCATGTCAGATGTGGAGATTACGGAGGGGTACCACGAGATCGACACTGGATTCCGATCCGGCTCCGCCCCTTAARCGATATCCTGACCTGGTCAG
 M S D V E I T E E G T N E I D T G F E S G S A P L N D I L N L V S

2010 2020 2030 2040 2050
 CGCCATCGGAATTGCTCTATTGTGTTAGCATTGACATCCAGCTAGCTGCCCTATAG
 A I G I A L L C L A L N I Q L A A L *

Fig. 4-17A *BrfARIS1* 遺伝子・BrfARIS1 タンパク質の配列

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 ATGGCTGCCGTACCGCACGCCCTCCGGCTGGTGTCTGGCGTCTCTGGCCGTCTGTGCCGAGGACCCTCAGGGCCGCTTCGGTGACAGGGTGACGGACG
 M A R A V P H A S A L V L G V L A V L C P R T A H G R F G D R V T D V

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TGGTGACGACGACAGGTTCCGAGGTGATGGGGCAGGCCTACGTGGAGACCTTCACTGTTACTAACGACGTGGTGGAACTGGAGTCTGGTGGAGGACAC
 V D D D R F E V M G Q A Y V E T F T V T N D V V E L E V V V E D T

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GGTGATGTTTACGAGTTCTGGCTGGATACAGTTGATGTGTACGAGTTTGGCTAGTGGATTTCCAGCCGTACGAGTTCCAGCCGACGGCAGCTGTTT
 V D V Y E F W L D T V D V Y E F W L V D F Q P Y E F S P N G T L F

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 AACAGGATACCGGTGAGATGGAGCGGCAGTACACCTCGCCCTGTGCTAGCTCCTTCTGGCGACTGAACTCTACAGTCCGCTTACGGCTACCCCTTCC
 N K D T G E M E R Q Y T S P C A S S F W R L N L Y S P S Y G Y P F P

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 CCTTCAGGACACGGGCAGCTTATCCCGACTAACGGAGTGAAGAGGGCGGCTTCCCCCAGCTGCTGTACACTACTACCTCAGAGTACCCCTA
 F T D T G S F I P T N G S E E G G V P P K L L V N Y Y L K S T P Y

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 CAACATCACGGACACCCCGCGGAGAGGGTGGAGAGGACACCAATAGGATGGTGTTCAGGGCTCGTCCGACTGTTCAACTGTACCGACAGGAC
 N I T D N R G E R V E R T T N R M V F Q G S S Y R L F N C T D T S

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 GGAGGACAGTATGGCGCTACCCACCCAGACGGAGACAGTGGAGTTCCGGTCTACCATCTACTTCCCAACATCCGCCCCATCCAAACCTCGGACCTCA
 G G T V W R Y T N Q T E T V E F R S T I Y F T N I R P I Q T S D L T

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 CAAGGGCCATTCCTATGTCCAGTCCCACGCTGAGCTGATCTACCGCATTTCCGGATCCGCTGGTCAACGTGGTGGTCAGCAGCTCGGCACTGGTCAR
 K G H S Y V Q S H A E L I Y R I S R I A L V N V V V S S S A L V K

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 GCCGCTGCTGAATTACGTATCATCTCCCTGGTTACGAAACCGGACGGCAGCCGGCCACGGACCTGGCCAGGTGGAGATACAGTTCCAGACGCTTACA
 P L L N Y V I I S P G Y E P D G T P A T D L A T V E I Q F T T S T

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 CAGTCCCGCTCGGGAGGCGGAACCACTACATCCACTCGGCCACCTCTCTGAACACTACACGGCGGACTATGTCTCCCTGCACGACCTGCAGACGGTTACAA
 Q S P S G E R N H Y I H S A T S L N Y T A D Y V S L H D L Q T V T T

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 CCTACCCACCCACACCCCGCCATGCGATATCACTAACGGCGCCATCAACCTGTGTACGACGACGTGGACGTTTGTGGTCACTTGAAGATCACCCCGCG
 Y P T T T P P C D I T N G A I N L C T Q T W T F V V I L K I T P R

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GAGCGTGGATGACGGCCTCCAGTGGATGCGTCAGGTGTGTTACGTTCCGGTTCGTGACGGAGCGGTGTACGACACCCTGCTGACGAGTCACTCGGCG
 S V D D G L P V D A S G V F T F R F V T E R C N D T T A D E S S A

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 AACTGCACCATCGTGGACACATCAACCCCTCCGTCATCTCCATGAACATCACTATCCAGACGGTAGTTGACCTGGTGGATGAAGATACAGACACCCCGT
 N C T I V D N I N P S V I S M N I T I Q T V V D L V D E D T D N P W

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 GGCTGGTGGTGAAGCTCTCCGGGGCGGACACCTGGACCTGCGGGGCGGGTTCGCGGGCGGACGGAGGGGGGTCAACCCACTGGAGGACATCCGGAT
 L V V T K L S G A D N L D L R G G F A A G R R G V N H L E D I R M

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 GGAAGTCAAGTTCACCCGAGTTCCTTTGGGACTTCTTCACTCTGGAACGAAATGTTTCATGGTGTGCATTGGTGAACGACCTGGCCATGATACGGGT
 E V K F Y P E F L W D F F T L E L K M F M V C I G D Q T G H D T G

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
 TCCTGGCGGTTACCAAGGACACCCGTTACATCGCACACCTGGAGAACCGCTTCGCGTACCAGTACGTGGACGGCAGCGGCGTCACCGACACCTCACAC
 C L A V T K D N R Y I A H L E N D F A Y Q Y V D G S G V T Q H L N I

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 TCAGCGACATCCATGACGCGGAGTGGGATCCTGTAAACCCCAACAGAGCCTCACAGCCACCGCTTACGACTCCACCAACACACCTGTACCACATGGACTT
 S D I H D A E W D P V N P Q Q S L N S H A Y D S T N N L Y H M D F

1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 CACCAACACCGCGCTGCTGTTGAGAGGAACTCCTACACCATCACACCGGTGTACCGACTGATCGAGAGCCGGGTAGAAAGAGCGAGACGTATCGAC
 T N T A L S F E R N S Y T I T T V Y R L I E K P G R K K R D V I D

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
 GAACCGATATTGCTCGACGCGTACGCGTGGTCAACCGTACATCATGACAGTGCACCCCTTCCACAGGAAACACATTGCGTTTGGAGTTCTGGGCT
 E T D I V L N G H V V K R D I M T S A T L P Q G N H I A F E F L G C

1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 GTCCCGAAGGATCCAGTACGACGAGACTCCCGCCACTGCGCATGACAGTCCGACACCCACCTGTACAGCAGGGACAGCTTCCAGTCCGAGCCGATCGC
 P E G S Q Y D E D S R H C A C T S D N H L Y S R D S F Q C E P I A

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 TGTCAGTCTGACGATCGCACCCCGACAAAGGACAGCGGAGCCCTCGTGTCTCCGCGAGTCTGTTCTCAATGACTTCTCTTGTCTTATATGGATGTTG
 V K S D D R T P T K D S G A P R V S A S L F S M T S L V L I W M L

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
 TATCTTTATCACGAGTGAGCATGATCGTTTAAAGCCTGGTCACTTGTGAATGCATAAGAACTTTGTAGACTATAGTTCTCAACAAAGTCTGACGA
 Y L Y H E * G M I V * G L V T C E M H K K L C R L * F S N K S L T I

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
 TCGCACCCGACAAAGGACAGCGGAGCACCTCGTTCCTCGCAATTAACCTGCCCCCAATAACTTCCCTCGTTCCTTATATGGATGTTGTATCTTTATAA
 A P R Q R T A E H L V P S Q I N L P P I T S L V L I W M L Y L Y N

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 CAGTGAGGAAATGATCTTGCCAGGCTAAATGCGTGAGAAATGATTTTGTAAACCCGATGTCTCGAACAAAGTAAATTTGAGCACCAAGATTTTGC
 K * G M I L P G * M R E K L I L * T R M S S N K V K L S N Q R F C

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500
 TTAGCTACATTCATTAAGTCTCTTGTACCATTTCTTTTACGATGGGTAAAGTAAAGTTACGTCACTTCTGTTATATATCTAGGAAACTGTCTGTTC
 L A T F N K V S C N H C F F T M G K V K L R H F C Y I S R K L S V L

2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600
 TATGCAATTTATATCCCTTTAGATATTTATACAAACACTGTTTAAACGTAATATCTTTGATGGTAAAGAACAGGTACACCTGGCAGTTCCCGCGACT
 C K L Y P L D I Y T N T V * N V N I F D G K N K V Q P G K F P R L

2610
 CGTGAATGTAT
 V K C

Fig. 4-17B *BrfARIS2* 遺伝子・BrfARIS2 タンパク質の配列

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
ATGTAAGTGTACATGGCTGCAGCGTGTCTCTCTGCACGGGGATCTCTTCATCCACACTGCAGAGGCGCGCTTTGGCTCCGACATCTCCACGGACARTG
M Y C Y M A R A L F L L H G D L F I H T A E A R F G S D I S T D N A

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
CAGATACAGGTTCCGCTACATGGGCCAGGTGACAGTGAAGGGAGTGGCCCGTGGTGGACGGACAGGTGGATCTGAAGCTGAACGTGGAGGACACGCGCTGG
D N R F A N M G Q V T V K E W A V V D G Q V D L K L N V E D T P G

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
GGAACTAGAGGCGTGGATCTGGACTTCCAACCCATACATGCACACGCCACAGCAGTGGCCCGTGGAGACGGTGGTGTGGTGGACCCAGACTGGT
E L E A W I L D F Q P Y M H N A N E Q W P V E D G W L W S N Q T G

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
GAGTGTCCAGCGTGCACACGCTCTGCAGAGTTCTACACCTTTCTGAACGACACAGGCTTCCAGTCCCTGACTGGGACGGGCGGAGGATCTGTTCAACA
E C S S V H T S A E F Y T F L N D T G F Q S L T G T G G K D L F N S

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
GCTACACCGAGGACCCCTAGGCAACGCCCTCCAGACGTGCAGCAGAGTGGCGTACTCGGGCCCGCTGAAGACTCTCTGGGCTGTAAAGAGTCAGGGTAG
Y T R G T L G N A S R R A D E V A Y S G P L K T L L G C K S Q G S

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
TAACGAATCAGTCTGGACATGACGTCAACAGAGATGAAGTAGAGTTCGGTACAGGCTTTATGTTGTCAACGTCAAGCCAAAGGACTATTATAGACCA
N E S V W N M T S T E D E V E F R T R L Y V V N V R P K D Y Y R P

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
CAGAAAGGAACTCCTTCGTGCAGAGCCACATAGACCTGATCTGGCGGCTGTACCGGACGGCGCTGGCCAAAGTCATCATCAGCTCGTCCGGCTGCTCC
Q K G I S F V Q S H I D L I W R L Y R T A L A K V I I S S S G L L R

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
GACCAAGTGTTCGAATACGCCATCGTCAGCACTGTGTATGACGTCAACGGGACCCCGACTGGTCAAGGCCCGGCTAGATCTCCGGTTCATCACCATCAC
P V F E Y A I V S T V Y D V N G D P D W S K A R R L D L R F I T I T

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
GGACTCCACACCCAGATGAGTGTGTACGTGACGCCAGCGCGAATACACCGCGCAGACCCCGCTAACGGGCTGCGGGAGGTTGGTGTACGCCCCGCC
D S N T Q M S V Y V N A S A N Y T A Q N P A N G L R E V V S A P P

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
GTGGAGCCGGACAGAGCGCGTCAATGTCAGCTCATCCCGCACTACATAGACGGCGGCTTCAGTGTACAGGTTGGGATTTCAATTTTCATCCTGGACA
V E P E Q T P S C Q L I P H Y I D G G L Q C H Q V W D F I F I L D I

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
TTGACACGAGCTCACTAATAGACGGACAGCCGGTGGACGCCACAGGTGACTTCTCTTCATGTACGACTCGTACACATGCGCGGTACCAATGGCACAGT
D T T S L I D G Q P V D A T G D F S F M Y D S Y T C A V T N G N V

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
CAACAGGACCCGTGCACCAAGATGCCGTCCCTTCCACCAAGTGTGCGCGGAGATCACCATCCAGACCACAGTAGAGCTAACGGACGCTGAGGCTGAC
N R T L C T K D A V P S T K V S A E I T I Q T T V E L T D A E A D

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
GCCATCACTCTGCACCTGCACAGGATGGTTGGCTCTGACACAGAGATGTGAGTGTGACGGCCCGCGGGGTGGCGCACCTTGAGAACGTGACCATGG
A I T L H L H R M V G S D N E D V S V N G R R G V A H L E N V T M E

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
AGGTGAAGTTTTCCCGGCTTCTGCGCGTGGACTACAGCTGGAGCTCAGCTGTTTCATGGTCTGCATCGGGAACGTCAAGAGCACCCAGCGGGGTG
V K F S P A F L R V D Y E L E L T L F M V C I G N V T E H P A G C

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
TTTAGTGGCAGCCCAAGATGATCGTTACGTTGCTGGAGGAGCCTCATCTGGTGTTCGATATAACGGCACTACTTGGCGCCATGACGACTTTCTATCG
L V A T P D D R Y V A W K E P H L V F E Y N G T T W R H D D F L S

```

1510      1520      1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
GACTACGACAGCCGCTATATTCACAGGGCTATGTCACGAGAGTGTGAGARCCCCACCCAGTCCACCGGTCCCAGTTCACCAACCTGGCCCTGTCAG
D Y E Q P L Y S Q G Y V H E S A E N P T P V H R S Q F T N L A L S A

1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680      1690      1700
CACAGTCTGCNCAGTACCCATCACTACGGTCTTCTACCTGGTGGCGAAGGARAGGGGCCAGGAGAGGAGGACACTACCAGGAACCAATTCATCATGAA
Q S X Q Y T I T T V F Y L V A K E G A R R R R A L P G K Q F I M N

1710      1720      1730      1740      1750      1760      1770      1780      1790      1800
CAGGGTGTGGGACCTGAGGACTTTCATCCATCGGAACAGCCCTGGCCCTTCCCGTACAGGACGTGAACTCATGGACCCATCAACGAACCAAGAGC
K V L G P E D F H P S E T A L A L P R T R R E L M D T I N E P K S

1810      1820      1830      1840      1850      1860      1870      1880      1890      1900
TTTGTGACTGCGTTTCAGTTTCTCTGGCTGTCCCTGCAATGCCAGATACGACCCCAAGCAAGGGCATGCGAGTGTCCAGACACATGGTGTATAGTTCAC
F V T A F S F S G C P A N A R Y D P Q Q R A C E C P D N M V Y S S L

1910      1920      1930      1940      1950      1960      1970      1980      1990      2000
TCACTTATACCTGTCAAGAGTTAGAGTGCCAGGATCAGGTCTTGAACCAAGTGGTACACCTAACTTAGGGGCCAGTATCATCCTCTTGTTCCTGTCCTG
T Y T C Q E L E V P G S G L E P S G T P N L G A S I I L L F L S C

2010      2020      2030      2040
TGTAGTTCAGCTTATACAGTCTGTGGTAAATTTGAGTGCTAG
V V Q L I Q S V V N L K C *

```

Fig. 4-17C *BrfARIS3* 遺伝子・BrfARIS3 タンパク質の配列

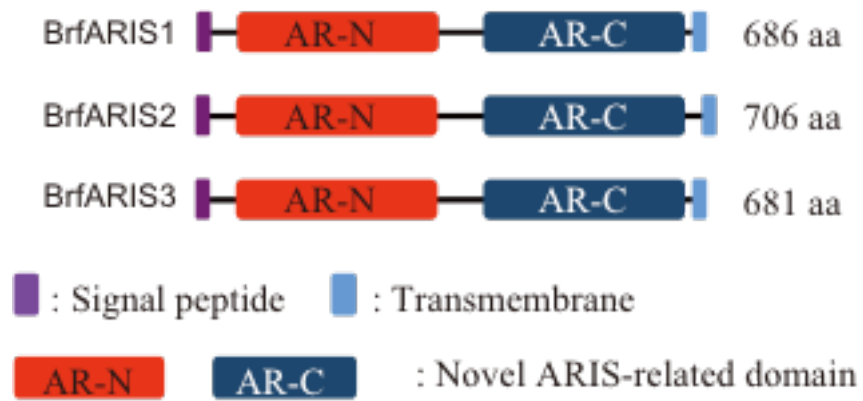


Fig. 4-18 BrfARIS タンパク質の domain 構成配列

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GCTCTTATTGCTCTCTCTGCTTGTGCCACTGGACAGTCCAGGATTTGGGGATCATATCGATGCATCCTCTGTTCTTGTCTGTCAGTCCACGGGGT
 A L I A L S A C A T G Q V Q E F G D T I D A S S V L A V Q S Y A G A

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 CAGCGGGTGTATCACCAGATCCGTGAGTTTGACATTATCTCCGGGGTCCAGTGGAGATGGGCTCTTTCTACAGGTGGAGATCCCCTACCAACA
 A G V S P Q I R E F D I I S G G A S G D G L F L Q V E I P V P Q Q

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GAACGATACGTATCAGAGCACAGTATTTTGTARTCGACTTCRAACCTTTCTCAGCCACATCAACCCCATAGTTAATGATACGATAGACCCCTCTCTG
 N D T S S E H S I F V I D F K P F S A T S N P I V N D T I D P S L

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 TTGAGTAACTGTTCTAACATCCTTGAGACAGCTCCTCTTTCCAGCTACTTCGAACAGAGGGAGACAGTACTCGACAGTCCCCGCTACACCTCCGAT
 L S N C S N I L E T A P L S S Y F E T E G D S D S T V P A T T S V P

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 CCTTCTTTGCGGTGGAGCTAGCGGAGACAAACAGTCCATTCTATACACATTCACAGACTCCTATTACGGTTCACTCCTGTGATCTGGCGAGATGG
 F F A V E L A E D K Q S I L Y T F N D S Y S R F N S C D T G R D G

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 GGGGATGTGGATACCCAGCTCTCAGGGCCGACTACTGAGTACTCGACAGTGTGGTTGTTARCAATATCTTTGTACAGCAGAGGGAGGGAGATGAA
 G M W I P S S Q G R T T E Y S T V L V V N N I F V T A E G E G D E

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 GCAGATATAACACTGCTTATCGAGCTACTACATTCATCCTCACGTGGTCTATTAGCCAATACATCTTTGTGGACACAGTAGTGTATCCAGAGAGCGG
 A E Y N T A Y R A T T F I L T W S I S Q Y I F V D T V V S S Q K R V

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
 TTTCTGTTGAGCTGGCCTACACATCCCTGTACCCTGTGATAGAGGGGGATACAGGGTACACAGATATGGTCTTAAATATCGGCTTCAAAACCACTCT
 S V E L A Y T S L Y P V I E G D N R V T R D M V L N I G F K T T L

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 TGAGAGGCCATTCTCCACTTAACATGATGAATATGAGTCTGATAGGCCCATCTGCTGTTGGATGGTGCAGTATAGCTGCTGCCTACAGACCCCT
 E K A F S N S N M M K Y E S D K A H L L L D G V S I A A A S T N P

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
 CACCCCGGTGTTCAACCATGGACCGATGAGGATGCTGCAACAARTCTGGGACTTCACCTGGTCTTCCAGACAGTACTTCGGAATAGAGAGT
 H P R C S D H G P N E D V C K Q I W D F N L V I P D T Y F G T R E L

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
 TGTCGGGGTCTTCTTACCGATTAGAGCTGGTTAGGTGCGATGATTTGGAGGGCGATCTGACCTGTGTGCCGCACAGAGTACTGGACTTGGGGAGGA
 S G S F F Y R L E L V R C D D L E G D L N L C A A Q S T G L G E E

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AATTGTGGCCCAATCACCCTCGATAATATCATAGAGTTCCAGAGCGACAGGAGACTGGGCTCCAGTTRAAAGTTGTAGTGTTCGAGATCCCTCTGGA
 I V A T I T L D N I I E V R S D K E T G L Q L K V V S V R D P S G

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
 CAGGCTGATTTCTCTCGGATCTGGTTCTCAATCCGCCAGGGTATTTACCATCGGGAGGAGTGGAGATTTGGCTGGCACCTGCCCGAATACCCCTC
 Q A D F L F G S G S Q S A R G I Y H R E E V E I W L A P A R N Y P L

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 TTATTACTAGTATGATGGAGCTAGTTGCCCTTCTGCTGATTGATAAARAGTCCACTTGAGCAAGAGGGGTTGTCTAGAGGCTGCTCCCGA
 I T Q Y G L E L V A F L V C I D N K V P L G A K R G C L E A A P E

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
 GGATCGGTATATAGCCATCTGGCTGAGACCTGGAGTTGACTGTAGTGGTAGTTTCTACCGGCATCTGAT
 D R Y I A H L A E D L E L T V S G S F Y Q A S D

Fig. 4-19 *PpARIS* 遺伝子・PpARIS タンパク質の配列

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GGTGCTGCCTCGAGCCATCCTCTGCAGGGGGAGAACCTGATTTTAAATTAACTTACAGGATTGTGTGTTTTATTGATATTACAATTACTGTATTATA
G  A  A  S  S  H  P  L  Q  G  E  K  P  D  F  K  L  N  L  Q  G  L  C  V  L  L  I  L  Q  L  L  Y  Y  K

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
AAAAAAGTGTCAACTTGTGTCATGGCTTATCACTACCACAAAAAAGTAGGTTGCGGTTGTGCTATTGCACTGAGAACAAATATATTCTCTC
K  T  V  N  L  C  H  G  L  S  L  P  Q  K  L  K  S  R  L  R  L  C  P  I  A  L  R  T  I  I  F  L  S

      210     220     230     240     250     260     270     280
TGCTGAAGTACAGCAAAATTGTTCAATATTGCCATAGACTTTATTTCCGCTTGTCTTTTGTGGATGTCTAGACGCAGCCCC
A  E  V  Q  Q  N  C  S  N  I  A  I  D  F  I  S  A  C  S  F  V  G  C  L  D  A  A

```

Fig. 4-20 *MIARIS* 遺伝子・MIARIS タンパク質の配列

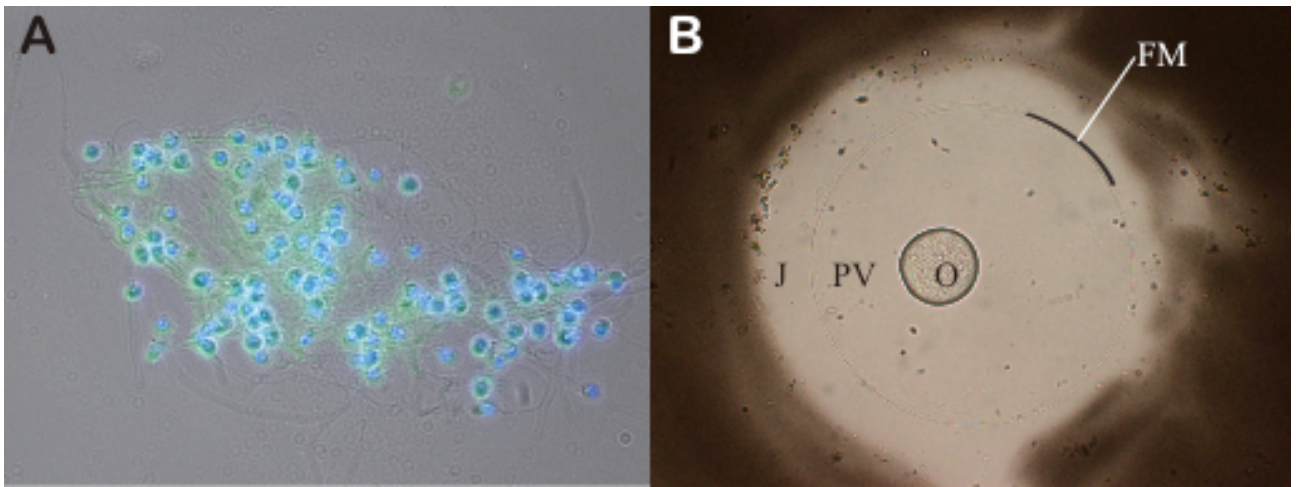


Fig. 4-21 *Bo. Mikado* の受精観察

A. 卵外液と混合した精子。

青 : Hoechst で核染色 緑 : Alexa-phalloidin で F-actin を染色

B. 受精卵。O: 卵、PV: 囲卵腔、J: ゼリー状の卵外被

4-3-5 *ARIS* 遺伝子群の系統学的解析

最後に、得られた *ARIS* 遺伝子群の系統的解析を行った。ORF のアミノ酸配列を用いて解析を行うこととし、*ARIS* は 1, 2, 3 でそれぞれ相同性を有しているので、まずは棘皮動物内で *ARIS*1, 2, 3 それぞれの分子系統樹を作成した。棘皮動物内で作成した *ARIS*1, 2, 3 の分子系統樹は、他の分子マーカーから提案されている進化系統とほぼ一致し、互いが相同遺伝子であることが示された (Figs. 4-1, 2; 4-22A, B, C)。

次に門を超えた比較を行った。棘皮動物門 (代表として *AaARIS*1, 2, 3)、半索動物門 (*BsARIS*3)、頭索動物亜門 (*BrfARIS*1, 2, 3)、有櫛動物門 (*PpARIS*, *MIARIS*) で分子系統樹を作成した結果、やはり、既存の進化系統とほぼ一致し、互いが相同遺伝子であることが示された (Figs. 4-2, 4-22D)。棘皮動物・半索動物・頭索動物の *ARIS*1, 2, 3 はそれぞれがグループを形成する形であり、後口動物の起源において、すでに *ARIS* は 3 つ存在していたと考えられる。一方で、有櫛動物門の 2 種からはそれぞれ 1 つの *ARIS* 遺伝子しか見つからなかったが、分子系統樹において、*ARIS*1, 2, 3 のグループの外側に位置しており、有櫛動物は *ARIS*1, 2, 3 が分岐する前の原始的な *ARIS* を有していると考えられる。

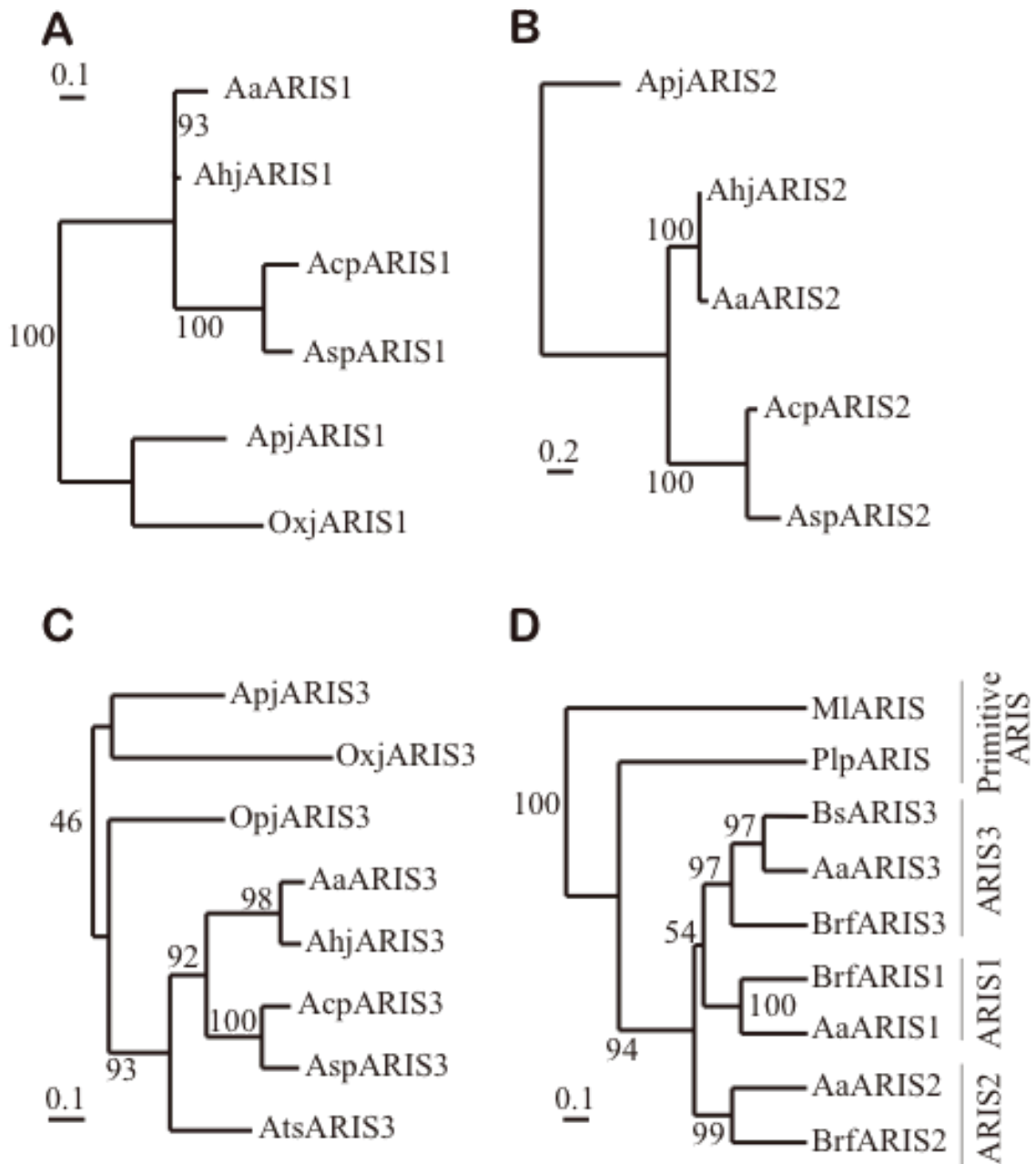


Fig. 4-22 ARIS アミノ酸配列の分子系統解析結果

A. 棘皮動物 ARIS1 の分子系統樹、**B.** 棘皮動物 ARIS2 の分子系統樹、**C.** 棘皮動物 ARIS3 の分子系統樹、**D.** 動物門を超えた ARIS の分子系統樹

bars: アミノ酸置換率 , 分岐位置の数字: bootstrap 確率

4-4 考察

ヒトデ綱、棘皮動物門、そして動物界へと広げた解析より、マヒトデで発見した ARIS タンパク質・ARIS 遺伝子が動物界において高度に保存されたものであることが明らかとなった。分子系統解析の結果、ほぼ既存の進化系統樹に従った形の分子系統樹が得られたことから、得られた全ての ARIS 遺伝子が単一祖先由来の相同遺伝子であることが示された。ここで、有櫛動物門の ARIS が他の動物門の ARIS1, 2, 3 が分岐する外に位置したことは、有櫛動物と後口動物が分岐するまでの過程のどこかで ARIS 遺伝子の重複が起こり、3つの ARIS 遺伝子の系統が産まれたことを示している。また、ARIS1 をマヒトデ・マナマコ・ニッポンウミシダ・フロリダナメクジウオで比較することで、頭索動物と棘皮・半索動物が分岐した後に FA5/8C domain の挿入が起こり、そして、ナマコ・ウニ類とヒトデ・クモヒトデ類の分岐の後に Kringle domain の挿入が起こったと予測される (Fig. 4-23)。2度も domain 挿入が起こったことを考えると、ARIS1 の存在するゲノム領域は挿入が起こりやすい構造を持っている可能性がある。以上を系統樹上に整理して Fig. 4-24 に示す。

ウニ類が ARIS タンパク質を持たないことが実験から示唆されたが、そもそもウニ類の卵外被はヒトデやナマコと異なり、かなり構造的に緩いことが知られている。すなわち、ウニ類の精子は先体反応前に卵外被の半ばまで進入することが可能であり、卵に到達するための先体突起も、ヒトデやナマコと比較するととても短い (Figs. 4-25A, B, C, D)。従って、ウニ類では ARIS が存在しないことで、卵外被の構造が緩いものへと変化し、先体突起の短小化が起こったと推測され、いわば ARIS による卵外被構造と先体突起形成とを対応したものと考え

ることができる。今回の観察ではニホンクモヒトデは短い突起しか形成しなかったが (Fig. 4-8C)、スナクモヒトデ *Amphipholis kochii* を用いた研究では 30 μm の先体突起形成が観察されている (Yamashita, 1983) (Fig. 4-25E)。棘皮動物以外においても、*ARIS* 遺伝子が発見された半索動物や頭索動物、有櫛動物でもそれぞれ先体突起形成が記載されており (Colwin and Colwin, 1963; Morisawa et al., 2004; Franzen, 1956) (Figs. 4-26, 27)、*ARIS* と先体突起形成の関連性が支持される。*ARIS* と先体突起形成が共進化していると仮定すると、逆に先体突起形成する動物には *ARIS* が存在する可能性がある。例えば、尾索動物亜門で最も原始的とされる尾虫綱のオタマボヤ類は先体突起を有する (Holland, 1988) (Figs. 4-24, 28)。また、我々人間も含まれる脊椎動物亜門においても、無顎類のヤツメウナギ類・ヌタウナギ類は先体反応によって突起を形成することが知られ、硬骨魚類でも原始的な軟質亜綱に属するチョウザメ類では先体突起形成が報告されている (Kille, 1960; Cherr and Clark, 1985; Morisawa and Cherr, 2002; Psenicka et al., 2009) (Figs. 4-24, 29)。これらの生物においては *ARIS* 遺伝子が存在することが期待できる。

進化学上の興味深い点は、無脊椎動物でここまで広く保存されていた *ARIS* が脊椎動物進化の過程のどこで消えたかである。ほとんどの硬骨魚類には先体反応が存在しないことや、また両生類以降の先体反応は先体胞の開口分泌のみで突起形成を伴わないこと (Onitake et al., 2000; Ueda et al., 2002)、これらをまとめて考えると、魚類で先体反応は一旦失われ、新たな別の現象として両生類以降の先体反応が現れたと推察される。この先体反応の消失とともに *ARIS* も不要となって淘汰されたと考えるのが自然である。両生類以降の祖先と近縁である肉

鰭類の受精の研究を行うことで、先体反応が一度消失した経緯がさらに明確になると考えられる。

魚類への進化に伴って先体反応が失われた原因としては、

1. 魚類に一般的に見られる卵門システムが産まれたから
2. 硬骨魚類に進化する際に淡水生活を行ったため、精子先体胞の浸透圧的な維持が困難になったため
3. 成体の感覚器官の発達により、異性を認識することが可能となり、配偶子間で種認証をする必要性が薄れたから

等が挙げられるが、全てが複合的に先体反応を失わせる方向に働いたのではないかと推測される。ARIS が失われる要因もここにあると考えられ、卵外被の複雑化が大きな要因であることが予想される。後口動物の卵を比較すると、棘皮動物・半索動物・尾索動物は非常に単純な卵であり、球状の卵を一層の卵外被が包んでいるだけである (Figs. 4-30A, B, C, D)。しかしながら、原始的な脊椎動物であるヤツメウナギでは卵はタマゴ型で、頭頂部とそれ以外の部分で卵外被の区別があり、受精のポイントも頭頂部のみに限られている (Fig. 4-30E, F)。そして、ヤツメウナギ→ヌタウナギ→チョウザメと卵外被を比較すると、徐々に卵門のシステムができあがっていくのが見られ、その断面を観察すると、チョウザメでは卵外被が4層から構成されている (Fig. 4-30E, F, G, H)。この卵外被の複雑化は、ARIS 以外の卵外被構成タンパク質の出現を伴っていると考えられ、卵外被の役割が認識だけでなく、淡水に移動したことによる浸透圧からの防御や川底への接着といった多岐に渡るようになったためと考えられる。この多数産まれた卵外被タンパク質の中で、ARIS タンパク質は淘汰され、また ZP タン

パク質が哺乳類への系統では残ったと推測される。ZP タンパク質の進化を考えた場合、魚類から両生類にかけてその重複が起こり、卵外被構成タンパク質としての機能を確立していったと考えられる。従って、やはり魚類からの進化の過程で卵外被構造・先体反応様式に大幅な変化が起こったと考えられ、これら境界動物における受精をより詳しく解析する必要性を感じる。

ARIS を有する動物においては、保存された ARIS コアタンパク質が構造を司り、そこへ結合した糖鎖が先体反応誘起を担うとともに、種間の多様性を形作っていると考えられる (Fig. 4-32)。糖鎖は結合様式・修飾でほぼ無限の多様化が可能であるため、非常にリーズナブルな機構といえる。有櫛動物から脊索動物まで広く保存されている可能性は興味深く、幅広い動物種における ARIS 遺伝子のクローニングは進化学的に系統的位置の不安定な有櫛動物の位置を決定する助けとなることが期待される。先体反応誘起能を持つ糖鎖の構造の種による変化の解析もこれから成されるべきである。

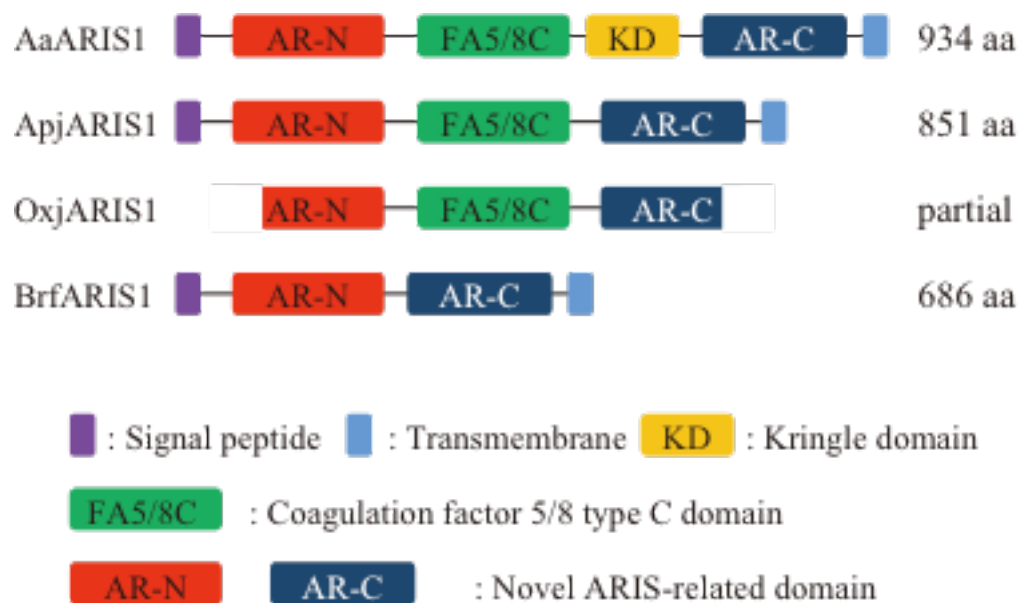


Fig. 4-23 マヒトデ, マナマコ, ニッポンウミシダ, フロリダナメクジウオの
ARIS1 domain 構造の比較

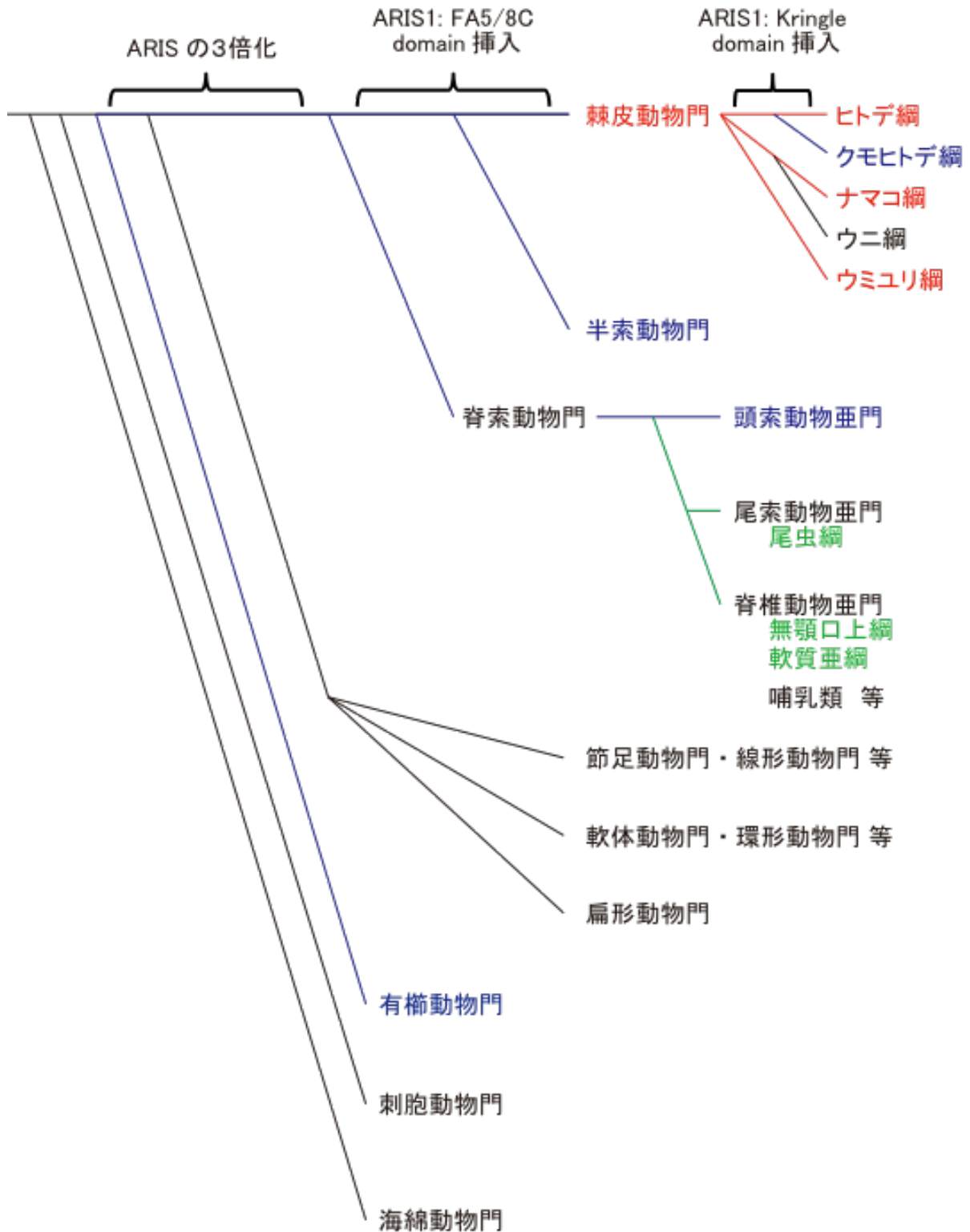


Fig. 4-24 動物界の系統的關係図と ARIS

赤字：ARIS が存在し、先体反応誘起をしている。青字：ARIS 遺伝子が存在する。緑字：先体反応に伴ってアクチン性の先体突起が形成される。

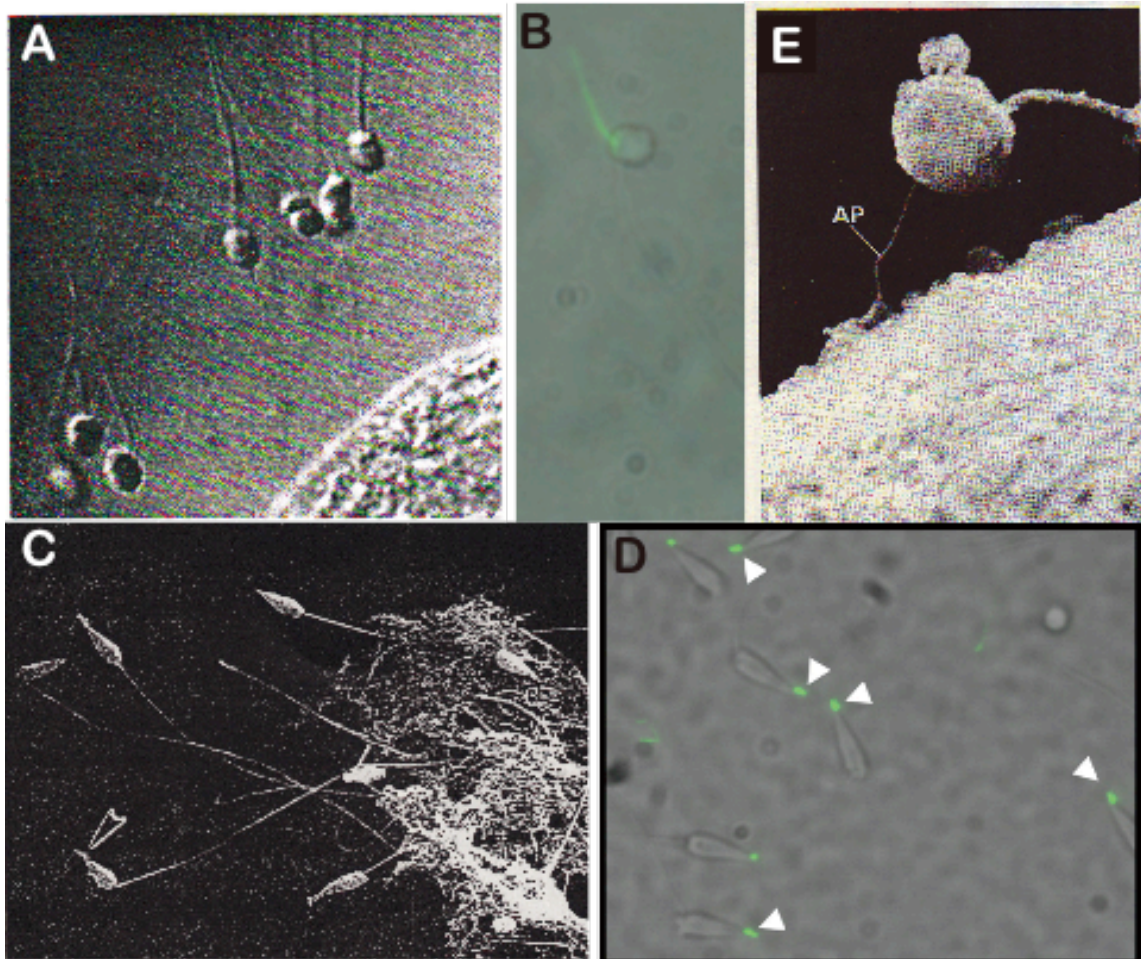


Fig. 4-25 棘皮動物精子の先体反応

- A. マヒトデ精子 (Ikadai and Hoshi, 1981)
- B. マヒトデ精子 緑 : Alexa-phalloidin で F-actin を染色
- C. ウニ精子 (Bonnell et al., 1994)
- D. ウニ精子 (Yokota and Sawada, 2007)
- E. スナクモヒトデ精子 (Yamashita, 1983)

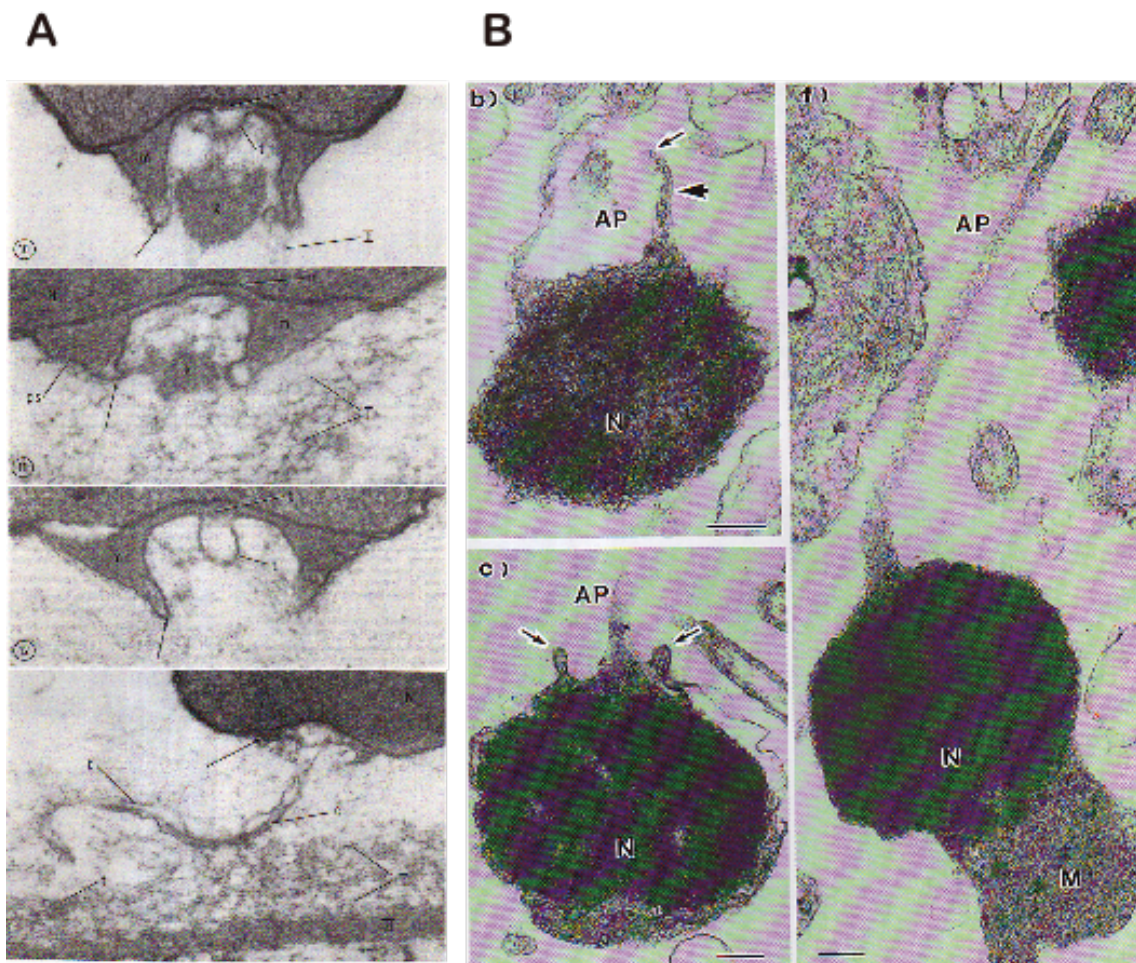


Fig. 4-26 半索動物・頭索動物の精子先体反応

A. *Saccoglossus kowalevski* (半索動物門) の精子 (Colwin and Colwin, 1963)

B. *Branchiostoma belcheri* (頭索動物門) の精子 (Morisawa et al., 2004)



Fig. 4-27 有櫛動物の精子

左: *Beroe cucumis*, 右: *Pleurobrachia pileus* の精子 (Franzen, 1956)

a: 先体突起, n: 核, g: 顆粒

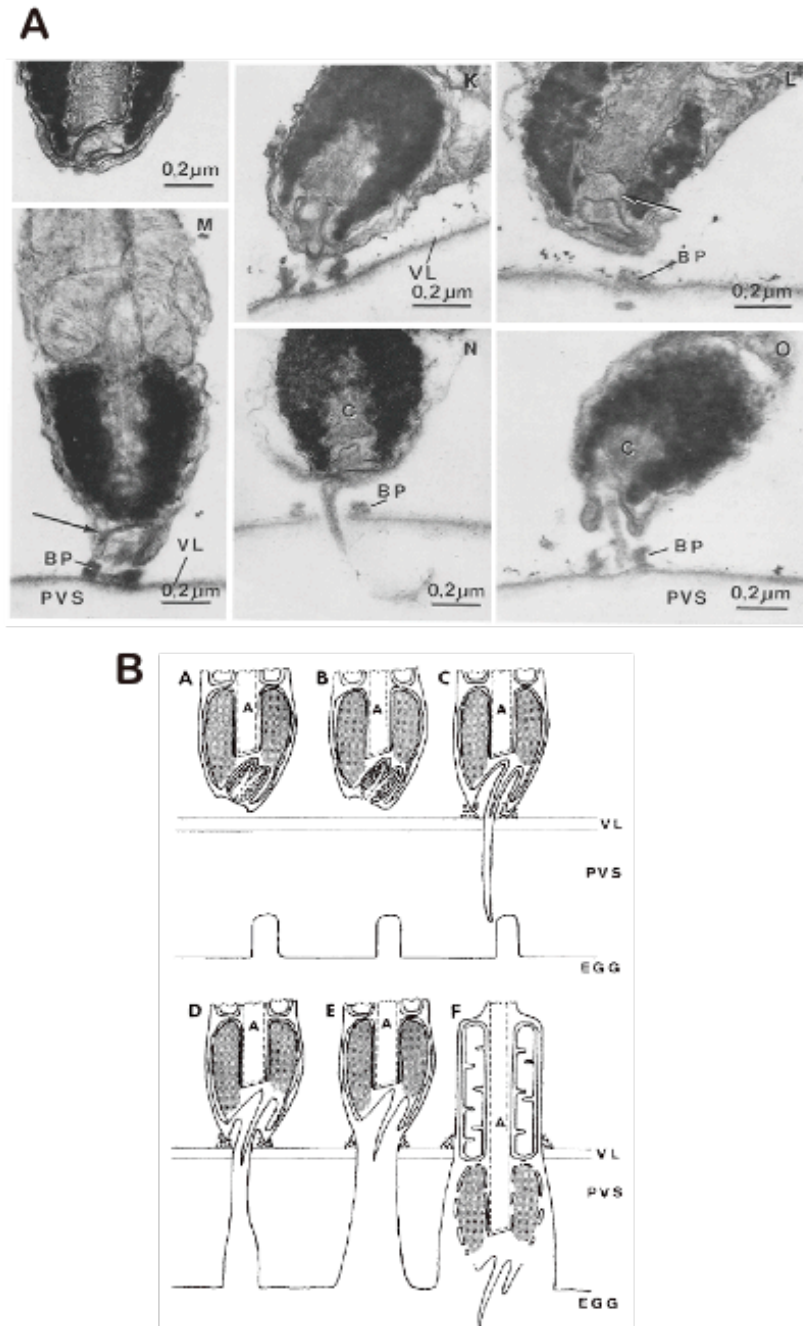


Fig. 4-28 尾索動物門尾虫綱の精子先体反応

A. ワカレオタマボヤ *Oikopleura dioica* の精子先体反応 (Holland, 1988)

B. 卵外被通過の模式図 (Holland, 1988)

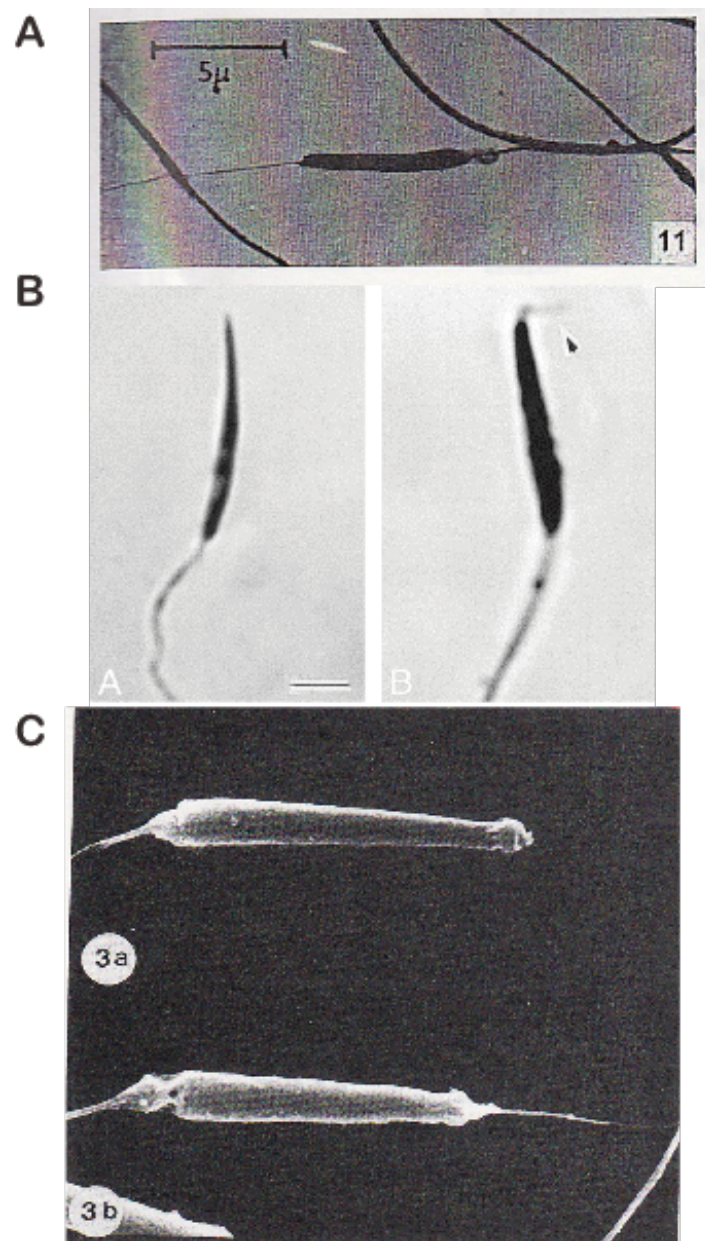


Fig. 4-29 脊椎動物精子の先体反応

A. *Lampetra fluviatilis* (ヤツメウナギ) の精子 (Kille, 1960)

B. *Eptatretus burgeri* (ヌタウナギ) の精子 (Morisawa and Cherr, 2002)

C. *Acipenser fulvescens* (チョウザメ) の精子 (Cherr and Clark, 1985)

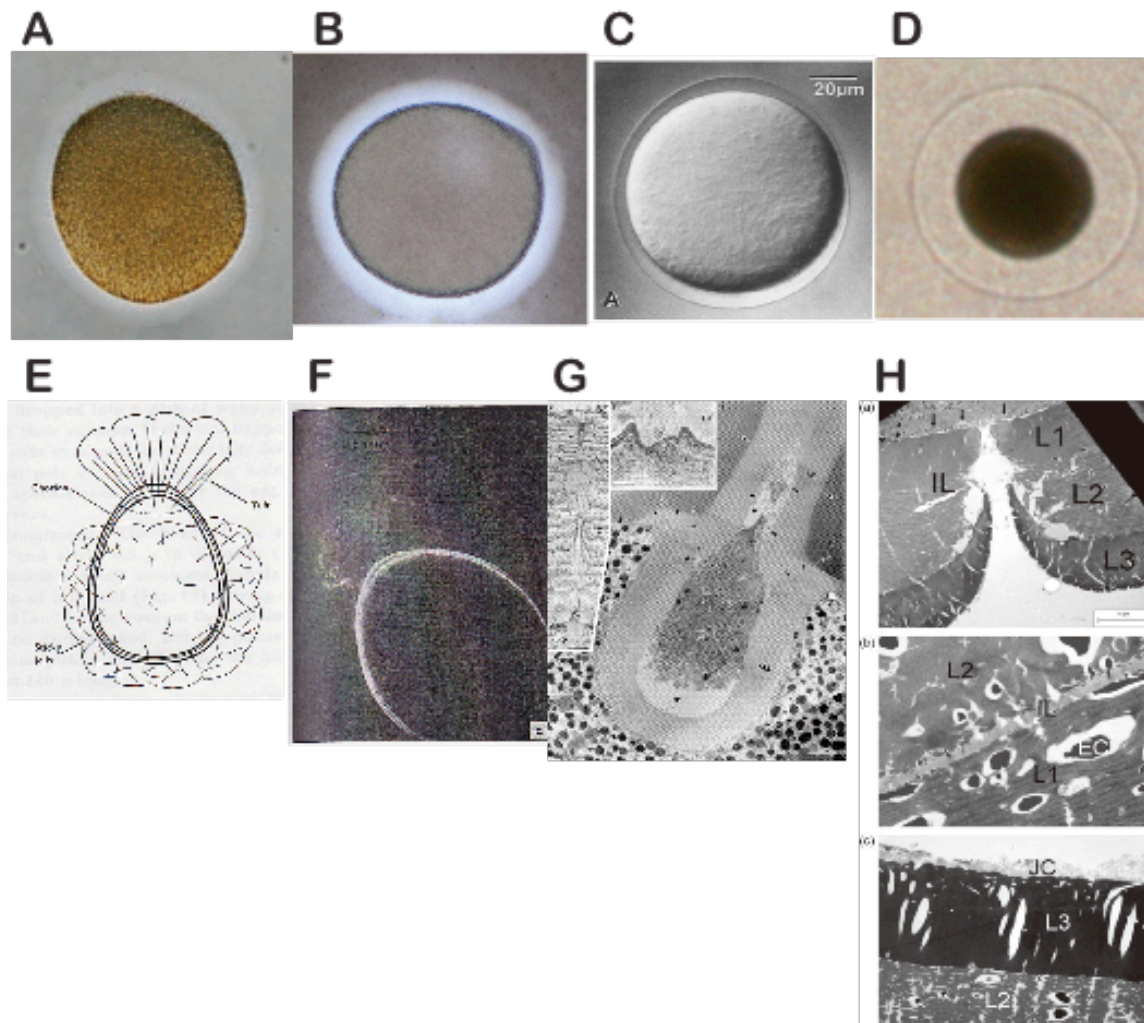


Fig. 4-30 後口動物の卵

- A. イトマキヒトデの卵 (墨汁によって卵外被を可視化)
- B. マナマコの卵 (墨汁によって卵外被を可視化)
- C. ワカレオタマボヤの卵 (Holland, 1988)
- D. シモダギボシムシの卵
- E. *L. fluviatilis* (ヤツメウナギ) の卵の模式図 (Kille, 1960)
- F. *L. fluviatilis* (ヤツメウナギ) の卵 (Kille, 1960)
- G. *E. burgeri* (ヌタウナギ) の卵の卵門部分 (Morisawa, 1999)
- H. *Aci. fulvescens* (チョウザメ) の卵の卵門部分 (Psenicka et al., 2009)

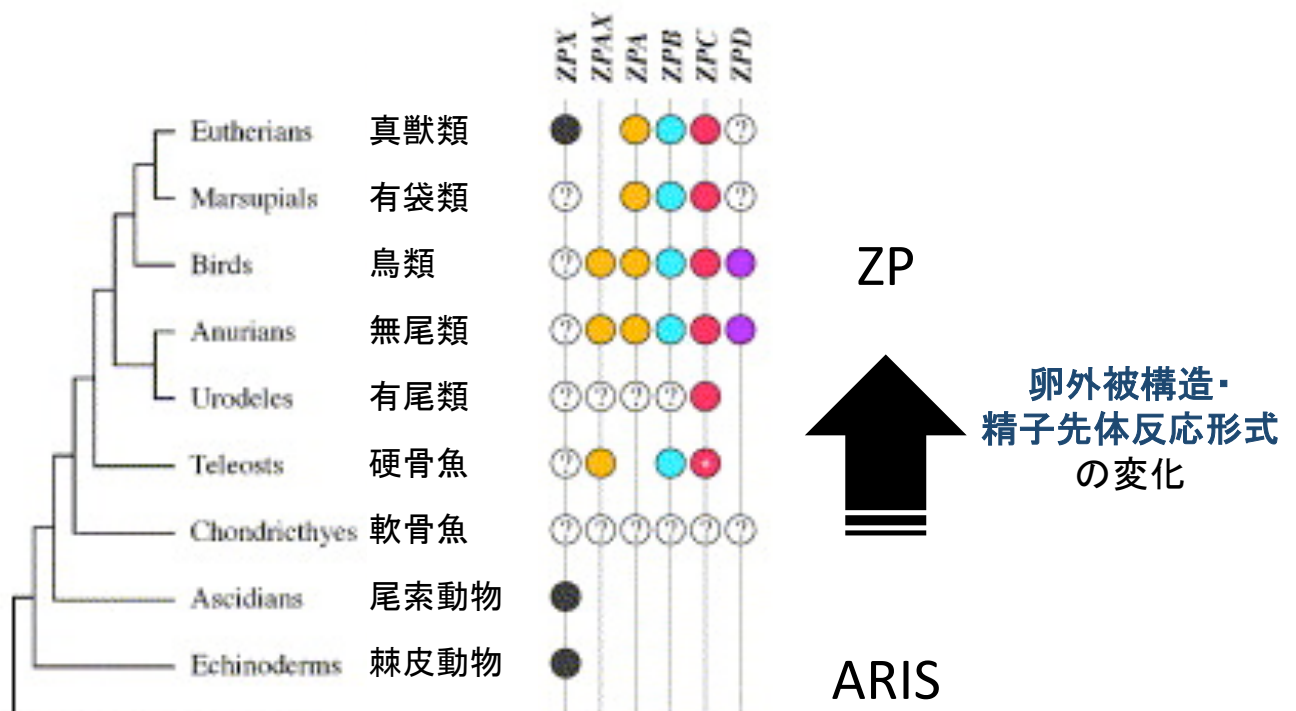


Fig. 4-31 後口動物における ARIS から ZP への移行

(Wong et al., 2006 から抜粋利用)

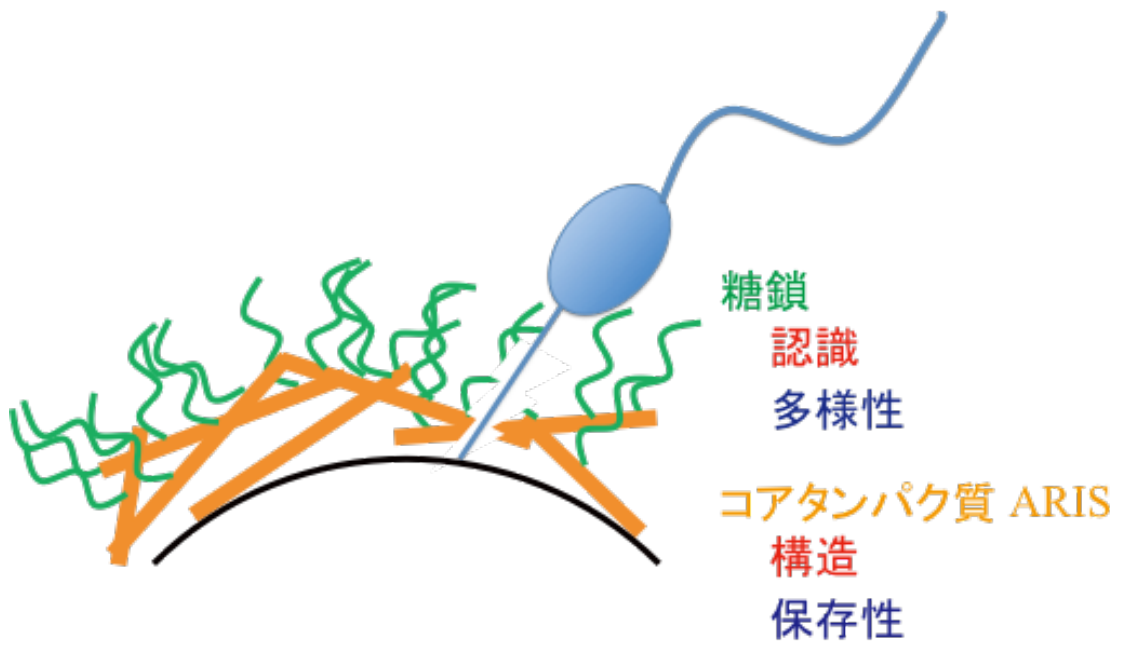


Fig. 4-32 ARIS による卵外被構造と先体反応認識モデル

第5章 ARIS 受容体の解析

5-1 緒言

第2～4章においては先体反応誘起物質について述べたが、先体反応誘起物質は精子側の受容体といわば1対のセットであり、精子のもつ先体反応誘起物質受容体を同定し、解析することが先体反応の認識機構を完全な理解へ導くといえる。

先体反応誘起物質の受容体についてもマウス・ウニで、よく研究が行われてきた。マウスにおいて、ZP3 を先体反応誘起物質と考える研究者達は、非還元末端の N-アセチルグルコサミン残基が先体反応を引き起こすとする説に基づいて、精子表面のガラクトース転移酵素 (GalT) が受容体であるという説を唱えてきた (Lu et al., 1997)。この GalT が ZP3 との結合によって精子膜上で会合することによってその細胞内ドメインの G タンパク質活性化モチーフが活性化し、さらに G_i を活性化するというシグナル経路が示されている (Gong et al., 1995)。しかしながら、前述のように先体反応誘起因子・シグナル伝達経路に複数の候補が報告されていることが研究の進展の妨げとなっているようであり、確定的な研究結果は得られていない。

ウニにおいては、先体反応阻害抗体の標的として得られた suREJ-1 がウニの先体反応誘起物質である FSP と親和性を有する (Podell et al., 1985) ことが明らかにされている。この suREJ-1 の遺伝子配列は PKDI というヒト多発嚢胞性腎疾患の原因遺伝子と相同性を持っており (Moy et al., 1996)、その PKDI の産物である

polycystin-1 は polycystin-2 とヘテロ複合体を形成して膜中で非選択的陽イオンチャネルとして働くことから、suREJ-1 も同様に働く可能性があるが、未だにその確認報告はない。また、suREJ-1 に相同性を持つ suREJ-3 が suPC2 (ウニ polycystin ホモログ) と相互作用することは確認されているが(Mengerink et al., 2002; Neill et al., 2004)、逆に FSP との相互作用は確認されていないという状態で研究が停止している。

本研究で用いているヒトデにおいては、その先体反応誘起の主役となる ARIS に対する受容体が未だに同定されておらず、ARIS を結合させた金粒子を精子と混合して電子顕微鏡で観察することで、その局在が精子頭部先体胞周縁部であるのみことが報告されている (Longo et al., 1995) (Fig. 5-1)。先に述べたようにマウス・ウニにおける先体反応誘起物質受容機構の解明には諸問題があるが、ヒトデにおいては先体反応に必要な糖鎖構造が分かっており、補因子もはっきりと決定されている。このヒトデを用いることでより明確に先体反応誘起機構の全貌が解明できると考えられ、そのためにもこの ARIS 受容体の同定は早急になされるべき課題である。今回 ARIS を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって ARIS 受容体候補分子を探索し、Fr. 1 糖鎖との相互作用を行う 38 kD のタンパク質を同定した。このタンパク質は精子膜上マイクロドメインに局在しており、シグナル伝達系の開始点としてのこの局在は非常に意味深い。

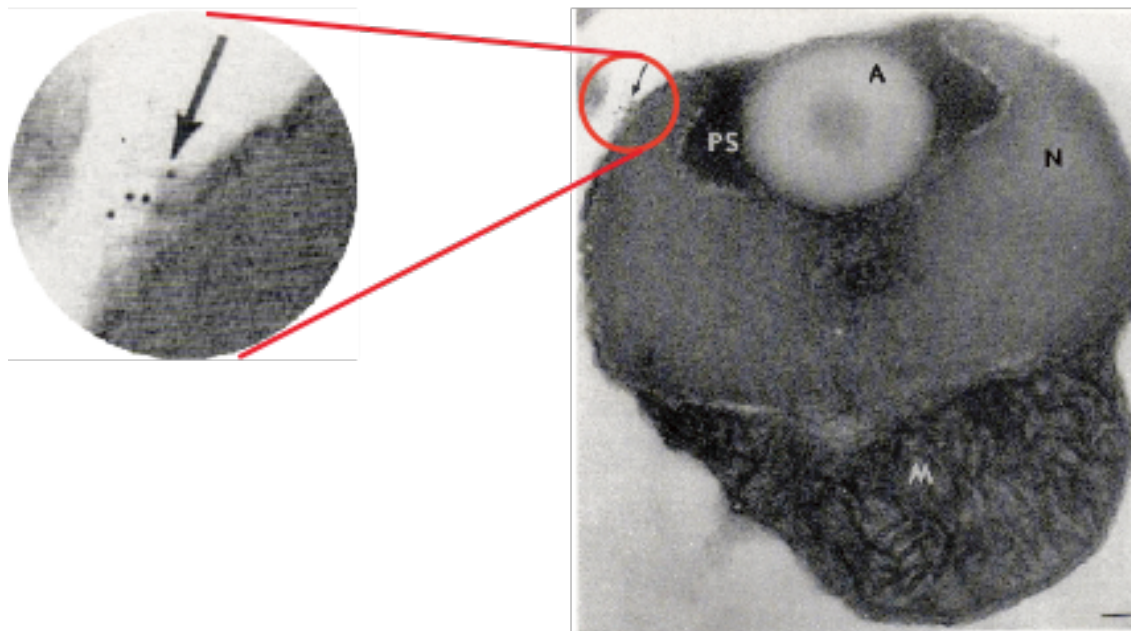


Fig. 5-1 ARIS 受容体の局在 (Longo et al., 1995 より)

5-2 方法

P-ARIS の精製, Fr.1 の精製, dry sperm の調整, 金コロイド Fr. 1 の作成

第 2 章参照

マヒトゲ, 海水の調整, ゼリー層の採集, ARIS の精製, 還元糖の定量, ポリアクリルアミド電気泳動, hydroxylamine 分解, N 末端配列解析

第 3 章参照

ARIS resin の作成

Epoxy-activated Sepharose 6B (GE Healthcare, UK) 5 g を 500 ml の脱イオン水に懸濁し、4 回 wash した。resin の半分の量の 4 mg/ml ARIS / coupling buffer (200 mM NaCl, 100 mM Na₂B₄O₇·10H₂O-NaOH, pH 10) を加えて 4°C で 2 晩回転攪拌した。Control resin はこの時に coupling buffer のみを加えている。次に、上清を取り除いて今度は blocking buffer (200 mM NaCl, 100 mM Na₂B₄O₇ · 10H₂O-HCl pH 8.0) を加えて 4°C で 1 晩回転攪拌した。その後、resin の 50 倍量の wash buffer I (1 M NaCl, 200 mM sodium acetate-acetic acid, pH 4.0) で 3 回、wash buffer II (1 M NaCl, 200 mM Tris-HCl pH 8.3) で 3 回、脱イオン水で 2 回 wash を行った。最後に 15 ml チューブに回収し、4°C で保存した。

sperm lysate の調整

冷凍保存した dry sperm 約 500 µl に lysis buffer (5 mM octyl-β-glucoside / ASW)

を 800 μ l 加え、ダウンスホモゲナイザーでホモゲナイズした後に、超音波破碎機 Branson Sonifier 250 (Branson Ultrasonics Corporation, USA) を用いて氷上で超音波処理 (Duty cycle 90%, output 4, 30 min \times 4) を行なった。そして、最後に 1,500 g, 5 min 遠心し、その上清を sperm lysate とした。

アフィニティークロマトグラフィー

まず 100 μ l の ARIS resin 及び control resin にそれぞれ 800 μ l の sperm lysate を加え、マイクロチューブローテーター MTR-103 (Matsuura seisakusho. Ltd., Japan) を用いて 4°C で回転攪拌し、12 hr 後, 24 hr 後に卓上小型微量遠心機プチまる 8 (Wakenyaku Co. Ltd., Japan) で遠心をし、上清を捨てて 1 ml の lysis buffer で置換し、再び 4°C で回転攪拌を続けるという形で洗浄を行った。36 hr 後、遠心と lysis buffer への置換による洗浄を 6 回繰り返す、最後に ASW で置換をしてから上清を捨てた。これに sample buffer (20% glycerol, 10% β -mercaptoethanol, 0.4% SDS, 0.0001% BPB, 125 mM Tris-HCl, pH6.8) を resin と等量加え、100°C で 5 min 煮沸した後の上清を電気泳動用サンプルとした。

電気泳動ゲルの染色

CBB 染色は Rapid Stain CBB Kit (ナカライテスク, Japan) を用いた。また、銀染色には Silver stain 2 Kit wako (Wako pure chemical industries Ltd., Japan) を使用した。

Smiss 分解

サンプルを 6 M Urea, 0.1 M ammonium acetate-acetic acid, pH 4.0 溶液に溶解し

て、そこへ終濃度が 15 mM となるように NaIO₄ を加え、それを 7 day, 4 °C で振盪した。最後に、5% sodium borohydrate で 4 °C , 18 hr 還元した。

マイクロドメイン画分の調整

500 µl の dry sperm に対して 1% Triton-X100 / TNE buffer (0.15 M NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) を 1 ml 加えて、ダウンスホモゲナイザーでホモゲナイズし、さらにボルテックスでよく攪拌した。1,500 g で遠心した後の上清に等量の 85% sucrose TNE buffer を加えたものを Centrifuge Tubes Ultra-Clear (Beckman Coulter Inc., USA) の最低部に 3.3 ml 入れ、その上に 30% sucrose / TNE buffer を 6.6 ml, 5% sucrose / TNE buffer を 3.3 ml と静かに重層し、超遠心機 Optima L-100XP Ultracentrifuge (Beckman Coulter Inc., USA) を用いて、100,000 g, 21 hr 遠心を行なった。遠心後に 30% sucrose / TNE buffer と 5% sucrose / TNE buffer の間に白い層が生成しており、それらを集めて透析・凍結乾燥したものをマイクロドメイン画分とした。

ARIS 受容体サンプルの濃縮

アフィニティークロマトグラフィーの wash が完了した状態の resin 1 ml に対して、抽出 buffer (10% β-melcaptoethanol , 0.4% SDS, 125 mM Tris-HCl, pH6.8) を 1 ml 加え、5 min 煮沸した。その後、遠心 500 g, 5 min の上清を回収し、Amicon Ultra Ultracel-10k (Millipore, USA) を用いた限外濾過に分け、脱イオン水で徐々に置換することで SDS を減少させた。最後に凍結乾燥を行い、最低限の量の sample buffer (20% glycerol, 10% β-melcaptoethanol , 0.0001% BPB, 125 mM Tris-HCl,

pH6.8) に溶解したものを濃縮 sample として SDS-PAGE に用いた。

PVDF 膜への転写

SDS-PAGE を行ったゲルを、セミドライ式ブロットイング装置 Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) を用いて PVDF membrane Hybond-P (GE Healthcare, UK) に転写した。転写には、Transfer buffer (48 mM Tris, 39 mM glycine, 4% SDS) を用い、20 V で 45 min の条件で行った。

trypsin 処理

ゲルの乾燥までの手順は hydroxylamine 処理と同様に行った。その後、trypsin 溶液 (0.02 g/l trypsin (Trypsin Gold, Promega, USA), 40 mM NH_4HCO_3 , 10% acetonitril) を加えて 37°C で 2.5 min 湯浴することで分解を行なった。

5-3 結果

5-3-1 ARIS 結合分子の探索

ARIS に対するアフィニティークロマトグラフィーを用いて ARIS 受容体の探索を行った。resin の洗浄回数、sperm lysate の条件検討の結果、再現性があり信頼できる実験方法を確立した (5-2 節、方法を参照)。ARIS resin, Control resin を用いてアフィニティークロマトグラフィーを行った結果、ARIS resin からの溶出画分にのみ特異的に現れる 38 kD のタンパク質バンドが検出された (Fig. 5-2, 赤矢頭)。38 kD 以外のバンドは ARIS resin, Control resin 両者ともに出現するので、resin に対して結合していると考えられる。一方で、この 38 kD タンパク質は ARIS 特異的な結合性を持っていると考えられる。

20 kD 程度には逆に Control resin にのみ特異的に現れるバンドが存在し (Fig. 5-2, 青矢頭)、再現性を持って現れることからコンタミネーションでないと考えられるが、その実態は不明である。

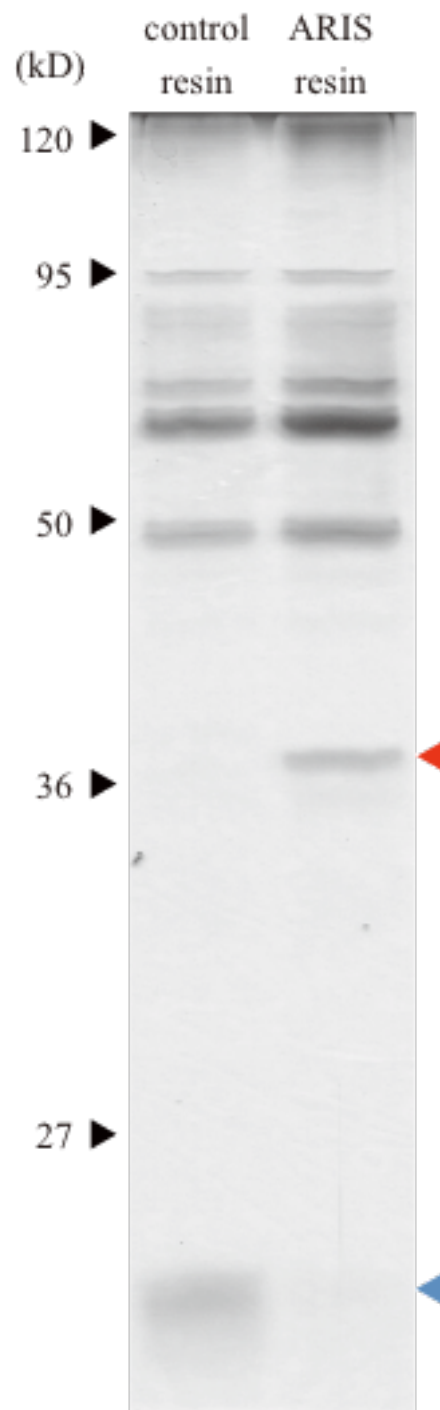


Fig. 5-2 アフィニティークロマトグラフィー結果

赤矢頭: ARIS resin 特異的に結合する 38 kD のタンパク質

15% ゲルで銀染色により検出。

5-3-2 種特異性の解析

第1章に述べたように、マヒトデのゼリー層は亜科レベルでの先体反応誘起特異性を有しており、亜科の異なるニッポンヒトデや目の異なるイトマキヒトデの精子に対しては先体反応誘起できない。これは先体反応誘起を担う糖鎖が異なることに起因すると考えられ、従ってマヒトデ ARIS はイトマキヒトデの ARIS 受容体を活性化することができないと考えられる。イトマキヒトデ精子を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行うことで、ARIS resin を用いた実験系の検証を行うこととした。

イトマキヒトデの精子の lysate をマヒトデと同様に作成し、5-3-1 と同一の resin を用いてアフィニティークロマトグラフィー実験を行ったが、ARIS resin 特異的に結合するタンパク質は検出されなかった (Fig. 5-3)。従って、イトマキヒトデの精子にはマヒトデ ARIS 特異的な結合性を持つタンパク質が存在しないという、前述の亜科特異性と一致した結果が得られ、ARIS resin を用いたアフィニティークロマトグラフィーの妥当性が支持された。

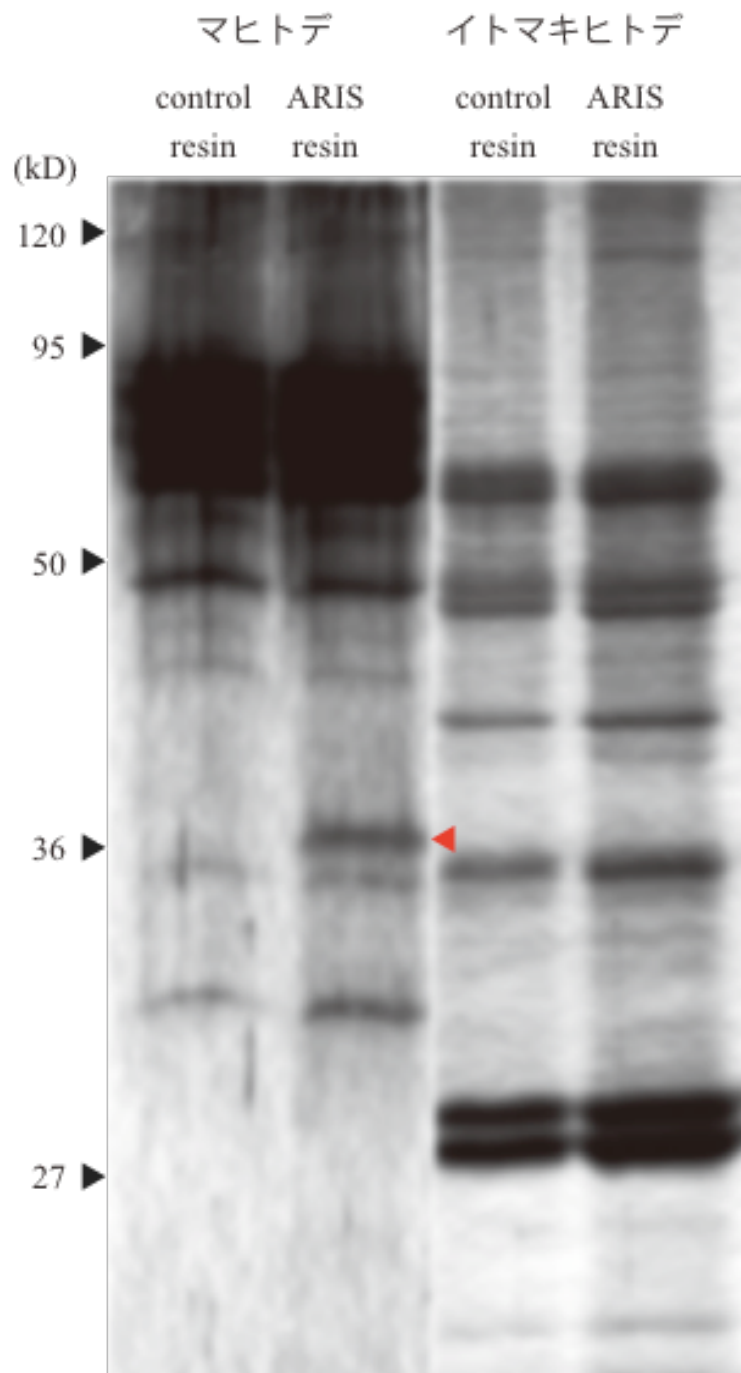


Fig. 5-3 マヒトデ精子のイトマキヒトデ精子との比較

赤矢頭: マヒトデ精子からのみ得られる ARIS resin 特異的に結合する 38 kD のタンパク質

15% ゲルで銀染色により検出。

5-3-3 Smiss 分解を用いた、糖鎖との相互作用解析

ARIS を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって ARIS 結合タンパク質として 38 kD のタンパク質を見出した。38 kD タンパク質が ARIS のタンパク質部分と糖鎖部分どちらに結合性を持つかは重要な問題であり、明確に示さなくてはならない。そこで、ARIS に対して Smiss 分解（過ヨウ素酸酸化・水素還元処理による糖鎖の開裂）を行なうことでその糖鎖構造のみを開裂した smiss-ARIS を作成し、smiss-ARIS resin に対する 38 kD タンパク質の結合性を検討した。

アフィニティークロマトグラフィーの結果、smiss-ARIS resin への 38 kD タンパク質の結合性は ARIS resin と比較して明らかに減少した (Fig. 5-4)。従って、38 kD タンパク質は smiss 分解後に残っている ARIS コアタンパク質部分ではなく、smiss 分解によって失われる ARIS の糖鎖部分に結合性を持つタンパク質であることが示された。これは 38 kD タンパク質が ARIS 受容体であることを支持する結果である。

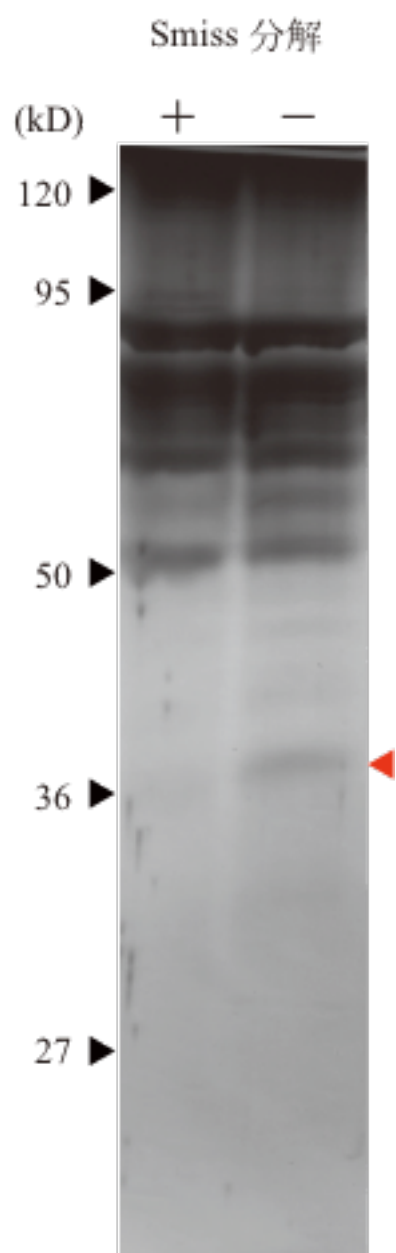


Fig. 5-4 Smiss-ARIS と ARIS の比較

赤矢頭: 38 kD タンパク質

15% ゲルで銀染色により検出。

5-3-4 Fr. 1 糖鎖との相互作用の解析

第2章で述べたように、Fr. 1 糖鎖は ARIS コアタンパク質部分、もしくは人工的に金粒子などによって局所的に密集させることがその先体反応活性に重要であることが示されており、分離された状態ではその活性が激減する。この活性の変化は ARIS 受容体と Fr. 1 糖鎖との結合の様式に従っていると考えられ、Fr. 1 糖鎖の局所的な高密度化が重要となると予想される。そこで、アフィニティークロマトグラフィーの実験系に ARIS resin に対する拮抗阻害剤として ARIS, Fr. 1, Au-Fr. 1 を加えて、ARIS resin への結合量を比較することにより、38 kD タンパク質の ARIS, Fr. 1, Au-Fr. 1 との結合性を確認した。

競合阻害剤として 10 $\mu\text{g sugar / ml}$ の ARIS, Fr. 1, Au-Fr. 1 を加えた結果では、阻害剤を加えなかった場合と差は見られなかった (Fig. 5-5)。また、より高濃度の 100 $\mu\text{g sugar / ml}$ の Fr.1 でも 38 kD タンパク質が検出され、阻害は起こらなかった (Fig. 5-5)。しかしながら、100 $\mu\text{g sugar / ml}$ の ARIS と Au-Fr.1 を添加して行ったアフィニティークロマトグラフィーでは 38 kD タンパク質が検出されず、38 kD タンパク質と ARIS resin の結合に対する阻害が起こったと考えられる (Fig. 5-5)。このことから、38 kD タンパク質は Fr.1 糖鎖との結合性を持ち、それは分離された Fr.1 糖鎖ではなく、ARIS の状態や Au-Fr.1 のようにクラスター化を受けた Fr.1 糖鎖に限られたものといえる。これは第2章において明らかにした Fr.1 糖鎖の先体反応誘起活性に関する生理学的知見とも一致する。

以上の知見から 38 kD タンパク質を以後 ARIS 受容体候補分子と呼ぶこととし、その単離・同定を目指した。

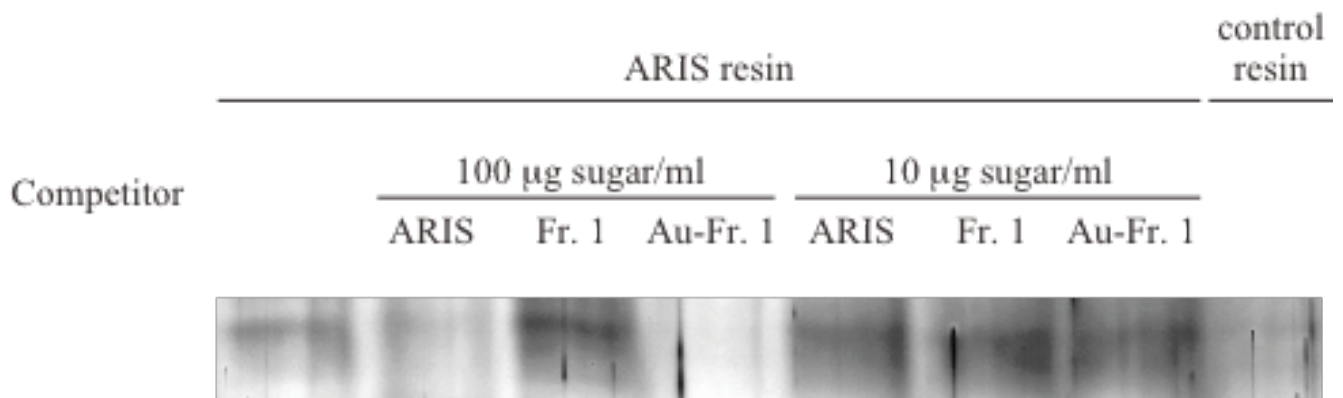


Fig. 5-5 ARIS, Fr.1, Au-Fr.1 の 38 kD タンパク質との結合比較

15% ゲルで銀染色により検出。

5-3-5 精子膜マイクロドメインに局在するタンパク質の解析

ARIS 受容体は、先体反応へのシグナル伝達の開始点であり、精子表面で特定の部位に局在していると考えられ、先行研究によって、ARIS 受容体が精子頭部に局在していることが知られている (Longo et al., 1995) (Fig. 5-1)。シグナル伝達のプラットフォームとなる膜構造の代表として界面活性剤耐性画分として得られる、いわゆるマイクロドメイン画分がよく知られており、単離したラフト画分が ARIS 受容体候補分子を豊富に含んでいることが期待できる。

dry sperm から界面活性剤耐性画分としてのマイクロドメインを単離した。その SDS-PAGE 結果からマイクロドメイン画分は 38 kD の ARIS 受容体候補分子を含んでいることが明らかになった (Fig. 5-6, 赤矢頭)。

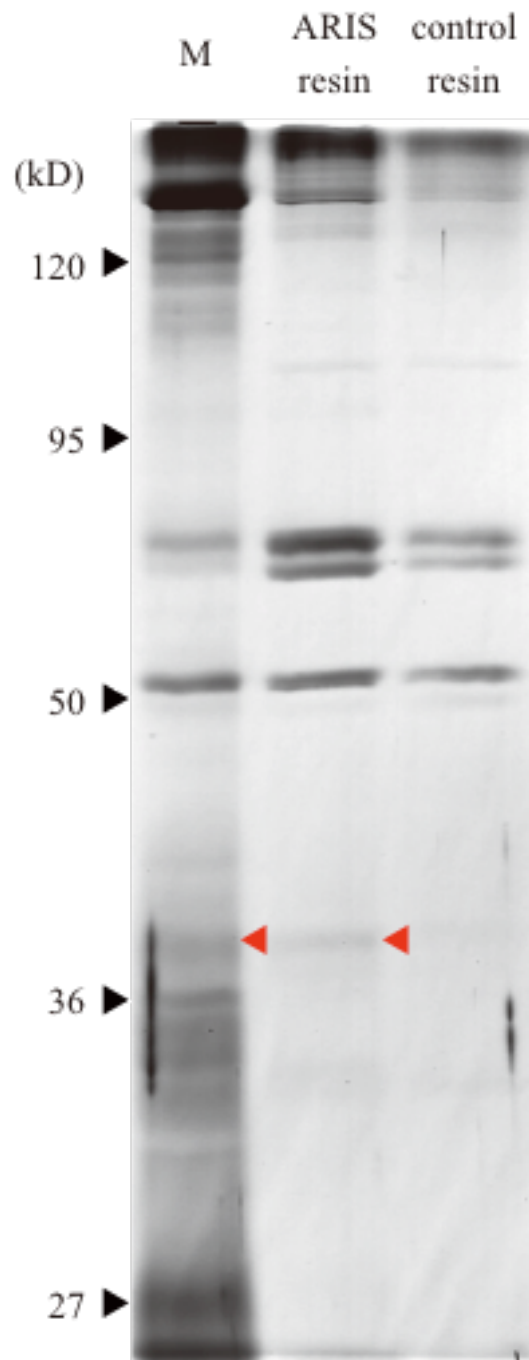


Fig. 5-6 精子マイクロドメイン画分に含まれるタンパク質の解析

M: マイクロドメイン画分

15% ゲルで銀染色により検出。

赤矢頭: ARIS 受容体候補分子

5-3-6 先体反応時に放出されるタンパク質の解析

ARIS 受容体は先体胞周縁領域に存在するとされることから、先体反応時の開口分泌によって膜と同時に精子から剥がれている可能性がある。先行研究により、先体反応時に特異的に精子から放出されるタンパク質画分が示されており、ARIS 受容体が存在するかを検討することとした。

ARIS や卵ゼリーでの先体反応誘起では、誘起物質中のタンパク質が混入してしまうため、10 μ M Ionophore, 50 μ M Monensin / ASW を精子に作用させることで、人工的に精子に先体反応を誘起し、その上清を用いることとした。得られた画分の SDS-PAGE 結果では、ARIS 受容体とほぼ同じ位置にバンドが検出された (Fig. 5-7, 赤矢頭)。しかしながら、他のバンドと比較してその存在濃度は薄く、残念ながら ARIS 受容体の大量精製には向いていないことが明らかとなった。精子の SDS-PAGE 結果でも ARIS 受容体は観察できないことが示すように、精子の有する ARIS 受容体が絶対的に少ないからであると考えられる。

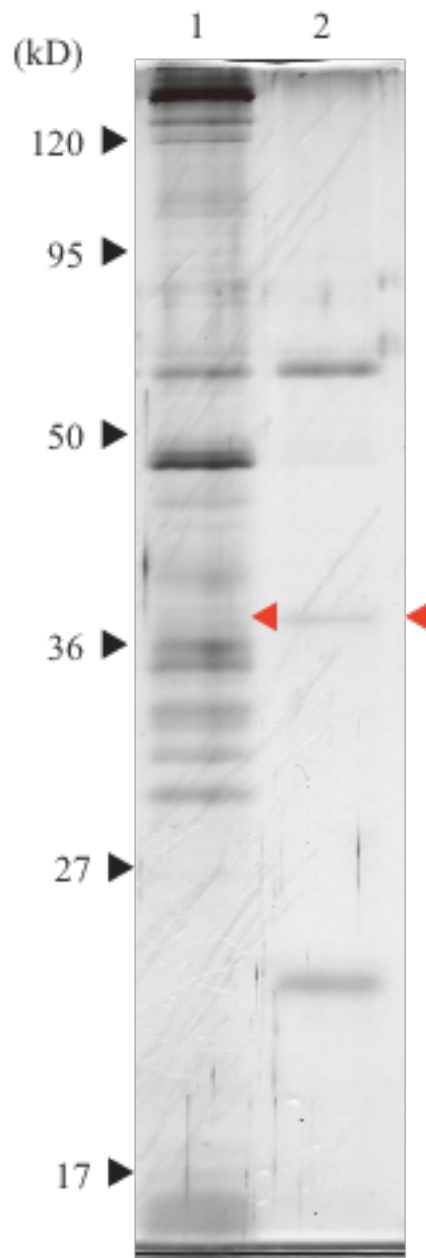


Fig. 5-7 先体反応により放出されるタンパク質の SDS-PAGE 結果

lane 1: 先体反応時に放出されるタンパク質画分, lane 2: アフィニティークロマトグラフィーによって得られたサンプル,

赤矢印: ARIS 受容体候補分子

15% ゲルを用い、銀染色によって検出した。

5-3-7 ARIS 受容体候補分子の濃縮と配列解析

アフィニティークロマトグラフィーの resin からの ARIS 受容体候補分子の脱離は Fr. 1 溶液や ARIS 溶液によっては不可能であったので、確実に resin から解離することのできる SDS を用いることとした。ARIS 受容体候補分子を解離した溶液に対して、限外濾過によって濃縮・SDS の希釈を行うことで濃縮に成功し、Fig. 5-8 に示す形で CBB 染色でも検出可能であった。この方法によって得られたバンドをエドマン分解による N 末端アミノ酸配列解析にかけたところ、

NH₃-AELVLA

という配列が得られた。しかしながら、BLAST 検索によって、有意に相同性を持った既知配列は見つからず、従って、内部配列の取得から縮重プライマーを設計、PCR 増幅によってクローニングという手段をとらなければならない。

そこで次に、trypsin 処理及び、hydroxylamine 分解によって内部アミノ酸配列取得を目指した。trypsin 処理の結果、多数の断片バンドが見られたのに対し、hydroxylamine 分解では処理時間を増やしてもわずかな断片バンドしか生成されなかった (Figs. 5-9, 5-10)。

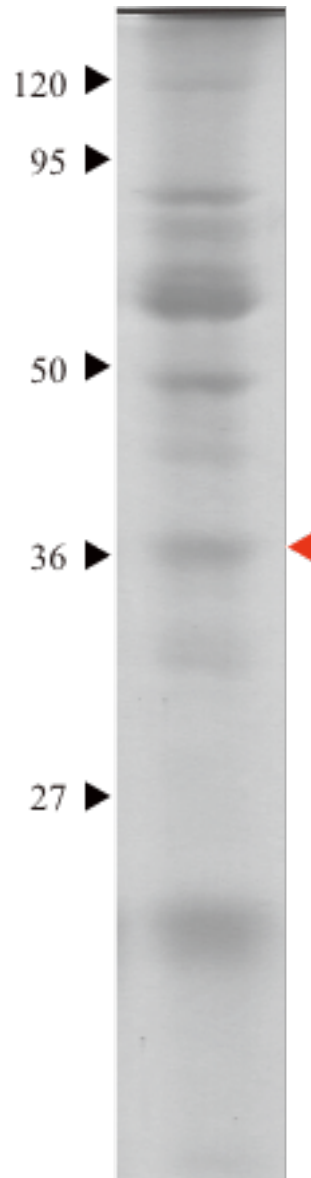


Fig. 5-8 濃縮した ARIS 受容体候補分子の SDS-PAGE 結果

15% ゲルで CBB 染色により検出。

赤矢頭: ARIS 受容体候補分子

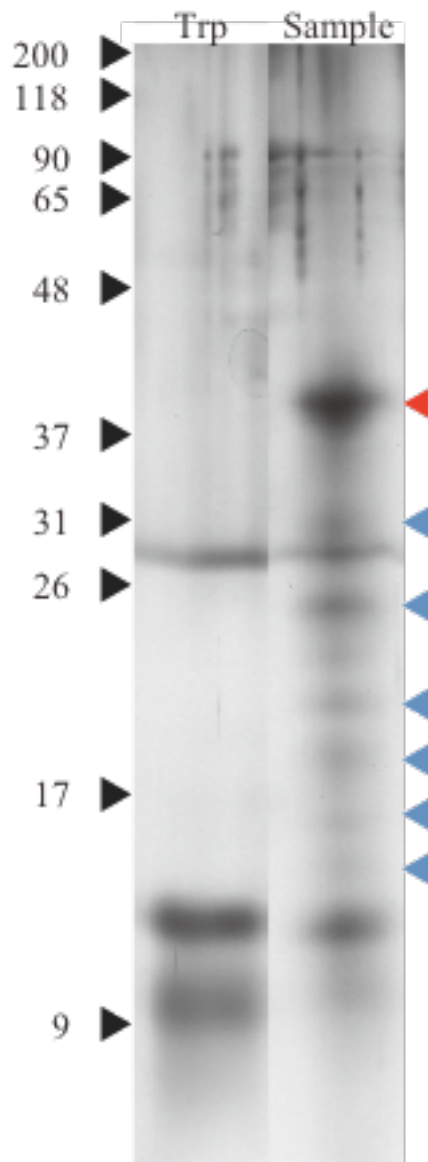


Fig. 5-9 ARIS 受容体候補分子の trypsin 処理結果

Trp: 分解に用いた trypsin 溶液をアプライした lane, Sample: trypsin 処理した ARIS 受容体候補分子をアプライした lane。赤矢印: ARIS 受容体候補分子 青矢印: ARIS 受容体候補分子の trypsin 消化断片

20% ゲルで銀染色により検出した。

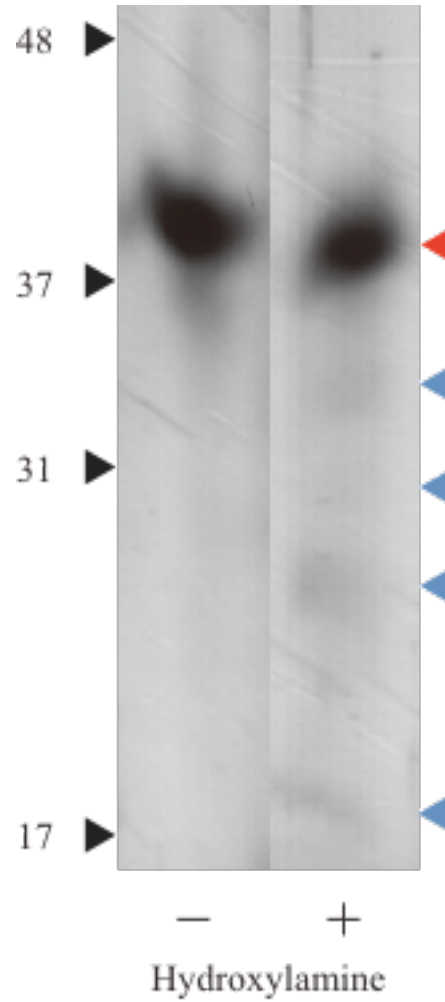


Fig. 5-10 ARIS 受容体候補分子の hydroxylamine 処理結果

赤矢印: ARIS 受容体候補分子

青矢印: hydroxylamine 処理によって生じた、ARIS 受容体候補分子の断片。

20% ゲルで銀染色により検出。

5-4 考察

本研究において、ARIS を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行うことで発見した 38 kD のタンパク質は、Fr. 1 糖鎖と特異的な相互作用をすることから、ARIS 受容体である可能性が高い。Fr. 1 との結合性についても、Fr. 1 よりも Au-Fr. 1 と強く結合するという結果は、第 2 章で述べたクラスター効果が存在している証拠であり、実際の精子の認識機構と一致していると考えられる。

本章後半ではこの ARIS 受容体候補分子の同定を目指し様々なアプローチを行った。結果として、マイクロドメイン画分や、先体胞の開口分泌によって放出される画分への局在を示したが、類似のサイズの濃いバンドが近接しており、解析は困難であった。また、マイクロドメイン画分に存在するという事はシグナル伝達の開始点である受容体にふさわしい局在である。hydroxylamine 分解は処理時間を延長してもほとんど断片が得られなかったことから、今後は trypsin 消化によって内部配列の取得を行うことで、配列決定に至ることが期待される。

残念ながら全長配列決定に至ることはなかったが、ARIS 受容体候補分子の N 末端アミノ酸配列の決定は成功した。BLAST 検索によって類似配列が見つからないという結果は、このタンパク質が新規のものであることを示唆している。第 4 章で述べたように、保存された ARIS コアタンパク質と多様性のある糖鎖が先体反応誘起の認識を担うという機構が動物界に広く保存されている可能性がある。従って、その相手である ARIS 受容体も保存されていると考えられ、今回発見した ARIS 受容体候補分子の同定から、他の多くの動物における先体反応誘起物質受容体の発見につながると予想される。また、種特異的に多様性を作り出している糖鎖部分に対して、受容体がどのように進化しているかを解析する

ことで、種分化を規定する共進化の過程が明らかになると考えられる。

第6章 先体反応誘起補因子 Co-ARIS の作用機構

6-1 緒言

Co-ARIS はゼリー層中に含まれる低分子先体反応誘起補因子として構造決定された分子であり、その分子構造から硫酸化ステロイドサポニンに分類される (Fujimoto et al., 1987)。構造的に単一ではなく、主として3種類のアイソフォームから成り、それぞれ Co-ARIS I, II および III と名づけられた (Fig. 1-5) (Nishiyama et al., 1987b)。Co-ARIS の活性には二面性があり、一定の濃度限界内では濃度依存的に先体反応を誘起したが、高濃度域ではその界面活性剤的作用によって精子に対して細胞毒性を示す (Fig. 6-1)。また、活性の変化は3つのアイソフォームによって異なる濃度依存性を見せる (Fig. 6-1)。糖鎖構造の改変は活性に影響を与えないことから、糖鎖は親水性領域を形成する役割をしているだけに過ぎないと考えられ、ステロイド側鎖の構造の僅かな違いが活性に大きく影響すること、C-3位の硫酸基が活性に必要なことからこれらの部分が先体反応誘起補因子としての活性に重要な部分と考えられている (Nishiyama et al., 1987a)。ARIS と Co-ARIS は協同的に精子に先体反応を誘起するとされ、ARIS と Co-ARIS の作用点は密接に関係していると思われる。

サポニンはトリテルペン環もしくはステロイド環を持つ一群の配糖体であり、主に植物由来のものが知られ、動物ではヒトデ・ナマコ・海綿にのみ存在が知られている (Ohtsuki, 1984)。トリテルペン環・ステロイド環 (ゲニン部分) に加えて親水性領域としての糖鎖を持つために両親媒性分子となっており、界面活

性を持つことが知られる。トリテルペンサポニンではミセル形成作用が特徴的であり、細胞膜に侵入したサポニンと Cholesterol が結合して円状のミセル構造を形成する (Ohtsuki, 1984)。しかしながら、Co-ARIS の属するステロイドサポニンではそういった細胞膜穿孔活性は報告されておらず、異なった機構で膜に作用していると考えられる。

第5章において ARIS 受容体が局在したマイクロドメインは、マウスの精子においても重要な役割を持っているとされ、先体反応や卵との融合に必要ないくつもの因子が局在していることが明らかにされている (Trevino et al., 2001; Sleight et al., 2005; Tanphaichitr et al., 2007; Young et al., 2009; Baker et al., 2010)。特に、capacitation においては、精子膜の cholesterol が減少し、マイクロドメインの構造変化が起こる。

流動モザイクモデルにおいて、細胞膜上の脂質やタンパク質は均一に分布・流動すると考えられてきたが (Singer and Nicolson, 1972)、マイクロドメインという概念が導入されたことによって、膜上の物質が均一ではなく、それぞれ分布が片寄って存在していると現在は考えられている (Simons and Ikonen, 1997)。マイクロドメイン領域にはシグナル伝達に必要なタンパク質群が集積していて、外からの情報に反応してそこから効率よく内部へと情報が伝わっていくようになっている。マイクロドメインは脂質成分において細胞のその他の部分と違いがあり、その構造は、細胞外側は sphingo 糖脂質と sphingomyelin (Fig. 6-2, 赤) と cholesterol (Fig. 6-2, 灰色) からなり、GM1 や GM3 といった Sphingo 糖脂質 (Fig. 6-2) と sphingomyelin が頭部で相互作用によって会合していて、その根元の隙間を豊富な cholesterol がうめている。細胞質側ではグリセロリン脂質 (Fig. 6-2, 緑)

と cholesterol が多く存在していて、やはり相互作用しあっている。

本章では、マイクロドメインに豊富に含まれる cholesterol と Co-ARIS の相互作用を見出し、そこから Co-ARIS の標的が精子先体胞周縁部に局在するマイクロドメインであることを示唆した。さらに、培養細胞系や人工膜を用いて、Co-ARIS が膜に与える物理化学的な影響を解析することで、精子膜上において Co-ARIS と ARIS とが協同的に働くモデルを提案する。

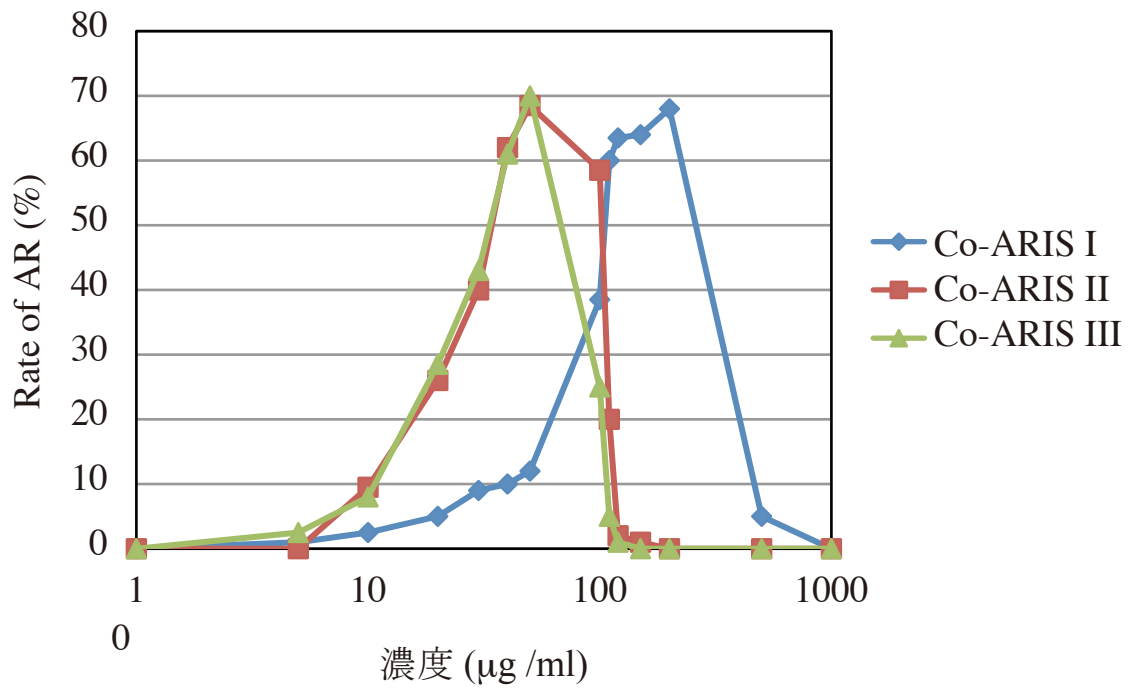


Fig. 6-1 Co-ARIS 活性の濃度依存性 アイソフォーム間の比較

(Nishiyama et al., 1987b より)

縦軸: 先体反応率, 横軸: Co-ARIS 濃度

ARIS を 0.1 mg sugar/ml で用いた。

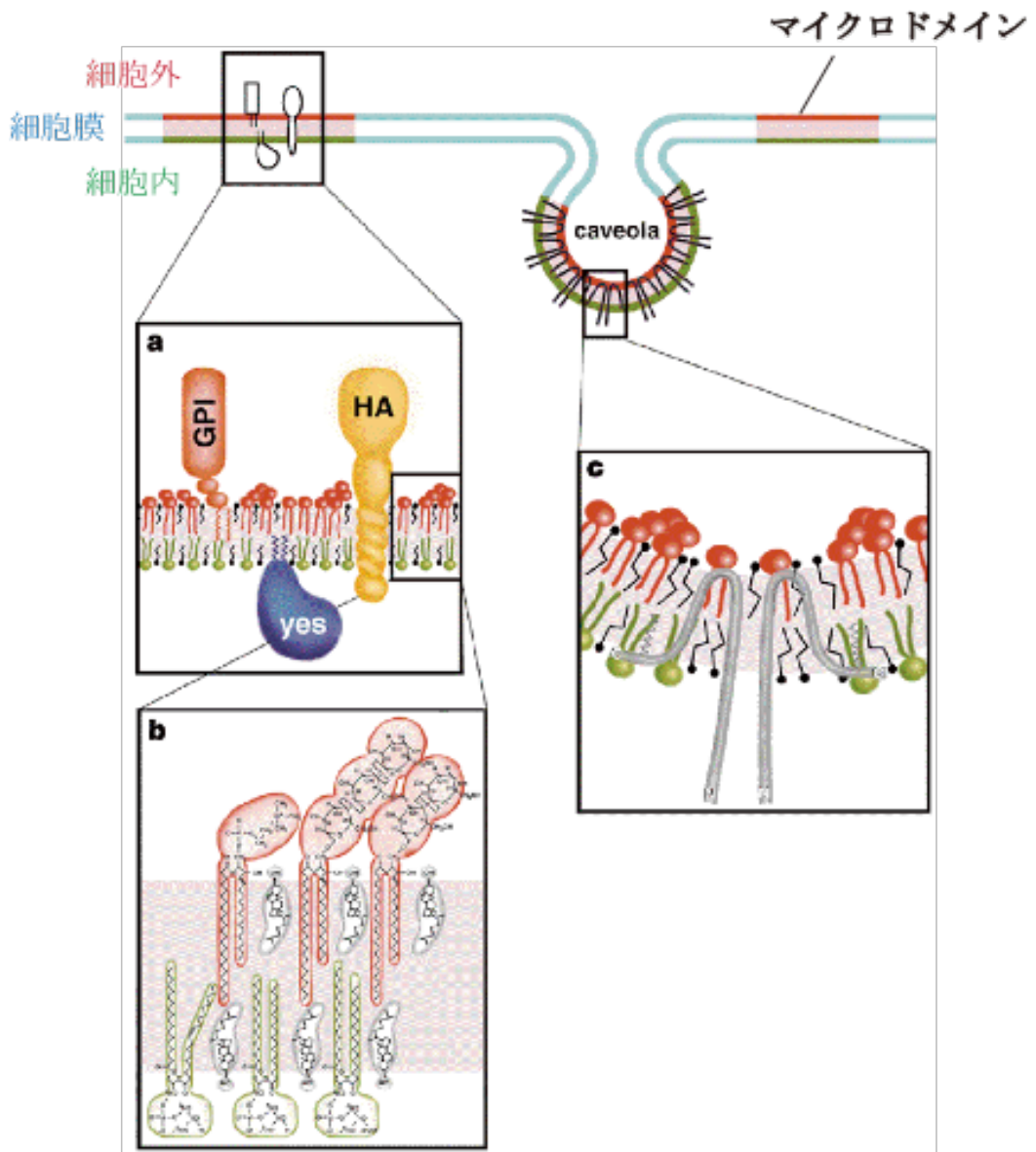


Fig. 6-2 マイクロドメインの膜構造モデル

(Simons and Ikonen, 1997 を改変)

赤: sphyngo 糖脂質・sphynomyeline

緑: グリセロリン脂質

黒 or 灰: cholesterol

6-2 方法

dry sperm の調整, 先体反応率の測定

第 2 章参照

マヒトゲ, 海水の調整, 卵ゼリーの採集, ARIS の精製, 還元糖の定量

第 3 章参照

Co-ARIS の精製

先行研究に従って行った (Nishiyama et al., 1987b)。3 l の卵ゼリー溶液に 2 倍量の EtOH を加え一晩-30°C で放置した後、4°C, 15,000 g, 30 min 遠心し、その上清をロータリーエバポレーター NVC-2000 (Tokyo rikakikai, Japan) で 900 ml 程度まで濃縮した。それを、ODS 担体 (LC-SORB SP-C-ODS, Chemco Scientific Co. Ltd., Japan) を用いた逆相カラムクロマトグラフィー ($\phi 1.0 \times 10$ cm; 30 ml Chl-MeOH (1:2) \rightarrow 30 ml MeOH \rightarrow 30 ml 5% MeOH で洗浄) を行うことで、脱塩を行った。全量をアプライした後、30 ml 5% MeOH, 30 ml 50% MeOH でそれぞれ洗浄し、40 ml 80% MeOH で溶出を行った、これをロータリーエバポレーターで乾固したものを M₈ 画分と呼ぶ。その後、M₈ 画分を DEAE-Sephadex A-25 担体 (GE Healthcare, UK) を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー ($\phi 3.0 \times 20$ cm; 50 mM sodium acetate-acetic acid, pH4.0 で平衡化) を行うことでさらに精製を行った。アプライ後に 100 ml 50 mM sodium acetate-acetic acid, pH4.0 で洗浄し、0.5 M NaCl を含む同緩衝液で溶出を行い、上記 ODS カラムによって脱塩後、ロ

ロータリーエバポレーターで乾固した。次に、AKTA purifier (GE Healthcare, UK) に COSMOSIL 5C18-PAQ (ナカライテスク, Japan) を組み合わせた HPLC を用いて、更なる精製を行った。HPLC は 20% acetonitrile で平衡化後、Co-ARIS 画分を inject し、20% → 50% acetonitrile の濃度勾配を 20 min, 流速は 6 ml で行い、243 nm の吸収によって Co-ARIS のピークを検出した。HPLC 用の溶液は全てアスピレーターで脱気をし、同時に PTFE タイプメンブレンフィルター (孔径 0.5 μm , H050A047A; Advantec, Japan) を用いて濾過した。ここで得られた Co-ARIS を Co-ARIS I, II, III の混合物として使用した。

Co-ARIS II の単離のためには、さらにイアトロビーズ 6RS-8060 (Mitsubishi Chemical Medience Corp., Japan) を担体として用いたカラムクロマトグラフィー ($\phi 1.0 \times 10$ cm; Chl-MeOH-脱イオン水 (10:5:1) で平衡化) を行った。Co-ARIS I, II, III の混合物をアプライし、流速 1.5 ml/min で 10 ml ずつ画分を採集し、TLC で Co-ARIS II の含まれる画分を探索し、回収した。TLC 板は TLC ガラスプレート シリカゲル 60 (MERCK, Germany) 、移動層は Chl-MeOH-2.4 N Ammonia 水溶液 (60:35:8) で行い、0.2% orcinol / 2 M 硫酸を噴霧してから 100°C に加熱して Co-ARIS 含む糖を検出した。この TLC によって得られる Co-ARIS II の R_f 値は 0.3 程度であり、Co-ARIS II のみを含む画分を集め、ロータリーエバポレーターで乾固したものを Co-ARIS II サンプルとした。

asterosap

asterosap は SUNBOR 研究員 南方宏之 博士のご好意により化学合成精製されたものを用いた。配列は P15 アイソフォームのもの (Fig. 1-6)、すなわち

NH₂-GQTQFGVCIARVRQQHQGQDEASIFQAILSQCQS-COOH

である。

[³H]-Co-ARIS II の作成と精子への取り込み量の測定

1 mg の Co-ARIS II を 4 ml の 0.75% [³H]-NaBH (American Radiolabeled Chemicals Inc., USA) に溶解し、5 hr 室温に静置した。その後、ODS 担体 (LC-SORB SP-C-ODS, Chemco Scientific Co. Ltd., Japan) を用いた逆相カラムクロマトグラフィー (φ1.0 × 5 cm; 30 ml CH₂Cl₂-MeOH (1:2) → 10 ml MeOH → 10 ml 5% MeOH で平衡化) を行い、アプライ後に 10 ml 50% MeOH で洗浄し、10 ml 80% MeOH で溶出を行った。最後に真空ポンプ Laboport pump (KNF Neuberger Inc., USA) で乾固し、[³H]-Co-ARIS II サンプルとした。

40 mg/ml [³H]-Co-ARIS II を精子に 5 min 作用させ、遠心—ASW への置換を 2 度行って洗浄した後、液体シンチレーションカウンター Tri-Carb 2910TR liquid scintillation analyzer (Perkin Elmer, USA) を用いて、[³H]シグナルを測定し、QuantaSmar software (Perkin Elmer, USA) を使用して解析した。

filipin による Cholesterol 動態解析

あらかじめ 600 μl の ASW に 30 μl の dry sperm を懸濁し、氷上で 5 min 静置した。この精子溶液を 2 等分し、片方の 300 μl には 500 μl の 64 μg/ml Co-ARIS 溶液を、残りの 300 μl にはコントロールとして ASW を加えた。5 min 後、1,500 g, 5 min 遠心し、ペレットとして回収した精子を 240 μl の ASW に懸濁した。さらにまた半分をブランクとして保存し、残りの 120 μl には 195 μM filipin

(Sigma-Aldrich, USA) / ASW を 5 μ l 加え、3 hr, on ice で静置した。ブランク・サンプル共に 1,500 g で精子を回収後、2 度 ASW で wash し、10 倍希釈して吸光度測定を行なった。filipin の 323 nm の吸光度の値によって精子に結合した filipin の定量を行なった (Severs and Robenek, 1983; Fujita et al., 1984; Castanho et al., 1991)。

精子膜 sterol の抽出と定量

精子膜ステロールは aceton-hexane 法を用いて行った。Co-ARIS 処理をして、遠心で回収した精子 100 μ l に 5 ml acetone 加え、上清を回収し、再び 5 ml acetone を加え、その上清も回収した。ロータリーエバポレーターで 2 ml 程度に濃縮後、2 ml hexane を加えて、分液漏斗にて hexane 層を回収した。さらに、2 ml 5% NaHCO₃ を加えて hexane 層をとることで、塩を除去し、ロータリーエバポレーターで乾固したものを精子膜 sterol サンプルとした。

定量は、無水酢酸-硫酸による呈色反応で行った。抽出 sterol 試料を 400 μ l chloroform に溶解して、5% 硫酸 / 無水酢酸を 20 μ l 加えた。室温で 10 min 静置後に、600 nm の吸光度を測定し、既知濃度の sterol 標品の検量線と比較することで濃度を算出した。

精子 sterol・マイクロドメインの染色

氷上にて、海水 1 ml に dry sperm 10 μ l を加え、軽く攪拌して精子懸濁液を準備した。5 min 静置後、ASW に溶解した検定試料 80 μ l に、20 μ l の精子懸濁液を加えて軽く攪拌した。5 min 反応後、5% glutaraldehyde / ASW 20 μ l を加え、5 min,

on ice で固定した。カバーガラス上にパップペンで直径 2 cm 程の円を描き、その内部を BD CellTak (Becton, Dickinson and Company, USA) でコートしたところに、固定した精子溶液を移し、30 min, on ice で湿箱の中に静置して精子のカバーガラスへの結合を待った。その後、上清を捨て、50 µg/ml FITC-CTx / ASW (Sigma-Aldrich Co., USA) もしくは、50 µg/ml Filipin / ASW を加え、30 min, on ice で湿箱の中に静置した。最後に 2 度 ASW で置換することで洗浄し、蛍光顕微鏡で観察を行った。FITC-CTx 染色の観察には B 励起、Filipin 染色の観察には UV 励起を用いた。

ARIS-fluosphere の作成と精子への結合解析 assay

ARIS-fluosphere は記載を参考に作成した (Ushiyama et al., 1993)。600 µl 0.2% FluoSpheres carboxylate-modified microspheres, 0.02 mm, red fluorescent (life technologies, USA) / 15 mM sodium acetate - acetic acid, pH 5.0 を 250 µl 3.2 mg/ml ARIS / 15 mM sodium acetate - acetic acid, pH 5.0 と混合し、15 min 振盪した。その後、EDC を 5 mg 加えて攪拌し、0.01 N NaOH を用いて pH 7.0 にしてから常温で一晩振盪した。翌日、L-glycine を 100 mM になるように加えて 30 min 攪拌し、反応を停止させ、40,000 g, 10 min の遠心で色のついた層を ARIS-fluosphere として回収した。

定量解析には、Spectrofluorophotometer RF-540 (Shimadzu Corp., Japan) を用いて、580 nm の励起光に対する 605 nm の蛍光強度を測定し、定量化の指標とした。

Caveola breaking assay

培養細胞系統 CHO-K1 に、pN-luc-CAV1, pC-luc-CAV1-Hygr を導入し、luciferase の N 末端側半分と C 末端側半分のどちらかと CAV1 がコンジュゲートされたものの両方が発現されている状態を作った。培地は、450 ml DMEM nutrient mixture F12 (life technologies, USA) に 50 ml FBS (life technologies, USA)、及び 500 μ l Hygro Gold (life technologies, USA) と適当な抗生物質を加えて、フィルター滅菌してから使用した。試料はこの培地に混ぜて作用させることとし、luciferase 活性は、Bright Glo luciferase assay system (Promega Corp., USA) を使用し、Glo Max 96 microplate luminometer (Promega Corp., USA) で検出を行った。また同時に細胞生存を CellTiter-Glo luminescent cell viability assay (Promega Corp., USA) を用いて確認した。

人工膜の作成

人工膜は記載を参考にして作成した (Yuan et al., 2002; Iijima et al., 2009)。140 × 100 mm² の Langmuir 型トラフ (USI Co. Ltd., Japan) 及び、Compaq Presario (Compaq computer Corp., USA) で制御された Film balance controller FSD-220 (USI Co. Ltd., Japan)、低温高温水槽 UA-100S (Tokyo rikakikai, Japan) で構成されるシステムを用いた。脂質類は chloroform に溶解したものをマイクロシリンジでゆっくりと滴下し、LB Lift Controller FSD21 (USI Co. Ltd., Japan) の LB モードで制御したバリアーにて、12 cm²/min の速度で圧縮して単分子膜を作成した。

AFM 観察

サンプルは天然マイカ (The Nilaco Co., Japan) 上で観察を行い、1 cm × 2 cm 程度のマイカ表面を劈開して用いた。一層目はトラフの底にマイカを置き、その上に 35 mN/m で作成した POPC の単分子膜を、排水することで液面を下げて、マイカ側が親水基になるように付着させた後、デシケーターで一晩保存した。二層目は、POPC-cholesterol-sphingomyeline-GM1 (10:7:2:1) + 適当な濃度の Co-ARIS の組成の単層膜を 30 mN/m で作成し、上からマイカを押し込んで付着を行うことで、マイカ上に脂質二重層を構成した。AFM 観察は AFM SPA300 (Seiko Instruments Inc., Japan) を使用し、コンタクトモードで行った。探針は SN-AF01 (Olympus Optical Co., Japan) を用いた。試料は試料台にシリコングリースで固定し、脱イオン水中で測定を行った。解析はフリーソフト Image SXM (<http://download.cnet.com/Image-SXM/>) を用いて行った。

人工膜への CTx-binding assay

人工膜 CTx (Sigma-Aldrich Co., USA) との相互作用を、表面プラズモン共鳴を用いたシステム Biacore X (Biacore AB, Sweden) によって測定した。POPC-cholesterol-sphingomyeline-GM1 (10:7:2:1) + 適当な濃度の Co-ARIS という組成で単分子膜を作成し、天然マイカを押し込んで付着を行うことで、マイカ上に脂質一重層を構成した。センサーチップとして Au-coated chips SIA Kit Au (Biacore AB, Sweden) を使用し、GM1 無しの人工膜を非特異的な結合に対する control として用いた。

6-3 結果

6-3-1 cholesterol 添加による Co-ARIS 活性の阻害

トリテルペン系サポニンが cholesterol と相互作用するということと、精子マイクロドメインが先体反応に関わっているということを複合して考え、Co-ARIS の標的が精子マイクロドメインであるという仮説を立てた。哺乳類では capacitation の際に cholesterol が精子から減少し、マイクロドメイン構造が変化することが知られており、マヒトデでも類似の現象が起こっているという推測のもと、cholesterol が先体反応誘起に与える影響を観察することとした。

先体反応誘起系は卵ゼリー、ARIS+asterosap、ARIS+Co-ARIS の3つが考えられ、それぞれに対して 20 $\mu\text{g/ml}$ の cholesterol が系中に存在した場合の変化を解析した。結果として、卵ゼリー、ARIS+asterosap の先体反応誘起系は cholesterol 添加の有無で精子先体反応率に変化が見られなかった (Fig. 6-3A)。一方、ARIS+Co-ARIS の先体反応誘起は cholesterol 添加によって有意に減少しており、cholesterol によって抑制されることが示された (Fig. 6-3A)。Cholesterol 存在下での ARIS+Co-ARIS の先体反応誘起活性は ARIS のみの場合とほぼ同じであった (Fig. 6-3A)。また、cholesterol の濃度依存的な阻害効果があることも確かめられた (Fig. 6-3B)。

ARIS+asterosap と ARIS+Co-ARIS での影響の違いは、asterosap と Co-ARIS という2つの補因子がまったく異なる経路で作用しているということを裏付けており、これは新しい発見である。

cholesterol 添加が精子に影響しているのか、Co-ARIS に影響しているのか、が疑問となるが、cholesterol と Co-ARIS の精子への処理のタイミングをずらした

実験から、cholesterol の前処理は阻害効果が無いが、後処理は阻害効果を示すことが明らかとなった (Fig. 6-4)。つまり、Co-ARIS と精子が共存した状態にのみ cholesterol は影響を与えうるのだと考えられる。

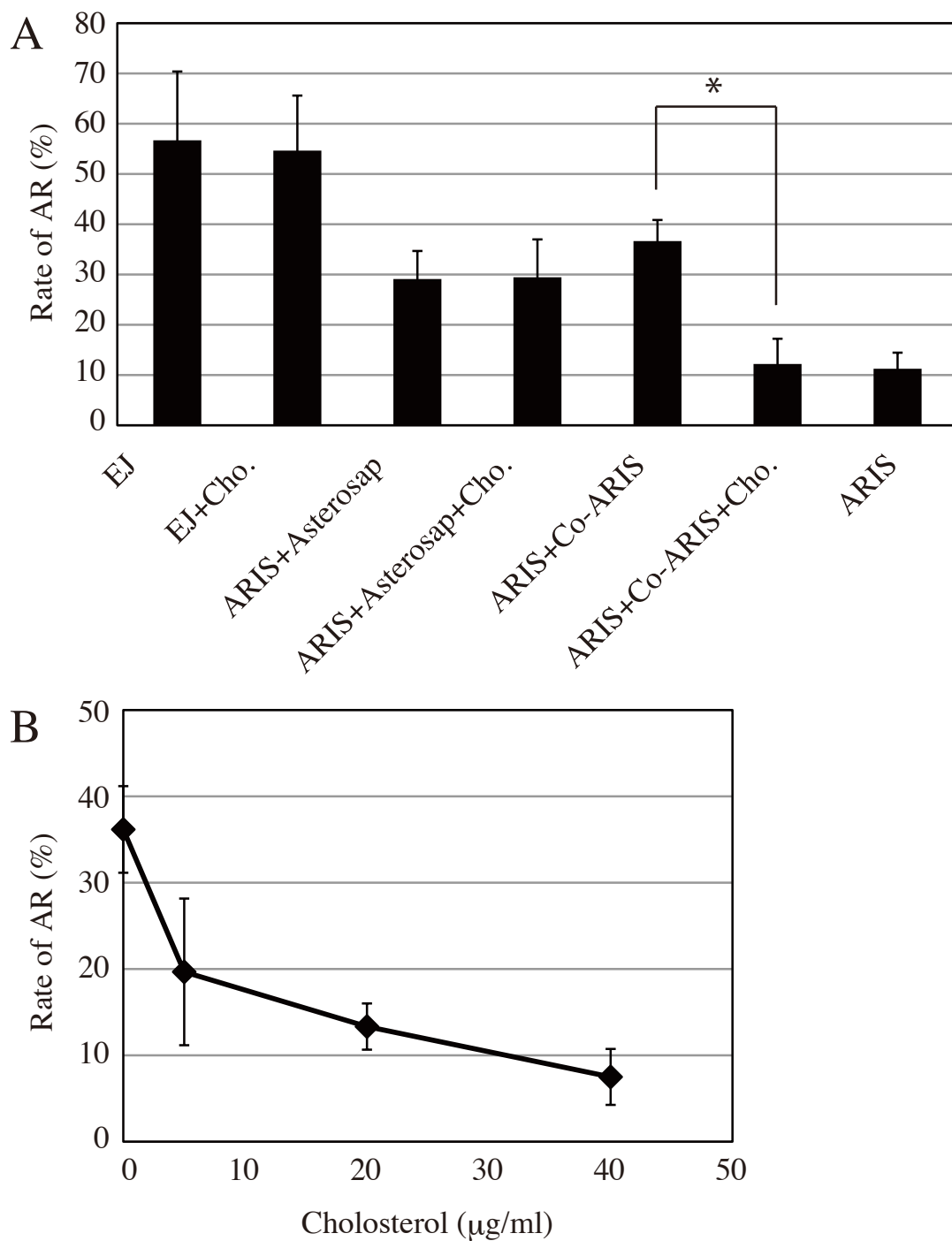


Fig. 6-3 cholesterol 添加による先体反応誘起への影響

A. EJ, ARIS+asterosap, ARIS+Co-ARIS の先体反応誘起系への影響

縦軸: 先体反応率, n=10, bars: SD, *p<0.001。ARIS: 0.1 mg sugar/ml, asterosap: 100 nM, Co-ARIS: 40 μg/ml で使用。

B. ARIS+Co-ARIS の先体反応誘起系への cholesterol 濃度による阻害の比較。

縦軸: 先体反応率, n=3, bars: SD, ARIS: 0.1 mg sugar/ml

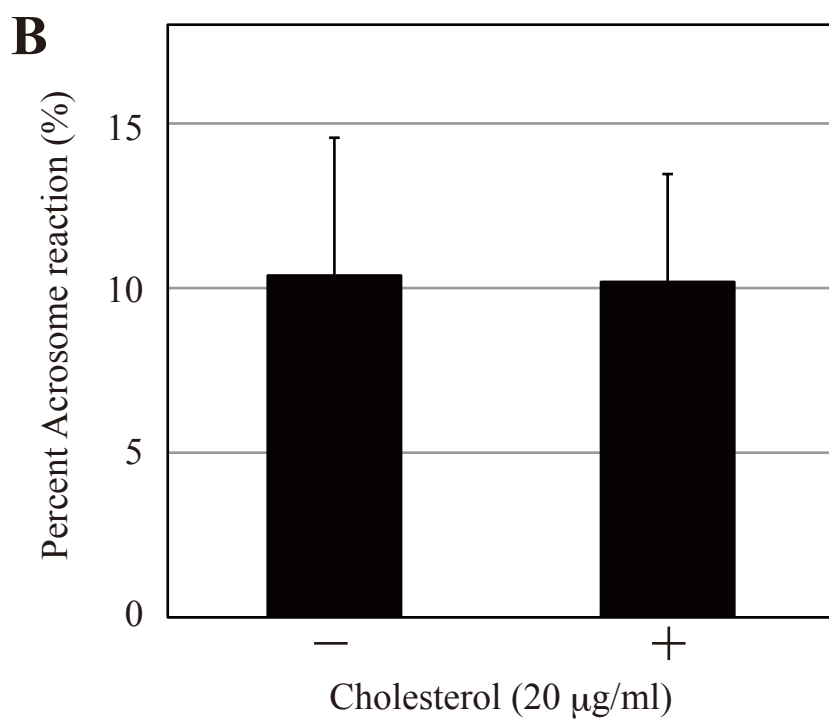
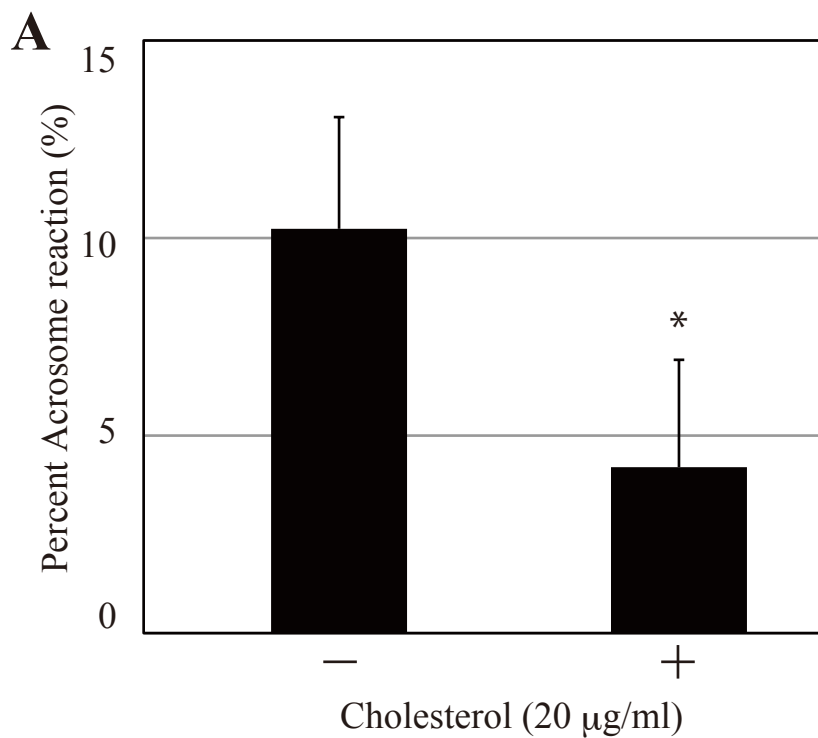


Fig. 6-4 Cholesterol 添加タイミングによる Co-ARIS 活性の阻害の比較

A. Co-ARIS 処理後に cholesterol 処理 **B.** Co-ARIS 処理前に cholesterol 処理

縦軸: 先体反応率 n=14, bars: SD, *p<0.001。ARIS: 0.1 mg sugar/ml

6-3-2 精子膜 sterol に対する Co-ARIS の影響

cholesterol によって Co-ARIS の活性が阻害されるということから、Co-ARIS が精子膜 sterol へ何らかの形で作用している可能性がある。ヒトデ類の持つ strol は cholesterol とは二重結合の位置が異なる Δ -7 sterol であるが (Ikekawa et al., 1979) (Fig. 6-5)、精子膜から抽出した sterol を前節の cholesterol の代わりに先体反応系に添加した場合も、同様に Co-ARIS 活性を阻害するという結果が得られたため (Fig. 6-6)、Co-ARIS が精子膜 sterol へ作用する可能性は高い。

Filipin は sterol 一般に結合する分子として知られており、また吸光度によって定量化が可能である (Tesarik and Flechon, 1986)。Co-ARIS 処理をした精子への Filipin の結合性を測定したところ、Co-ARIS 未処理精子と比較してその結合性は格段に落ちていた (Fig. 6-7A)。これは精子膜 sterol が減少した、もしくは、sterol が他の物質と複合体を形成しているために Filipin が結合できないという状態にあると考えられる。

哺乳類と同じ様に精子膜 sterol の減少が起こっているかを明確にするために、精子 sterol を定量化し、Co-ARIS 処理による変化を解析することとした。しかしながら、その結果、有意な精子 sterol 量の減少は見られず (Fig. 6-7B)、sterol が Filipin と結合出来ない状態にあることが、Fig. 6-7A の結果を生み出したと考えられる。従って、Co-ARIS が精子膜に入り込み、sterol と複合体を形成していることが示唆された。

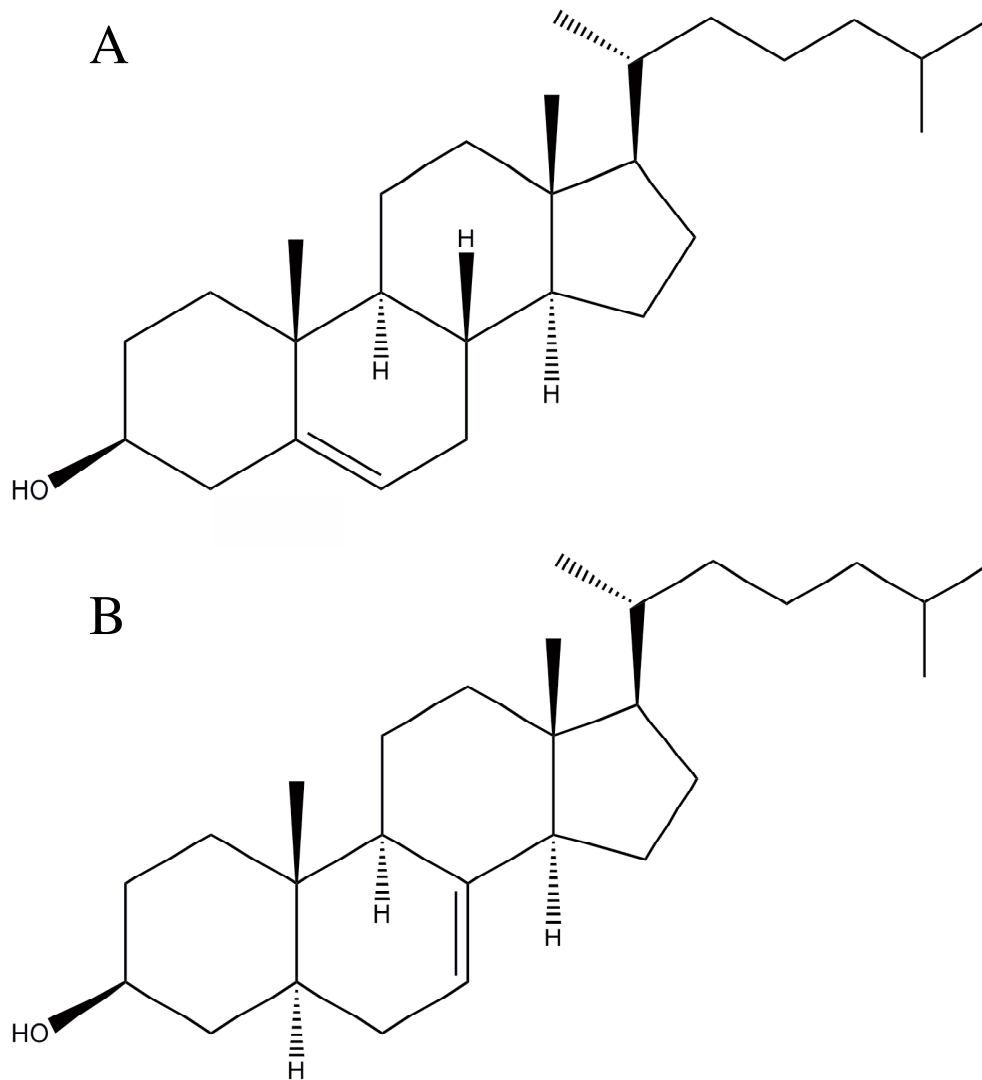


Fig. 6-5 sterol の基本構造

A. cholesterol (Δ -4) **B.** Δ -7 sterol

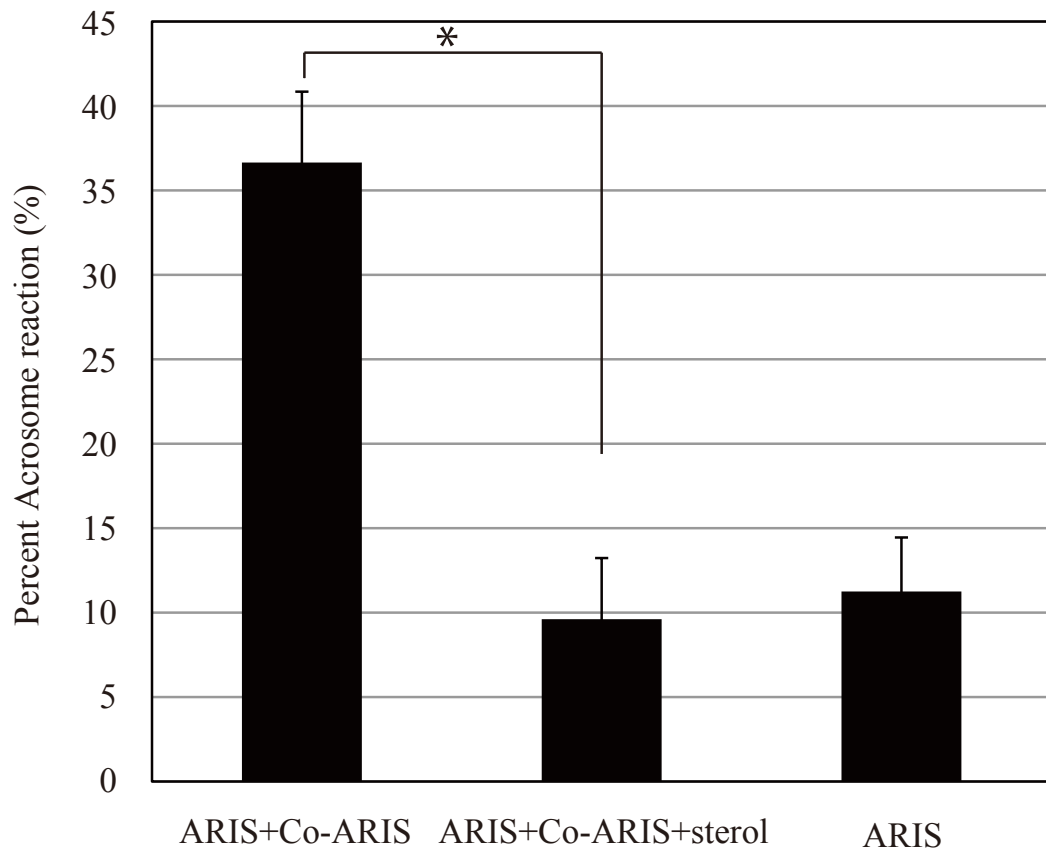


Fig. 6-6 精子膜 sterol 添加による Co-ARIS 活性への影響

縦軸: 先体反応率, n=10, bars: SD, *p<0.001。ARIS: 0.1 mg sugar/ml, Co-ARIS: 40 µg/ml で使用。

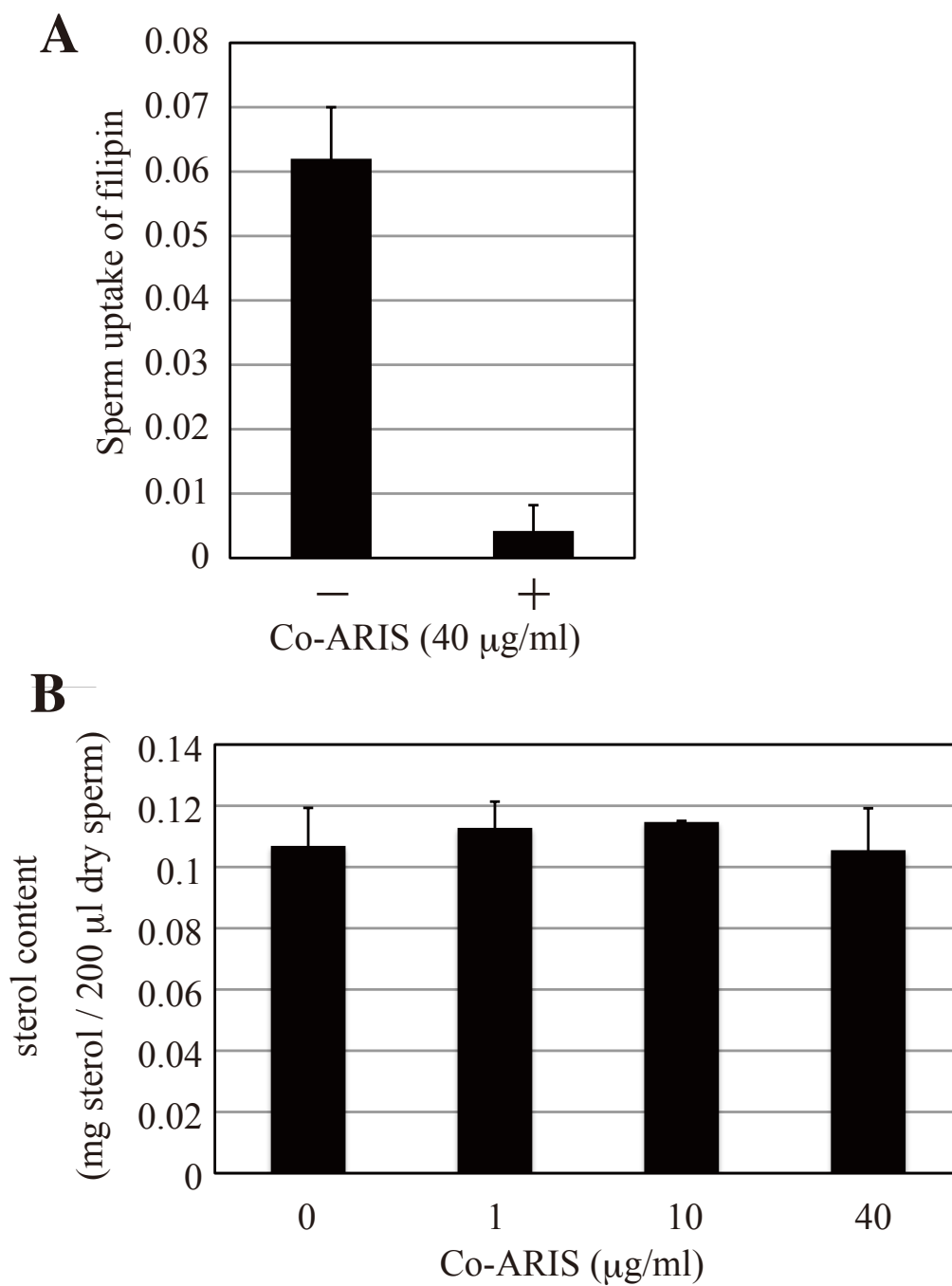


Fig. 6-7 Co-ARIS 処理による精子膜変化の解析結果

A. Filipin 結合アッセイ結果 縦軸: OD_{323} (Filipin 結合量), $n=4$, bars: SD

B. 精子膜 sterol 量の測定結果 縦軸: ステロール量, $n=4$, bars: SD

6-3-3 精子の Co-ARIS 取り込み量の解析

前項において、Co-ARIS が精子膜に侵入し、精子膜 sterol と複合体を形成することが示唆された。Co-ARIS の精子への取り込みをより明確にするために、放射性同位体 (RI) ラベルした Co-ARIS を作成し、精子への取り込み量を測定することを考えた。

ARIS II は NaBH_4 による還元によって、側鎖の二重結合が還元されることが知られており (Nishiyama et al., 1987a) (Fig. 6-8A)、また、この還元型 Co-ARIS II (red. Co-ARIS II) は、もとの Co-ARIS II とほぼ変わらない活性特性を持っていることが示されている (Nishiyama et al., 1987a) (Fig. 6-8B)。この還元反応の際に ^3H ラベルされた NaBH_4 を用いて、 ^3H -Co-ARIS II を作成した。

この ^3H -Co-ARIS II を精子と反応させて、よく洗浄した後に液体シンチレーションカウンターで Tritium 量を測定すると、確かに精子に取り込まれているということが示された (Fig. 6-9)。この取り込みは、cholesterol の存在下で減少することから (Fig. 6-9)、cholesterol は Co-ARIS の精子膜への侵入を阻害していたことがわかる。つまり、cholesterol を添加した場合には、液中のフリーの cholesterol が Co-ARIS と複合体を形成することで精子膜への侵入を抑制していたと考えられる。

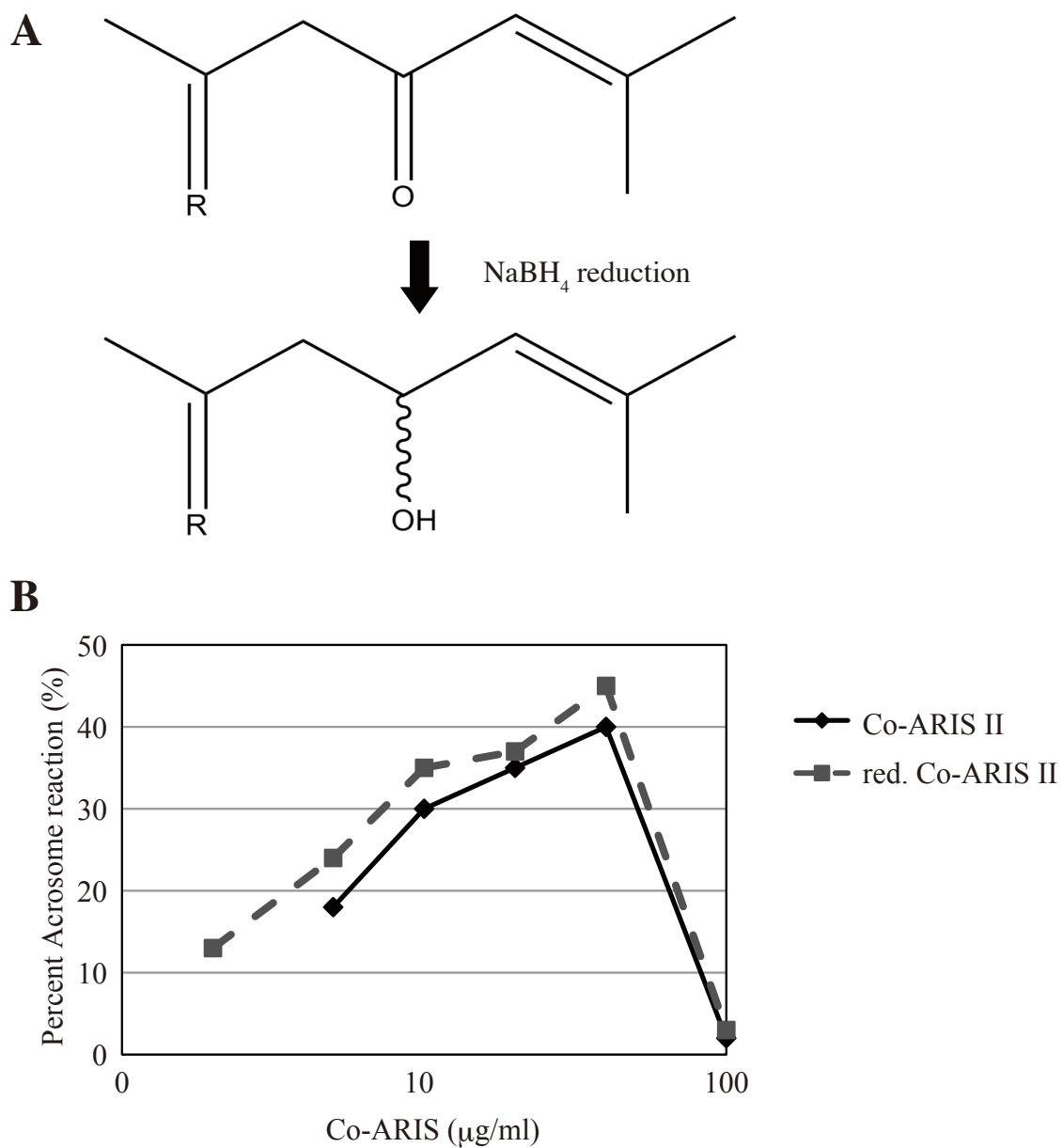


Fig. 6-8 Co-ARIS II の還元とその活性

A. Co-ARIS II とその還元型 red. Co-ARIS の構造 **B.** Co-ARIS II と red. Co-ARIS の活性比較

ARIS を 0.1 mg sugar/ml で使用。

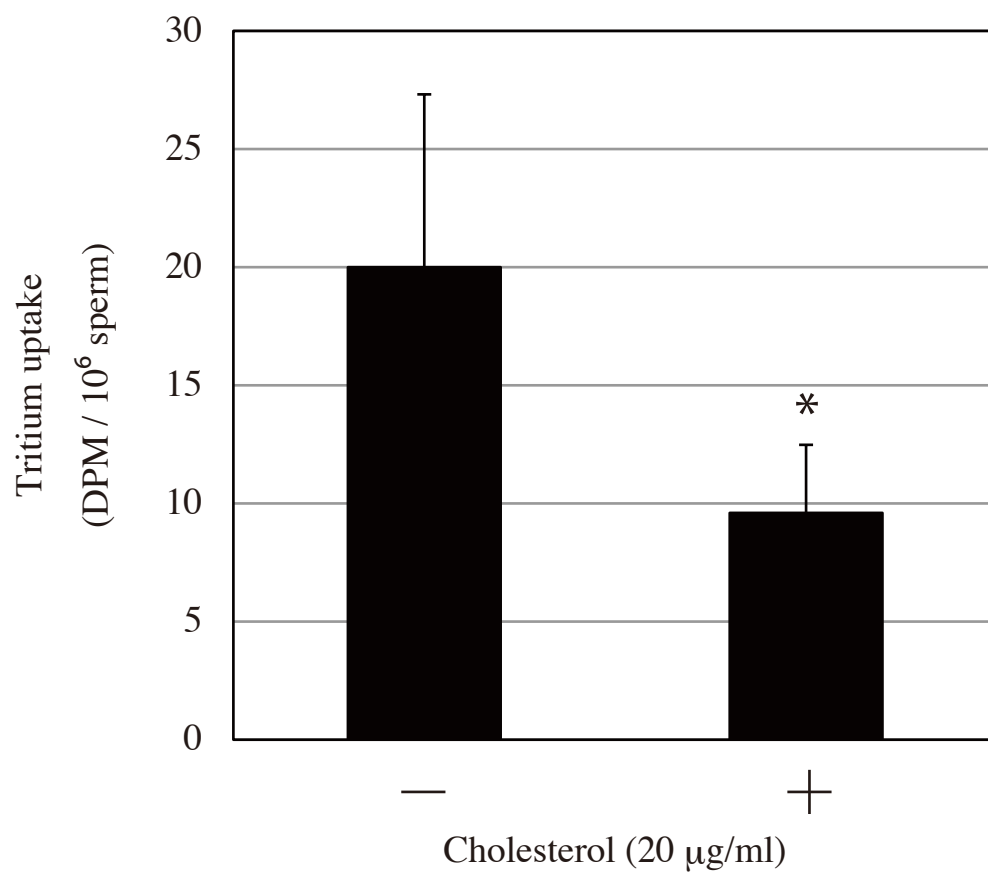


Fig. 6-9 Co-ARIS の精子への取り込み量の測定結果

縦軸: DPM 単位の Tritium 検出量, n=5, bars: SD, *p<0.05

6-3-4 精子膜マイクロドメインの観察

ここまでの結果から、Co-ARIS が精子膜に侵入し、また sterol と相互作用することが判明した。sterol との相互作用が細胞膜にどのような影響を与えるのかを考えた場合、まず細胞膜上で sterol に富むマイクロドメインが挙げられる。マイクロドメインはまた、sterol だけでなく、スフィンゴ脂質 GM1 も多く含むことから、その 2 種類の分子のイメージングを行うことで、マイクロドメインを可視化し、Co-ARIS 処理による変化を観察することとした。

まず、FITC-CTx を用いて GM1 を可視化すると、ミトコンドリア領域と先体胞周縁領域が検出され、その領域にマイクロドメインが存在することが示唆された (Figs. 6-10A, C)。Co-ARIS 処理した精子で染色を行うと、興味深いことに先体胞周縁領域のシグナルのみが消失するという結果が得られた (Figs. 6-10B, D)。Co-ARIS 処理によってこの領域のマイクロドメインに変化があったと考えられる。

Filipin による sterol の可視化は、精子全体にドット上のシグナルが検出された (Figs. 6-10E, H)。Filipin は複数の sterol 分子と複合体を形成するため、正確な分布を議論することは難しいが、精子頭部前方が染まった精子が多く見られた (Figs. 6-10F, I)。Co-ARIS 処理精子においては、精子はほとんど染色されず (Figs. 6-10G, J)、Filipin が結合できなくなったと考えられる。この変化は Fig. 6-7A の結果と一致した。

精子先体胞周縁部は ARIS 受容体が存在する領域であり、イメージングによって明らかにしたマイクロドメインの変化は、受容体の存在状態にも影響を与えている可能性がある。ARIS を蛍光ビーズ fluosphere 結合させた ARIS ビーズは精

子頭部先体胞周縁領域に結合する (Fig. 6-11A)。この ARIS-fluosphere の精子への結合量によって、精子の ARIS との結合親和性を定量化すると、Co-ARIS 処理した精子において、ARIS-fluosphere の結合量の増加が見られた (Fig. 6-11B)。従って、Co-ARIS 処理によって精子頭部先体胞周縁領域のマイクロドメイン構造が変化し、それが ARIS 受容体の配置・構造に影響することで、精子の ARIS 受容能が増加したということが示唆された。

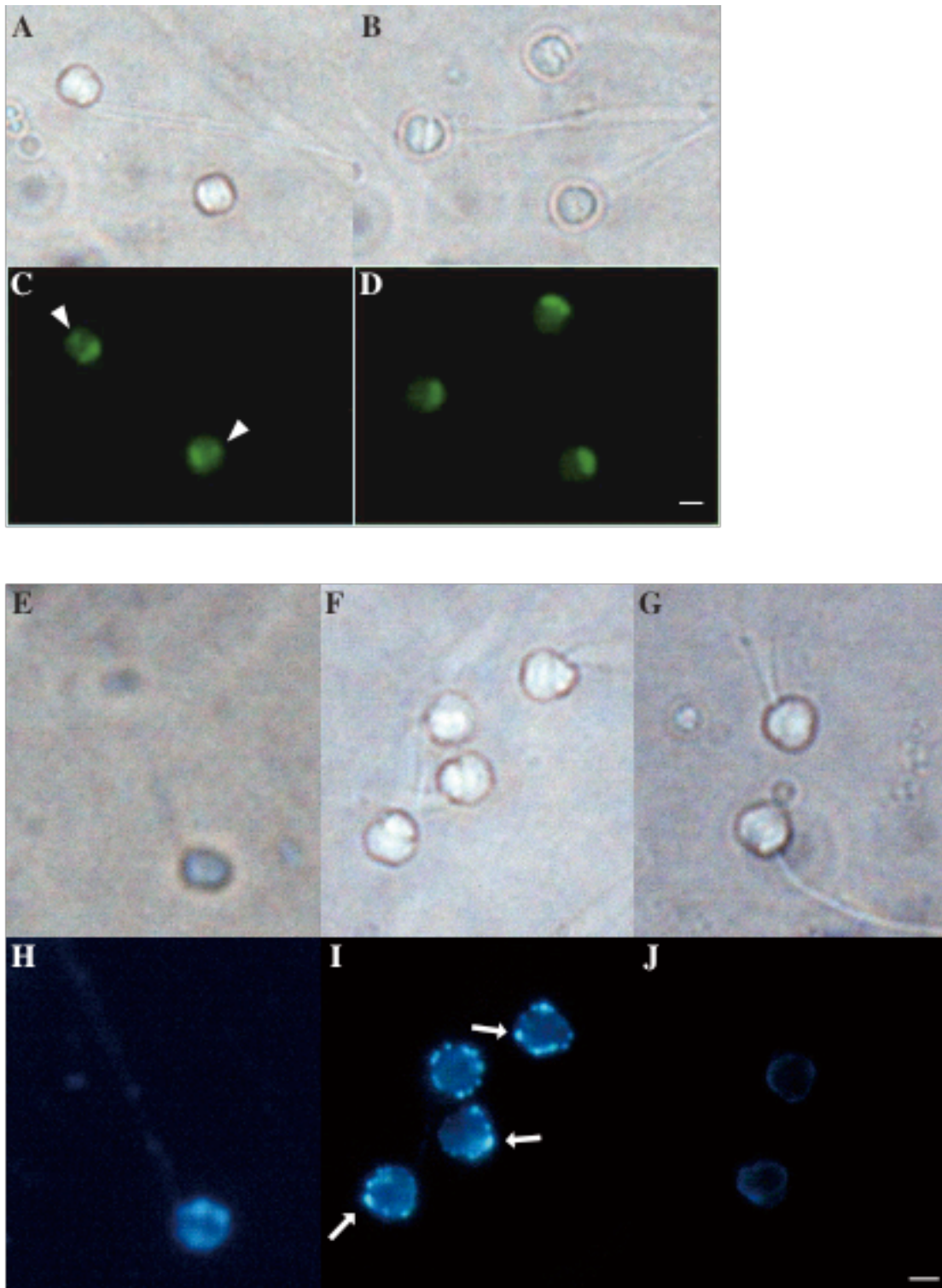


Fig. 6-10 Co-ARIS 処理による精子膜マイクロドメインの観察結果

C, D. FITC-CTx の検出結果、A, B. その明視野像 H, I, J. Filipin の検出結果、
 E, F, G. その明視野像 B, D, G, J. Co-ARIS 処理後 矢頭:先体胞周縁部の GM1
 クラスタ 矢印: cholesterol のクラスタ

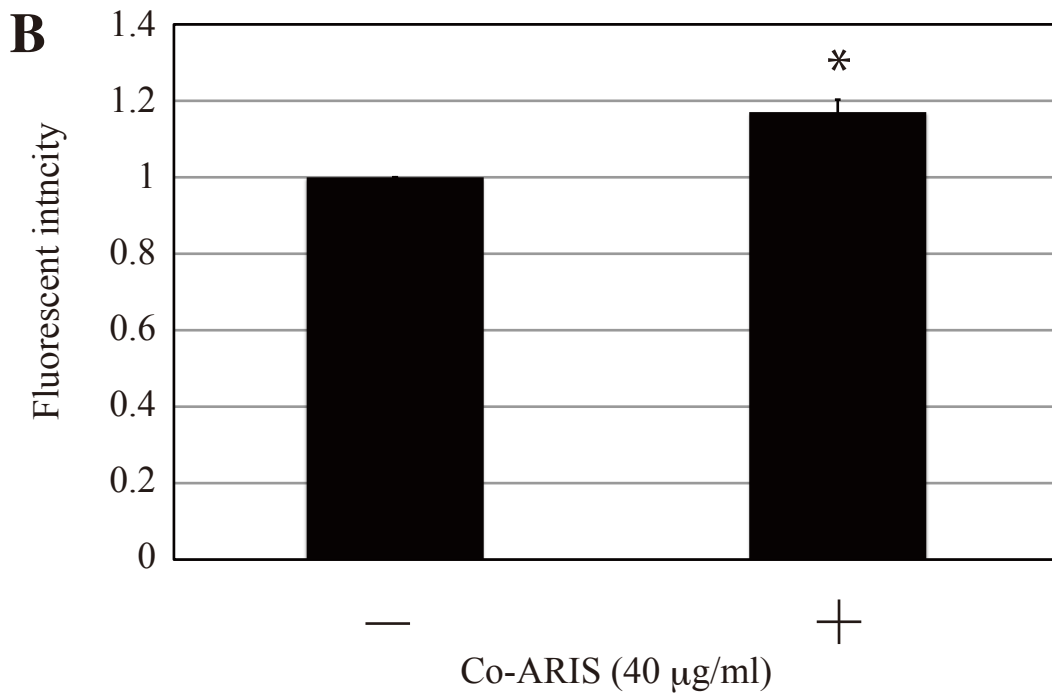
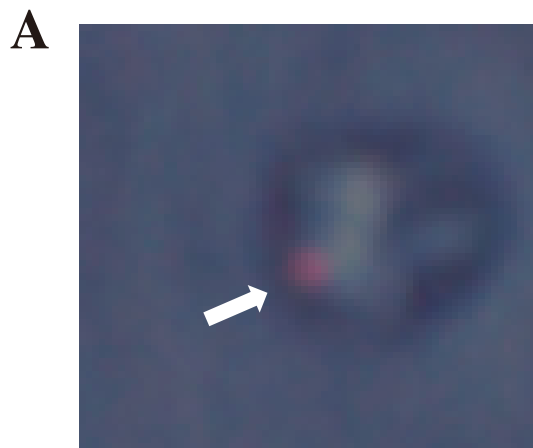


Fig. 6-11 精子の ARIS 受容能の Co-ARIS 処理による変化の解析結果

A. ARIS-fluosphere の結合した精子 矢印: fluosphere

B. fluosphere 結合量の比較結果 control で標準化 n=4, bars: SD, *p<0.001

6-3-5 Caveola breaking assay

カベオラ構造は細胞のエンドサイトーシスに関わる部分であり、カベオリンタンパク質が集積するマイクロドメインの一種である。培養細胞系統 CHO-K1 において、カベオラの量を定量化するシステムが開発されたので、それを用いて Co-ARIS のマイクロドメインへの影響を解析することとした。

細胞膜から cholesterol を抜き取る M β CD や、細胞膜に侵入して cholesterol と複合体を形成する Filipin による処理はカベオラ構造を破壊すると考えられ、コントロールとして用いたところ、確かにルシフェラーゼ活性の減少が観察された (Fig. 6-12A)。5 μ g/ml Co-ARIS 処理では、ルシフェラーゼ活性の変化は見られなかったが、40 μ g/ml や 200 μ g/ml Co-ARIS による処理はルシフェラーゼ活性の大幅な減少を引き起こした (Fig. 6-12A)。従って、Co-ARIS は CHO-K1 細胞系について、そのマイクロドメインの一種であるカベオラ構造を乱す活性があるといえる。

M β CD 処理した細胞では、その後の培地の交換によってカベオラ構造が回復するが、Filipin 処理した細胞では培地を交換しても細胞膜に Filipin が残ってしまうために回復は起こらない (Fig. 6-12B)。Co-ARIS 処理細胞でも、Filipin 処理と同様に回復がほとんど見られなかったため、CHO-K1 細胞においても Co-ARIS は細胞膜に侵入することで働いていると考えられる。

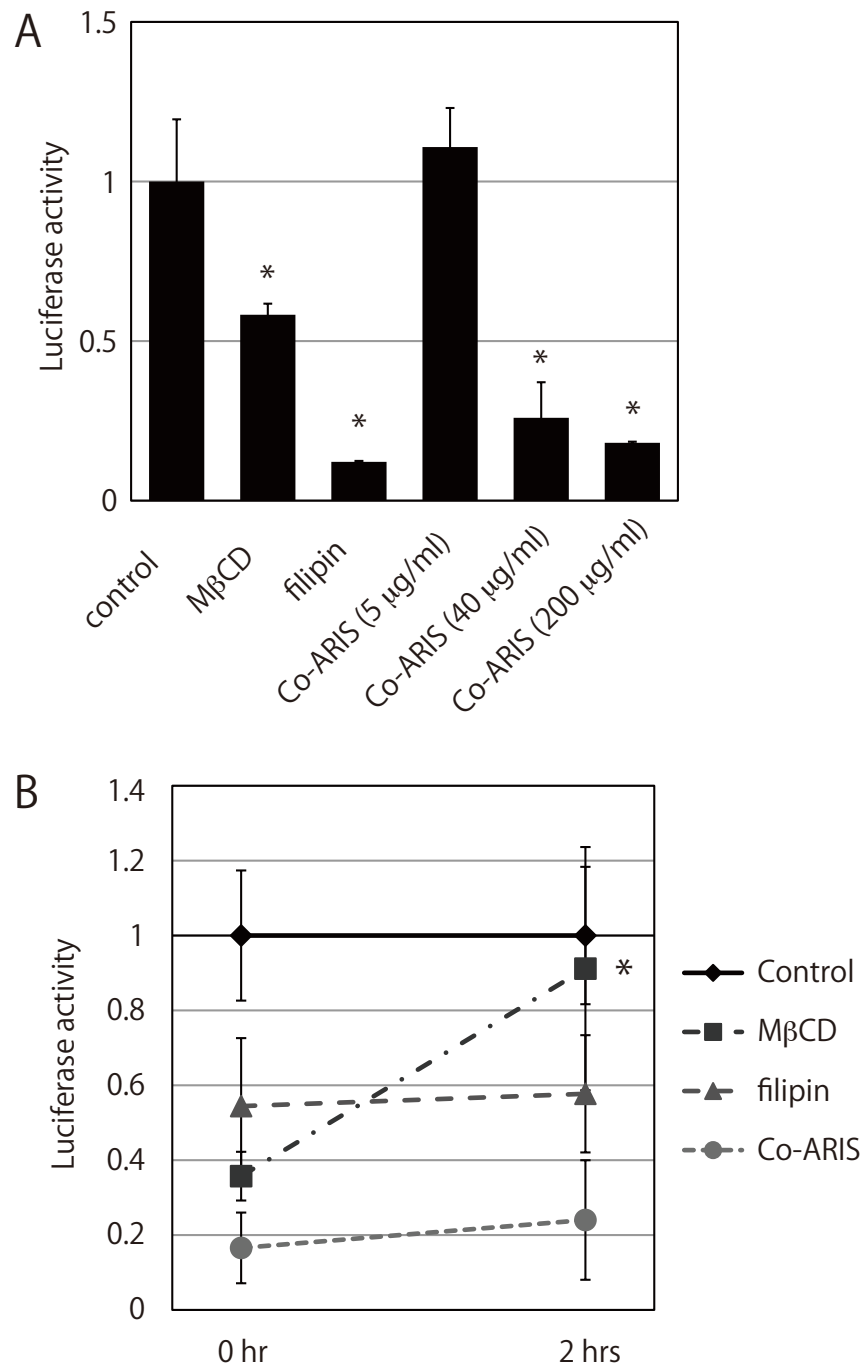


Fig. 6-12 Caveola breaking assay 結果

A. Caveola breaking assay の結果 n=10, bars: SD, *p<0.001

B. 培地交換による rescue 実験結果 n=10, bars: SD, *p<0.001

縦軸: luciferase 活性 control で標準化

MBCD: 1%, Filipin: 5 μg/ml

6-3-6 人工膜マイクロドメインを用いた解析

最後に、Co-ARIS がマイクロドメインに対して物理化学的にどのような変化を起こしているのかを、AFM を用いることで観察した。これまで、人工膜上にマイクロドメインを作成し、その AFM 観察を行った研究より、マイクロドメインの中に GM1 がクラスターを形成することが知られており、また GM1 クラスターにはタンパク質が共局在する傾向があることが示されている (Yuan et al., 2002; Fujita et al., 2007; Iijima et al., 2009)。Co-ARIS 処理によって精子の ARIS 受容性が変化したことは、ARIS 受容体の存在状態が変化したことを意味しており、Co-ARIS が GM1 クラスターのようなタンパク質の集積部分の構造変化を起こした可能性が高い。従って、人工膜上において、この GM1 クラスターの構造に対する Co-ARIS の影響を調べることにした。

精子において Co-ARIS が活性を発揮するときの精子膜 sterol と Co-ARIS の存在量の比は Fig. 6-7B と Fig. 6-9 の結果より、sterol : Co-ARIS = 150 : 1 と算出される。この濃度の Co-ARIS を添加した人工膜を作成し、観察することとした。control の人工膜 POPC-cholesterol-sphingomyeline-GM1 (10:7:2:1) では、マイクロドメイン上に高さ 0.3 nm 程度で GM1 クラスターが見られ (Figs. 6-13A, C)、マイクロドメイン表面の $1.42 \pm 0.96\%$ (n=4) を占めていた (Figs. 6-14A, C)。一方で、Co-ARIS を添加した人工膜では、マイクロドメイン上に 0.7 nm 程度の高さの部分が現れ (Figs. 6-13B, D)、また、それらはマイクロドメイン表面の $11.6 \pm 7.01\%$ (n=5) を占めていた (Figs. 6-14B, D)。この結果は、Co-ARIS が GM1 クラスターを飲み込む形でクラスター形成をしていることを示唆している。10 倍量の Co-ARIS を添加した人工膜 (sterol : Co-ARIS = 15 : 1) では、より大きなクラスタ

ーが形成されており、その高さは最高 2.3 nm に達し、かなり多様であった (Figs. 6-15A, B)。クラスターはマイクロドメイン表面の $15.9 \pm 9.64\%$ ($n=10$) を占めており (Figs. 6-15C, D)、人工膜表面が激しい凹凸を持ち、Co-ARIS が細胞毒性を発揮する時の状態を表していると考えられる。

Co-ARIS がマイクロドメイン上にクラスターを形成することが明らかとなったが、GM1 クラスターとの相互関係はまだはっきりしていない。Co-ARIS が GM1 と共局在すること示すため、人工膜に対する CTx-binding assay を行った。その結果、Co-ARIS 処理によって人工膜と CTx との結合性が落ちることが判明した (Fig. 6-16A)。構造の異なる digitonin を作用させた場合には結合性の変化がないことから (Fig. 6-16B)、この効果は Co-ARIS 特異的と考えられ、さらに Langmuir プロットで解析したところ (Fig. 6-17)、Co-ARIS 添加によって人工膜と CTx の解離定数に変化はないものの、その結合サイト数が激減していることが明らかとなった。従って、Co-ARIS が膜表面において GM1 と相互作用することでマスクしていることが示唆された。これは、Figs. 6-10A~D の CTx-FITC を用いたイメージングの結果とも一致し、Co-ARIS は精子頭部先体胞周縁領域のマイクロドメインに特異的に侵入し、その GM1 クラスターと共局在することで構造変化を引き起こしていると考えられる。

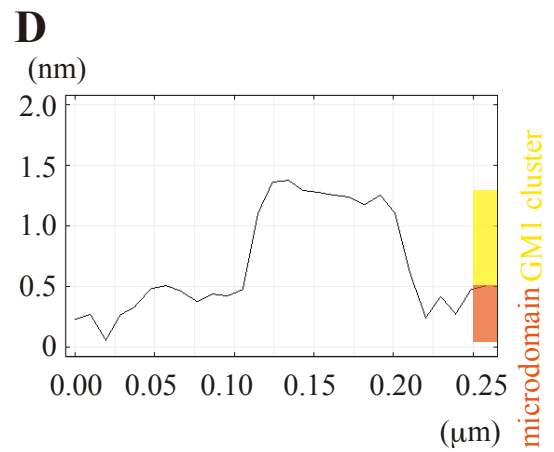
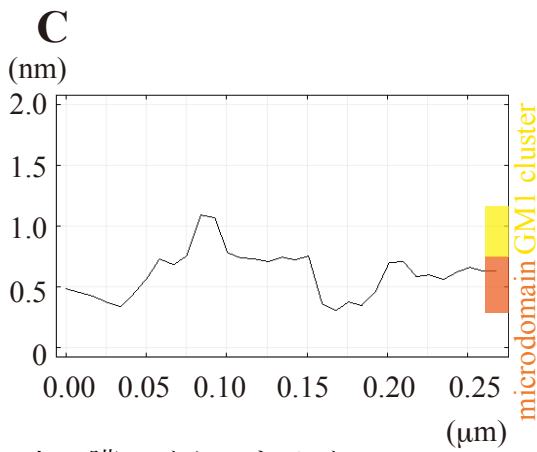
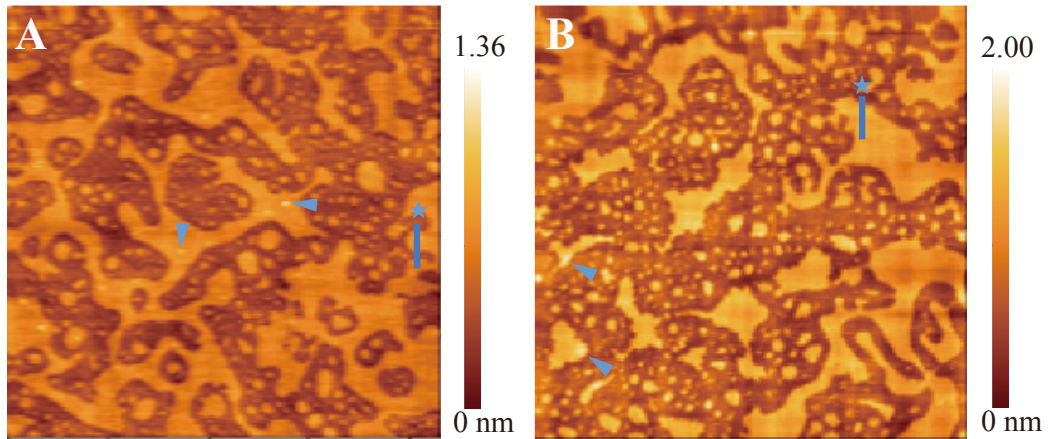


Fig.

6-13 人工膜マイクロドメイン

の観察結果

A, C. control B, D. Co-ARIS-cholesterol (1:150) C, D. それぞれ A, B の青線の断面 青星が左側

矢頭: GM1 クラスタ

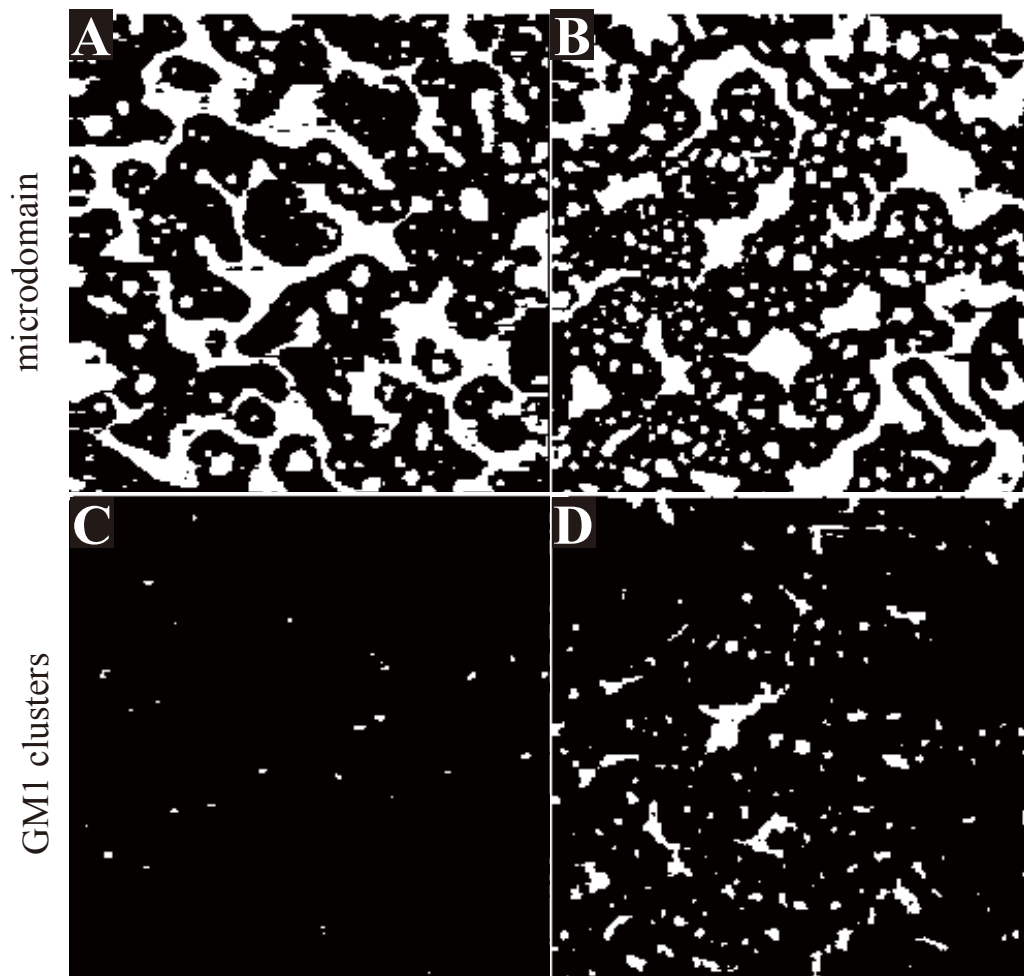


Fig. 6-14 マイクロドメインと GM1 の面積比較

A, C. control B, D. Co-ARIS-cholesterol (1:150) A, B. マイクロドメイン領域
C, D. GM1 クラスタ領域

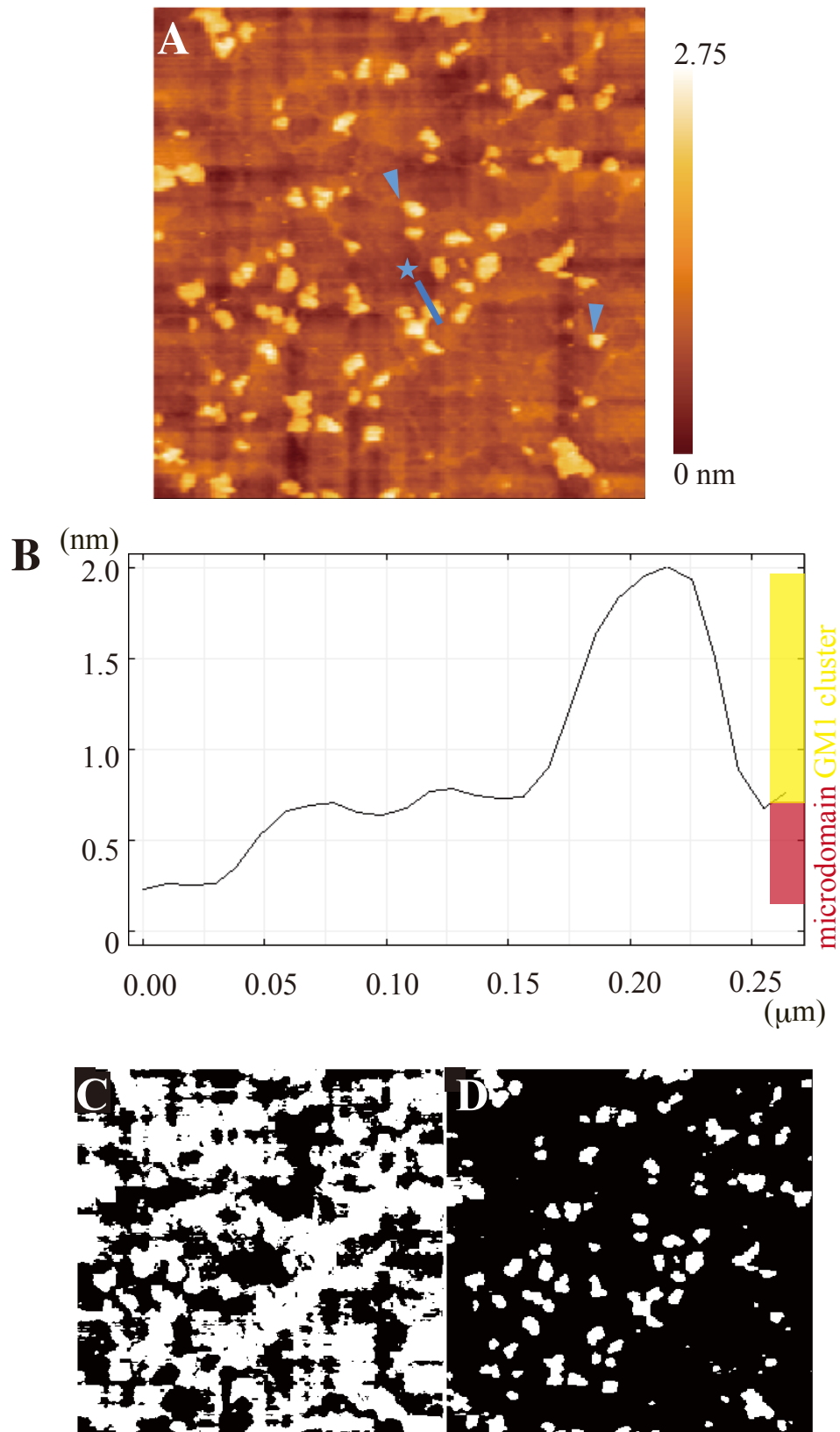


Fig. 6-15 Co-ARIS-cholesterol (1:15) の人工膜マイクロドメインの解析

A. AFM 画像 矢印: GM1 クラスター B. A の青線の断面 青星が左側 C, D, それぞれマイクロドメイン領域、GM1 クラスター領域

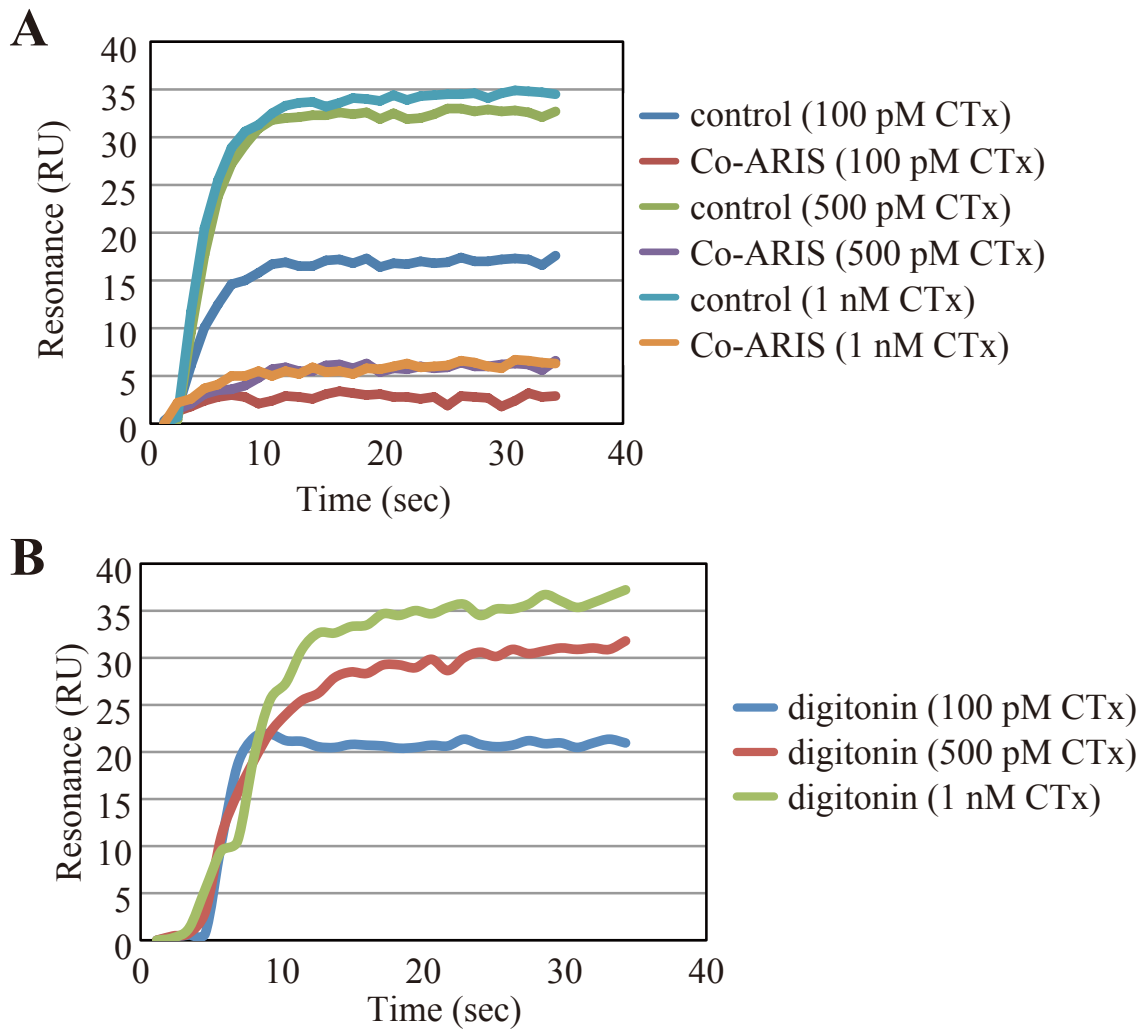


Fig. 6-16 SPR 実験結果

A. 人工膜と CTx の相互作用の Co-ARIS の有無での比較

B. digitonin 存在下での人工膜と CTx の相互作用

縦軸: Resonance per unit, 人工膜への結合量に比例

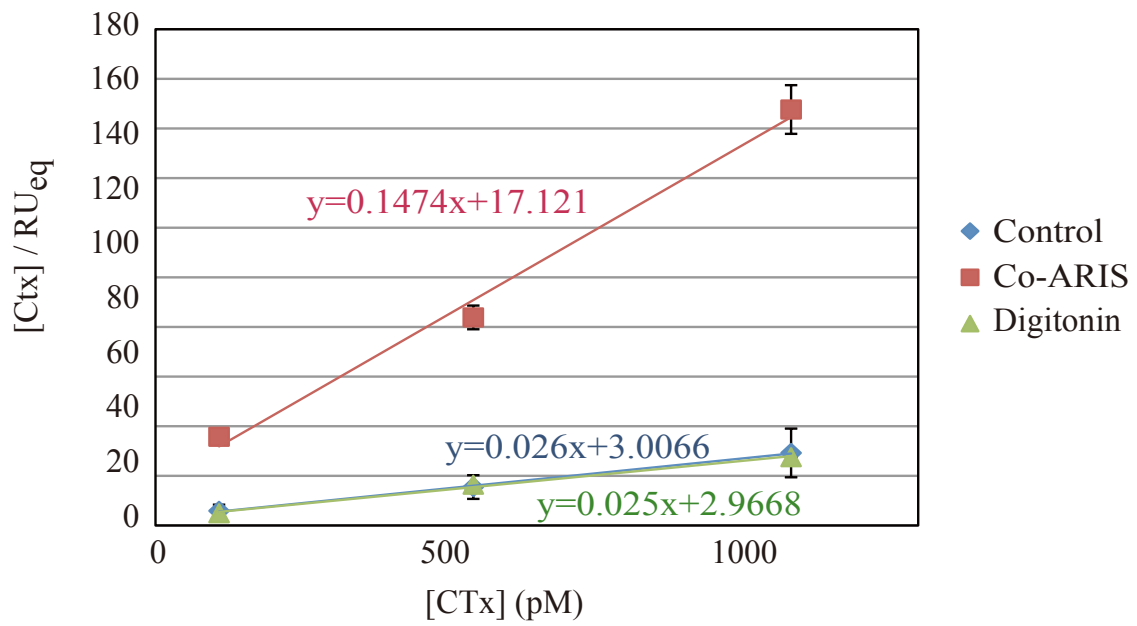


Fig. 6-17 SPR 実験結果の解析 Langmuir plot

縦軸: CTx 濃度/平衡状態の RU 横軸: CTx 濃度

n=3, bars: SD

Table 6-1 SPR 実験の解析結果まとめ

	control	Co-ARIS	digitonin
K_D (pM)	115.64	116.15	118.67
RU_{max} (pg/mm ²)	38.5	6.78	40.0
CTx-binding sites (/mm ²)	5.71×10^7	1.01×10^7	5.93×10^7

6-4 考察

本章において、今まで未知であった Co-ARIS の精子先体反応への作用機構が明らかになってきた。精子膜からの **cholesterol** の減少・放出は哺乳類の **capacitation** で重要な役割をしていることが知られており、マヒトデにおいても類似の機構であると予想した。しかしながら、**cholesterol** 量は変化しておらず、その状態が変化するという解析結果であり、Co-ARIS が精子膜マイクロドメインに侵入することで構造変化が起こり活性を發揮するということが示された。哺乳類の **capacitation** においても、**cholesterol** の放出から最終的にはマイクロドメインの構造変化へと進むことを考えると、**capacitation** とマヒトデにおける Co-ARIS の作用は、開始機構は異なるものの最終的な変化は同じであることが示唆される。GM1 の局在変化という意味でも共通点が見られ、GM1 の精子先体胞周縁領域への局在が、やはりマウスやハムスターの **capacitation** の際にも消失すること、また **capacitation** 状態になることを防ぐプロセスである **decapacitation** においても重要であることが報告されている (Selvaraj et al., 2007; Kawano et al., 2008)。両生類の *Bufo arenarum* の精子でも、やはり **capacitation** 様の膜構造変化が知られ (Krapf et al., 2007)、精子先体反応過程、及びその予備段階における精子膜構造の変化は動物界において広い現象である可能性が示唆された。

CTx-binding assay の結果から、Co-ARIS は 83%もの CTx 結合サイトをブロックしていることが示された。ここから、1分子の Co-ARIS が 17分子の GM1 に影響を与えていることが算出され、Co-ARIS が **cholesterol** と非常に密接な距離にいることが示唆された。Co-ARIS の親水部は糖鎖であるために GM1 と相互作用が期待され、また疎水部はステロイド骨格であるために **cholesterol** と相互作用

できると考えられる。親水部の相互作用は GM3 のような糖鎖でも同様に起こると考えられ、マイクロドメイン上の種々の糖脂質クラスターに影響を与えうる。様々な膜組成の人工膜に Co-ARIS を添加して AFM 観察を行うことで、Co-ARIS の相互作用機構のより明確な議論できると考える。

第 5 章において、ARIS 受容体候補分子は精子マイクロドメイン画分に含まれていることが明らかになった。また、先行研究で ARIS 受容体が精子頭部の先体胞周縁領域に局在することが示唆されていた (Longo et al., 1995)。従って、精子頭部先体胞周縁領域にマイクロドメインの一種が存在していることが示唆される。Fig. 6-10 において、FITC-CTx を用いた染色観察結果もやはり精子頭部先体胞周縁領域に GM1 に富むマイクロドメインが存在することを示しており、2つのアプローチが繋がったといえる。同時に、ARIS と Co-ARIS とが精子頭部先体胞周縁領域の細胞膜マイクロドメインにおいて協同的に働くことが明らかになった。ARIS 受容体はマイクロドメイン上の糖脂質クラスターに局在すると推測され、Co-ARIS のマイクロドメインへの侵入によって糖脂質クラスター同士間の移動が活発化され、ARIS 受容体同士またはその標的分子との会合頻度が上がることで、先体反応が起こりやすい状況ができるという仮説が考えられる (Fig. 6-18)。ARIS 受容体を同定し、そのマイクロドメイン上での詳細な局在を解析することで検証が可能となると考えられる。

サポニン近年、その強い生理活性から注目されている。例えば、ユリ科植物由来サポニン・トマト由来サポニンの抗腫瘍活性、人参サポニンの血管拡張作用、ナマコサポニンの細胞接着阻害などというような生理活性が研究されている (Mimaki et al. 1996; Kuroda et al. 2001; Ito et al., 2007)。しかしながら、自然

界での真の意味でのサポニンの作用というものはあまり知られていない。サポニンの多くは植物由来として精製されてくるが、ある程度の細胞毒性を示すことからもともとは抗菌物質・毒物として働いているものと考えられる。よって植物は自分達へとサポニンを分泌するわけではなく、外敵に対しての防御として分泌していることが推測される。これは動物由来のサポニンにもいえ、海綿で報告があるように (Kubaneck et al., 2002)、Co-ARIS ももともとは自分の身をを守るためのものであったと思われる。それが、進化の過程でマヒトデにおいては先体反応誘起補因子としての役割を獲得し、この位置におさまったと考えられる。本来毒性を示すサポニンを自分達のために分泌するというこの異例のサポニンの用途が何故起こりえるのかを考える上で、ヒトデ類の細胞ステロールが他の生物種と異なるという事実が重要である。ヒトなど多くの生物は Δ -5 の cholesterol (Fig. 6-5A) を持っているのに対してヒトデでは Δ -7 の sterol (Fig. 6-5B) を持っており、マヒトデからも Δ -7 の sterol として asterosterol (Fig. 6-19A) と amuresterol (Fig. 6-19B) が発見されている (Ikekawa, 1979)。 Δ -7 sterol は、棘皮動物門の中でもサポニンを分泌するヒトデ・ナマコにおいてのみこの見られ、進化的にこの2つの間に位置するウニでは見られない (Ikekawa, 1979)。このことは、この構造の違いがサポニンの細胞毒性に対する耐性となっている可能性を示唆しており、外敵からの防御のために分泌するサポニンによって自分が傷害を受けないために獲得した形質であると考えられる。Caveora breaking assay では CHO-K1 細胞のマイクロドメインが破壊されるという結果であり、マイクロドメインの破壊ということはマヒトデ精子における先体反応誘起という作用と相反するように思われる。しかしながら、マヒトデ精子がサポニンに対しての

耐性を持っていると仮定すると、Co-ARIS は Δ -7 sterol を持つヒトデ精子ではマイクロドメインの破壊には至らず、特異的な状態を作っている可能性がある。ステロールの構造の違いによるサポニンとの相互作用の変化という意味で興味深い。

Co-ARIS は Asterosaponin A (ASA) とも呼ばれ、マヒトデにおいて放卵抑制作用を持つことが知られている (Ikegami 1976)。マヒトデにおける放卵は、神経から分泌された生殖腺刺激ホルモン GSS (Gonad-stimulating substance) が卵を囲む濾胞細胞へ 1-methyladenine (1-MA) の分泌を促し、その 1-MA が卵巣膜の収縮を誘導することによって起こる (Kanatani et al., 1973)。1-MA は同時に卵成熟因子としても働くが、ASA は放卵のみを抑制して卵成熟は抑制しないことを考えると (Ikegami et al., 1976)、ASA は 1-MA の卵巣への働きを抑制していると考えられる。この抑制効果も他の界面活性剤やナマコサポニンでは得られないことから Co-ARIS (ASA) 特異的な生理活性によると考えられ、精子膜におけるものと類似なことが卵巣で起こっていると予想される。他にも濾胞細胞の自発的な 1-MA 分泌を ASA は抑制することも知られていることを考えると (Ikegami et al., 1976)、卵巣や精子だけではなくマヒトデの細胞は全般的にこの Co-ARIS (ASA) に対する感受性を持っている可能性は高い。興味深いことに属の異なるイトマキヒトデにおける放卵抑制因子は L-グルタミン酸であり、Co-ARIS (ASA) は放卵抑制効果を持たない。これはイトマキヒトデ精子に Co-ARIS が補因子として働かないことと一致し、Co-ARIS に対する感受性はマヒトデ近縁種に限られた特異的なものと考えられる。

一般のサポニン群がどのようなメカニズムで生体膜に対して効果を発揮する

のかはほとんど解明されておらず、今回用いた Caveora breaking assay や AFM を用いた観察を行うことで、これから様々な事実が明らかになることが期待される。

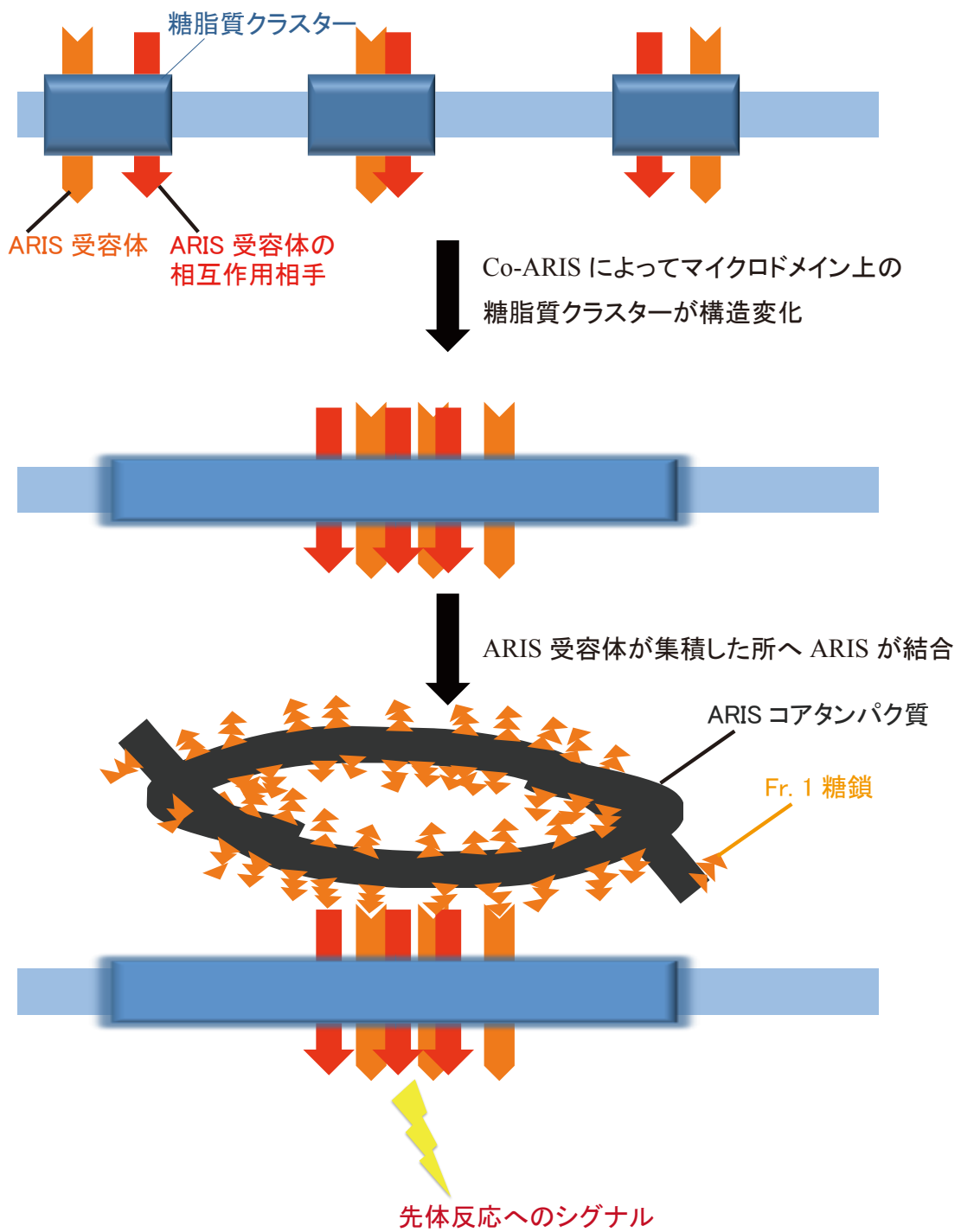


Fig. 6-18 ARIS と Co-ARIS によるマイクロドメイン上の作用モデル

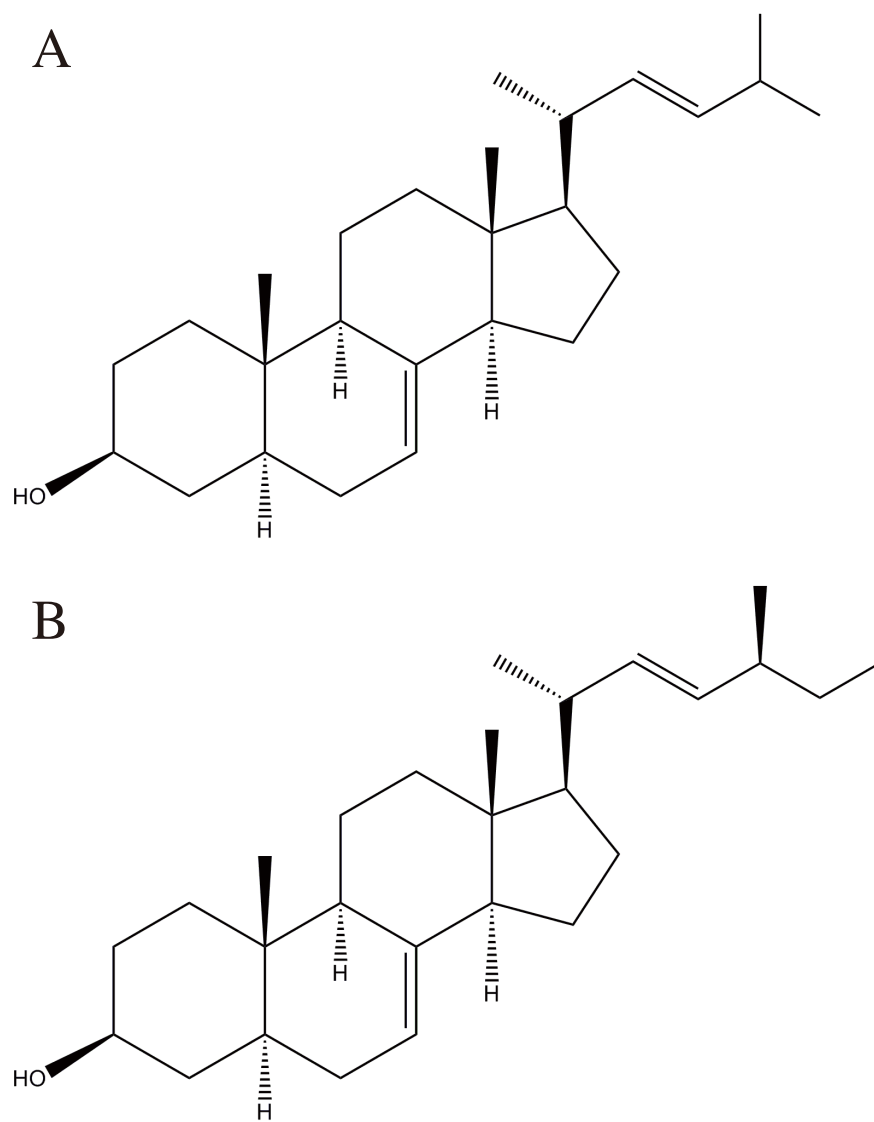


Fig. 6-19 マヒトデ由来 Δ -7 sterol の化学構造

A. asterosterol

B. amuresterol

第7章 総括

第2章～第3章において ARIS の構成物質と構造を解明し、第4章では卵外被構造の進化を解析した。一方、第5章ではその受容体となる分子を探索し、第6章では精子による ARIS の認識の場となるマイクロドメイン構造を解析し、精子側の受容機構に関する議論を行った。各論はそれぞれ、前半は第4章、後半は第6章の考察にて十分に述べたので、ここでは触れない。

全体を通して、受精機構の動物界における共通性が見られた。先体反応誘起物質として発見した ARIS は無脊椎動物で広く保存された分子であり、また精子膜マイクロドメインのダイナミクスもマヒトデと哺乳類で類似するものであった。新たな個体を産み出す発生という現象の最初の段階である受精は、確実性が求められる現象であり、頑健なメカニズムが保存されて存在しているべきでもある。特に先体反応は卵外被に到着したタイミングで、かつ種特異的に誘起されなければならないため、正確な認識と迅速な反応が必要である。本論文では触れなかったが、精子先体反応の精子内部のシグナル伝達系は無籍類動物から哺乳類まで高度に保存されている。シグナルの入力の部分にだけ、種の認識のための多様性が存在し、シグナルの入力が異なるもののその後の経路・帰着先が同じであるという仮説が、本研究で明らかにした ARIS の無脊椎動物における保存性、及び精子膜マイクロドメインの構造変化のマヒトデと哺乳類の共通性によって強く支持されると考えられる (Fig. 7-1, 7-2)。まさに生物の単系統性と多様性の現れではないか。

本研究で扱った先体反応は、新規コアタンパク質の形作るプロテオグリカン構造・マイクロドメインのダイナミックな構造変化・ステロイドサポニンの生理活性といった生化学的に興味深いトピックを含んでおり、ARIS 受容体などの更なる解析によって、今後得られる知見は生化学の分野を大きく広げることとなることが期待される。また、受精は **Sexual conflict** を最も強く受ける場であり、受精に関わる分子には高い淘汰圧がかかることが知られている。ARIS とその受容体の分子進化はこの **Sexual conflict** を大きく反映していると考えられ、種分化についての解析が興味深い。有櫛動物など、系統的位置がはっきりしない生物群の解析にも役立つと予想され、ARIS が進化学的な指標となることも期待される。

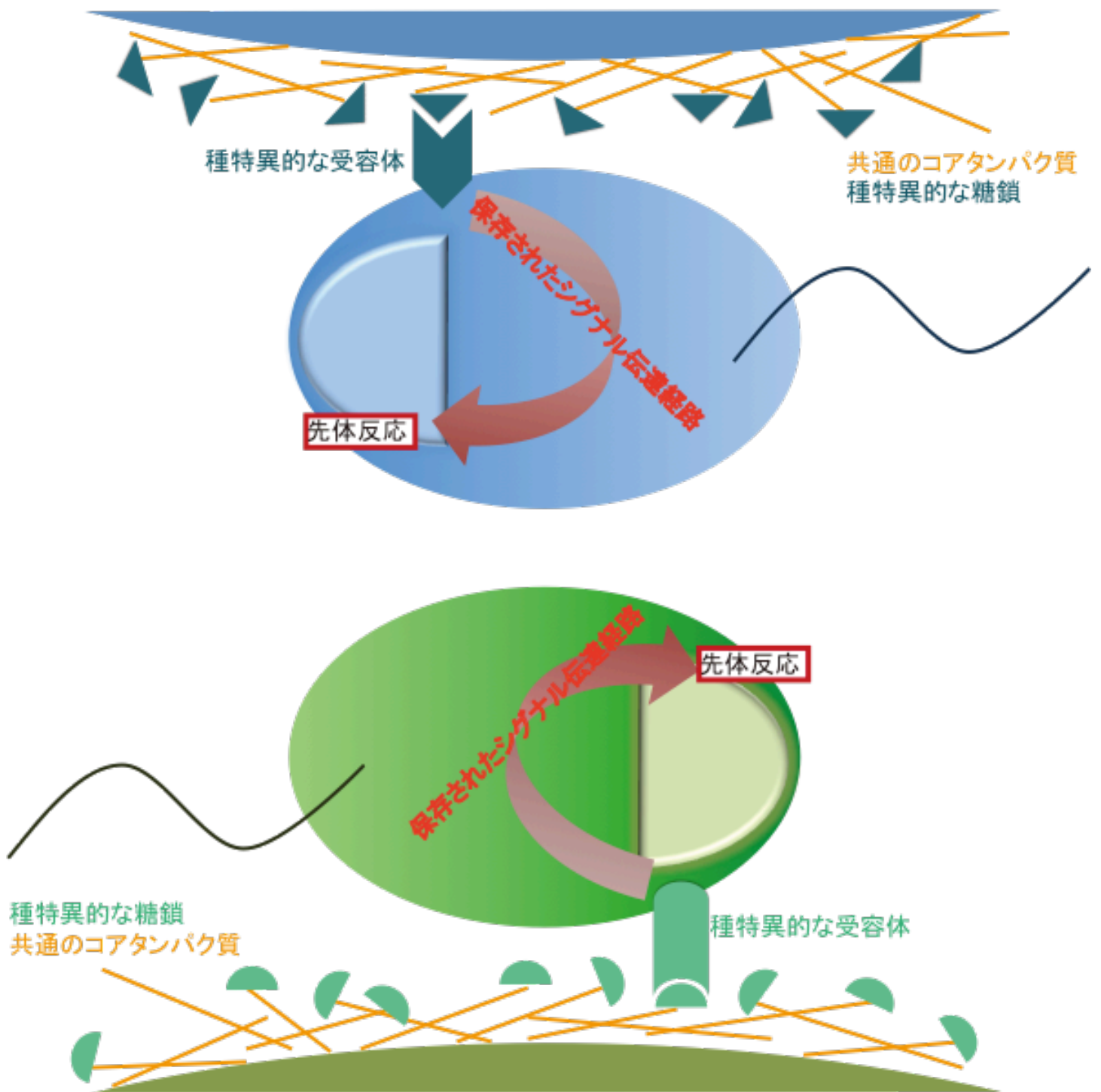


Fig. 7-1 受精の共通性と多様性

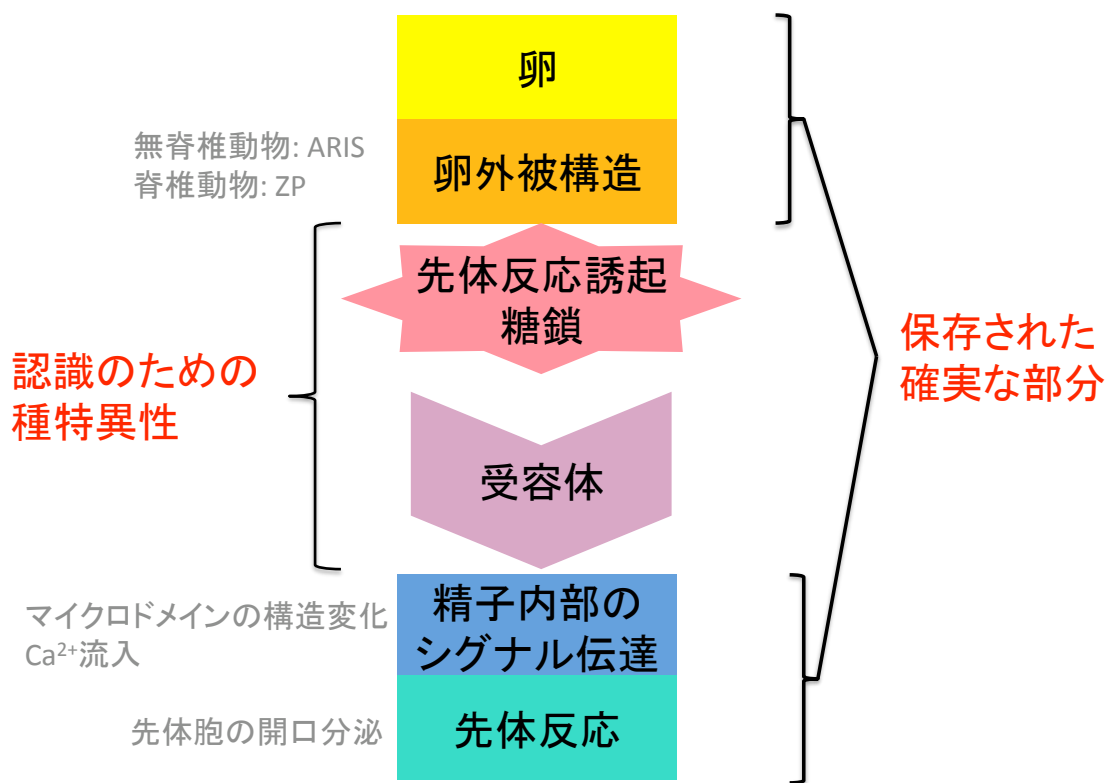


Fig. 7-2 共通性の中の多様化 模式図

参考文献

- Baibakov, B., Gauthier, L., Talbot, P., Rankin, T. L. and Dean, J.** (2007). Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. *Development* **134**, 933-43.
- Baker, M. A., Reeves, G., Hetherington, L. and Aitken, R. J.** (2010). Analysis of proteomic changes associated with sperm capacitation through the combined use of IPG-strip pre-fractionation followed by RP chromatography LC-MS/MS analysis. *Proteomics* **10**, 482-95.
- Bleil, J. D. and Wassarman, P. M.** (1980). Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* **20**, 873-82.
- Bleil, J. D. and Wassarman, P. M.** (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol* **95**, 317-24.
- Bleil, J. D. and Wassarman, P. M.** (1988). Galactose at the nonreducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6778-82.
- Bonnell, B. S., Keller, S. H., Vacquier, V. D. and Chandler, D. E.** (1994). The sea urchin egg jelly coat consists of globular glycoproteins bound to a fibrous fucan superstructure. *Dev Biol* **162**, 313-24.
- Castanho M. A. R. B., Coutinho A. and Prieto M. J. E.** (1999). Absorption and fluorescence spectra of polyene antibiotics in the presence of cholesterol. *J Biol Chem* **267**, 204-9
- Cheng, Y. M., Hong, T. Y., Liu, C. C. and Meng, M.** (2009). Cloning and functional characterization of a complex endo-beta-1,3-glucanase from *Paenibacillus* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**, 1051-61.

Cherr, G. N. and Clark, W. H., Jr. (1985). An egg envelope component induces the acrosome reaction in sturgeon sperm. *J Exp Zool* **234**, 75-85.

Colwin, A. L. and Colwin, L. H. (1963). Role of the Gamete Membranes in Fertilization in *Saccoglossus Kowalevskii* (Enteropneusta). I. The Acrosomal Region and Its Changes in Early Stages of Fertilization. *J Cell Biol* **19**, 477-500.

Crimmins, D. L., Mische, S. M. and Denslow, N. D. (2005). Chemical cleavage of proteins in solution. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 11**, Unit 11 4.

Cross, N. L. (2003). Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. *Biol Reprod* **69**, 529-34.

Donate, L. E., Gherardi, E., Srinivasan, N., Sowdhamini, R., Aparicio, S. and Blundell, T. L. (1994). Molecular evolution and domain structure of plasminogen-related growth factors (HGF/SF and HGF1/MSP). *Protein Sci* **3**, 2378-94.

Flesch, F. M., Brouwers, J. F., Nievelstein, P. F., Verkleij, A. J., van Golde, L. M., Colenbrander, B. and Gadella, B. M. (2001). Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci* **114**, 3543-55.

Florman, H. M. and Wassarman, P. M. (1985). O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* **41**, 313-24.

Franzen, A. (1956). On spermiogenesis, morphology of the spermatozoon, and biology of fertilization among invertebrates. *Zool. Bidrag. Uppsala* **31**, 355-488.

Fujimoto, Y., Yamada, T., Ikekawa, N., Nishiyama, I., Matsui, T. and Hoshi, M. (1987). Structure of acrosome reaction-inducing steroidal saponins from the egg jelly of the starfish, *Asterias amurensis*. *Chem Pharm Bull* **35**, 1829-32.

Fujita (1984). Filipin. *Seitai-no-kagaku* **35**, 495-6

- Fujita, A., Cheng, J., Hirakawa, M., Furukawa, K., Kusunoki, S. and Fujimoto, T.** (2007). Gangliosides GM1 and GM3 in the living cell membrane form clusters susceptible to cholesterol depletion and chilling. *Mol Biol Cell* **18**, 2112-22.
- Gadella, B. M., Tsai, P. S., Boerke, A. and Brewis, I. A.** (2008). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int J Dev Biol* **52**, 473-80.
- Gahlay, G., Gauthier, L., Baibakov, B., Epifano, O. and Dean, J.** Gamete recognition in mice depends on the cleavage status of an egg's zona pellucida protein. *Science* **329**, 216-9.
- Gong, X., Dubois, D. H., Miller, D. J. and Shur, B. D.** (1995). Activation of a G protein complex by aggregation of beta-1,4-galactosyltransferase on the surface of sperm. *Science* **269**, 1718-21.
- Greve, J. M. and Wassarman, P. M.** (1985). Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J Mol Biol* **181**, 253-64.
- Harada, Y., Takagaki, Y., Sunagawa, M., Saito, T., Yamada, L., Taniguchi, H., Shoguchi, E. and Sawada, H.** (2008). Mechanism of self-sterility in a hermaphroditic chordate. *Science* **320**, 548-50.
- Harlow, E. and Lane, D.** (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hirohashi, N., Kamei, N., Kubo, H., Sawada, H., Matsumoto, M. and Hoshi, M.** (2008). Egg and sperm recognition systems during fertilization. *Dev Growth Differ* **50 Suppl 1**, S221-38.
- Hirohashi, N., Vilela-Silva, A. C., Mourao, P. A. and Vacquier, V. D.** (2002). Structural requirements for species-specific induction of the sperm acrosome reaction by sea urchin egg sulfated fucan. *Biochem Biophys Res Commun* **298**, 403-7.

- Holland, L. Z., Gorsky, G., Fenaux, R.** (1988). Fertilization in *Oikopleura dioica* (Tunicata, Appendicularia): Acrosome reaction, cortical reaction and sperm-egg fusion. *Zoomorphology* **108**, 229-243.
- Hoshi, M., Nishigaki, T., Ushiyama, A., Okinaga, T., Chiba, K. and Matsumoto, M.** (1994). Egg-jelly signal molecules for triggering the acrosome reaction in starfish spermatozoa. *Int J Dev Biol* **38**, 167-74.
- Iijima, K., Soga, N., Matsubara, T. and Sato, T.** (2009). Observations of the distribution of GM3 in membrane microdomains by atomic force microscopy. *J Colloid Interface Sci* **337**, 369-74.
- Ikadai, H. and Hoshi, M.** (1981). Biochemical studies on the acrosome reaction of the starfish, *Asterias amurensis*. *Dev Growth Differ* **23**, 73-80.
- Ikegami, S.** (1976). Role of asterosaponin A in starfish spawning induced by gonad-stimulating substance and 1-methyladenine. *J Exp Zool* **198**, 359-66.
- Ikegami, S., Kamiya, Y. and Shirai, H.** (1976). Characterization and action of meiotic maturation inhibitors in starfish ovary. *Exp Cell Res* **103**, 233-9.
- Ikekawa, N.** (1979). Steroid and Terpenoid from marine organisms. *Kagaku Sousetsu* **25**, 157-200.
- Ikekawa, N., Yamada, S., Kurosawa, E. and Kitagawa, I.** (1979). Steroids and Terpenoids in marine organisms. *Kagakusousetsu* **25**, 157-200.
- Ito, S., Ihara, T., Tamura, H., Tanaka, S., Ikeda, T., Kajihara, H., Dissanayake, C., Abdel-Motaal, F. F. and El-Sayed, M. A.** (2007). alpha-Tomatine, the major saponin in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. *FEBS Lett* **581**, 3217-22.

- Jenny, R. J., Pittman, D. D., Toole, J. J., Kriz, R. W., Aldape, R. A., Hewick, R. M., Kaufman, R. J. and Mann, K. G.** (1987). Complete cDNA and derived amino acid sequence of human factor V. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 4846-50.
- Kanatani, H.** (1973). Maturation-inducing substance in starfishes. *Int Rev Cytol* **35**, 253-298.
- Kawano, N., Yoshida, K., Iwamoto, T. and Yoshida, M.** (2008). Ganglioside GM1 mediates decapacitation effects of SVS2 on murine spermatozoa. *Biol Reprod* **79**, 1153-9.
- Keller, S. H. and Vacquier, V. D.** (1994). The isolation of acrosome-reaction-inducing glycoproteins from sea urchin egg jelly. *Dev Biol* **162**, 304-12.
- Kille, R. A.** (1960). Fertilization of the lamprey egg. *Exp Cell Res* **20**, 12-27.
- Koyota, S., Wimalasiri, K. M. and Hoshi, M.** (1997). Structure of the main saccharide chain in the acrosome reaction-inducing substance of the starfish, *Asterias amurensis*. *J Biol Chem* **272**, 10372-6.
- Krapf, D., Visconti, P. E., Arranz, S. E. and Cabada, M. O.** (2007). Egg water from the amphibian *Bufo arenarum* induces capacitation-like changes in homologous spermatozoa. *Dev Biol* **306**, 516-24.
- Kubaneck, J., Whalen, K., Engel, S., Kelly, S., Henkel, T., Fenical, W. and Pawlik, J.** (2002). Multiple defensive roles for triterpene glycosides from two caribbean sponges. *Oecologia* **131**, 125-136.
- Kuroda, M., Mimaki, Y., Hasegawa, F., Yokosuka, A., Sashida, Y. and Sakagami, H.** (2001). Steroidal glycosides from the bulbs of *Camassia leichtlinii* and their cytotoxic activities. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **49**, 726-31.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.

- Lee, Y. C.** (1978). Synthesis of some cluster glycosides suitable for attachment to proteins of solid matrices. *Carbohydrate Research* **67**, 509-14.
- Longo, F. J., Ushiyama, A., Chiba, K. and Hoshi, M.** (1995). Ultrastructural localization of acrosome reaction-inducing substance (ARIS) on sperm of the starfish *Asterias amurensis*. *Mol Reprod Dev* **41**, 91-9.
- Lu, Q. and Shur, B. D.** (1997). Sperm from beta 1,4-galactosyltransferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reactions and penetrate the zona pellucida poorly. *Development* **124**, 4121-31.
- Matsui, T., Nishiyama, I., Hino, A. and Hoshi, M.** (1986). Induction of the Acrosome Reaction in Starfish. *Dev Growth Differ* **28**, 339-348.
- Matsumoto, M., Kawase, O., Islam, M. S., Naruse, M., Watanabe, S. N., Ishikawa, R. and Hoshi, M.** (2008). Regulation of the starfish sperm acrosome reaction by cGMP, pH, cAMP and Ca²⁺. *Int J Dev Biol* **52**, 523-6.
- Mengerink, K. J., Moy, G. W. and Vacquier, V. D.** (2002). suREJ3, a polycystin-1 protein, is cleaved at the GPS domain and localizes to the acrosomal region of sea urchin sperm. *J Biol Chem* **277**, 943-8.
- Mimaki, Y., Takaashi, Y., Kuroda, M., Sashida, Y. and Nikaido, T.** (1996). Steroidal saponins from *Nolina recurvata* stems and their inhibitory activity on cyclic AMP phosphodiesterase. *Phytochemistry* **42**, 1609-15.
- Monne, M., Han, L., Schwend, T., Burendahl, S. and Jovine, L.** (2008). Crystal structure of the ZP-N domain of ZP3 reveals the core fold of animal egg coats. *Nature* **456**, 653-7.
- Morisawa, S.** (1999). Acrosome reaction in spermatozoa of the hagfish *Eptatretus burgeri* (Agnatha). *Dev Growth Differ* **41**, 109-12.

- Morisawa, S. and Cherr, G. N.** (2002). Acrosome reaction in spermatozoa from hagfish (Agnatha) *Eptatretus burgeri* and *Eptatretus stouti*: acrosomal exocytosis and identification of filamentous actin. *Dev Growth Differ* **44**, 337-44.
- Morisawa, S., Mizuta, T., Kubokawa, K., Tanaka, H. and Morisawa, M.** (2004). Acrosome reaction in spermatozoa from the amphioxus *Branchiostoma belcheri* (Cephalochordata, Chordata). *Zoolog Sci* **21**, 1079-84.
- Moy, G. W., Mendoza, L. M., Schulz, J. R., Swanson, W. J., Glabe, C. G. and Vacquier, V. D.** (1996). The sea urchin sperm receptor for egg jelly is a modular protein with extensive homology to the human polycystic kidney disease protein, PKD1. *J Cell Biol* **133**, 809-17.
- Muramatsu, T.** (1965). A Sulphated Mucopolysaccharide from the Jelly Coat of Starfish Eggs. *J Biochem* **57**, 223-5.
- Nakachi, M.** (2008). Study on species-specificity of fertilization in starfish. 慶應義塾大学大学院理工学研究科 博士論文.
- Nakachi, M., Moriyama, H., Hoshi, M. and Matsumoto, M.** (2006). Acrosome reaction is subfamily specific in sea star fertilization. *Dev Biol* **298**, 597-604.
- Neill, A. T., Moy, G. W. and Vacquier, V. D.** (2004). Polycystin-2 associates with the polycystin-1 homolog, suREJ3, and localizes to the acrosomal region of sea urchin spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **67**, 472-7.
- Nishigaki, T., Chiba, K. and Hoshi, M.** (2000). A 130-kDa membrane protein of sperm flagella is the receptor for asterosaps, sperm-activating peptides of starfish *Asterias amurensis*. *Dev Biol* **219**, 154-62.
- Nishigaki, T., Chiba, K., Miki, W. and Hoshi, M.** (1996). Structure and function of asterosaps, sperm-activating peptides from the jelly coat of starfish eggs. *Zygote* **4**, 237-45.

Nishiyama, I., Matsui, T., Fujimoto, Y., Ikekawa, N. and Hoshi, M. (1987). Correlation between the molecular structure and the biological activity of Co-ARIS, a cofactor for acrosome reaction-inducing substance. *Develop Growth and Differ* **29**, 171-6.

Nishiyama, I., Matsui, T. and Hoshi, M. (1987). Purification of Co-ARIS, a cofactor for acrosome reaction-inducing substance, from the egg jelly of starfish. *Develop Growth and Differ* **29**, 161-9.

Onitake, K., Takai, H., Ukita, M., Mizuno, J. I., Sasaki, T. and Watanabe, A. (2000). Significance of egg-jelly substances in the internal fertilization of the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **126**, 121-8.

Ohtsuki, I. (1984). Saponin. *Seitai-no-Kagaku* **35**, 493-4.

Patthy, L., Trexler, M., Vali, Z., Banyai, L. and Varadi, A. (1984). Kringles: modules specialized for protein binding. Homology of the gelatin-binding region of fibronectin with the kringle structures of proteases. *FEBS Lett* **171**, 131-6.

Podell, S. B. and Vacquier, V. D. (1985). Purification of the Mr 80,000 and Mr 210,000 proteins of the sea urchin sperm plasma membrane. Evidence that the Mr 210,000 protein interacts with egg jelly. *J Biol Chem* **260**, 2715-8.

Pratt, K. P., Shen, B. W., Takeshima, K., Davie, E. W., Fujikawa, K. and Stoddard, B. L. (1999). Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. *Nature* **402**, 439-42.

Psenicka, M., Rodina, M. and Linhart, O. (2009). Ultrastructural study on the fertilisation process in sturgeon (*Acipenser*), function of acrosome and prevention of polyspermy. *Anim Reprod Sci* **117**, 147-54.

SeGall, G. K. and Lennarz, W. J. (1979). Chemical characterization of the component of the jelly coat from sea urchin eggs responsible for induction of the acrosome reaction. *Dev Biol* **71**, 33-48.

Selvaraj, V., Buttke, D. E., Asano, A., McElwee, J. L., Wolff, C. A., Nelson, J. L., Klaus, A. V., Hunnicutt, G. R. and Travis, A. J. (2007). GM1 dynamics as a marker for membrane changes associated with the process of capacitation in murine and bovine spermatozoa. *J Androl* **28**, 588-99.

Severs N. J. and Robenek H. (1983) Detection of recent development in freeze-fracture cytochemistry. *Biochem Biophys Acta* **737**, 373-408.

Shur, B. D. and Hall, N. G. (1982). A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida. *J Cell Biol* **95**, 574-9.

Simons, K. and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-72.

Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-31.

Sleight, S. B., Miranda, P. V., Plaskett, N. W., Maier, B., Lysiak, J., Scrable, H., Herr, J. C. and Visconti, P. E. (2005). Isolation and proteomic analysis of mouse sperm detergent-resistant membrane fractions: evidence for dissociation of lipid rafts during capacitation. *Biol Reprod* **73**, 721-9.

Tanphaichitr, N., Carmona, E., Bou Khalil, M., Xu, H., Berger, T. and Gerton, G. L. (2007). New insights into sperm-zona pellucida interaction: involvement of sperm lipid rafts. *Front Biosci* **12**, 1748-66.

Tesarik, J. and Flechon, J. E. (1986). Distribution of sterols and anionic lipids in human sperm plasma membrane: effects of in vitro capacitation. *J Ultrastruct Mol Struct Res* **97**, 227-37.

Toole, J. J., Knopf, J. L., Wozney, J. M., Sultzman, L. A., Buecker, J. L., Pittman, D. D., Kaufman, R. J., Brown, E., Shoemaker, C., Orr, E. C. et al. (1984). Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor. *Nature* **312**, 342-7.

- Trevino, C. L., Serrano, C. J., Beltran, C., Felix, R. and Darszon, A.** (2001). Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm. *FEBS Lett* **509**, 119-25.
- Ueda, Y., Yoshizaki, N. and Iwao, Y.** (2002). Acrosome reaction in sperm of the frog, *Xenopus laevis*: its detection and induction by oviductal pars recta secretion. *Dev Biol* **243**, 55-64.
- Ushiyama, A., Araki, T., Chiba, K. and Hoshi, M.** (1993). Specific binding of acrosome-reaction-inducing substance to the head of starfish spermatozoa. *Zygote* **1**, 121-7.
- Vilela-Silva, A. C., Castro, M. O., Valente, A. P., Biermann, C. H. and Mourao, P. A.** (2002). Sulfated fucans from the egg jellies of the closely related sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis* and *Strongylocentrotus pallidus* ensure species-specific fertilization. *J Biol Chem* **277**, 379-87.
- Visconti, P. E., Ning, X., Fornes, M. W., Alvarez, J. G., Stein, P., Connors, S. A. and Kopf, G. S.** (1999). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* **214**, 429-43.
- Wassarman, P. M.** (1988). Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem* **57**, 415-42.
- Williams, S. A., Xia, L., Cummings, R. D., McEver, R. P. and Stanley, P.** (2007). Fertilization in mouse does not require terminal galactose or N-acetylglucosamine on the zona pellucida glycans. *J Cell Sci* **120**, 1341-9.
- Wong, J. L. and Wessel, G. M.** (2005). Defending the Zygote: Search for the Ancestral Animal Block to Polyspermy. *Current Topics in Developmental Biology* **72**, 1-151.
- Yamashita, M.** (1983). Electron microscopic observations during monospermic fertilization process of the brittle-star *Amphipholis kochii* Luetken. *J Exp Zool* **228**, 109-120.

Yokota, N. and Sawada, H. (2007). Sperm proteasomes are responsible for the acrosome reaction and sperm penetration of the vitelline envelope during fertilization of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Dev Biol* **308**, 222-31.

Young, C., Grasa, P., Coward, K., Davis, L. C. and Parrington, J. (2009). Phospholipase C zeta undergoes dynamic changes in its pattern of localization in sperm during capacitation and the acrosome reaction. *Fertil Steril* **91**, 2230-42.

Yuan, C., Furlong, J., Burgos, P. and Johnston, L. J. (2002). The size of lipid rafts: an atomic force microscopy study of ganglioside GM1 domains in sphingomyelin/DOPC/cholesterol membranes. *Biophys J* **82**, 2526-35.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始御指導・御高配を賜りました慶應義塾大学理工学部准教授 松本緑博士に謹んで感謝の意を表します。

また、卒業論文の指導教官であり、また Supervisor として研究に助言を下された元・慶應義塾大学理工学部教授 星元紀博士にも深く感謝いたします。

第6章 Co-ARIS に関する研究は、元・慶應義塾大学理工学部教授 柳川弘志博士、慶應義塾大学理工学部教授 佐藤智典博士、慶應義塾大学理工学部専任講師 松原輝彦博士、協和発酵キリンバイオ生産技術研究所研究員 末友裕行氏との共同研究であり、研究遂行に際して各々方の専門的見地からの厳しいご助言を頂きましたことに感謝致します。また、本研究の一部は石川里歩氏、松鹿弥生氏、昌谷洋氏、大野陽平氏と共同で行った実験であり、深く感謝致します。

実験動物の入手に関し、御尽力頂きました東北大学大学院生命科学研究所付属浅虫海洋生物学研究センター、東京大学大気海洋研究所国際沿岸海洋研究センター、お茶の水女子大学湾岸生物教育研究センター、東京大学大学院理学系研究科付属三崎臨海実験所、筑波大学下田臨海実験センター、名古屋大学大学院理学研究科付属菅島臨海実験所、岡山大学理学部付属牛窓臨海実験所、タスマニア島 Marine Solutions の関係者の皆様に感謝致します。特に、マナマコの卵ゼリーを頂いた、三崎臨海実験所元所長・東京大学名誉教授、森澤正昭博士は第4章の考察に至るきっかけも頂き、厚く感謝致します。

実験材料・技術に関しましては、金コロイド粒子の作成に際してご助言下さったバンドー化学株式会社研究員武居正史氏、エドマン分解による N 末端アミノ酸配列決定を行って頂きました首都大学東京都市教養学部教授 川原裕之博士、及び北海道大学創成研究機構共用機器管理センターの方々、マナマコ EST ライブラリーの探索を行って頂きました九州大学農学部教授 吉国通庸博士、P15 の合成をして頂いた財団法人サントリー生物有機科学研究所研究員 南方宏之

博士に心より感謝致します。

また、親身になって御指導・御討論頂きました東京工業大学生命理工学部教授 岸本健雄博士、名古屋大学理学部教授 澤田均博士、東京大学理学部准教授 吉田学博士、お茶の水大学理学部特任講師 広橋教貴博士、慶應義塾大学医学部特別研究講師 小林一也博士、東京工業大学生命理工学部博士研究員 竹田典代博士に深く感謝致します。

研究生活における時間を共に過ごし、活発な議論を行う仲間であった、慶應義塾大学理学部生命情報学科松本研究室、および旧・星研究室の皆様、また日々の研究生活を支えてくださった歴代の秘書の方々に感謝致します。特に採集や研究を共に行ったヒトデチームの方々に心から感謝致します。

十年来の仲である慶應義塾普通部教諭 矢澤和明氏には普通部の土曜選択授業「ザ・矢上」の講義を毎年任せて頂き、講義を受け持つ中で研究の楽しさを再確認することができましたこと感謝しております。また、実行委員長を務めた臨海若手の会を通じて出会い、朝まで研究を語りあい、互いに高めあった動物学会の若手研究者の皆様にも感謝いたします。

最後に、素晴らしい環境と遺伝子を下さった家族の皆に感謝致します。

2011年2月
成瀬正啓