

## メダカ近縁種、フグ、マウスにおける精子ファクター PhospholipaseC の比較と機能解析

動物生殖システム分野 66535 張 兩

指導教員 三谷 啓志

### < 背景 >

受精は生物にとって大切な生命現象であり、受精時の卵活性化反応は生物学において重要な意義を有する。脊椎動物においては、成熟卵は第二減数分裂中期で分裂を停止し、精子との受精をきっかけに活性化した後、細胞周期を再開して、胚として発生をすすめる。

哺乳類では、精子と卵との膜融合時に、精子から卵活性化を引き起こす因子である精子ファクター (SF, sperm factor) が卵内へ移行し、卵の小胞体膜上にあるレセプターと結合し、 $Ca^{2+}$ 遊離を引き起こすことで、卵を活性化すると考えられている。PLCZ 哺乳類の精子ファクターであり、哺乳類以外においても、鳥類のニワトリ、魚類のメダカ (*Oryzias latipes*) において、PLCZ 相同遺伝子がクローニングされ、マウスの未受精卵を活性化する活性を有することが報告されている。

また、メダカでは種内変異が極めて大きいことが知られている。アメリカ西海岸のアワビでは、精子の先体に含まれるライシンの遺伝子には大きな種内変異があり、種分化に寄与していることが報告されている。同じく受精に関連する遺伝子である PLCZ がメダカにおいて大きな種内・種間変異を示し、種の分化に関与している可能性が考えられる。

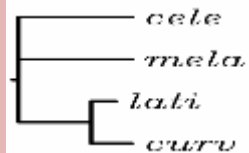
本研究では、日本メダカの近縁3種 (インド、セレベス、ハイナン)、クサフグについて、PLCZ 相同遺伝子をクローニングした。メダカ種間、魚類および哺乳類の PLCZ を比較し、さらにメダカ未受精卵において機能解析することによって、魚類そして脊椎動物における PLCZ の性質と魚類受精卵の活性化機構を解明することを目的とした。

### < 結果と考察 >

#### 日本メダカ近縁種の PLCZ 塩基配列決定

日本メダカ近縁種のインドメダカ、セレベスメダカ、ハイナンメダカまたクサフグについて、cDNA から 3',5'RACE 反応によって PLCZ 遺伝子の全長を決定した。メダカ近縁種の3種類 PLCZ として 1611bp(537 アミノ酸残基)の配列を確認した。クサフグ PLCZ として 1671bp(557 アミノ酸残基)の配列を確認したが、データベースで予測されたトラフグ (*T. rubripes*) PLCZ の配列とは、別種のものにもかかわらず、全く同一の配列であった。

メダカ近縁種 PLCZ の系統樹

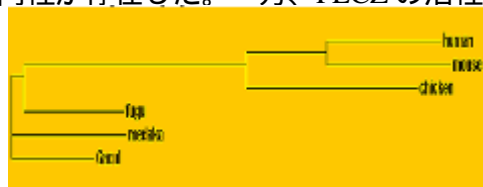


#### メダカ近縁種、フグおよび哺乳類間でのアミノ酸配列比較

メダカ近縁種 PLCZ 相同遺伝子について、DNA レベルでみると日本メダカはハイナンメダカと 98%、セレベスメダカとは 95%、インドメダカとは 95%の高い相同性がみられた。当初の予想と反して、メダカ PLCZ は種間変異はほとんどなく、種内および種間においては

強く保存されていることが明らかになった。これより、近縁種を含めたメダカ PLCZ に機能的な差異は予想されなかった。

脊椎動物の PLCZ 遺伝子を比較した場合、魚類、鳥類、哺乳類の PLCZ ではエキソン 3~11 までアミノ酸レベルでの相同性が確認された。X、Y、C2 ドメインにおいて、共通する、もしくは性質の近いアミノ酸が頻繁に見られ、高い相同性が存在した。一方、PLCZ の活性制御に関与するとされる EF hand では大きな変異が存在した。哺乳類と比較して、魚類では EF-hand ドメインが短い傾向が見られた。これにより、魚類と哺乳類の間で PLCZ の活性の違いが説明されると考えられる。

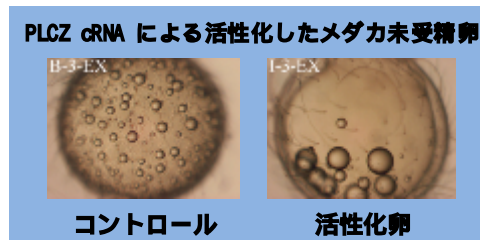


脊椎動物 PLCZ の EF hand ドメインの系統樹

### メダカ未受精卵における PLCZ の機能解析

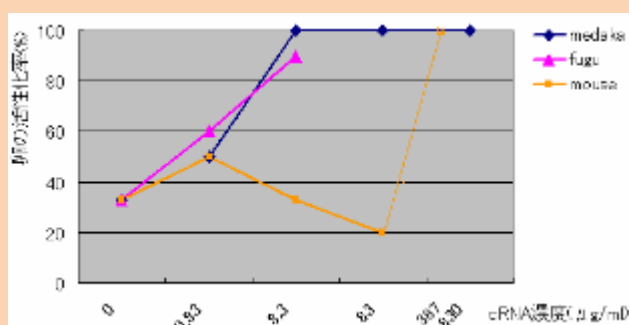
先行研究では、メダカ PLCZ の cRNA をマウス未受精卵に顕微注入して強制発現させた場合に、メダカ PLCZ はマウス PLCZ よりもマウス未受精卵においてカルシウム上昇反応を誘起する活性が 100 倍ほど強いことが示唆されていた。

本研究では、*in vitro* で合成したメダカ、クサフグ、マウス PLCZ の cRNA をそれぞれメダカ未受精卵にマイクロインジェクションし、卵活性化反応を顕微鏡で観察して確認した。また蛍光顕鏡観察では、活性化した卵の細胞質に、PLCZ が局所的に発現されていることが確認された。メダカ未受精卵において、メダカ、フグ、マウスの PLCZ がメダカ未受精卵の活性化反応を誘導できることが強く示唆された。



PLCZ cRNA による活性化したメダカ未受精卵

### メダカ、クサフグ、マウス PLCZ によるメダカ未受精卵の活性化率の比較



さらに、異なる濃度の cDNA インジェクション実験では、メダカとフグ PLCZ はマウス PLCZ cRNA を注入した時と比べて、高い卵の活性化率を示した。魚類 PLCZ は、哺乳類 PLCZ より強い活性を有することが示唆された。

PLCZ がどのようにして、 $[Ca^{2+}]_i$  上昇を調節しているのか、またこの $[Ca^{2+}]_i$  上昇によって引き起こされるその後の下流シグナル伝達がどのようにして細胞周期や発生に関わる遺伝子の発現しているのかというのが今後の課題となる。本研究により、魚類の受精時における PLCZ の重要性をより明確にし、さらに脊椎動物における PLCZ の性質および機能をより詳しく解明できたと考えられる。