

学 位 論 文 題 名

STUDIES ON THE INDUCTION MECHANISM OF THE ACROSOME REACTION IN  
SEA URCHIN SPERM

(ウニ精子の先体反応誘起機構に関する研究)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

哺乳類を含む多くの動物で、卵表面で起こる精子の先体反応が受精の成立に不可欠な現象であることはよく知られている。ウニ精子の先体反応は卵ゼリー層中の高分子成分(フコース硫酸タンパク質複合体)により引き起こされ、その過程で精子先体部域が顕著な形態変化(先体胞内容物の放出、および、先体突起の形成)を示す。この形態変化には細胞膜を通じて外液から $Ca^{2+}$ の流入が起こること、および、細胞内から $H^+$ が放出されることが不可欠である。本研究はこれらイオンの流れを調節する分子機構を明らかにする目的で行った。

Aketa & Ohta(1983)は、エゾバフンウニ(*Strongylocentrotus intermedius*)精子がレクチン(糖結合タンパク質)の一種である小麦胚芽レクチン(WGA)による処理で受精力を失うことを観察した。本研究では彼らの観察した受精能喪失の機構、およびその際、WGAが特異的に結合する精子細胞膜上のWGA結合性膜タンパク質の同定と、その生理機能を明らかにする実験を行った。さらに、エゾバフンウニ、および、バフンウニ(*Hemicentrotus pulcherrimus*)精子を用いて高pHの海水により引き起こされる先体反応の解析も併せ行った。

これらの結果を3章に分けて論述する。

1) WGA処理による受精能喪失の機構

本研究で、WGA処理によるエゾバフンウニの受精能の喪失は先体反応の阻害に起因することが明らかになった。蛍光色素FITCで標識したWGAで精子を処理すると、WGAは精子の先体部、中片部、および、鞭毛の先端部に集中的に結合した。しかし、WGAの認

糖の1つであるN-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc)の存在下ではWGAは卵ゼリーによる先体反応を阻害せず、また、FITC標識WGAの精子への結合はみられなかった。WGAはシアル酸とも結合するが、これをサクシニル化すると、その結合性が失われる。本研究でサクシニル化したWGAによって先体反応が阻害されなかったので、WGAがシアル酸残基を持った膜の糖タンパク質と特異的に結合し、その結果、先体反応が阻害されることが示唆された。

次に、卵ゼリーと同様の先体反応を起こさせることができるイオノフォア (A23187、および、ナイジェリシン)を用い、WGA処理精子がこれら薬品によって先体反応を起こし得るか否かを調べた。その結果、WGAはイオノフォアによる先体反応を全く阻害しなかった。このことはWGAによる先体反応の阻害がWGAによって精子細胞表面の糖タンパク質が架橋された結果、物理的に阻害が起こるのではなく、WGAの結合が先体反応に不可欠なイオンの流れ ( $Ca^{2+}$ の流入、および、 $H^+$ の放出)に影響を及ぼしている可能性が考えられる。そこでこれを確かめるため、 $Ca^{2+}$ 指示薬であるFura-2とpH指示薬のBCRCPを精子細胞内に取り込ませた精子をWGAで処理した。これらのものでは、卵ゼリーの存在下でも、 $Ca^{2+}$ の流入が著しく阻害され、また、 $H^+$ の放出も明らかに抑制されることが分かった。

さらに、精子細胞膜上のWGA結合性膜タンパク質の同定も行い、それが分子量約26万 (還元条件下: 23万)の膜の糖タンパク質であることを明らかにした。

## II) WGA結合性膜タンパク質の先体反応誘起における役割

WGA結合性膜タンパク質の生理機能を調べるため、このタンパク質に対するポリクローナル抗体を作成した。得られた抗体を用いて行った免疫蛍光観察の結果はWGA結合性膜タンパク質の精子表面における分布が蛍光標識したWGAを用いて得られた結果と全く同じであった。また、この抗体を精子に作用させると、卵ゼリーと同様、精子細胞内の $Ca^{2+}$ 濃度とpHが上昇し、先体反応が起こった。

次に、この細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度とpHの上昇のための条件を調べた結果、 $Ca^{2+}$ 濃度の上昇が外液中の $Ca^{2+}$ に依存すること、pHの上昇は外液中の $Na^+$ の存在が必要であることが明かとなった。さらに、抗体による先体反応と卵ゼリーによる先体反応が全く同じ条件で阻害された。このような結果はWGA結合性膜タンパク質が $Ca^{2+}$ チャンネル、および、 $Na^+/H^+$ 交換系の活性化に深く関わっていることを示唆している。

### III) 高 pH 海水処理による $\text{Ca}^{2+}$ 流入への WGA 結合性膜タンパク質の関与

精子を高 pH (9.0) の海水で処理すると、卵ゼリーによる場合と同様、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが活性化されて  $\text{Ca}^{2+}$  流入が起こり、先体反応が引き起こされることは他種のウニで既に報告されている。高 pH の海水による先体反応誘起機構の解析は精子の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの調節機構を解明する上で有意義であると考えられる。

エゾバフンウニとバフンウニの精子細胞膜上の WGA 結合性膜タンパク質は分子量、分布、抗原性、生理機能が殆ど同じであった。この 2 種のウニの精子を高 pH の海水で処理し、その際に起こる  $\text{Ca}^{2+}$  の流入と、細胞内 pH の変化を詳細に追跡した結果、エゾバフンウニ精子は高 pH 条件下で顕著な  $\text{Ca}^{2+}$  流入を示さず、先体反応も起こさなかった。一方バフンウニ精子では、同じ条件下で  $\text{Ca}^{2+}$  の急激な流入と細胞内 pH の上昇がみられ、先体反応が引き起こされた。またこの  $\text{Ca}^{2+}$  流入は、卵ゼリー処理の場合と同様、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル遮断剤（ベラパミルおよびニソルジピン）や WGA による処理で阻害された。この結果は、高 pH 処理が卵ゼリー処理の場合と同じタイプの  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを活性化していることを示すと考えられ、さらに、WGA 結合性膜タンパク質が  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの調節に深く関わっているという考えを支持する。加えて、細胞内 pH の上昇は必ず細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を伴っており、さらに、外液に  $\text{Ca}^{2+}$  が存在しない場合や、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル遮断剤、WGA で処理することによって、pH 上昇が著しく阻害されたことから、 $\text{Ca}^{2+}$  が精子の  $\text{H}^+$  放出系の調節で重要な働きをしていると考えられる。

以上の成果は精子細胞膜上に存在する WGA 結合性膜タンパク質が先体反応誘起の分子機構、特に  $\text{Ca}^{2+}$  の流入調節で極めて重要な働きをしていることを明白にしたものである。このタンパク質の分子的特徴がより一層明確になれば、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの活性化を制御する機構や、精子細胞膜に存在する未知の先体反応誘起物質の受容体を特定する手がかりが得られると期待される。

## 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

主 査 教 授 緋 田 研 爾  
副 査 教 授 山 本 正  
副 査 教 授 堀 浩

卵表面で起こる精子の先体反応は多くの動物の受精の成立に必須な条件である。ウニ精子の先体反応は先体胞内容物の放出と先体突起の形成からなっている。この変化には細胞膜を通じての $Ca^{2+}$ の流入と細胞からの $H^+$ の放出が必要である。本研究はこれらのイオンの流れを調節する分子機構を明らかにする目的で行われている。エゾバフンウニ(Si)精子はレクチンの一種のWGAによって受精能力が失われる事が分かっていた。本研究ではその理由及びその際WGAが特異的に結合する精子膜上のタンパク質の同定と、その生理機能を明らかにする実験を行った。更にSi精子とバフンウニ(Hp)精子を用いて高pH海水により引き起こされる先体反応の解析も併せ行った。これらの結果を三章に分けてまとめている。

(1) WGAによる受精能喪失の機構：この喪失は先体反応の阻害に起因することが分かった。蛍光色素FITCで標識したWGAは精子の先体、中片及び鞭毛の先端に結合した。しかしWGAの認識糖の一つであるN-アセチル-D-グルコサミンの存在下ではWGAは先体反応を阻害せず、またFITC標識WGAの精子への結合は見られなかった。WGAはシアル酸とも結合するが、これをサクシニル化して結合性が失われたWGAによって先体反応が阻害されなかったので、WGAがシアル酸残基を持った膜の糖タンパクと特異的に結合して、その結果、先体反応が阻害された事が示された。次に人工的に先体反応を起こすことのできるイオノフォアをWGA処理精子に作用させると先体反応は全く阻害されなかった。このことはWGAによる先体反応阻害がWGAによる精子表面糖タンパク質の架橋の結果ではなくWGAの結合が先体反応に必要なイオンの流れ( $Ca^{2+}$ の流入と $H^+$ の放出)に影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで、Ca指示薬fura-2とpH指示薬BCECFを取り込ませた精子をWGAで処理した。これらのものでは $Ca^{2+}$ の流入が著しく阻害され、また $H^+$ の放出も抑制される事が分かった。さらに精子膜上のWGA結

合タンパク質の同定も行い、それが分子量約26万の糖タンパク質である事を明らかにした。

(2) WGA 結合性膜タンパク質の先体反応誘起における役割：次にこのタンパク質に対するポリクローナル抗体を作成し、それを用いて行った免疫蛍光観察の結果はWGA 結合性膜タンパク質の精子表面における分布が蛍光標識WGA で得られた結果と全く同じであった。また、この抗体を精子に作用させると精子内のCa<sup>2+</sup>濃度とpHが上昇して先体反応が起こった。次に、この細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度とpHの上昇のための条件を調べた結果、Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が外液中のCa<sup>2+</sup>に依存すること、pHの上昇は外液中のNa<sup>+</sup>の存在が必要であることが明らかになった。更に抗体による先体反応と通常の前体反応が全く同じ条件で阻害された。このような結果はWGA 結合性膜タンパク質がCa<sup>2+</sup>チャンネル及びNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換系の活性化に深く関わっていることを示している。

(3) 高pH海水処理によるCa<sup>2+</sup>流入へのWGA 結合性膜タンパク質の関与：精子を高pH海水で処理するとCa<sup>2+</sup>チャンネルが活性化されてCa<sup>2+</sup>の流入が起こり先体反応が引き起こされる事は既に報告されている。SiとHpの精子膜上のWGA 結合性タンパク質は分子量、分布、抗原性、生理機能が殆ど同じであった。この2種のウニの精子を高pH海水で処理し、その際に起こるCa<sup>2+</sup>流入と、細胞内pHの変化を詳細に追跡した結果、Si精子は高pH条件下でも顕著なCa<sup>2+</sup>流入を示さず先体反応も起こさなかった。一方、Hp精子ではCa<sup>2+</sup>の急激な流入と細胞内pHの上昇が見られ、先体反応が引き起こされた。またこのCa<sup>2+</sup>流入は、Ca<sup>2+</sup>チャンネル遮断剤やWGAによって阻害された。この結果は高pH処理が通常の場合と同じタイプのCa<sup>2+</sup>チャンネルを活性化している事を示すと考えられ、更に、WGA 結合性膜タンパク質がCa<sup>2+</sup>の調節に深く関わっているという考えを支持する。加えて、細胞内pHの上昇は必ず細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を伴っており、更に外液にCa<sup>2+</sup>が存在しない場合や、Ca<sup>2+</sup>チャンネル遮断剤やWGAによってpH上昇が著しく阻害された事から、Ca<sup>2+</sup>が精子のH<sup>+</sup>放出系の調節に重要な働きをしていると考えている。

以上の成果は精子膜上に存在するWGA 結合性タンパク質が先体反応誘起の分子機構とくにCa<sup>2+</sup>流入調節で極めて重要な働きをしている事を明白にしたものであり、審査員一同は申請者が理学博士を得る十分な資格があると認めた。