

学位論文題名

受精におけるプロテアソーム（高分子量多機能プロテアーゼ複合体）の  
意義に関する研究

学位論文内容の要旨

卵と精子の相互認識により受精現象が開始され、精子の卵内への侵入に伴って卵内で一連の反応が起き、個体発生が開始される。この受精および発生の過程は、精子と卵との時間的に定められた形態変化を伴って進行する。マボヤの受精過程の中で、精子の卵膜通過と精子の卵細胞膜への結合から卵割に至るまでの2つの過程にキモトリブシン様酵素が関与することが、プロテアーゼインヒビターを用いた受精阻害実験から示唆されていた。本研究では、上記2つの過程に関与すると考えられる精子および卵由来のキモトリブシン様酵素をとりあげ、その生理機能を明らかにする目的で、両配偶子からの本酵素の精製を行い、得られたキモトリブシン様活性を有する高分子量プロテアーゼ複合体の性質を調べた。その結果、真核細胞に広く存在するプロテアソーム（MCP I）がマボヤの両配偶子に存在すること、MCP Iよりも高分子量のプロテアソームのアイソフォーム（MCP II）がマボヤの両配偶子に存在すること、精子の卵膜通過の過程で精子MCP IIが卵膜消化に関与することを明らかにした。

(1) 卵割に至るまでの過程に関与する卵キモトリブシン様酵素を精製する目的で、マボヤ未受精卵ホモジネートの遠心分離後に得られる上清画分を出発材料として、3段階のクロマトグラフィーを行い、ディスク電気泳動的に均一な精製酵素標品を得た。一方、精製酵素標品のSDS電気泳動では分子量25~33kDの位置に数本のバンドを与えた。本酵素の分子量はゲルろ過より610kDと求められ、沈降速度実験においても高分子であることが示された。また、本酵素の電子顕微鏡観察像はプロテアソームに特有のシリンドラー状構造を示した。さらに、本酵素はキモトリブシン様活性とトリブシン様活性を有し、キモスタチンは両活性とも強く阻害するのに対して、ロイバプチニンはトリブシン様活性をより強く、アンチバインはトリブシン様活性のみを阻害した。以上の結果をふまえて、本酵素はプロテアソーム（MCP I）に分類されると結論した。

プロテアソームに特有な共通した性質として、低濃度のSDSや脂肪酸による活性化が

挙げられる。マボヤ卵MCP Iが有するキモトリプシン様活性も低濃度のSDSの添加により活性化されるが、SDSにより誘起される活性化は一過的な現象であることを明らかにした。さらに、SDS添加に伴う蛋白質の自家蛍光の変化を追跡した結果、SDSの添加と同時に自家蛍光が上昇し、その後減少すること、この蛍光変化は活性の変化に先立って生じることを見いだし、SDSによる活性化が酵素の構造変化に起因することを明らかにした。

(2) マボヤ卵MCP Iの場合と同様の方法でマボヤ精子からキモトリプシン様酵素を精製した。得られたキモトリプシン様活性を有する酵素の電子顕微鏡観察像もシリンドー状構造を与え、SDS電気泳動での挙動、基質特異性やインヒビター感受性も卵由来のMCP Iとよく類似していることから、精子から得られたキモトリプシン様酵素もプロテアソーム(MCP I)に分類されると結論した。

(3) マボヤ精子からのMCP Iの精製の際に、DEAE-celluloseクロマトグラフィーにおいてMCP Iの場合よりも高塩濃度で溶出される画分にキモトリプシン様活性が検出されたので、その酵素を単離する目的で、さらに5段階のクロマトグラフィーを行い、MCP Iのアイソフォーム(MCP II)を精製した。MCP IIの分子量はゲルろ過より930KDと求められた。MCP IIのSDS電気泳動では20Sプロテアソームのアイソフォームである26Sプロテアソームのパターンと比較的類似したパターンを与え、かつ、抗マボヤ卵MCP Iポリクローナル抗体と交叉するバンドが検出された。また、MCP IIが示すキモトリプシン様活性はプロピオキサチニンAで阻害され、トリプシン様活性はロイペプチドで阻害されることが明らかになった。さらにマボヤ卵にも同様の性質を有するMCP IIが存在することを明らかにした。

(4) 精子が卵膜に結合した際に起きる精子の形態変化(sperm reaction)に伴って卵膜分解酵素が精子から遊離されるか否かを明らかにする目的で、sperm reactionを人工的に誘起させた精子から得られる分泌液の卵膜消化活性を調べた。その結果、sperm reactionを誘起させた精子から卵膜分解酵素が遊離されることが明らかになった。その卵膜消化活性はプロピオキサチニンAにより強く阻害されること、精子分泌液が抗マボヤ卵MCP Iポリクローナル抗体を用いたドットプロッティングで陽性であること、精子分泌液のゲルろ過において分子量1,000KD付近の画分がドットプロッティングで陽性であり、かつ、その画分に卵膜消化活性が検出されたことから、sperm reactionに伴ってMCP IIが精子から遊離され、卵膜消化に関与すると推論した。MCP IIの精子内局在性や卵膜消化過程へのユビキチンの関与を明らかにすることが今後解決すべき課題である。

## 学位論文審査の要旨

主査 教授 横沢英良

副査 教授 長沢滋治

副査 助教授 高橋和彦

副査 助教授 沢田 均

卵と精子の相互認識により受精現象が開始され、精子の卵内への侵入に伴って卵内で一連の反応が起き、個体発生が開始される。この受精および発生の過程に各種プロテアーゼが関与すると考えられているが、それらの生理機能の詳細は不明な点が多い。

本論文提出者は、受精研究の対象として原索動物マボヤを用い、その受精過程の中で、プロテアーゼインヒビターを用いた受精阻害実験から精子の卵膜通過の過程と精子細胞膜と卵細胞膜の融合から卵割に至るまでの過程との2つの過程に関与すると考えられていたキモトリプシン様酵素をとりあげ、精子および卵由来の酵素の化学的実体と生理機能を明らかにする目的で、一連の研究を展開し、以下の成果をおさめた。

(1) 卵割に至るまでの過程に關する卵キモトリプシン様酵素を単離・精製する目的で、マボヤ未受精卵ホモジネートの遠心分離後に得られる上清画分を出発材料として、3段階のクロマトグラフィーを行い、ディスク電気泳動的に均一な精製酵素標品を得た。精製酵素標品がSDS電気泳動で分子量25~33kの位置に数本のバンドを与えること、その分子量(610k)、沈降速度定数(22.8S)および電子顕微鏡観察像から高分子であること、さらに、キモトリプシン様活性とトリプシン様活性を有し、インヒビターの中でキモスタチンは両活性とも強く阻害するのに対して、ロイベブチンはトリプシン様活性をより強く、アンチバインはトリプシン様活性のみを阻害することを明らかにし、それらの結果をふまえて、本酵素がプロテアソーム(MCP I)に分類されると結論した。

プロテアソームに特有な共通した性質として、低濃度のSDSや脂肪酸による活性化が挙げられる。マボヤ卵MCP Iが有するキモトリプシン様活性も低濃度のSDSの添加により活性化されることを見い出し、かつ、その活性化は一過的な現象であることを明らかにした。さらに、SDS添加に伴う蛋白質の自家蛍光の変化を追跡し、SDSの添加と同

時に自家蛍光が上昇し、その後減少すること、この蛍光変化は活性の変化に先立って生じることを見い出し、SDSによる活性化が酵素の構造変化に起因すると推論した。

(2) マボヤ卵MCP Iの場合と同様の方法でマボヤ精子からキモトリプシン様酵素を単離・精製した。得られたキモトリプシン様活性を有する酵素の電子顕微鏡観察像、SDS電気泳動での挙動、基質特異性やインヒビター感受性も卵由来のMCP Iとよく類似していることから、精子から得られたキモトリプシン様酵素もプロテアソーム(MCP I)に分類されると結論した。

(3) マボヤ精子からのMCP Iの精製の際に、DEAE-celluloseクロマトグラフィーにおいてMCP Iの場合よりも高塩濃度で溶出される画分にキモトリプシン様活性が検出されたので、その酵素を単離・精製する目的で、引き続き5段階のクロマトグラフィーを行い、MCP Iのアイソフォーム(MCP II)を単離した。その分子量(930k)、SDS電気泳動でのサブユニットのパターンおよび抗マボヤ卵MCP Iポリクローナル抗体との交叉性から、MCP IIは26Sプロテアソーム(20Sプロテアソームのアイソフォーム)に分類されると推論した。さらに、MCP IIが示すキモトリプシン様活性はプロピオキサチニンAで阻害され、トリプシン様活性はロイバブチンで阻害されることを明らかにした。

(4) 精子が卵膜に結合した際に、精子の形態変化(sperm reaction)がおきる。sperm reactionを人工的に誘起させた精子から得た分泌液の卵膜分解活性を調べ、sperm reactionを誘起させた精子から卵膜分解酵素が遊離されることを明らかにした。その卵膜分解活性はプロピオキサチニンAにより強く阻害されること、精子分泌液が抗マボヤ卵MCP Iポリクローナル抗体と免疫交叉すること、さらに、精子分泌液のゲルろ過において免疫交叉性を示す分子量1,000kD付近の画分が卵膜分解活性を示すことを見い出し、卵膜分解酵素は初めから精子表面に存在しているのではなく、sperm reactionが誘起されて初めて卵膜分解活性を有するMCP IIが精子から遊離され、卵膜分解を行うと推論した。

以上の新知見およびそれを得るために用いた研究技法は、細胞が生存する上で基本的な機能を果たしていると考えられているプロテアソームの生理機能を理解する上で重要な寄与をなすものである。審査員一同このことを高く評価し、本論文提出者が博士(薬学)の称号を受けるにふさわしいものと、一致して判断した。