

学 位 論 文 題 名

Studies on the Protease of Sea Urchin Sperm
Involved in the Initiation of the Acrosome Reaction
(ウニ精子先体反応に関与するプロテアーゼの研究)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

多くの動物種において、精子先体反応は受精の成立にとって必須の過程である。ウニ精子先体反応は、受精に先だって卵表で、人為的には卵外被ゼリー層中の高分子糖タンパク質や精子結合因子と名付けられた卵膜成分により誘起され、形態的には精子先体胞のエクソサイトシス及び先体突起の形成がみられる。また先体反応時には外液からの Ca^{2+} の流入と、細胞内からの H^+ の放出が起こり、これらのイオンの流れが形態変化に先立つ必要条件だと考えられている。他方、この先体反応にプロテアーゼが関与している可能性が示唆されているが、確証は得られていない。本研究では、エゾバフンウニ(*Strongylocentrotus intermedius*)を材料とし、まず実際にプロテアーゼが先体反応に関与しているのかどうか、もしそうであるならばどの段階で関与しているのかを調べ、更に関係するプロテアーゼを精子より単離精製し、その活性化機構を調べた。以下にその結果を論述する。

(1) プロテアーゼ阻害剤による先体反応阻害の機構

卵ゼリーで誘起される先体反応は、キモトリプシン阻害剤である1-tosylamide-2-phenyl chloromethyl ketone(TPCK)、キモスタチン、キモトリプシン基質であるN-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester(BTEE)により阻害された。しかし、これらの阻害剤は、イオノフォアで人工的に誘起される先体反応を阻害することはなかった。このことは、これらの阻害剤が形態変化に先立つイオンの流れに影響を与えていることを示している。実際に、 Ca^{2+} 指示薬fura 2、pH指示薬BCECFを用いて精子細胞内 Ca^{2+} 濃度とpHを測定したところ、BTEEは卵ゼリー添加時の急速な Ca^{2+} 流入を阻害したのに対し、

細胞内pHの上昇には殆ど影響を与えずその後起こる再酸性化を遅らせた。これらの効果は、 Ca^{2+} チャンネル遮断剤であるベラパミルの効果と類似していた。以上の事から、ウニ精子のキモトリブシンタイプのプロテアーゼが先体反応初期のイオンの流れ、特に Ca^{2+} 流入を制御する系に関与することが示唆された。

(2) 先体反応に関与するプロテアーゼの精製

次に、精子から先体反応に関与すると思われるプロテアーゼの単離精製を試みた。キモトリブシンに対する二種類のペプチド基質の先体反応阻害能を調べたところ、 $\text{Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA}$ が阻害したのに対し、 $\text{Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA}$ には阻害能はなかった。そこで、前者の基質を分解する活性を指標に精子抽出液から DEAE-Sephacel、ハイドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、Sephacryl S-300 ゲル濾過およびヘパリン Sepharose CL-6B クロマトグラフィーによりプロテアーゼを精製した。最終的に、分子量が65kDaと700kDaの二種類のプロテアーゼが得られた。65kDaプロテアーゼは先体反応阻害能をもたない基質の分解活性も同程度もっていたのに対し、700kDaプロテアーゼはこの基質を全く分解しなかった。更に、65kDaプロテアーゼは先体反応阻害能のないアミノペプチダーゼ阻害剤ベスタチンにより強く阻害されたことから、このプロテアーゼは先体反応開始機構には関与していないと判断された。一方700kDaプロテアーゼは、キモトリブシン様活性以外にトリブシン様活性も有しており、それぞれの阻害剤感受性の違いより少なくとも二個の独立した活性部位をもっていると考えられた。このうちキモトリブシン様活性と先体反応の阻害が一致することから、このプロテアーゼのキモトリブシン様活性が先体反応に関与していると思われる。この700kDaプロテアーゼは未変性条件下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動(native-PAGE)では一本のタンパク質バンドを示したのに対し、SDS-PAGEでは分子量22kDa~33kDaに少なくとも8本のバンドがみられた。更に、この酵素のキモトリブシン様活性はポリリジン及びSDSの添加で上昇することがわかった。これらの性質は、最近酵母から哺乳類までの真核細胞に広く見いだされているプロテアソーム(高分子量多機能プロテアーゼ)の性質と同じであった。以上のことから、精子プロテアソームのキモトリブシン様活性が先体反応開始機構に関与する可能性が著しく高まった。

(3) 精子プロテアソームの活性化機構

精子プロテアソームのキモトリブシン様活性はポリリジン、SDSで活性化されるこ

とから、精子細胞内で不活性型として存在する酵素が先体反応時に何らかの活性化物質により活性化される可能性が考えられた。そこで、生理的活性化物質の候補として細胞膜を構成するリン脂質とその代謝産物の活性への影響を調べた。飽和脂肪酸のパルミチン酸、ミリスチン酸、リン脂質のホスファチジルイノシトールは $250\mu\text{g/ml}$ の濃度で4～7倍に活性を上昇させたが、活性化に必要な濃度としては比較的高かった。これに対し、リゾリン脂質、特にリゾホスファチジルイノシトールは $2.5\mu\text{g/ml}$ という低濃度で活性を12倍に上昇させた。更に、精子から抽出した脂質画分にも活性化能があり、卵ゼリー処理直後の精子から抽出したものが未処理精子のものより強い活性化能があることがわかった。これらの結果から卵ゼリー処理言いかえれば先体反応時に活性化物質が増加すること、そしてそれはリゾリン脂質である可能性が高まった。

(4) 先体反応開始機構へのホスホオリパーゼ A_2 (PLA_2) の関与の可能性

リゾリン脂質は脂肪酸とともに、リン脂質の PLA_2 による分解産物である。そこで、先体反応初期に PLA_2 が関与するのかどうかを、この酵素の阻害剤と活性化剤を用いて調べた。 PLA_2 阻害剤であるキナクリンとp-ブロモフェナシルプロミド (PBPB) はともに卵ゼリーによる先体反応を阻害し、この阻害は細胞内への Ca^{2+} の流入が抑えられた結果であることが明かとなった。また、 PLA_2 活性化剤であるメリチンは、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇とともに疑似先体反応ともいえるべき形態変化(エクソサイトシス)はしているが先体系は伸長していないと思われる)を誘起することがわかった。以上のことから、先体反応初期、特に Ca^{2+} 流入時以前に PLA_2 が関与していることが示唆された。

以上の研究成果より、アゴニストの受容に始まる先体反応系の応答において、まず PLA_2 が活性化され細胞膜リン脂質を分解し、その産物であるリゾリン脂質が精子プロテアソームのキモトリプシン様活性を上昇させ、その結果 Ca^{2+} 流入系が活性化されて形態変化に至るというメカニズムが考えられた。

プロテアソームは真核細胞に普遍的に存在し、非リソソーム系のATP依存性タンパク質分解への関与が考えられているが、細胞分化、細胞増殖といった多様な、そして生命の根幹に関わる現象に関与している可能性も論じられている。本研究は、リゾリン脂質が強いプロテアソーム活性化能をもつことを初めて明らかにし、細胞膜リン脂質代謝を含む細胞応答、情報伝達系へのこの酵素の関与を示唆するものである。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

主 査 教 授 緋 田 研 爾

副 査 教 授 久 田 光 彦

副 査 教 授 片 桐 千 明

ウニ精子先体反応 (AR) は、受精に先だって卵表で起こる。この時 Ca^{2+} の流入と H^+ の放出が起こり、それらが形態変化に先立つ必要条件だと考えられている。この AR にプロテアーゼが関与している可能性が云われているが、確証はない。本研究では、エゾバフンウニ (*Strongylocentrotus intermedius*) を材料とし、まず実際にプロテアーゼが AR に関与しているのか、そしてそれはどの段階であるのかを調べ、更に関係するプロテアーゼを精子より単離精製し、その活性化機構を調べ、これらの結果を論述している。(1) プロテアーゼ阻害剤による AR 阻害の機構: 卵ゼリーで誘起される AR は、キモトリプシン阻害剤 TPCK、キモスタチン、キモトリプシン基質 BTEE により阻害された。しかし、これらの薬剤はイオノフォアによる AR を阻害することはなかったので、それらが形態変化に先立つイオンの流れに影響を与えていることが分った。実際には、 Ca^{2+} 指示薬 fura 2、pH 指示薬 BCECF を用いた精子内 Ca^{2+} 濃度と pH の測定で BTEE は卵ゼリーによる急速な Ca^{2+} 流入を阻害したのに対し、細胞内 pH の上昇には殆ど影響を与えなかった。ウニ精子のキモトリプシン様プロテアーゼが AR 初期の Ca^{2+} 流入を制御する系に関与することが示唆される。(2) AR に関与するプロテアーゼの精製: キモトリプシンのペプチド基質 Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA が AR を阻害したのでこれを分解する活性を指標に精子抽出液から四段階のカラムクロマトグラフィーによりプロテアーゼを精製し、最終的に 65kDa と 700kDa の二種類の酵素が得られた。前者は AR 阻害能をもたない基質の分解活性ももっていたのに対し、後者はこの基質を全く分解しなかった。更に、前者は AR 阻害能のないベスタチンにより強く阻害されたことから、このプロテアーゼは AR 開始機構には関与していないと判断された。一方後者は、キモトリプシン様活性以外にトリプシン様活性も有しており、このうちキモトリプシン様活性と AR の阻害剤感受性が一致することから、この活性が AR に関与していると思われた。

この700kDaプロテアーゼはnative PAGEでは一本のタンパクバンドを示したのに対し、SDS-PAGEでは分子量22kDa~33kDaに少なくとも8本のバンドがみられた。更に、このキモトリブシン様活性はポリリジン及びSDSの添加で上昇することが分った。これらの性質は、真核細胞に広く見いだされているプロテアソーム（高分子量多機能プロテアーゼ）の性質と同じであった。（3）精子プロテアソームの活性化機構：精子プロテアソームのキモトリブシン様活性は精子内で不活性型として存在しAR時に活性化される可能性が考えられた。そこで、この活性化物質の候補として細胞膜を構成するリン脂質とその代謝産物を調べた。ある種の脂肪酸、リン脂質は比較的高濃度で4~7倍に活性を上昇させたが、リゾリン脂質（LPL）特にリゾホスファチジルイノシトールはその1/100（ $2.5\mu\text{g/ml}$ ）という低濃度で活性を12倍に上昇させた。更に、精子から抽出した脂質画分にも活性化能があり、卵ゼリー処理直後の精子から抽出したものが未処理精子のものより強い活性化能があることも分った。これらの結果からAR時に活性化物質が増加すること、そしてそれはLPLである可能性が高まった。（4）AR開始機構へのホスホオリパーゼA₂（PLA₂）の関与の可能性：LPLはリン脂質のPLA₂による分解産物である。そこで、AR初期にPLA₂が関与するのかどうかを調べた。PLA₂阻害剤キナクリンとp-ブロモフェナシルプロミドはともに卵ゼリーによるARを阻害し、これは細胞内へのCa²⁺の流入を抑えた結果であることが分った。また、PLA₂活性化剤メリチンは細胞内Ca²⁺濃度の上昇とともに疑似ARともいふべき形態変化を誘起した。以上のことからAR初期、特にCa²⁺流入以前にPLA₂が関与していることが示唆された。

以上の研究成果より、アゴニストの受容に始まるAR系の応答において、まずPLA₂が活性化され細胞膜リン脂質を分解し、その産物であるLPLが精子プロテアソームのキモトリブシン様活性を上昇させ、その結果Ca²⁺流入系が活性化されて形態変化に至るというメカニズムが考えられた。プロテアソームは、細胞分化、細胞増殖といった生命の基本現象に関与している可能性も論じられている。本研究は、LPLが強いプロテアソーム活性化能をもつことを初めて明かにし、細胞膜リン脂質代謝を含む細胞応答、情報伝達系へのこの酵素の関与を示唆するものであり審査員一同は申請者が博士（理学）を得る十分な資格があると認めた。