

学 位 論 文 題 名

Studies on the functions of sperm autoantigens  
in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*

（ナイルテラピア精子自己抗原の機能に関する研究）

学位論文内容の要旨

数種の硬骨魚類の精子変態期には、生殖細胞表面にいくつかのタンパク質が発現することが知られている。これらのタンパク質はその発現の時期より生殖細胞の最終成熟期及び精子において特有の機能を有し、また、通常自身の免疫系に対して寛容を獲得しておらず自己抗原となっていることが知られている。哺乳類においては、これらのタンパク質のうちのいくつかは、受精時に機能していることも報告されている。しかし、硬骨魚類においては、精子変態期に発現するタンパク質の機能についてはほとんど調べられていない。

水産有用魚種の一つであるナイルテラピア *Oreochromis niloticus* の養殖においては、本種の強い繁殖力に由来する密殖により魚体の不均一化を生じることが問題点の一つとして指摘されており、そのため、密殖防止を目的とした雄の生殖の人為的統御法の確立は重要な課題の一つである。そこで、本研究ではナイルテラピアを用い、最終成熟及び受精の分子機構に関する基礎的知見を得ることを目的として、先ず、精子変態期に発現するタンパク質精子自己抗原を検索し、次いでこれらに対するモノクローナル抗体を作製して、この抗体を用いた機能の解析を試みた。

界面活性剤 (n-octyl- $\beta$ -D-thioglucopyranoside) を用いて可溶化したテラピア精子膜タンパク画分から、テラピア精子自己抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより自己抗原を精製した。その結果、自己抗原画分には主として 80kDa 及び 27kDa のタンパクが含まれることが明かとなった。次に、この自己抗原画分を Balb/c 雌マウスに免疫してモノクローナル抗体の作製を試み、4 種類の抗体を得た。一つ目の抗体は 27kDa タンパクを認識し、また免疫組織学的検索に

より、この抗原は精子の特に中片域、精子変態後期の精細胞、A 及び 初期 B 型精原細胞に局在することが示された。二つ目の抗体は 80kDa 及び 30-40kDa の複数のタンパクを認識し、三つ目の抗体は 80kDa のタンパクのみを認識した。これらの抗原は共に精子変態後期の精細胞及び精子頭部に局在していた。四つ目の抗体は 120kDa のタンパクを認識し、その抗原は精子頭部及びセルトリ細胞、輸精管上皮細胞に局在が認められた。これらの抗体は Testicular Antigen of Tilapia の頭文字をとり、それぞれ TAT-10, TAT-20, TAT-21及び TAT-30 と命名した。また、これらの抗体はその認識抗原の局在部位より考えて、最終成熟から受精にいたる一連の分子機構の解明に有用であることが示された。

次に、これらの抗体が認識する抗原の機能について調べた。最近の哺乳類の研究では、嗅覚系受容体が精子においても発現し、受精時に卵からの走化性因子あるいは精子活性化因子の受容体として機能していることが示唆されている。また、数種のサケ科魚類では、卵巢腔液中に精子運動時間を延長させる因子が存在することが知られている。予備的実験により TAT-10 抗原が嗅覚系にも存在していること及び TAT-10 抗原が精子の中片域に局在していたことから、テラピア卵巢腔液の精子運動延長活性と TAT-10 抗原との関連について調べた。まず、卵巢腔液中に精子運動延長因子が存在しているか否かを調べた。その結果、卵巢腔液を含むバッファーで希釈した精子は、バッファーのみで希釈した精子に比較して一定時間後に有意に高い運動比率を示したことから、テラピア卵巢腔液中にも精子運動延長因子が存在していることが示された。また、この因子は Sephadex G-25 を用いたゲル濾過により分子量 約 2,000 であると推定された。また、卵巢腔液を 100°C、5min の熱処理した後も精子運動延長活性が保持されたことから、この因子は熱安定な物質であると考えられた。次に、精子を TAT-10 処理した結果、この因子による運動延長が有意に抑制された。また、対照群として TAT-21 処理した精子においては、この因子による運動延長抑制は認められなかった。この結果より TAT-10 抗原が、卵巢腔液中の運動延長因子の受容体であることが示唆された。

TAT-10 抗原の組織特異性について、イムノプロット法により調べたところ、精巢の他に、嗅覚系及び卵巢において同一分子量 27kDa のタンパクとして存在していることが示された。嗅覚系及び卵巢における TAT-10 抗原の局在部位を免疫組織化学的に検索した結果、嗅覚系においては嗅上皮の核に特に強い局在が認めら

れ、このほか嗅神経束及び嗅球に入り込む軸索部分に局在が認められた。この結果より、TAT-10 抗原は嗅覚受容においても何らかの役割を果たしていることが示唆された。卵巣においては、最初に卵原細胞から染色前期にある卵母細胞の細胞質部分に発現し、周辺前期から卵黄胞期へと発達するにつれて抗原の局在部位が細胞質及び核の両者から、核のみへと変化することが示された。卵黄形成が始まると抗原の局在はほとんど観察されなくなった。このことから、TAT-10 抗原は卵巣においては卵黄形成前の卵細胞の成長に関わっていることが示唆された。

数種の硬骨魚類の精漿中における精子運動抑制因子はカリウムイオンや精漿の持つ浸透圧であることが知られている。しかし、テラピア精漿中の抑制因子はどちらにも属さないことが予備的実験により確かめられた。また、哺乳類ではタンパク性の運動抑制因子が精漿中に存在していることが知られている。加えて、TAT-30 抗原が精漿中に分泌される型のタンパクであることから、精漿中での精子運動抑制とこの抗原との関連について調べた。部分精製した精漿タンパク成分は濃度依存的に精子運動を抑制し、また、この抑制活性は TAT-30 処理により顕著に減少した。このことから、TAT-30 抗原は精漿中に存在し、精子運動抑制因子の一つとして機能していることが示された。精漿を Superose 6 を用いたゲル濾過により分画し、TAT-30 陽性画分を検索した結果、この運動抑制因子の本体は分子量約 2,000,000 の高分子タンパクであることが示された。また、免疫沈降反応法によりこの因子は、TAT-30 抗原 (120kDa)、27kDa 及び 18kDa タンパクがモル比 1: 1: 1 で構成されていると推察された。また、レクチンを用いた糖鎖の検索により TAT-30 抗原は少なくとも *Lens culinaris agglutinin* (LCA) 親和性糖鎖を持っていることが示された。免疫電顕による観察の結果、TAT-30 抗原はセルトリ細胞によりさかんに分泌されることが示された。同時に、ライソゾーム上にも局在が認められたことから、余剰分、あるいは退行した抗原がさかんに取り込まれていることも示唆された。

以上の結果より、今回検索を行なった精子自己抗原は精子運動に関与するタンパクであることが示された。TAT-20 及び TAT-21 認識抗原の機能については今後の課題として残された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 内 皓 平  
副 査 教 授 山 崎 文 雄  
副 査 講 師 足 立 伸 次

## 学位論文題名

Studies on the functions of sperm autoantigens  
in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*

(ナイルテラピア精子自己抗原の機能に関する研究)

水産有用魚種の一つであるナイルテラピアの養殖においては、本種の強い繁殖力に由来する密殖により魚体の不均一化を生じることが問題点の一つとして指摘されており、そのため、密殖防止を目的とした雄の生殖の人為的統御法の確立は重要な課題の一つである。そこで、本研究では、最終成熟及び受精の分子機構に関する基礎的知見を得ることを目的として、本種の精子変態期に発現するタンパク質精子自己抗原に対するモノクローナル抗体を作製して、この抗体を用いた機能の解析を試みた。

界面活性剤を用いて可溶化したテラピア精子膜タンパク画分から、テラピア精子自己抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより自己抗原を精製した。この自己抗原画分を Balb/c 雌マウスに免疫してモノクローナル抗体の作製を試み、4 種類の抗体を得た。一つ目の抗体は 27kDa タンパクを認識し、また免疫組織学的検索により、この抗原は精子の特に中片域、精子変態後期の精細胞、A 及び初期 B 型精原細胞に局在することが示された。二つ目の抗体は 80kDa 及び 30-40kDa の複数のタンパクを認識し、三つ目の抗体は 80kDa のタンパクのみを認識した。これらの抗原は共に精子変態後期の精細胞及び精子頭部に局在していた。四つ目の抗体は 120kDa のタンパクを認識し、その抗原は精子頭部及びセルトリ細胞、輸精管上皮細胞に局在が認められた。これらの抗体は Testicular Antigen of Tilapia の頭文字をとり、それぞれ TAT-10, TAT-20, TAT-21及び TAT-30 と命名した。

次に、これらの抗体が認識する抗原の機能について調べた。まず、テラピア卵巢腔液の精子運動延長活性と TAT-10 抗原との関連について調べた。まず、卵巢腔液中に精子運動延長因子が存在しているか否かを調べた結果、卵巢腔液を含むバッファで希釈した精子は、バッファのみで希釈した精子と比較して一定時間後に有意に高い運動比率を示したことから、テラピア卵巢腔液中にも精子運動延長因子が存在していることが示された。次に、精子を TAT-10 処理した結果、この因子による運動延長が有意に抑制された。また、対照群として TAT-21 処理した精子においては、この因子による運動延長抑制は認められなかった。この結果より TAT-10 抗原が、卵巢腔液中の運動延長因子の受容体であることが示唆された。

TAT-10 抗原の組織特異性について、イムノプロット法により調べたところ、精巢の他に、嗅覚系及び卵巢において同一分子量 27kDa のタンパクとして存在していることが示された。嗅覚系及び卵巢における TAT-10 抗原の局在部位を免疫組織化学的に検索した結果、嗅覚系においては嗅細胞の核に特に強い局在が認められ、このほか嗅神経束及び嗅球に入り込む軸索部分に局在が認められた。この結果より、TAT-10 抗原は匂い受容においても何らかの役割を果たしていることが示唆された。卵巢においては、最初に卵原細胞から染色前期にある卵母細胞の細胞質部分に発現し、周辺前期から卵黄胞期へと発達するにつれて抗原の局在部位が細胞質及び核の両者から、核のみへと変化することが示された。卵黄形成が始まると抗原の局在はほとんど観察されなくなった。このことから、TAT-10 抗原は卵巢においては卵黄形成前の卵細胞の成長に関わっていることが示唆された。

次に、精漿中での精子運動抑制と TAT-30 抗原との関連について調べた。部分精製した精漿タンパク成分は濃度依存的に精子運動を抑制し、また、この抑制活性は TAT-30 処理により顕著に減少した。このことから、TAT-30 抗原は精漿中に存在し、精子運動抑制因子の一つとして機能していることが示された。精漿を Superose 6 を用いたゲル濾過により分画し、TAT-30 陽性画分を検索した結果、この運動抑制因子の本体は分子量約 2,000,000 の高分子タンパクであることが示された。また、レクチンを用いた糖鎖の検索により TAT-30 抗原は少なくとも *Lens culinaris agglutinin* (LCA) 親和性糖鎖を持っていることが示された。以上の結果より、今回検索を行なった精子自己抗原は共に精子運動に関与するタンパクであることが示された。

上述のように、ナイルテラピア精子自己抗原の機能解析より得られた結果は、魚類の生殖生理機構を知るうえで重要な示唆を与えるに留まらず、増養殖における生殖の人為的統御法確立のための基礎的資料を提供したのものとして高く評価され、本論文が博士（水産学）の学位請求論文として相当の業績であると認定した。