

Study on Phosphorylation and Dephosphorylation of Sperm Proteins

(精子細胞内タンパク質のリン酸化・脱リン酸化に関する研究)

学位論文内容の要旨

受精は精子細胞と卵細胞の誘引に始まり、両細胞の融合を経て、核の融合をもって終了する。この過程で、精子細胞は卵外被を構成する物質により、代謝の活性化や精子先体反応等の受精の成立に必要な作用を受けるものと考えられている。ウニ卵外被を構成する物質として、精子活性化ペプチド (SAP) とフコース硫酸タンパク質複合体 (FSG) とシアロ糖タンパク質の3種類が明らかにされている。SAPはアミノ酸10残基程度のペプチドであり、弱酸性海水中で精子細胞の呼吸活性を促進し、精子細胞内cAMPおよびcGMP濃度の上昇を引き起こす。FSGは精子先体反応を誘起し、精子細胞内cAMP濃度の上昇を引き起こす。本研究では卵外被物質の作用機構の解明を目的とし、サイクリックヌクレオチド濃度により調節される精子細胞内タンパク質のリン酸化反応の解析を行った。

バフンウニ精子のCHAPS抽出液中に $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPを添加し、リン酸化タンパク質の検出を試みた結果、2種類のタンパク質 (48 kDa, 33 kDa) がリン酸化された。33 kDaタンパク質のリン酸化は100 mM Mg^{2+} の存在条件下でcAMPまたはcGMPにより誘起されたが、48 kDaタンパク質のリン酸化は Mg^{2+} 濃度に関係なく誘起された。リン酸化された48 kDaタンパク質は反応液中にcAMPまたはcGMPを加えることにより、脱リン酸化された。さらに、この脱リン酸化はプロテインホスファターゼ阻害剤のカリキュリンAとオカダ酸により阻害された。48 kDa タンパク質は39 kDa タンパク質と複合体を形成しており、ゲル濾過による分子量の推定では400 kDa の位置に溶出されることが明らかとなった。精製した400 kDaオリゴマーはcAMP依存性ヒストンキナーゼ活性を示し、高リシン型の仔牛胸腺ヒストン (H1, H2B) をよくリン酸化した。5 μM cAMPを含む溶出バッファーで平衡化したカラムでゲル濾過を行ったところリン酸化活性は39 kDa タンパク質にあることが明らかとなった。48 kDa タンパク質のリン酸化は精製した400 kDa オリゴマー単独でも起こる事と、光親和性cAMPアナログが48 kDa タンパク質に結合する事から、48 kDa タンパク質はヒストンキナーゼの調節サブユニットであり、自己リン酸化を受ける事が示唆された。ヒストンキナーゼオリゴマーの自己リン酸化した48 kDa 調節サブユニットへcAMPが結合することで、39 kDa 触媒サブユニットとの解離が起こり、プロテインホスファターゼが48 kDa サブユニットに接触できるようになるものと考えられた。

ヒストンキナーゼの性質について更に検討を行った。分子量は、SDS を含まない電気泳動により 178kDa と推定された。バフンウニ精子頭部より精製したヒストンを基質として、

基質特異性を再検討したところ、同じく高リシン型のヒストン H1、H2B をよくリン酸化した。このキナーゼは四量体と思われ、このキナーゼの精子細胞内局在性を検討した結果、大部分の活性が可溶性分画に存在し、顆粒膜分画にもわずかに活性が存在することが明らかとなった。次に、このヒストンキナーゼのクローニングを行った。39 kDa サブユニットのcDNAは全長 3881 bpであり、オープンリーディングフレーム (ORF) より 352 残基のタンパク質が推定された。これらのアミノ酸配列は、哺乳類の cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) の触媒サブユニットに約 78 % の相同性を示した。PKAの触媒サブユニットのデンドログラムは、*Drosophila*と線虫 (*Caenorhabditis elegans*) がバフンウニよりも哺乳類に近縁であることを示唆していた。48 kDa サブユニットのcDNAは全長 4589 bp であり、ORF より368 残基のタンパク質が推定された。このアミノ酸配列は、ヒトの PKA の II β 型調節サブユニットに最大 57 % の相同性を示したが、1-77 残基のアミノ酸配列は相同性が低く、かつ 33 残基の欠失構造が見られた。PKAの調節サブユニットのデンドログラムは、バフンウニが*Drosophila*と線虫 (*Caenorhabditis elegans*) よりも哺乳類の II 型調節サブユニットに近縁であることを示唆していた。ノーザン解析を行った結果、39 kDa 触媒サブユニットについては 7.5 kb、48 kDa 調節サブユニットについては 4.6 kb の mRNA の存在がバフンウニの精巣、卵巣および未受精卵の組織において確認された。アミノ末端に特徴的な1次構造を持つバフンウニの 48 kDa 調節サブユニットを用いて、ウシ心臓PKA の触媒サブユニットとの会合実験を行った結果、cAMP により活性が調節される高分子量の複合体が形成された。この結果から、ヒストンキナーゼの48 kDa 調節サブユニットの1-77残基のアミノ酸配列は、触媒サブユニットの活性調節に必須ではないことが示唆された。触媒サブユニットの活性調節のためには、77残基 (障害部位) 以降のアミノ酸配列が関与している可能性が示唆された。

次に、サイクリックヌクレオチド濃度に依存して、自己リン酸化したヒストンキナーゼの48 kDa 調節サブユニットを脱リン酸化するプロテインホスファターゼの検討を行った。バフンウニ精子および精子尾部抽出液からイオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過により、 ^{32}P -ヒストンを基質として5種類、パラニトロフェニルリン酸を基質として2種類の合計7種類のプロテインホスファターゼを分離した。顆粒膜分画中には哺乳類の1型と2B型に相当するプロテインホスファターゼが存在し、可溶性分画中には哺乳類の2A型と2C型に相当するプロテインホスファターゼが存在した。分子量43 kDa の哺乳類の1型プロテインホスファターゼに相当する酵素は、バフンウニ精子より精製したcAMP依存性ヒストンキナーゼの、自己リン酸化を起こした48 kDa 調節サブユニットを脱リン酸化した。しかしながら、この酵素による脱リン酸化はcAMPにより調節を受けておらず、別の種類のプロテインホスファターゼがあることが示唆された。

以上の研究の成果から、バフンウニ精子の抽出液中で $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ によりリン酸化される48 kDa タンパク質はcAMP依存性ヒストンキナーゼの調節サブユニットであり、そのリン酸化反応は自己リン酸化であることを決定できた。また、cAMP依存性ヒストンキナーゼの触媒サブユニットと調節サブユニットの全1次構造を推定でき、分類学上の門の異なるウシPKAとのサブユニットの再構成実験から、調節サブユニットの活性の発現に必要と思われる1次構造上の領域を推定できた。さらに、バフンウニ精子中に少なくとも7種類のプロテインホスファターゼが存在することを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 範 男
副 査 教 授 片 桐 千 明
副 査 教 授 高 橋 孝 行
副 査 助 教 授 山 下 正 兼

学 位 論 文 題 名

Study on Phosphorylation and Dephosphorylation of Sperm Proteins

(精子細胞内タンパク質のリン酸化・脱リン酸化に関する研究)

近年、ヒトを含めた高等動物の受精に関する研究が盛んである。しかし、その多くは医学的あるいは競走馬の品種改良などを家畜学的成果を目的としたもので、受精機構の分子・生化学的解明を目指した研究は未だ十分に進んでいるとは言えず、今後の発展が待たれる状況にある。

本論文は、受精現象が初めて発見された動物種である棘皮動物門に属するウニを用いて、受精時における精子と卵の相互作用をタンパク質のリン酸化・脱リン酸化の側面から分子・生化学的検討を加えたものであり、生殖生物学上有益な成果を得ている。

受精に際して、精子は卵の作用を受け、細胞内の代謝活性が増加する。これには細胞内二次伝達物質である環状ヌクレオチド (cAMP, cGMP) が密接に関与している。本学位論文はこの二次伝達物質の1種である cAMP によって、活性調節を受けるタンパク質キナーゼの生化学的及び分子生物学的性質を明らかにしている。すなわち、このキナーゼは 48 kDa 及び 39 kDa の2種類のサブユニットが2つずつ計4つで構成されているヘテロ複合体であり、48 kDa サブユニットは cAMP 結合能を示す調節サブユニットで、39 kDa サブユニットは他のタンパク質をリン酸化する触媒サブユニットであることを明らかにしている。また、48 kDa サブユニットは自己リン酸化され、cAMP 結合によって活性化されるときには 39 kDa 触媒サブユニットから解離することも明瞭に示している。一方、自己リン酸化された 48 kDa サブユニットは精子細胞内に7種存在するプロテインホスファターゼのうちの1種によって脱リン酸化され、元の状態になることも明らかにしている。

さらに、分子クローニングの結果、39 kDa サブユニットの cDNA は 3881 bp で、352 残基のアミノ酸から構成されており、最尤法による類似性解析の結果ショウジョウバエや線中の cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) の触媒サブユニットよりも哺乳類の PKA の触媒サブユニットに分子系統学的に近縁であり、48 kDa サブユニットの cDNA は 4589 bp で 368 残基のアミノ酸からなり、ヒトの PKA の II β 型調節サブユニットに最大 57% の相同性を示したが、1-77 残基アミノ酸配列は相同性が低く、かつ 33 残基の欠失が見られることが明らかにされている。最尤法による類似性解析の結果は 39 kDa サブユニットの場合と同じであり、ウニ類は進化上哺乳類に近縁であるという、形態学的知見とも一致する結果を得ている。これらのサブユニットに翻訳される遺伝子の直接産物である mRNA は精巣、卵巣に認められ、その大きさは、39 kDa サブユニットについては 7.5 kb、

48 kDa サブユニットについては 4.6 kb であることも明らかにしている。加えて、サブユニットの一次構造（特にアミノ末端部に）に大きな違いがあるにもかかわらず、ウニの 48 kDa 調節サブユニットとウシ心臓 PKA の触媒サブユニットは会合し、cAMP による活性調節を受ける複合体を形成することを明らかにしている。

これらは哺乳動物の受精機構の基礎的研究にも適用できる新知見であり、受精の分子的機構の解明に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格があるものと認める。