

学 位 論 文 題 名

Studies on the Mechanisms of Fertilization Envelope Formation in the Sea Urchin Eggs

（ウニ卵における受精膜形成機構に関する研究）

学位論文内容の要旨

近年、ヒトを含めた哺乳動物の生殖・発生に関する研究は活発であるが、個体発生の出発点である受精の化学的機構については不明な点が多い。卵は成熟して初めて受精可能となる。成熟卵は、引き金があれば賦活され、受精膜形成を含む一連の受精反応を起こす能力を持つ。精子の働きの一つはその引き金を引く事である。既知の因子で人工的に卵を賦活する事で精子の働きを真似し、引き金が何かを調べる方法がある。1887年に発表された O. Hertwig 及び R. Hertwig による人工的卵賦活実験以来、多くの物質によってあるいは機械的刺激によって卵が賦活される事が示された (Harvey, 1956)。卵賦活の機構についての統一的な説明は未だになされていないが、卵の賦活から受精膜形成までに、次のような一連の反応が起こると考えられている (Trimmer and Vacquier, 1986; Berridge, 1993)。① 精子と卵表面に存在する精子受容体との結合、② G タンパク質 (あるいは Tyrosine kinase) の活性化、③ Phospholipase C (PLC) の活性化、④ IP_3 の細胞質内増加、⑤ 小胞体からの Ca^{2+} の遊離、⑥ 表層顆粒の開口分泌、⑦ 受精膜の形成。

しかし、(1) 引き金とは何か、(2) それはどのように引かれるのか、という問題については未解決であり、(3) 上記の ①-⑦ の経路が唯一のものかどうか、についても明確な実験的証拠があるわけではない。現在まで、ウニ精子から卵賦活能を持つ物質は精製されていない。従って、これらの問題を解決する手段として、新しい人工賦活剤の開発は不可欠である。本研究は、受精研究では輝かしい成果をあげてきたウニ卵を用い、新しい人工賦活剤の探索からはじめ、賦活剤の作用機構を解析する事によって、(1) - (3) の問題を解析する事を試みた。

第1章：バフンウニ卵に受精膜形成を誘起するオニコンブ由来のレクチン様タンパク質、Diabolin の発見

バフンウニ成熟卵をオニコンブ葉状部の海水抽出物で処理すると受精膜が形成された。しかし、この抽出物はエゾバフンウニ及びキタムラサキウニ卵には無効であった。抽出液を 60°C、5 分間熱処理すると受精膜形成能が失われたので、有効物質はタンパク質性で、しかも精製に使用を試みた Sephadex gel をカラム内で凝集させる性質を持つことから、レクチン様物質であると推測し、レクチンを不活性化させる各種の糖存在下でのオニコンブ抽出液によるバフンウニ未受精卵への受精膜形成能を検討した。その結果、GlcNAc が最も強い抑制効果を示した。レクチンによるウニ卵の賦活についての報告は皆無であったので、この有効物質を新しい人工賦活剤として利用することを目的に、この物質の精製を試みた。

80%飽和硫酸沈殿後、TSK gel DEAE-Toyopearl 650M、TSK gel Toyopearl HW-55F、TSK gel AF-Blue Toyopearl 650ML による chromatography を行い、native PAGE 的に単一の Coomassie brilliant blue 染色バンドになるまで精製した。精製物質 (タンパク質) のゲル濾過による推定分子量は 120 kDa で、100%受精膜形成を起こす最低濃度は 0.5 μ g/ml であった。精製物質による受精膜形成能は GlcNAc によって最も強く抑制され、精製物質 4.2 μ g/ml による受精膜形成能は 24 μ M の GlcNAc で完全に抑制された。しかし、同じ抑制効果を示すためには GlcN

は GlcNAc の 2,000 倍の濃度を必要とした。なお、GlcNAc は精子による受精膜形成は抑制しなかった。精製物質に対する抗ウサギ抗体を用いての免疫組織化学的検討によって、この物質はオニコンブの粘液腔道を構成する細胞が腔道内に分泌したものであることが明らかになった。この物質は血球凝集は起こさないの、レクチンとは断定できないが、レクチン様タンパク質と結論し、Diabolin と命名した。

非ジヒドロピリジン系の 2 種類の Ca^{2+} -チャンネル阻害剤 (Diltiazem、Verapamil) を用いて Diabolin の作用機構を検討した結果、200 μM の Diltiazem による前処理卵での Diabolin による受精膜形成率は 14% で、先体反応後の精子による受精膜形成率は 63% であった。また、500 μM の Diltiazem による前処理卵での Diabolin による受精膜形成率は 0% で、先体反応後の精子による受精膜形成率は 27% であった。一方、200 μM の Verapamil による前処理卵では Diabolin による受精膜形成率は 27% で、先体反応後の精子による受精膜形成率は 92% であった。更に、500 μM の Verapamil 前処理卵では、Diabolin 及び先体反応後の精子による受精膜形成率は共に 0% であった。Verapamil 存在下では、受精膜形成の有無に関らず媒精 90 分後に約 30% の卵に細胞分裂が認められたので、精子の侵入は起こっているものと考えられる。

ウニ卵は脱分極性の外向き電流によっても、細胞外液の K^+ 濃度を高くしても活性化されない (Jaffe, 1976; Hagiwara and Jaffe, 1979) ことが広く認められているので、卵の電位依存性 Ca^{2+} チャンネルは受精時には働いていないと考えられている。上記の定説を踏まえ、本研究の結果を以下に考察する。

Diabolin は、卵表面に存在すると考えられる Diabolin レセプター作動性 Ca^{2+} チャンネルを開口し、細胞外 Ca^{2+} の細胞内への流入を促進させ、受精膜形成を引き起こすものと考えられる。GlcNAc は Diabolin による受精膜形成を抑制するが、精子による受精膜形成を抑制しないことから、Diabolin が受精膜形成において精子を完全に mimic しているとは言えないが、両者は部分的に類似の作用機構を持ち、同一の Ca^{2+} チャンネルの開口に関与しているものと考えられる。Diabolin の効果に種特異性があることは、精子との類似点であり、Diabolin の作用が精子受容体を介していることも考えられる。従って、卵賦活の引き金は、① 種特異的糖鎖を持つ卵表面の精子受容体であり、② 精子が持つレクチンあるいはレクチン様の物質によって引き金が引かれ、③ レセプター作動性 Ca^{2+} チャンネルの開口によって引き起こされるものと推測する。

第 2 章：細胞内フッ素イオン (F^-) によるウニ卵の受精膜形成

1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB) をエゾバフンウニ卵に与えると受精膜が形成された。100% 受精膜形成を起こす FDNB の濃度は 0.1 mM であった。FDNB はバフンウニ、キタムラサキウニ卵にも受精膜形成を誘起した。しかし、FDNB のフッ素の位置が塩素に置き換わった 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) には受精膜形成能は認められず、しかも卵懸濁液に加えた NaF では受精膜は形成されなかった。FDNB は SH 基と結合してフッ素イオン (F^-) を放出することが知られているので (Wallenfels and Streffer, 1965; Gold, 1968)、FDNB による受精膜形成は FDNB から放出されたフッ素イオンに起因するものと推測される。また、L-cysteine 存在下で媒精した場合は受精膜は形成されたが、FDNB による受精膜形成は起こらなかった。更に、SH 基阻害剤である iodoacetamide で前処理した卵を媒精した場合、受精膜は形成されたが、FDNB によっては受精膜は形成されなかった。これらの結果は、細胞内のフッ素イオンは表層反応のある段階を促進するが、細胞外のフッ素イオンは無効であることを示す。

受精膜形成におけるフッ素イオンの作用点を特定するために、 Ca^{2+} -ionophore の一種である ionomycin (Liu and Hermann, 1978) と FDNB の受精膜形成に対する作用効果を、細胞内 Ca^{2+} の移動を阻害することが知られている TMB-8 (Stapleton *et al.*, 1985) で前処理した卵について比較検討した。0.2 mM TMB-8 存在下では、FDNB による受精膜形成率は 0% であったが、ionomycin による受精膜形成率は 60% あった。Cytochalasin B 前処理卵では ionomycin による受精膜形成は完全に阻害され、FDNB についても同様であった。 Ca^{2+} -ionophore の作用点は IP_3 の作用点と同じであることが知られているので、上記の結果は細胞内フッ素イオンの作用点が IP_3 の産生以前の段階にあることを示すと思われる。

以上、本研究で明らかにされた Diabolin と FDNB によるウニ未受精卵への受精膜形成は動物卵一般における受精膜形成機構の研究の発展に貢献するだけでなく、未だ完全には理解されていない精子による卵賦活機構の解明に資するものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 範 男

副 査 教 授 山 下 正 兼

副 査 助 教 授 清 水 隆

副 査 主任研究員 野 村 晃 司(東京都老人総合研究所)

学 位 論 文 題 名

Studies on the Mechanisms of Fertilization Envelope Formation in the Sea Urchin Eggs

(ウニ卵における受精膜形成機構に関する研究)

近年、ヒトを含めた哺乳動物の生殖・発生に関する研究は活発であるが、個体発生の出発点である受精の分子機構については未だ不明な点が多い。卵は成熟して初めて受精可能となり、成熟した卵は精子の接近、結合によって賦活され、受精膜形成を含む一連の化学反応を起こし、精子・卵両細胞の融合(受精)に至る。即ち、受精における精子の働きの一つは卵を賦活させる事である。19世紀後半から既知の物質によって人工的に卵を賦活する事で精子の受精における役割の1つを真似し、卵の賦活から受精膜形成に至る機構を調べる研究が行われてきた。その結果、卵賦活の機構についての統一的な説明は未だになされていないが、卵の賦活から受精膜形成までに、次のような一連の反応が起こると考えられている:① 精子と卵表面に存在する精子受容体との結合、② Gタンパク質(あるいはチロシンキナーゼ)の活性化、③ ホスホオリパーゼC(PLC)の活性化、④ イノシトールトリスリン酸(IP₃)の細胞質内増加、⑤ 小胞体からのCa²⁺の遊離、⑥ 表層顆粒の開口分泌、⑦ 受精膜の形成。しかし、(1) 卵の賦活は何によって引き起こされるか、(2) それはどのような仕組みなのか、という問題は未解決であり、(3) 上記の①-⑦の経路が唯一のものかどうか、についても明確な実験的証拠が提出されていない。その1つの理由は、卵の賦活を容易に引き起こす人工賦活剤が無いことにあるものと考えられる。本学位論文は、受精の研究に頻用され、輝かしい成果をあげてきたウニ卵を用い、新しい人工賦活剤の探索からはじめ、賦活剤の作用機構を解析する事によって、(1)-(3)の問題を解析する事を試みたもので、2つの章から構成されている:第1章は「パフンウニ卵に受精膜形成を誘起するオニコンブ由来のレクチン様タンパク質、Diabolinの発見」、第2章は「細胞内フッ素イオン(F⁻)によるウニ卵の受精膜形成」に関するものである。

第1章では、パフンウニ成熟卵をオニコンブ葉状部の海水抽出物で処理すると受精膜が形成されるという発見に端を発して、この有効物質を精製し、有効物質の本体(Diabolinと命名)が分子量120 kDaのレクチン様タンパク質であることを明ら

かにし、このタンパク質を用いた研究から、卵賦活は、① 種特異的糖鎖を持つ卵表面の精子受容体に、② 精子が持つレクチンあるいはレクチン様の物質の結合によって開始され、③ 受容体作動性 Ca^{2+} チャンネルの開口によって引き起こされる示唆した。

第2章では、1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB) をエゾバフンウニ卵に与えると受精膜が形成されるという発見に端を発して、この機構を詳細に調べ、細胞内のフッ素イオンが細胞内二次伝達物質の1つである IP_3 の産生以前の段階で表層反応を促進することによって引き起こされることを明らかにした。

以上、本学位論文で明らかにされた Diabolin と FDNB によるウニ未受精卵への受精膜形成は動物卵一般における受精膜形成機構の研究の発展に貢献するだけでなく、未だ完全には理解されていない精子による卵賦活機構の解明に資するものと考えられる。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あるものと認める。