

## 論文内容の要旨

### Studies on the Cell Signaling for the Activation of Sperm Motility in Ascidian.

(ユウレイボヤ精子運動活性化に関与する細胞  
内情報伝達機構に関する研究)

氏名 野村 守

脊索動物門尾索亜門カタクウレイボヤ(*Ciona intestinalis*) 及びユウレイボヤ(*C. savignyi*) の精子は通常海水に懸濁された状態では運動を停止している。この運動停止精子は両種の未受精卵より放出される精子活性化誘因物質(Sperm-activating and -attracting factor, SAAF)によって種非特異的に運動を開始・活性化し、更に SAAF の濃度勾配に従って走化性を示し、卵へと達する(Yoshida et al, 1993, Dev. Biol.)。この運動活性化に関しては精子細胞外の  $Ca^{2+}$  の流入と cAMP 濃度の上昇(Yoshida et al., 1994, Dev. Growth Differ.) 及び細胞膜の過分極による cAMP 合成(Izumi et al., 1999, Dev. Biol.) が関与している。しかし、 $Ca^{2+}$  が関与する細胞内情報伝達機構及び cAMP に依存するタンパク質のリン酸化が関与する細胞内情報伝達は未知である。本博士論文の第 1 部では、SAAF により合成された cAMP によりタンパク質リン酸化酵素の活性化がおこること、この酵素による分子量 21kDa および分子量 26kDa タンパク質のリン酸化が最終的に引き金となり精子運動活性化が起こることを明らかにし、またこれらのリン酸化タンパク質の精子活性化への関与の相互関係についても明らかにした。第 2 部では、SAAF の作用によって細胞内へ流入した  $Ca^{2+}$  がカルモジュリンに作用し、カルモジュリン依存性リン酸化酵素を活性化し、 $K^+$  チャンネルなどのタンパク質のリン酸化を介して細胞膜の過分極を引き起こし、それが第 1 部で明らかとなった cAMP 依存の精子活性化の細胞情報伝達の引き金を引き、精子を活性化することを明らかにした。

#### 第 1 部 精子運動活性化を制御するリン酸化タンパク質の同定とその性質

界面活性剤 TritonX-100 により細胞膜を除去したカタクウレイボヤの除膜精子は、ATP のみでは運動せず、cAMP により運動した。一方 SAAF により活性化した後除膜した精子は、cAMP なしで運動すること、 $Ca^{2+}$  欠如海水中で SAAF によって処理した精子は運動しないが、その除膜精子もその運動に cAMP を必要とした。(表 1)。この結果は cAMP が精子活性化に必須であることを示している。次に、精子そのものを  $^{32}P$  リン酸を含む海水中に懸濁し静置しておき、 $^{32}P$  を取り込ませた後 SAAF により精子を活性化し、この精子のタンパク質のリン酸化をオートラジオグラフィーにより調べ、リン酸化が顕著であるタンパク質バンドの  $^{32}P$  の取込みをシンチレーションカウンターで測定した。その結果、34kDa、26kDa および 21kDa タンパク質のリン酸化が顕著であった。更に、図 1 に見られるように静止精子を TritonX-100 で除膜した場合、34kDa、26kDa、21kDa のタンパク質分子はリン酸化されるが、この 3 つのタンパク質のうち 26kDa タンパク質と 21kDa タンパク質では SAAF により運動活性化した後に作成した除膜精子では  $^{32}P$  の取込みが見られなかった。これらの結果から、21kDa 及び 26kDa タンパク質のリン酸化が精子運動活性化を直接制御していると結論した。また cAMP を作用させ 5 秒後に 26kDa タンパク質が、10 秒後に 21kDa タンパク質がリン酸化されることも明らかとなった。

更にこれらのリン酸化タンパク質の同定を試みた。21kDa タンパク質は 0.6MKCl によって鞭毛軸系から可溶化することができた。この 0.6MKCl 可溶性画分をショ糖密勾配遠心によって分離し、ダイニン ATPase 活性を測定したところ、21kDa タンパク質は鞭毛外腕ダイニンと挙動を共にした(図 2)。この結果から 21kDa タンパク質は鞭毛外腕ダイニンの軽鎖であり、そのリン酸化反応が鞭毛運動開始に深く関与していると考えられる。

一方、軸系に強固に結合しているため可溶化できないなどの理由で、26kDa タンパク質の分子の同定

は未だ成功していない。そこで、cDNA 塩基配列を基としたデータベース検索を目的として 26kDa タンパク質のアミノ酸配列の決定を試みた。そのために 26kDa タンパク質の精製条件について検討したところ、このタンパク質は低イオン強度溶液では可溶化されないが、8M 尿素で水素結合を切断することにより可溶化することが明らかとなった。さらに DEAE-Sepharose CL-6B クロマトグラフィーによって、尿素処理以前に 26kDa タンパク質に強固に結合していたチューブリンを除去することができた。さらに CM-Cellulofine クロマトグラフィーによって 26kDa タンパク質の濃縮を行い、Sepharose CL-6B によるゲル濾過によって市販の PKA によってリン酸化される 26kDa タンパク質を部分精製することに成功した。この部分精製標品および精子鞭毛軸系内で *in situ* のリン酸化を受けた 26kDa タンパク質を共泳動した結果、これら両者が同一のタンパク質であることも確認された。

以上の結果から、SAAF により、鞭毛軸系に強固に結合したタンパク質で PKA の直接の基質となりうる分子、26kDa タンパク質、が最初にリン酸化を受け、続いてダイニン軽鎖である 21kDa タンパク質がリン酸化され、この細胞内情報伝達経路がユウレイボヤ精子運動活性化の最終段階を担うことが明らかとなった。

表 1 SAAF により運動を活性化した後作成した除膜精子運動性に対する cAMP の効果

精子懸濁液	除膜前の精子運動性	除膜精子への cAMP 添加の有無	除膜精子運動性 (%)*
-SAAF, ASW	-	-	0
-SAAF, ASW	-	+	52.5 ± 6.5 **
+SAAF, ASW	+	-	66.7 ± 6.9 **
+SAAF, CFSW	-	-	0
+SAAF, CFSW	-	+	57.7 ± 6.2 **

ASW; 人工海水 CFSW; Ca<sup>2+</sup>欠如海水

全ての再活性化溶液は 100μM ATP を含む。

\* 精子運動性は cAMP (+) または DDW (-) 添加後 60 秒の時点で測定した。

\*\* 値は平均 ± 標準誤差 (n=3)

除膜前の処理条件	ASW -SAAF	ASW -SAAF	ASW +SAAF	CFSW +SAAF
除膜前の精子運動性	-	-	+	-
再活性化条件	-cAMP	+cAMP	+cAMP	+cAMP
除膜精子の運動性	-	+	+	+

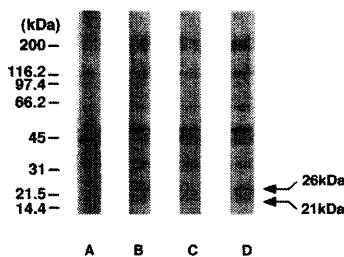


図 1 運動前と運動後の精子より作成した除膜精子におけるタンパク質のリン酸化。海水(ASW)中で運動を停止している精子(A,B)、SAAF を含む海水に懸濁し活性化した精子(C)、及び Ca<sup>2+</sup> 欠如海水(CFSW)に懸濁し SAAF によっても運動を示さない精子(D)より作成した除膜精子を [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP を含む溶液中で再活性化し、精子タンパク質を SDS-PAGE により分離しオートラジオグラフィーによりリン酸化タンパク質を検出した。21kDa、26kDa タンパク質は cAMP 依存的にリン酸化される(A,B)。しかし、SAAF で活性化した後の精子より作成した除膜精子では cAMP による 21kDa、26kDa タンパク質のリン酸化は見られない(C)。このことは、SAAF による精子活性化によって、これらタンパク質のリン酸化が予め起こり、除膜精子での新たなリン酸の取り込みが阻害されたと考えらる。すなわち、21kDa、26kDa 両タンパク質のリン酸化が精子活性化に必須であることが示唆された。また(D)の結果はこれらタンパク質のリン酸化は細胞外 Ca<sup>2+</sup> により調節されていることを示している

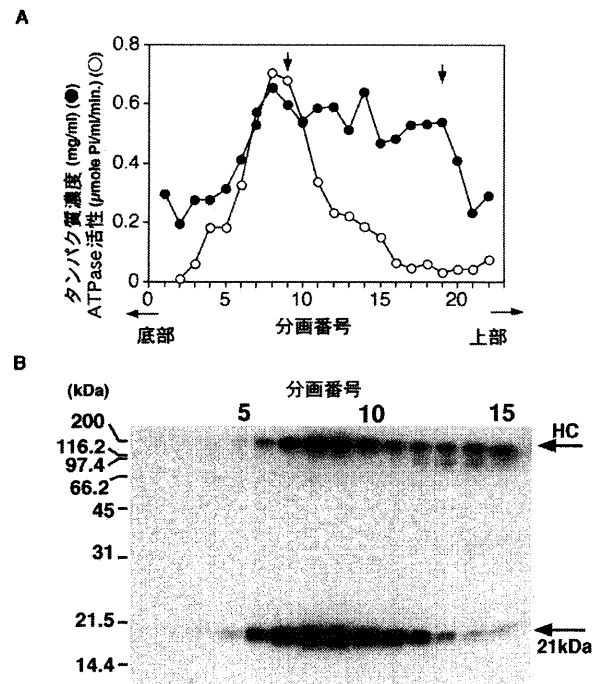


図 2 0.6M KCl で抽出し、<sup>32</sup>P で標識した軸系タンパク質の 5-20% ショ糖密度勾配遠心による分画。A ; 各分画のタンパク質濃度(●)とダイニン ATPase 活性(○)。ATPase 活性は沈降係数 20 S 画分にみられた。矢印は沈降定数 19 S と 11.3 S を示す。B ; フラクション番号 2 から 15 までに含まれるタンパク質の SDS-PAGE によるオートラジオグラフィー像。21kDa タンパク質は ATPase 活性(A)と挙動を共にした。

## 第2部 精子活性化機構におけるカルシウム、カルモジュリンおよびカルモジュリン依存性キナーゼの役割

ユウレイボヤ精子は細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  流入を介した cAMP 濃度の増加に伴って運動を開始する (Yoshida, et al., 1994)。しかし、 $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内作用起点カルモジュリンの役割は不明であった。本研究ではまずユウレイボヤ精子にカルモジュリンが存在することを W-7 固定化ビーズを用いたアフィニティ沈殿によって明らかにした。更に、カルモジュリン阻害剤 W-7 及びカルモジュリン依存性キナーゼ II の阻害剤 KN-93 はそれぞれ  $25\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$  以上で顕著に SAAF による精子運動活性化を阻害すること (表 2)、それぞれの不活性アナログである W-5、KN-92 は精子運動性を阻害しないことを明らかにした。また W-7、KN-93 は SAAF による精子細胞膜の過分極を阻害した (図 3)。カルモジュリン依存性脱リン酸化酵素カルシニューリンの阻害剤 Fenvalerate、Cypermethrin は SAAF による精子活性化を阻害しなかった (表 2)。以上の結果は SAAF の作用によって細胞内に流入した  $\text{Ca}^{2+}$  がカルモジュリンを介して CaMKII を活性化し、活性化された CaMKII が細胞膜の  $\text{K}^+$  透過性を調節することで膜電位の過分極を調節していることを示唆している。

一方 W-7、KN-93 存在下で運動が阻害されている精子を  $\text{K}^+$  イオノフォア Valinomycin で処理すると、精子運動性が回復し、また、この精子では細胞膜の  $\text{K}^+$  透過性が上昇し膜電位の過分極を起こし、cAMP 濃度が上昇した (図 4)。これらの結果からユウレイボヤ精子の運動活性化の細胞内情報伝達は細胞内に流入した  $\text{Ca}^{2+}$  が CaM/CaMKII を活性化し、細胞膜の過分極を引き起こし、この膜電位変化が cAMP 合成を促す順序で起こることが明らかとなった。

### 考察

以上第一部と第二部をまとめると、ユウレイボヤ精子活性化は以下のような機構のもとで起こると考えられる (図 5)。ユウレイボヤ未受精卵より放出される精子活性化誘因物質 SAAF は精子に  $\text{Ca}^{2+}$  の流入を起こす。この  $\text{Ca}^{2+}$  は  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM/CaMKII の一連の反応により細胞膜電位の変化とそれに続くアデニル酸シクラーゼの活性化、cAMP 合成を引き起こす。この cAMP は PKA を活性化し、まず鞭毛軸系の分子量  $26\text{kDa}$  タンパク質のリン酸化を引き起こす。続いて外腕ダイニンのサブユニットである軽鎖のリン酸化が起こり、精子鞭毛運動が活性化する。今後は CaMKII がどのように膜電位変化を引き起こすのかを検討する必要がある。また  $26\text{kDa}$  リン酸化タンパク質に関しては cDNA のクローニングからその同定、特徴付け及び機能の解明を行う必要がある。

表 2 カルモジュリン、カルモジュリン依存性キナーゼ II、カルシニューリン阻害剤存在下での精子運動

阻害剤	SAAF 添加後の精子運動性 (%)	バリノマイシン添加後の精子運動性 (%)
Control	$90.7 \pm 2.3$	$88.5 \pm 2.3$
$50\mu\text{M}$ W-7	$12.0 \pm 7.5$	$90.7 \pm 0.4$
$50\mu\text{M}$ W-5	$92.8 \pm 2.0$	N.D.*
$5\mu\text{M}$ KN-93	$23.8 \pm 5.3$	$89.0 \pm 7.9$
$5\mu\text{M}$ KN-92	$87.3 \pm 4.6$	N.D.*
$1\mu\text{M}$ Fenvalerate	$86.1 \pm 6.9$	N.D.*
$1\mu\text{M}$ Cypermethrin	$83.0 \pm 7.1$	N.D.*

全ての実験は人工海水中で行った。

SAAF、Val 添加後 60 秒で運動性を測定した。

\*検定せず。値は平均  $\pm$  標準誤差 (n=3)。

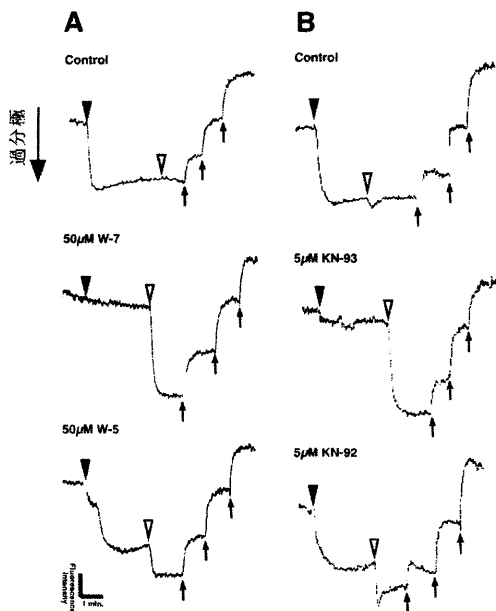


図 3 SAAF による細胞膜電位変化に対するカルモジュリン、カルモジュリン依存性リン酸化酵素 II 阻害剤の効果。A; コントロールとしての DMSO (上)、カルモジュリン阻害剤  $50\mu\text{M}$  W-7 (中)、そのアナログ  $50\mu\text{M}$  W-5 (下)、B; コントロール (上)、CaMKII 阻害剤  $5\mu\text{M}$  KN-93 (中)、そのアナログ  $5\mu\text{M}$  KN-92 (下) を含む海水中に懸濁した精子に、黒矢尻において SAAF を加えた。その後中抜き矢尻において Valinomycin を加え、続いて矢印において  $2\text{M}$  KCl を  $10\text{mM}$ 、 $20\text{mM}$ 、 $40\text{mM}$  となるように加えた。W-7、KN-93 はそれぞれ SAAF による膜電位過分極を抑制するが、W-5、KN-92 では阻害効果が見られなかった。

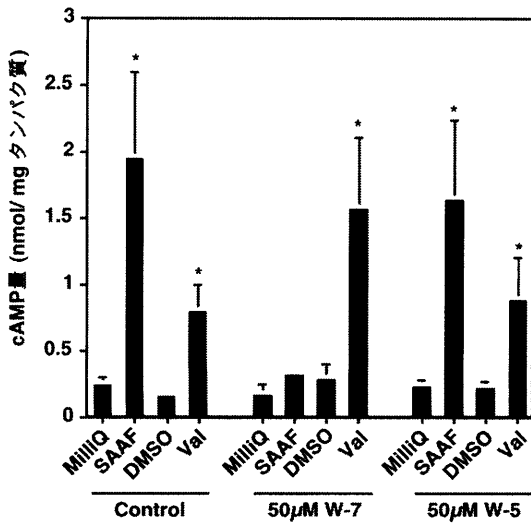


図4 SAAF による cAMP 合成に対するカルモジュリン阻害剤の効果。SAAF および Valinomycin(Val) は cAMP 量を増加させる(control)。しかし、W-7 でカルモジュリンを阻害すると SAAF による cAMP 合成が阻害される。Val はこれらの阻害を回復させる。W-7 のアナログ W-5 は SAAF による cAMP 合成を阻害しない。以上の結果を図3での結果と合わせると、カルモジュリンは膜の過分極および cAMP 合成の上流で作用していることを示唆している。

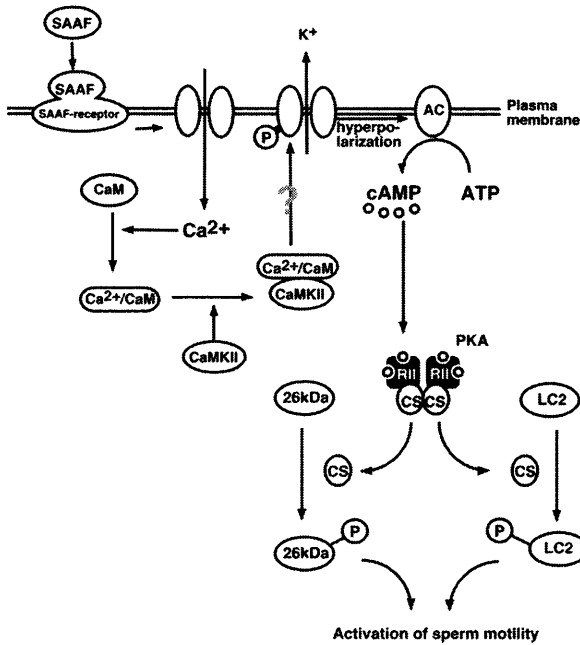


図5 SAAF による精子活性化の細胞内情報伝達機構。SAAF により  $Ca^{2+}$  チャネルを通して精子内に  $Ca^{2+}$  が流入する。この細胞内  $Ca^{2+}$  増加が起点となり  $Ca^{2+}/CaM/ CaMKII$  の一連の反応が起こり、それが  $K^+$  チャネルに作用して細胞膜の電位の変化とそれによるアデニル酸シクラーゼ(AC)の活性化を引き起こし、その結果 cAMP が合成される。細胞内で上昇した cAMP は PKA を活性化し、鞭毛軸系の分子量 26kDa タンパク質のリン酸化を引き起こし、遅れて外腕ダイニンのサブユニットである軽鎖(LC2)のリン酸化が起こる。この一連の軸系タンパク質のリン酸化によって精子鞭毛運動活性化の引き金が引かれる。