

論文審査の結果の要旨

氏名 野村 守

論文内容の要旨

本論文は2章からなり、第1章はユウレイボヤ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、第2章は精子活性化機構におけるカルシウム (Ca^{2+})、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について述べられている。

2種のユウレイボヤ、*Ciona intestinalis*, *C. savignyi* の精子は海水中では運動を停止しており、未受精卵より放出される精子活性化誘因物質(SAAF)によって運動を開始・活性化する。第1章では界面活性剤TritonX-100により細胞膜を除去した除膜精子は、ATPのみでは運動せず、cAMPにより運動する事、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せず、その除膜精子は運動にcAMPを必要とする事を明らかにし、 Ca^{2+} 及びcAMPが精子活性化に必須であることを示した。次に、精子に ^{32}P を取り込ませた後SAAFにより運動を活性化し、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により調べ、34kDa、26kDaおよび21kDaタンパク質のリン酸化が顕著である事、更に、除膜精子の場合、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作成した除膜精子では ^{32}P の取込みが見られない事から、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、26kDaタンパク質が21kDaタンパク質より早くリン酸化されることも明らかとした。さらに、21kDaタンパク質を0.6MKClによって鞭毛軸糸から可溶化し、可溶性画分をショ糖密度勾配遠心によって分離し、ダイニンATPase活性を測定し21kDaタンパク質が鞭毛外腕ダイニンの軽鎖であることを明らかにした。一方、軸糸に強固に結合し、可溶化できず分子の同定は困難である26kDaタンパク質を8M尿素で可溶化することに成功し、クロマトグラフィ法によって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し26kDaタンパク質の濃縮を行い、26kDaタンパク質を部分精製することに成功した。以上の結果から、PKAにより鞭毛軸糸に強固に結合した26kDaタンパク質が最初にリン酸化され、続いて21kDaダイニン軽鎖がリン酸化され、ユウレイボヤ精子運動活性化の細胞内情報伝達経路の最終段階を担うことが明らかとなった。

第2章では、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が顕著にSAAFによる精子運動活性化を阻害する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する事を明らかにした。以上の結果はSAAFの作用によって細胞内に流入した 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 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 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 K^+ 透過性が上昇し膜電位の過分極を起し、cAMP濃度が上昇する事を示した。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 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。

以上第一部と第二部から、ユウレイボヤでは未受精卵より放出される精子活性化誘因物質SAAFが精子に Ca^{2+} の流入を起こし、この Ca^{2+} は $Ca^{2+}/CaM/CaMKII$ 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、まず鞭毛軸糸の分子量26kDaタンパク質のリン酸化と続く外腕ダイニン軽鎖のリン酸化が起こり、精子鞭毛運動が活性化する、というホヤ精子の運動活性化の分子機構が明らかとなった。

なお、本論文の1章は稲葉一男、森沢正昭 第2章は吉田 学、森沢正昭との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。また、本研究は精子活性化を司る細胞内情報伝達機構を見事に解明した研究として評価できる。従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。