

論文の内容の要旨

論文題目 : Studies on the Transmembrane Cell Signaling for the Initiation of Sperm Motility in Salmonid Fishes

(サケ科魚類精子運動開始における細胞膜での情報伝達機構の研究)

氏名 高 綱 熙

精子は生理機能として運動するために特殊化した単純な細胞であり、精子運動の細胞内情報伝達機構を解明する上で最適な研究材料である。その中で、硬骨魚類の精子は K^+ イオンや2次メッセンジャーである Ca^{2+} や cyclic AMP が関与する精子先体反応を持たない特徴から、精子鞭毛運動機構に関する情報伝達機構を解明するのに最適な材料である。特に、ニジマス等サケ科魚類では、精子は雄性生殖器の中では精漿に含まれる高濃度の K^+ によって運動を抑制されており、 K^+ の少ない淡水中に放精されると周囲の K^+ 濃度の減少を感知して運動を開始することが知られている (Morisawa and Suzuki, 1980)。従ってサケ科魚類精子では実験的にはそれを懸濁する溶液の K^+ の有無で運動性をコントロールできるという利点を持つ。この利点を用いてこれまでニジマスでは精子の周囲の K^+ の減少が細胞膜での電位変化や cyclic AMP の合成を引き起こし (Morisawa and Okuno, 1982)、特定の蛋白質がリン酸化され、精子が運動を開始することが私たちの研究室での研究で明らかにされている。しかし、精子の細胞膜での運動開始調節機構、すなわち、運動開始調節に関与する ion channel の種類に関してはほとんど分かっておらず、また細胞膜での情報伝達の経路における K^+ channel, Ca^{2+} channel, 膜電位、cyclic AMP の位置関係は未だ不明である。本博士論文の第1部では voltage-dependent K^+ channel の阻害試薬に感受性を持つ K^+

channel において、それを通る外向きの K^+ の流れに起因する精子膜の過分極が cyclic AMP を合成を引き起こし、それがこれまで明らかにされている cyclic AMP 依存性のタンパク質のリン酸化を引き起こし、サケ科魚類の精子の運動を開始させる事を明らかにした。第2部では dihydropyridine に感受性を持つ Ca^{2+} channel において、それを通じ流入した Ca^{2+} が精子細胞膜の過分極と cyclic AMP を合成に関与することを明らかにした。また、精子運動開始における calmodulin の関与についてもしらべた。

第1部 K^+ channel、細胞膜電位変化及び cyclic AMP 合成が関与するの精子運動開始機構

ニジマス及びサクラマス精子の運動はアルカリ金属に属する Rb^+ , K^+ , Cs^+ のそれぞれ 5 mM, 10 mM, 20 mM 以上の濃度で完全に抑制された。しかし、 Li^+ , Na^+ は 0 mM から 40 mM の濃度範囲で精子運動を阻害しなかった。また、これらのイオンの阻害の強さは $Rb^+ > K^+ > Cs^+ \gg Li^+ > Na^+$ であること、サケ科魚類の精子の運動性調節に K^+ channel が関与している事を示している。そこで、ニジマスの精子の運動に関与する K^+ channel の特定を試みた。広範な K^+ channel の阻害剤である $BaCl_2$ は 2.5 mM で精子運動を阻害し、voltage-dependent K^+ channel の阻害試薬として知られている tetraethylammonium (TEA) 25 mM, また、神経細胞で voltage-dependent K^+ channel 阻害試薬としてよく使われている α -dendrotoxin β -dendrotoxin, γ -dendrotoxin, σ -dendrotoxin, dendrotoxin-I, MCD-peptide は 1-5 μ M で顕著に精子運動を阻害した。さらに、25 mM 以上の濃度の TEA で運動を顕著に阻害された精子は、 K^+ に特異的な ionophore である 0.1 μ M valinomycin で運動を回復した。以上の結果は voltage-dependent K^+ channel 阻害試薬に感受性を持つ K^+ channel における K^+ の流出が精子運動開始を引き起こしていることを示している。

一方、蛍光指示薬 $DisC_3(5)$ を用いて精子細胞膜電位を測定したところ、ニジマス精漿と同濃度の 40 mM KCl を含む溶液では細胞膜電位が一定の値をとり、細胞外部液の K^+ 濃度を 40 mM ~ 0 mM の範囲で段階的に減らすと、膜電位は外部 K^+ 濃度の減少に伴い段階的に過分極する事が明らかになった。また、外部 K^+ 濃度の減少による精子膜の過分極は TEA によって濃度依存的に抑制された。さらに、精子運動開始に伴う cyclic AMP 合成は、同様に TEA によって抑制された。これらの精子膜過分極の抑制と、精子細胞内の cAMP 合成の抑制は valinomycin の添加によって回復した。以上の結果から、サケ科魚類精子では特定の K^+ channel における K^+ イオンの流出による細胞膜の過分極が cyclic AMP の合成を引き起こし、精子運動を引き起こす事が明らかになった。

第2部 精子運動開始における Ca^{2+} 及び calmodulin の役割

それぞれ 10 mM, 5 mM, 20 mM 濃度の K^+ , Rb^+ , Cs^+ によって運動が阻害された精子に Ca^{2+} を加えることで、精子は運動を開始した。このことは、精子の外側にある Ca^{2+} が精子運動開始に重要な役割を担っていることを示している。一方、L-type Ca^{2+} channel を阻害

すると言われている nimodipine, taicatoxin, FS-2, また、精子では T-type Ca^{2+} channel を阻害すると言われている nifedipine はそれぞれ 5-100 μM の範囲で精子運動を顕著に阻害した。さらに, nifedipine は精子運動性ばかりでなく精子細胞膜の過分極を顕著に抑制した。また、精子では calmodulin ばかりでなく Ca^{2+} channel の阻害試薬であると言われている trifluoroperazine は、精子運動開始に伴う膜の過分極ばかりでなく cyclic AMP 合成も阻害することが明らかとなった。以上の結果は nifedipine, nimodipine などの dihydropyridine に感受性を持つ L- または T-type Ca^{2+} channel を通じて流入した Ca^{2+} が、精子運動開始の細胞膜での情報伝達において、精子膜の過分極及び cyclic AMP 合成に関与していることを示している。

一方、calmodulin 阻害剤である W-7 は 12.5 μM ~ 400 μM の濃度範囲で、trifluoroperazine と calmidazol はそれぞれ 200 μM と 25 μM の濃度で精子運動を顕著に阻害した。W-7 の inactive analogue である W-5 は精子運動を阻害しなかった。さらに、これらの calmodulin 阻害試薬は精子膜の過分極を抑制し、cyclic AMP 合成を阻害した。これらの結果から calmodulin は精子の過分極とそれに続く cAMP 合成に関与していると思われる。しかし、calmodulin 阻害試薬による膜の過分極の抑制は valinomycin よって回復が顕著ではなかった。したがって、精子の運動性と精子膜の過分極に対する calmodulin 阻害試薬の効果は、calmodulin 以外のところに効く可能性を示しており、さらなる検討が必要であると考えられる。

考察

第1部及び第2部で得られた結果から、サケ科魚類では以下のような細胞内情報伝達機構の元で精子が運動を開始すると考えられる。精子は雄性生殖器の輸精管内では、精漿に含まれる高濃度の K イオンによって運動を抑制されている。この精子は放精の際、周囲の K^+ 濃度の減少に会い、精子細胞膜では voltage-dependent K^+ channel 阻害試薬に感受性を持つ特定のイオンチャネルにおける K^+ の流出が起こる。この K^+ の流出が精子細胞膜における膜電位変化、過分極を引き起こす。同時に L/T-type Ca^{2+} channel における Ca^{2+} の流入が精子膜の過分極に関与する。この膜の過分極はホヤ精子や *Paramecium* で知られているように cyclic AMP 合成酵素である adenylyl cyclase を活性化し、細胞内の cyclic AMP の増加が起こると考えられる。この cyclic AMP はこれまで明らかとなっている cyclic AMP 依存性の一連のタンパク質のリン酸化を通して、サケ科魚類の精子の運動を開始させると考えられる。

今後、さらに精子細胞膜における精子運動開始の情報伝達機構の詳細を解明するためには、遺伝子クローニング法や人工膜に取り込んだ細胞膜標品でのパッチクランプ法などの電気生理学的手法を用いた精子運動を調節するイオンチャネルの同定が必要である。また、calmodulin 及びそれと結合する Ca^{2+} の作用機序に関する詳細な生化学的研究も必要であると考えられる。