

## 論文審査の結果の要旨

氏名 Kho Kang Hee

本論文は2章からなり、第1章は、サケ科魚類精子運動調節における  $K^+$  チャネル、細胞膜電位変化、cyclic AMP・ $Ca^{2+}$ などの2次メッセンジャーの役割について、第2章は、 $Ca^{2+}$ チャネル及び calmodulin の役割について述べられている。

サケ科魚類の精子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最大の利点を持つため、細胞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。本博士論文の第1章では、サケ科魚類精子運動は  $Rb^+$ 、 $K^+$ 、 $Cs^+$ によって抑制されるが、 $Li^+$ 、 $Na^+$ では阻害されず、阻害の強さは  $Rb^+ > K^+ > Cs^+ \gg Li^+ > Na^+$ であることから、精子運動性調節に  $K^+$ channel が関与することが考えられた。更に、電位依存性  $K^+$  channel の阻害試薬である TEA、Dendrotoxin、MCD-Peptide が顕著に精子運動を阻害し、TEA で運動を阻害された精子は  $K^+$ イオノフォア、valinomycin で運動を回復した。一方、精子細胞膜電位は外部  $K^+$ 濃度の減少に伴い段階的過分極し、この過分極は 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、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運動開始を引き起こす事が明らかとなった。

第2部では  $K^+$ などによって運動が阻害された精子に  $Ca^{2+}$ を加えると精子が運動を開始する事から、精子外の  $Ca^{2+}$ が精子運動開始に重要であることが示された。一方、精子の L-及び T-type  $Ca^{2+}$  channel を阻害する nimodipine、taicatoxin、nifedipine などが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  $Ca^{2+}$  channel の阻害試薬といわれている 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、mimodipin などの dihydropyridine に感受性を持つ L- または T-type  $Ca^{2+}$

channel を通して流入した  $\text{Ca}^{2+}$  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、calmidazol はかなりの高濃度で精子運動、膜の過分極、cyclic AMP 合成を阻害した。これらの結果は calmodulin が精子膜の過分極とそれに続く cAMP 合成に関与しているように思われる。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 阻害試薬の効果については、さらなる検討が必要であると考えられる。

第 1 部及び第 2 部で得られた結果及びこれまでに行われた研究から、サケ科魚類精子は以下のような細胞内情報伝達機構の元で運動を開始すると考えられる。精子は雄生生殖器の輸精管内では精漿に含まれる高濃度の  $\text{K}^{+}$  によって運動を停止している。この精子は放精の際、周囲の  $\text{K}^{+}$  濃度の減少に会い、精子細胞膜では電位依存性  $\text{K}^{+}$  channel 阻害試薬に感受性を持つ特定のイオンチャンネルにおける  $\text{K}^{+}$  の流出が起こる。この  $\text{K}^{+}$  の流出が精子細胞膜の過分極を引き起こす。同時に、L-/T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel における  $\text{Ca}^{2+}$  の流入が精子膜の過分極に関与する。この膜電位変化はおそらく cyclic AMP 合成酵素、adenylyl cyclase を活性化し、細胞内の cyclic AMP の増加を起し、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。

なお、本論文第 1 章は稲葉一男、谷本さとみ、森澤正昭、第 2 章は岡良隆、森澤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。

従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。