

## 論文内容の要旨

### 論文題目

Studies on phosphorylation of flagellar proteins associating with the regulatory mechanism in hamster sperm motility

(ハムスター精子の運動調節機構に関連する鞭毛タンパク質のリン酸化に関する研究)

藤ノ木政勝

哺乳類精子鞭毛運動は、細胞外カルシウムや重炭酸イオンなどの影響により、鞭毛内のアデニレートシクラーゼの活性化が起きる。活性化したアデニレートシクラーゼは cAMP を産生する。cAMP は多くの細胞でセカンドメッセンジャーとして働く環状ヌクレオチドであるが、精子鞭毛運動においてもセカンドメッセンジャーとして働いていると考えられており、A-キナーゼの活性化を促す。活性化した A-キナーゼはタンパク質リン酸化を起こす。最終的にダイニン軽鎖のリン酸化が起こり、ダイニン-チューブリン相互作用の結果、鞭毛運動が起こると考えられている。ハムスター精子鞭毛運動においても基本的に同様な経路によって鞭毛運動が起こると考えられており、これまでに鞭毛運動への細胞外カルシウム、cAMP、A-キナーゼの関与、そして cAMP 依存的なタンパク質リン酸化の検出などが行われている。

哺乳類精子はまた、運動活性化のみならず、超活性化と呼ばれる独特の運動状態を持つことが知られている。超活性化は「受精能獲得」と呼ばれる哺乳類精子の変化に伴って起こる現象で、in vitro では輸卵管において、in vivo では約3時間の培養で起こることが知られている。運動中の鞭毛の波形が、活性化と大きく異なっており、8の字を描くような運動し、全体としては円を描きながら前方に進んでいく。この超活性化もタンパク質リン酸化(特にチロシンリン酸化)によって制御されていることが示唆されている。以上のように精子鞭毛運動は一連のタンパク質リン酸化反応によって制御されていると考えられており、cAMP 依存的なタンパク質リン酸化を中心に多くの研究においてタンパク質リン酸化の検出が行われてきた。しかし、その多くが精子全体からタンパク質の抽出を行っており、当然のことながら鞭毛タンパク質以外に頭部のタンパク質も含まれることになる。真に鞭毛運動に関与しているタンパク質を解析するためには、

まず鞭毛のみを単離する必要があると思われた。Siによりホモジェナイズと遠心分離による精子鞭毛の単離法が開発され、ハムスター精子においてcAMP依存的にリン酸化される分子量36k-Daのタンパク質が検出されている。そこで私は、Siにより開発された精子鞭毛の単離方法を用い、全鞭毛タンパク質を可溶化し二次元電気泳動で分離することで、網羅的に鞭毛運動と関連のあると思われるタンパク質リン酸化を検出する事を試みた。

鞭毛運動と関連のあると思われるタンパク質リン酸化の検出を行うために、まず精子鞭毛運動の運動状態の定義を行った。ハムスター精子はカルシウム依存的に活性化されることが知られている。しかしSiの報告ではカルシウムをEGTAでキレートしてもスイムアップは出来ないが若干の鞭毛運動が観察されている。これまでの多くの報告ではこの状態を非活性化とし解析の出発点としてきたが、鞭毛運動の情報伝達を調べようとする際にはこの状態ではすでに鞭毛運動を開始させる情報伝達が起こっており、解析の出発点としては不適當であると思われた。そこで、精巢上体尾部より採取した精子を低張液に懸濁することでまったく運動していない精子を調製し、この精子を「immotile精子」とした。またカルシウムをEGTAでキレートした時の若干の運動を示す精子を「initiated精子」とし、カルシウム依存的に活性化した精子を「activated精子」とした。さらに、受精能獲得の過程で起こる運動の変化(超活性化)を示した精子を「hyperactivated精子」とした。以上の4パターンの運動状態を定義し、それぞれの状態での鞭毛タンパク質のリン酸化の状態をdifferentialに解析した。

オートラジオグラフィおよび抗リン酸化アミノ酸モノクローナル抗体でのウエスタンブロットティングの結果、Siによって報告されていたよりも多くの鞭毛運動に関連すると思われるタンパク質リン酸化を検出した。セリン残基のリン酸化をひきおこすタンパク質を4種類検出し、見かけ上の分子量と等電点から、それぞれ66k-Daタンパク質、58k-Daタンパク質、36K-Aタンパク質、36K-Bタンパク質とした。36K-Aタンパク質と36K-Bタンパク質は、見かけ上の分子量が36k-Daであるが、等電点が異なっており、酸性よりのものを36K-Aタンパク質、塩基性よりのものを36K-Bタンパク質とした。さらに、チロシン残基のリン酸化もしくは脱リン酸化をひきおこすタンパク質を14種類検出し、見かけ上の分子量からそれぞれ120k-Daタンパク質、115k-Daタンパク質、100k-Daタンパク質、80k-Daタンパク質、75k-Daタンパク質、70k-Daタンパク質、60k-Daタンパク質、50k-Daタンパク質、45k-Daタンパク質、40k-Daタンパク質、30k-Daタンパク質、20k-Daタンパク質、16k-Daタンパク質、10k-Daタンパク質とした。これら検出された18種類の鞭毛リン酸化タンパク質のうち、66k-Daと58k-Daタンパク質は精子の鞭毛運動

が immotile から initiated に変化するときリン酸化していた。また、100k-Da、75k-Da、70k-Da、60k-Da、45k-Da、36K-A、36K-B、30k-Da として 10k-Da タンパク質は精子の鞭毛運動が activated するときリン酸化していた。さらに 36K-A、36K-B、30k-Da、10k-Da タンパク質のリン酸化は cAMP 依存的であった。最後に、精子が超活性化した時に 120k-Da、115k-Da、80k-Da、50k-Da、40k-Da、16k-Da タンパク質がリン酸化していた。

今回検出した 18 種類の鞭毛リン酸化タンパク質のうち、二次元電気泳動で分離・検出が可能であった 4 種類の鞭毛リン酸化タンパク質 (66k-Da タンパク質、58k-Da タンパク質、36K-A タンパク質、36K-B タンパク質) について電気泳動的に精製出来たので、まず抗血清の調製を行った。36K-A タンパク質と 36K-B タンパク質について特異的な抗血清を調製することが出来たので、この抗血清を用い鞭毛中での局在を検討した。その結果、36K-A タンパク質は Middle Piece に局在しており、36K-B タンパク質は Principle Piece に局在していた。さらに詳細に検討するために、Fibrous Sheath と Outer Dense Fiber を抽出し含まれる成分を二次元電気泳動で解析した結果、36K-A タンパク質は Fibrous Sheath の成分であった。一方、36K-B タンパク質は軸糸もしくはミトコンドリア鞘の成分であると思われた。

さらに上述の 4 種類の鞭毛リン酸化タンパク質の同定を試みた。まず、36K-A タンパク質が Fibrous sheath の成分であったこととその分子量から、A-kinase Catalytic Subunit である可能性が考えられたので、抗 A-kinase Catalytic Subunit 抗血清との反応性を検討した。その結果、36K-A タンパク質と 36K-B タンパク質両方に反応性が認められた。さらに 66k-Da タンパク質と 58k-Da タンパク質も含め、4 種類の鞭毛リン酸化タンパク質のアミノ酸配列を調べた。66k-Da タンパク質と 36K-A タンパク質については、得られたタンパク質量が少なかったこと、また N 末端のブロックが疑われたことからアミノ酸配列を明らかにすることは出来なかった。58k-Da タンパク質および 36K-B タンパク質については、N 末端のアミノ酸配列を明らかにすることが出来た。さらに 58k-Da タンパク質については内部配列も明らかにすることが出来た。得られたアミノ酸配列を元にデータベース検索をした結果、58k-Da タンパク質は N 末端側にチロシンキナーゼである TXK と似たシステインリッチな配列を持つ新規なタンパク質であった。一方、36K-B タンパク質はミトコンドリア成分である pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit であった。この 36K-B タンパク質は抗 A-kinase Catalytic Subunit 抗血清との反応性も有していたこともあわせて考えると、A-kinase Catalytic Subunit と共通の抗原性を有する pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit ではないかと思われ

た。一般的に、この pyruvate dehydrogenase は、TCA 回路のピルビン酸からアセチル Co-A を産生する酵素複合体であることが知られている。pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit はその複合体の構成タンパク質のひとつであり、セリン残基のリン酸化と脱リン酸化を受け、酵素活性の調節をされていることが知られている。しかしながら、本来この pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit のリン酸化と脱リン酸化による調節は、リン酸化によって酵素活性が阻害され脱リン酸化によって酵素活性が上がるというものであり、かつこのリン酸化には基本的に cAMP は関与しない。36K-B タンパク質は得られたアミノ酸配列から pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit であると同定されるが、その性状については必ずしも一般的な pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit の性質を有してはいない可能性も考えられた。さらなる詳細については今後、精巢 cDNA ライブラリーより 36K-B タンパク質の全長 cDNA をスクリーニングし、全塩基配列を決めることで明らかにすることができるものと思われる。

本研究から、ハムスター精子鞭毛運動は細胞外カルシウム非依存的に鞭毛運動を開始し、その際分子量 66k-Da および 58k-Da タンパク質のセリン残基のリン酸化を起こすことが明らかとなった。次いで細胞外カルシウム依存的に運動は活性化され、その際 cAMP 依存的にタンパク質リン酸化が起こっていた。cAMP 依存的にリン酸化されるものとしては、等電点が異なる分子量 36k-Da の2種類のタンパク質(36K-A タンパク質および 36K-B タンパク質)のセリン残基のリン酸化と分子量 30k-Da と 10k-Da のタンパク質のチロシン残基のリン酸化が検出された。さらに活性化時には分子量 20k-Da タンパク質のチロシン残基の脱リン酸化も検出された。これらリン酸化もしくは脱リン酸化タンパク質はすべて鞭毛タンパク質であると思われるが、その中でも特に 36K-A タンパク質は fibrous sheath に局在し、36K-B タンパク質はミトコンドリア成分である pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit であったことからミトコンドリア鞘に局在していることが明らかとなった。したがって鞭毛運動開始および活性化におけるタンパク質リン酸化・脱リン酸化を介した情報伝達経路は、軸糸のみならずミトコンドリア鞘や fibrous sheath においても運動に連動して情報伝達が行われている可能性が示唆された。