

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 藤ノ木政勝

精子の遊泳運動は自然界での受精にとって欠くことが出来ない要素の一つであり、その原動力は精子が持つ鞭毛の屈曲運動が生み出す力である。哺乳類精子においては、精巣における精子完成後、精巣上体における成熟、放精にともなう運動開始、雌生殖器内での受精能獲得というステップを経て初めて受精が可能となる。その過程で精子細胞内では様々な変化が生じるが、運動性もその一つである。哺乳類精子は精巣上体において運動能を獲得し、放精において運動活性化が起こる。そして雌性生殖器内では超活性化と呼ばれる激しい運動を示す。この運動性の変化は精子が置かれた異なった環境に対応するものであり、生理学的に重要な意味を持つと考えられる。それ故に、この運動の調節機構を解明することは生殖生物学においてきわめて重要な課題である。それに加えて、鞭毛は細胞生物学上重要な位置を占める微小管系運動器官の一翼を担っていることから、鞭毛および微小管運動の制御機構の解明という点においても重要な意義をもっている。

この精子の運動制御機構は、放精や雌生殖器官への進入などの細胞外環境の変化が起こると、それに応じて作動し、その結果として鞭毛運動の変化がもたらされる。そこで細胞外情報が細胞膜を介して細胞内シグナルに変換され、それが運動器官である鞭毛軸糸に伝達されて運動を調節するというシグナル伝達系が存在し、その根幹をなすのがタンパク質リン酸化であると考えられている。現在までにこのタンパク質リン酸化反応に関しては様々な研究がなされてきたが、まだ十分であるとはいえない。その問題点を挙げると、精子中で多くのリン酸化タンパク質が発見されているが鞭毛に特定されているものは少ない。運動の変化とリン酸化の対応が必ずしも明確ではない。リン酸化タンパク質の局在と機能が明確でない等である。本論文はこれらの問題点を明らかにする上で大いに貢献するものであり、その意義は大変大きいと認められる。

本論分の成果を以下に要約する。①従来多くなされてきた精子全体を対象としたものではなく、ハムスター精子からまず鞭毛を単離し、界面活性剤処理後の運動器官（鞭毛軸糸）を骨格とする鞭毛の不溶画分に的を絞り、そこに含まれるリン酸化タンパク質を 2 次元電気泳動法によって網羅的に解析した。②精子の運動性の指標として、従来の 3 段階法を改め、運動開始を新たに加えた、不動精子、運動開始精子、運動活性化精子、運動超活性化精子の 4 段階とし、それぞれの段階に対応してリン酸化、脱リン酸化されるタンパク質を新たに 18 種類検出した。③セリン残基のリン酸化に関しては、66kDa、58kDa、36kDa-A、-B タンパク質の 4 種類を検出し、そのうち 66kDa、58kDa タンパク質は不動精子が運動開始するのと同調してリン酸化されることを見出した。④36kDa タンパク質は 1 次元の SDS-PAGE 解析で既に報告があったものであるが、本論分ではそれが等電点の異なる 36kDa-A、-B タンパク質の 2 種に分かれること示した。それらは共に運動開始から活性化に移行する過程でリン酸化されるが、36kDa-A タンパク質は鞭毛主部の線維鞘に、36kDa-B タンパク質は中片のミトコンドリア鞘もしくは軸糸に局在することを示した。⑤部分的なアミノ酸解析およびウエスタンブロット解析の結果、36kDa-B タンパク質は

A-kinase Catalytic Subunit と共通の抗原性を有する pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit、また 58kDa タンパク質はその N 末端側に非レセプター型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るという結果を得た。⑥チロシン残基がリン酸化もしくは脱リン酸化されるタンパク質を 14 種類検出した。そのうち、100kDa、75kDa、70kDa、60kDa、45kDa、30kDa そして 10kDa タンパク質は運動活性化に同調してリン酸化され、また 20kDa タンパク質は脱リン酸化された。⑦精子が超活性化される時には、120kDa、115kDa、80kDa、50kDa、40kDa、16kD タンパク質がチロシンリン酸化されていた。⑧運動の活性化は cAMP 依存的に引き起こされることが既に知られているが、本研究で新たに検出されたリン酸化タンパク質のなかでは、36K-A、36K-B、30k-Da、10k-Da タンパク質のリン酸化が cAMP 依存的であった。⑨以上のような結果に基づいて、不動精子が運動開始する際には 66kDa、58kDa タンパク質が、また運動活性化には 36K-A、36K-B、30k-Da、10k-Da タンパク質が関与することが明らかにされた。それに加えて上述したタンパク質のチロシン残基のリン酸化や脱リン酸化も精子運動性に関連する可能性が示唆された。そこでこれらの結果を包括する、精子の運動変化を調節する新しいリン酸化反応経路を提唱した。

以上要約したように、藤ノ木氏の論文は哺乳類精子の運動調節に関わるシグナル伝達機構に多くの新しい重要な知見を加えるものである。①に示されるような運動器官に的を絞っての網羅的なタンパク質解析は従来ほとんどなされておらず、本研究によって②に示されるように多数のリン酸化タンパク質を鞭毛中で検出したことは、運動調節に関わるシグナル伝達系の経路を構築していく上で大きな貢献である。また従来の運動活性化は、精子が前進遊泳するかどうかで判断するという曖昧なものであった。すなわち、鞭毛が運動していても精子が前進していない場合は運動していないとみなされてきた。しかし鞭毛の屈曲運動を考えた場合、それが起こるか起こらないかが重要である。本研究では運動活性化の前段階として運動開始というステップを導入することによって、③に示されたように運動開始に関連する 58kDa、66kDa タンパク質を同定したことの意義は大きい。また④⑤では、既に報告されていた 36kDa タンパク質が等電点の異なる二つのタンパク質であり、鞭毛上の局在が異なることを示すことによってそれらの機能の解明に道筋を開いたことは高く評価できる。また 58kDa がチロシンキナーゼである可能性を示唆したことによって、これがタンパク質リン酸化カスケードに関わっている可能性を示唆したことも大きな成果である。また今までチロシンリン酸化は運動活性化には関与していないと考えられてきたが、⑥ではチロシンリン酸化、脱リン酸化が関わっていることを示したのは新しい発見である。⑦で示された超活性化に関連する新しいチロシンリン酸化タンパク質と共に、今後の解析が期待される。また⑧では運動活性化に密接に関連する cAMP 依存性リン酸化という点で、10kDa、30kDa という新しいタンパク質を同定している。シグナル伝達系において、cAMP 依存性の A-kinase によるセリンリン酸化の下流にあると予想されていたチロシンリン酸化が実体として示されたことの意義は大きい。以上のように、本研究は既に報告されてきたタンパク質に加えて、多くのリン酸化タンパク質が運動調節系に関与していることを明らかにし、それらが運動変化のどこに対応するかを位置付けたことで、哺乳類精子の運動調節機構の解明に多大な貢献をなすものである。したがって本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。