

論文内容の要旨

論文題目

Studies on Protein Phosphorylation Regulating the Initiation of Sperm Motility in

Salmonid Fishes

(サケ科魚類における精子運動開始機構を制御するタンパク質リン酸化に関する研究)

氏名 伊藤 篤子

はじめに

精子鞭毛運動の調節機構にサイクリック AMP(cAMP)依存性蛋白質キナーゼ (PKA) による特定の蛋白質のリン酸化が重要な役割を果たすことはよく知られている (5)。その中でニジマスやシロサケなど、サケ科魚類においては、細胞外のカリウムイオン(K^+)の減少が最初の引き金となり、それに続いて cAMP の合成酵素である adenylyl cyclase が活性化され、細胞内の cAMP 量が上昇して PKA が活性化され、活性化された PKA によって蛋白質がリン酸化され、精子の鞭毛運動が開始されるという細胞内情報伝達の概略が明らかにされている (5)。更に、精子運動に関与する cAMP 依存的にリン酸化される蛋白質として、分子量約 22kDa の外腕ダイニンの軽鎖 (3)、分子量約 48kDa の PKA の調節サブユニット (2)、そして精子運動開始機構における分子量 15,000 のチロシン残基がリン酸化される 15kDa 蛋白質 (1) が報告されている。また、ダイニン軽鎖のリン酸化の調節には、cAMP だけでなくプロテアソームが関与しているという報告もある (2)。しかし、それぞれの蛋白質の具体的構造は未知で、これらが PKA によって直接調節されているのか、あるいは間接的に調節されているのか、また、精子運動開始の情報伝達系のどこに位置するのかなど、不明な点が多い。そこで本研究では、サケ科魚類精子運動開始の情報伝達機構の詳細な解明を目的として、まず cAMP 依存的なリン酸化蛋白質の網羅的な検索を行い、更に、cAMP 依存的なリン酸化を引き起こす PKA、cAMP 依存的に上昇するリン酸化蛋白質のうち、構造が未知である 15kDa 蛋白質、について解析した。

第1部 cAMP 依存性リン酸化蛋白質群の同定

TritonX-100 で精子細胞膜を除いたモデル精子の再活性化には cAMP が必須であることが知られている(4)。

そこで、第1部ではこの除膜モデル精子の再活性化に関連する cAMP 依存的な鞭毛のリン酸化蛋白質の検出を試みた。これまで、蛋白質の可溶化には SDS が用いられてきたが、SDS が精子頭部の DNA を溶出し、溶液の粘性が非常に高くなり、蛋白質の収率と実験処理に困難があった。そこで、精子鞭毛の可溶化に尿素溶液を用いたところ、頭部を残して鞭毛全体が速やかに可溶化され、頭部を遠心分離操作によって簡便に取り除けるうえ、鞭毛蛋白質を収率よく回収することができるようになった。この方法を用い、現在までに報告されている 22kDa 外腕ダイニン軽鎖 (3)、48kDaPKA 調節サブユニット(2)、分子量 15kDa 蛋白質(1)に加えて、分子量 28kDa、33kDa、41kDa、63kDa、83kDa の 5 つの新規の cAMP 依存性リン酸化蛋白質を検出することができた。これらの蛋白質の精子運動開始における関与について調べるため、精子を K^+ を含まない溶液中であらかじめ運動させたあとに、除膜操作を行い、この除膜モデル精子に cAMP 存在下で $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を加えて再活性化させると、既報の 3 蛋白質と新規の 5 蛋白質の ^{32}P の結合は明らかに減少した。このことは *in vivo* での運動によってリン酸化された蛋白質では、除膜後に新たに ^{32}P を加えても ^{32}P が結合しない、あるいは結合効率がおちるためである。よって上に挙げた 8 つの cAMP 依存的なリン酸化蛋白質は、いずれも精子運動開始機構に関与するリン酸化蛋白質であることが明らかとなった。また H-89 や PKAI (PKA の合成ペプチド阻害剤) など PKA に特異的な阻害剤を加えると、除膜精子の運動開始および 8 つの蛋白質のリン酸化が阻害されることから、これらの蛋白質のリン酸化が PKA による調節を受けていること、即ち、PKA が運動開始情報伝達機構に必須であることを裏付けられた。更に、5 つの新規の蛋白質のうち 28kDa、33kDa、41kDa の 3 つの蛋白質は外腕ダイニン軽鎖と PKA 調節サブユニットが鞭毛軸系から抽出してくる条件である 0.6M NaCl 溶液で抽出することができないことから、この 3 つの蛋白質は鞭毛外腕ダイニン軽鎖に結合あるいは接触している因子ではないと考えられる。

一方、22kDa 外腕ダイニン軽鎖のリン酸化が、種々のプロテアソーム合成基質によって阻害されることから、この蛋白質のリン酸化が cAMP ばかりでなくプロテアソームによっても制御されていると考えられていた (2)。また、プロテアソーム合成基質によって PKA の活性は著しく阻害され、かつ 48kDaPKA 調節サブユニットはプロテアソームによって分解されない (2)。以上からプロテアソームが PKA の未知の活性制御因子を分解して下流の蛋白質リン酸化を制御していると考えられる。そこで、上記の cAMP 依存的にリン酸化される蛋白質に対してプロテアソーム合成基質を加えたところ、すべての蛋白質でリン酸化が阻害された。この結果から、cAMP 依存性リン酸化蛋白質は外腕ダイニン軽鎖と同じく、PKA の下流でプロテアソームと cAMP の両方によって調節を受けていることが示唆された。

第2部 ニジマス精子における PKA 触媒サブユニットの単離とその性質

PKA が精子運動開始に必須であることは第1部での研究で明らかである。そこで、第2部ではニジマス精子の PKA を単離し、その作用機序を調べた。まず、ホヤ精巣から得られている PKA 触媒サブユニットの cDNA をプローブとし、ニジマス精巣 cDNA ライブラリーを作成し、それを用いてニジマス精巣の PKA 触媒サブユニットの cDNA をクローニングすることに成功した。精巣 PKA 触媒サブユニットの cDNA は、全長 1324 塩基からなり、cDNA 配列から予想されるアミノ酸残基は 352、等電点は 9.3、分子量約 41kDa と推定された。予測されたアミノ酸配列を既に報告されている様々動物の組織に由来する PKA 触媒サブユニットと比較したところ、相同性が 80-87%と種間、組織間で非常によく保存されていることが明らかとなった。しかし、ニジマスでは、N末端とC末端に特異的な配列が見られた。そこで、この特異的な配列を持つ mRNA がニジマス組織内で発現しているかについて調べるため、各組織より調整した全 RNA を鋳型として、アミノ酸末端の特異的な配列に相当するプライマーを用いて RT-PCR を行ったところ、特異的 C末端配列を持つ mRNA はニジマスのどの組織でも発現していたが、特異的 N末端配列を持つ mRNA は精巣でのみ発現していた。

更に、この特異的に発現する PKA 触媒サブユニットが精子にあるかについて調べるため、得られた塩基配列を元に大腸菌で融合蛋白質を発現させ、この融合蛋白質を抗原としてポリクローナル抗体を作成し、免疫蛍光抗体法によりニジマス精子における精巣由来の PKA 触媒サブユニットの局在を観察した。その結果、この PKA は精子鞭毛全体に存在していることが確認された。

また、ニジマス精子鞭毛軸系から様々な溶液を用いて PKA 触媒サブユニットの抽出を行ったところ、除膜に用いられる TritonX-100、外腕ダイニン軽鎖の抽出条件の 0.6M KCl、内腕ダイニンや他の構成成分を抽出する Tris-EDTA のいずれの溶液でも抽出することができた。しかし、いずれの溶液でも完全に鞭毛から抽出することはできなかった。このことは、ニジマス精子で発現していると考えられる PKA 触媒サブユニットの末端部分が、普遍的に報告されているものとは異なることに関係していることが考えられる。

第3部 シロサケ精子における 15kDa 蛋白質の可溶化とその性質

リン酸化蛋白質群の中で、分子量約 15kDa のチロシン残基がリン酸化される 15kDa 蛋白質は、リン酸化の経時的な変化が鞭毛運動の開始に匹敵する早さで起こること、cAMP によりリン酸化されるが、それがチロシンキナーゼに關与する間接的な cAMP 依存性リン酸化であると考えられることなどから、運動調節機構の比較的下流に位置している興味深い精子運動開始の鍵となる蛋白質であると考えられている (1.)。しかし、その局在が鞭毛基部に強固に結合している可能性などから安定した可溶化法が確立されておらず、十分な解析には至っていない。そこで、本研究では、15kDa 蛋白質の安定した可溶化方法の確立し、その構造の解析をおこなった。

まず、除膜した精子からの鞭毛軸系の分離を、従来使われてきたテフロン製の Dounce 型ホモジナイザーでなく、POLYTRON 型ホモジナイザーを用いて行い、回収してきた鞭毛を高イオン強度の条件下、2M NaCl で処理をして 15kDa 蛋白質を抽出することに成功した。しかしながら、この方法で回収できる蛋白質量は非常に少なく、また、塩濃度を下げると更に回収効率が落ちるため、構造解析を行うのに必要な量を得ることができなかった。そこで、15kDa 蛋白質の収量が少ない理由として、この蛋白質の疎水性が非常に高く、このことが可溶化を困難にしていること、また、鞭毛と頭部を分ける操作の際に鞭毛基部が頭部側に残り鞭毛基部に存在している 15kDa 蛋白質を完全に回収できないことが考えられた。そこで第1部で用いた尿素溶液で、頭部と鞭毛を分けることなく精子を処理したところ、15kDa 蛋白質を安定して可溶化することができた。さらに尿素溶液で抽出した蛋白質を、密度勾配等電点電気泳動カラムクロマトグラフィーと Tricine SDS-PAGE を用いて分離したところ、約 pH 5 付近に抗リン酸化チロシン抗体に交差する 15kDa 蛋白質を明確に検出することができた。更に、CBB 染色で 15kDa 蛋白質の存在を確認することができたため、構造解析に進むための十分な量が得られたと考えた。そこで、この 15kDa 蛋白質のバンドをゲルから溶出し、逆相カラムクロマトグラフィーで分離後、アミノ酸配列を調べたところ、N末端から His-Ile-Phe の部分アミノ酸配列を得ることができた。しかし、クロマトチャートなどから得られた 15kDa 蛋白質は量的には配列解析に十分であるにもかかわらず、N末端から4つ目以降のアミノ酸を読みとることができなかった。このことは、糖などの何らかの修飾がシーケンス反応を阻害しているからであると考えられる。

次に、15kDa 蛋白質を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いてリン酸化標識し、オートラジオグラフィーで検出する際、その標識量が非常にわずかであることから、この蛋白質に脱リン酸化反応が起こっている可能性が考えられた。そこで、リン酸化検出の際の再活性化溶液及び 2M NaCl の抽出液にセリン/スレオニンフォスファターゼ阻害剤であるオカタ酸またはチロシンフォスファターゼ阻害剤であるヴァナジン酸を加えたところ、いずれの場合も 15kDa 蛋白質のリン酸化の検出効率が上昇した。このことは 15kDa 蛋白質のリン酸化調節機構にフォスファターゼが関与すること、特にヴァナジン酸の阻害効果が顕著に見られることから、チロ

シンフォスターゼが関与していることが強く示唆された。

まとめ

本研究ではサケ科魚類精子運動開始を支配する細胞内伝達機構に関与する cAMP 依存性リン酸化酵素、及びこの酵素によってリン酸化される蛋白質群の同定とそれらの性質について、遺伝子レベル、蛋白質レベルでの研究を行った。

第1部では、精子運動開始に関与していると既に考えられていた唯一の蛋白質である 15kDa 蛋白質に加え、精子運動に関与すると考えられていた 22kDa 外腕ダイニン軽鎖、48kDa PKA 調節サブユニット、更に新規に見いだされた 28kDa、33kDa、41kDa、63kDa、83kDa 蛋白質の合計 8 個の蛋白質におけるリン酸化が精子運動開始に重要な役割を担っていることが明らかとなった。更に、これらの 8 個の蛋白質のリン酸化が、プロテアソームによって調節を受けていることも明らかになり、PKA の活性化は、プロテアソームによる PKA 抑制因子の分解(2)、及び PKA への直接的な cAMP の結合の2つの反応によって調節を受け、精子運動開始に関与する蛋白質のリン酸化を制御していることが考えられた。以上から、PKA 及びプロテアソームによる調節を伴う直接、あるいは間接的な複数の蛋白質の cAMP 依存的なリン酸化反応が網目の様に張り巡らされ、精子の運動開始情報伝達機構を支配していることが示唆された。

第2部では、蛋白質リン酸化反応の中心を担う PKA 触媒サブユニットについて、その遺伝子をニジマス精巢 cDNA ライブラリーからクローニングし、その遺伝子配列の解析により、特異的 N 末端部分を持ち、精子の鞭毛全体に存在している PKA を同定することができた。ヒツジ精子では同様に、特定の N 末端を形成する精子に特徴的な PKA があることが報告されている(6)。この PKA は通常の PKA にはない他の鞭毛構成成分に対する結合性を有しており、従って、PKA の基質を効率よくとらえ、リン酸化を効率よく行うことにより、運動という特徴的な機能に役割を果たしていると推測されている(6)。従って、サケ科魚類精子運動開始という、早い、そしてエネルギーを要する機能において、同様な PKA が関与していることは十分に考えられる。

第3部では、これまで鞭毛基部に強固に結合しているため、抽出が困難であると考えられていた 15kDa 蛋白質について、疎水性が非常に高いことを明らかにし、尿素を用いてこの高い疎水性をうち消し、15kDa 蛋白質を可溶化することに成功した。更に、アミノ酸の配列の解析を行い、15kDa 蛋白質のアミノ酸部分配列を明らかにした。この蛋白質のリン酸化される残基がチロシン残基であることから、15kDa 蛋白質のリン酸化調節はチロシンキナーゼが行っていると思われる(1)。従って、セリン/スレオニンキナーゼである PKA は、チロシンキナーゼをその上流で調節することによって、結果として 15kDa 蛋白質を cAMP 依存的なリン酸化に導いていると考えられる。また、新たに 15kDa 蛋白質のリン酸化は、チロシンフォスターゼによって調節されていることも明らかとなり、サケ科魚類における精子の運動開始情報伝達のスイッチのオン/オフにリン酸化-脱リン酸化の反応が重要であることも示唆された。

参考文献

1. Hayashi, H., Yamamoto, K., Yonekawa, H. and Morisawa, M. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 16692-16698.
2. Inaba, K., Morisawa, S. and Morisawa, M. (1998) *J. Cell. Sci.* **111**, 1105-1115.
3. Inaba, K., Kagami, O. and Ogawa, K. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**, 177-183.
4. Morisawa, M. and Okuno, M. (1982) *Nature* **295**, 703-704.
5. Morisawa, M. (1994) *Zool. Sci.* **11**, 647-662.
6. San Augustin, J. T., Wilkerson, C. G. and Witman, G. B. (2000) *Mol. Biol. Cell* **11**, 3031-3044.