

論文審査の結果の要旨

氏名 伊藤篤子

本論文は3章からなり、サケ科魚類精子運動開始の情報伝達機構の解明を目的として第1部では、精子運動開始に関与する cAMP 依存的リン酸化蛋白質の検索、第2部では cAMP 依存的タンパク質リン酸化酵素 (protein kinase A:PKA)の構造を決定、第3部では cAMP 依存的に上昇するリン酸化蛋白質のうち分子量 15,000 のタンパク質 (15kDa 蛋白質) の解析を行った。

サケ科魚類精子は実験的には K^+ の有無で運動性を制御できる利点を持ち、精子運動制御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。更に、サケ科魚類精子運動開始には cAMP が不可欠であることが知られている。第1部では、尿素溶液を用いた新しい効果的な精子鞭毛の可溶化法を開発し、精子鞭毛蛋白質を収率よく回収し、分子量から外腕ダイニン軽鎖と同定された 22kDa タンパク質、PKA 調節サブユニットと同定された 48kDa タンパク質、精子運動開始に中心的な役割を果たしていると考えられてきた分子量 15kDa 蛋白質に加えて、28kDa、33kDa、41kDa、63kDa、83kDa の5つの新規の cAMP 依存性リン酸化蛋白質が精子運動開始機構に関与することを明らかにした。また、精子運動性及びこれら 8つの蛋白質のリン酸化が PKA 阻害試薬及びプロテアソーム合成基質により阻害されることから、精子運動開始が PKA 及びプロテアソームにより調節を受けていることが明らかとなった。更に、28kDa、33kDa、41kDa 蛋白質は外腕ダイニン軽鎖と PKA 調節サブユニットを抽出する 0.6M NaCl 溶液で抽出することができないことから、鞭毛外腕ダイニン軽鎖に結合あるいは接触していない因子であると考えられた。

第2部では精子運動開始に必須である PKA について既知のホヤ精巣 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、全長 1324 塩基、予想アミノ酸残基 352、等電点 9.3、分子量約 41kDa と推定されるニジマス精巣の 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 の予測アミノ酸配列は既知の PKA 触媒サブユニットとの相同性が 80-87%で種間、組織間で非常によく保存されていた。しかし、ニジマス PKA 触媒サブユニットは、N末端とC末端に特異的な配列が見られた。また、RT-PCR を行い調べたところ、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。更に得られた塩基配列を元に大腸菌で発現させた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調べたところ、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。

第3部では、運動調節機構の比較的下流に位置し精子運動開始の鍵となる蛋白質である 15kDa 蛋白質は疎水性が非常に高いため可溶化が困難であると考え、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構造を完全に回収できないと考え、除膜精子の全鞭毛軸糸を POLYTRON 型ホモジナイザーを用いて行い回収し、尿素溶液で、頭部と鞭毛を分けることなく精子を処理し、15kDa 蛋白質を安定して可溶化することに成功した。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、構造解析に進むための十分な量を分離することができた。この 15kDa 蛋白質を、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、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、修飾によるシーケンス反応阻害により以降のアミノ酸を読みとることができなかつた。更に、チロシンフォスファターゼ阻害剤が 15kDa 蛋白質のリン酸化の検出効率を上昇させた。このことから 15kDa 蛋白質のリン酸化調節機構にチロシンフォスファターゼによる脱リン酸化反応が関与していることが強く示唆された。

以上から、サケ科魚類精子運動開始機構においては、N末端が特徴的な PKA 触媒サブユニットを持つ PKA 及びプロテアソームが関与していることが明らかとなった。更に、それらの下流で起こる 22kDa 外腕ダイニン軽鎖、48kDa PKA 調節サブユニット、新規に見いだされた 28kDa、33kDa、41kDa、63kDa、83kDa 蛋白質、鞭毛基部に強固に結合し抽出が困難であり精子運動開始の鍵蛋白質であると考えられてきた 15kDa 蛋白質の合計 8 個の蛋白質におけるリン酸化及び脱リン酸化が精子運動開始機構に重要な役割を担っていることも明らかとなった。