

論文の内容の要旨

論文題目 受精に関与する糖鎖認識分子の
多価糖鎖プローブを用いた研究

氏名 吉谷 直栄

生体に存在する「糖鎖」は数多くの生理的プロセスに関与しており、それらの糖鎖が有する機能を十分に理解するためには、糖鎖構造およびそれをリガンドとして結合する糖鎖認識分子の双方の詳細な理解が必須である。糖鎖を介した細胞間相互作用の代表的なものに精子と卵の相互作用があり、精子上に存在する糖鎖認識分子が卵透明帯上の糖鎖を認識して結合すると考えられている。卵透明帯の詳細な糖鎖構造については、当研究室などによりブタで最も早く明らかにされ、糖鎖構造に立脚した研究が可能になっている。

本研究では、多価糖鎖プローブ（後述）を用いて、ブタ精子に存在が示唆されていた複数の糖鎖認識分子が頭部に存在することを明らかにし、それらの糖鎖認識分子の受精への関与を検討した。また、多価糖鎖プローブを固相化したプラスチックプレートを用いて、電気泳動による糖鎖認識分子のバンドの特定を試みたので、その結果も合わせて報告する。

(1) ブタ精子に存在する糖鎖認識分子の検出と受精への関与についての検討

ブタ卵透明帯の非還元末端糖鎖構造の概要を Fig.1 にまとめた。N結合型、O結合型糖鎖ともにシアロもしくはアシアロのN-アセチルラクトサミン構造を有しており、N結合型糖鎖はすべてが複合型であった。またこの他に、種々のフコース残基による修飾が存在していた。従って、ブタ精子にはN-アセチルラクトサミン構造、およびフコース残基を含めた構造を認識する分子が存在し、それらが卵との相互作用に関与していることが予想された。

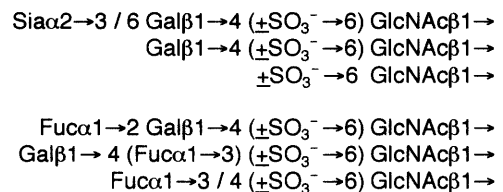


Fig.1. ブタ透明帯糖鎖の非還元末端構造

私は修士課程において、糖鎖認識分子の探索や解析に極めて有用であると考えられる天然型糖鎖を組み込んだ糖鎖プローブの作製法を開発しており、これを解析に利用した。プローブ作製に用いた糖鎖の構造を Fig.2 にまとめて示した。

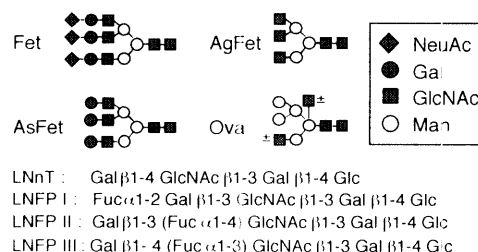
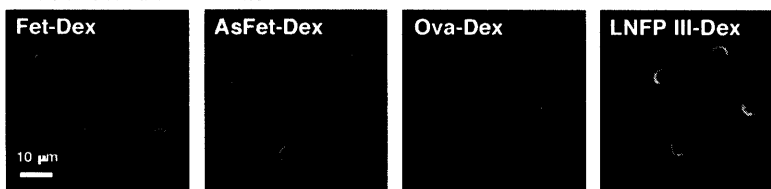


Fig.2. プローブ作製に用いた糖鎖の構造

受精能獲得後のブタ精子を種々の蛍光標識した多価糖鎖プローブで染色したところ、フェツインおよびアジアロフェツイン由来のN結合型糖鎖を組み込んだプローブ (Fet-Dex, AsFet-Dex)、および Lewis x 構造を組み込んだプローブ (LNFP III-Dex) によりブタ精子頭部先端領域が非常に強く染色された (Fig.3)。また、採取直後の受精能を獲得していない精子の場合は、Fet-Dex, AsFet-Dex ではごく弱く、LNFP III-Dex では中

受精能獲得後のブタ精子



受精能獲得前のブタ精子



Fig.3. 蛍光標識多価糖鎖プローブによるブタ精子の染色

程度に染色された。それに対して、末端のシアル酸およびガラクトースを酵素消化により除いてN-アセチルグルコサミンを露出させたフェツインN結合型糖鎖からなるプローブ (AgFet-Dex)、および Lewis x と類似構造の Lewis a (LNFP II-Dex) と type1H (LNFP I-Dex) からなるプローブでは、精子頭部はほとんど染色されなかった。また、オボアルブミン由来のN結合型糖鎖 (主に高マンノース、混成型) からなるプローブ (Ova-Dex) の場合においても、精子頭部はほとんど染色されなかった。さらに、N結合型糖鎖の非還元末端のN-アセチルラクタミン構造だけからなる糖鎖プローブ (LNNT-Dex) ではほとんど染色されなかったことから、N結合型糖鎖の分岐構造などを認識していることが示唆された。なお、カルシウムイオノフォア A23187 によって人為的に先体反応を誘導した場合には、いずれのプローブでも精子頭部は染色されなかった。これらの結果から、末端にシアル酸およびガラクトースを有する複合型N結合型糖鎖、および Lewis x 構造に対して特異的に結合する分子が精子頭部に存在していることが示された。また、これらの糖鎖結合分子が主に形質膜上に存在し、細胞内部にはほとんど存在しないことも明らかにした。

このように、糖鎖結合活性が受精能力の獲得とともに増大し先体反応とともに消失するという事実は、この糖鎖認識分子の精子-卵初期結合への関与を強く示唆するものである。精子-卵初期結合への関与という点に関しては、ブタではデキストラン硫酸やフコイジンなどの硫酸化多糖が結合を顕著に阻害することが知られており、続いてこれらについての検討を行った。

プラスチックプレートに固相化したブタ精子細胞膜へのビオチン標識した Fet-Dex, AsFet-Dex および LNFP III-Dex の結合に対する種々の硫酸化多糖の効果を検討した。その結果、ごく低濃度 (1 μ g/ml 程度) のデキストラン硫酸およびフコイジンによって Fet-Dex, AsFet-Dex の結合がほぼ完全に阻害されることがわかった (Fig.4)。一方、LNFP III-Dex については、Fet-Dex, AsFet-Dex とは若干異なり、デキストラン硫酸で強く阻害され、フコイジンによる阻害は弱かった。なお、いずれのプロープもヘパリンではほとんど阻害を受けなかった。ヘパリンは、ブタ精子-卵初期結合を阻害しないことが知られている。以上の結果より、ブタ精子-卵初期結合には主に複合型 N 結合型糖鎖を認識する分子が関与していると考えられる。一方、Lewis x 構造を認識する分子については、透明帯に Lewis x 構造が存在していることから、副次的な作用を有している可能性も考えられる。また、Lewis x 構造を認識する分子は複合型 N 結合型糖鎖を認識する分子とは若干異なり、精子採取直後からすでに十分な結合活性を持っていることから、精子と卵の初期結合以外にも重要な役割を担っている可能性も考えられ、これらに関しては今後の検討課題である。

なおこれとは別に、同様な系でオリゴ糖を用いた阻害実験を行ったところ、複合型 N 結合型糖鎖と Lewis x 糖鎖の結合部位は独立に存在していることを確認した (Fig.5)。

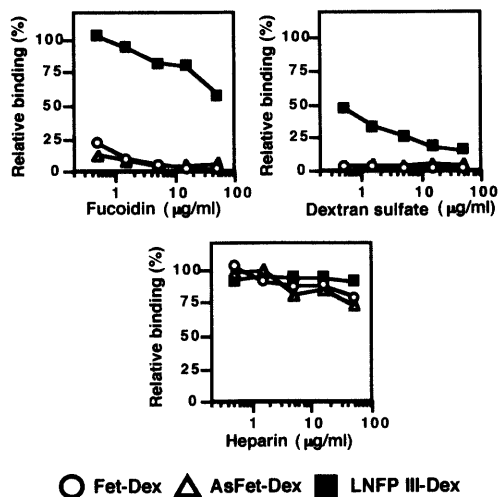


Fig.4. 硫酸化多糖による結合の阻害

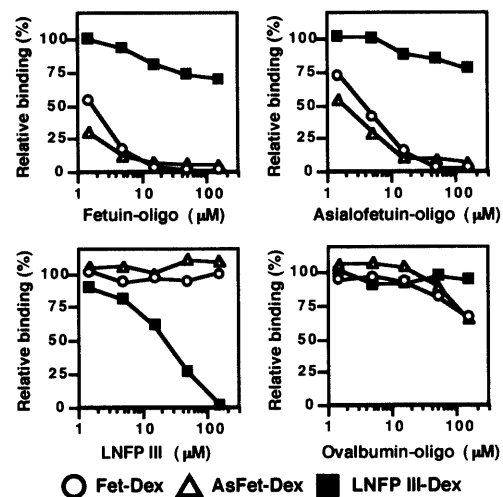


Fig.5. オリゴ糖による結合の阻害

(2) 電気泳動による糖鎖認識分子バンドの特定

私は、種々の多価糖鎖プローブを固相化したプラスチックプレートを利用した電気泳動による簡便な糖鎖認識分子検出法を開発しており、それを用いてブタ精子に存在する糖鎖認識分子の特定を試みた。

単離したブタ精子細胞膜を 1% Triton により可溶化し、遠心上清をウェルに加えた。洗浄後、ウェルに結合しているタンパク質をビオチン化した後に回収し、ウェスタンブロッティングにより検出した。その結果、Fet-Dex, AsFet-Dex および LNFPIII-Dex を固相化したウェルに対して特異的に結合する同一のバンドが複数検出された (Fig.6、矢印)。なお、これらの結合は対応するオリゴ糖によって特異的に阻害された。以上の結果から、複合型 N 結合型糖鎖を認識する分子および Lewis x 構造を認識する分子が何らかの複合体を形成していることが示唆された。

まとめ

天然型糖鎖を組み込んだ多価糖鎖プローブにより、ブタ精子頭部に 2 種類の異なった糖鎖認識分子が存在し、複合型 N 結合型糖鎖を認識する分子が精子-卵相互作用に関与している可能性が強いことを示すことができた。また、それらの糖鎖認識分子を含むいくつかのバンド群を電気泳動で確認することができた。今後、これら分子の同定により、受精に関与する糖鎖認識分子群の研究がさらに進展するものと期待される。

参考文献

1. Yoshitani, N., and Takasaki, S. (2000) *Anal. Biochem.*, **277**, 127-134.
2. Mori, E., Yoshitani, N., and Takasaki, S. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, **374**, 86-92.
3. Yoshitani, N., and Takasaki, S. (2001) *Glycobiology*, **11**, 313-320.

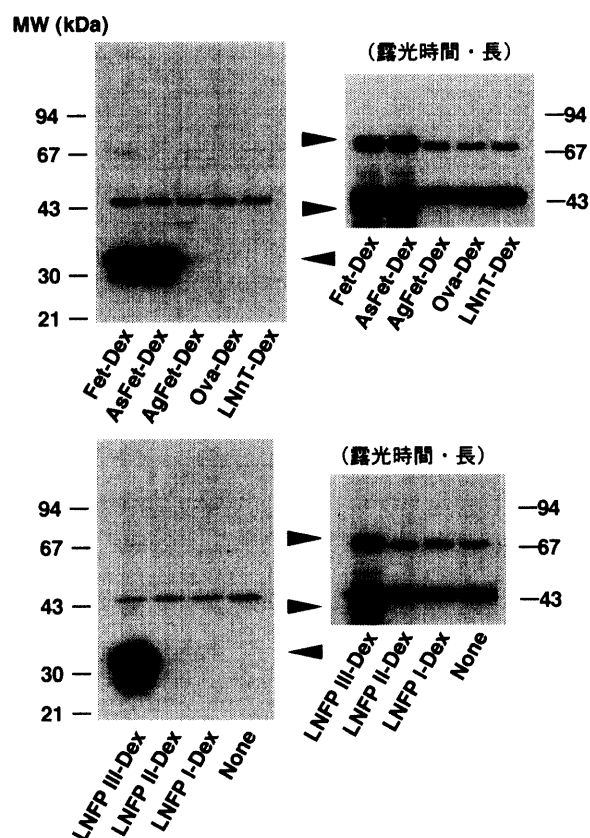


Fig.6. 糖鎖プローブ固相化プレートを利用した糖鎖認識分子の検出