

審査の結果の要旨

氏名 吉谷直栄

受精の初期過程においては、精子と卵との特異的結合が認められる。この結合には糖鎖認識反応が関わっていることが示唆されている。しかし、現在までのところ、卵との結合に関与する糖鎖認識分子は同定されていない。一方、卵透明帯の詳細な糖鎖構造については、すでに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。

そこで本研究では、卵透明帯糖タンパク質の糖鎖の構造情報に基づいて多価糖鎖プローブを作製し、これらを用いてブタ精子側の糖鎖認識分子の存在と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検索を行った。

(1) ブタ精子に存在する糖鎖認識分子の検出、特異性と受精への関与

卵透明帯糖タンパク質の糖鎖の非還元末端と同一、あるいは類似の構造を有する天然型糖鎖を組み込んだ種々の多価糖鎖プローブのビオチンあるいは蛍光標識体を作製し、これらを用いた細胞化学的方法によりブタ精子の糖鎖認識分子の解析を行った。その結果、受精能を獲得した精子の頭部先端領域が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する糖鎖プローブ、及びフコース含有 Lewis x 構造を有する糖鎖プローブによって強く染色されるが、他のプローブ（糖鎖の末端が GlcNAc、Man、type 1 H 構造 あるいは Lewis a 構造等）では染色されないこと、この糖鎖結合活性は、採取直後の受精能を獲得していない精子の場合には微弱あるいは中程度であり、受精能の獲得とともに増大し先体反応とともに消失すること等が判明した。また、糖鎖結合分子が主に形質膜上に存在し、細胞内部には殆ど存在しないことも明らかにした。

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糖鎖プローブの結合に対するオリゴ糖の阻害実験から、N-アセチルラクトサミン構造を有する糖鎖と Lewis x 糖鎖の結合部位は独立に存在していることを示した。また、配偶子間の結合の阻害剤として知られている多糖（デキストラン硫酸およびフコイジン）の添加によって、固相化した精子細胞膜への糖鎖プローブの結合が用量依存的に阻害され、その程度は Lewis x 糖鎖プローブよりもN-アセチルラクトサミン構造を有するプローブにおいてより顕著であることを認めた。以上から、ブタ精子-卵初期結合過程には主としてN-アセチルラクトサミン構造を認識する分子が関与していることを示唆した。

(2) 糖鎖認識分子の検索

本研究の過程で、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かつ高感度な糖鎖認識分子検出法を開発し、こ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。その結果、単離したブタ精子細胞膜の Triton 可溶化物の遠心上清中に、*N*-アセチルラクトサミン構造や Lewis x 構造を有するプローブ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を複数検出した。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ことから、*N*-アセチルラクトサミン構造を認識する分子および Lewis x 構造を認識する分子が複合体を形成している可能性を示唆した。

以上、本研究はブタ精子頭部には少なくとも2種類の異なった特異性を持つ糖鎖認識分子が存在し、中でも *N*-アセチルラクトサミン構造を認識する分子が精子-卵相互作用に主に関与していることを示した。また、糖鎖認識に関わるいくつかの候補分子を指摘した。これらの知見は糖鎖生物学、生殖生物学の発展に寄与する有用な知見を提供するものであり、博士（薬学）の学位に値すると判定した。