

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 守田昌哉

生殖は生物種によって決まった環境下において営まれる。それ故に、精子はそのような生殖環境下において、運動の開始や受精能の獲得という生殖に必要とされる機能を発現させている。魚類の精子においては、一般に生殖器内では運動をしておらず、放精によって運動を開始するものが多い。この場合、放精による細胞外環境の変化が運動開始もしくは運動活性化の引き金になっている。魚類の体液の浸透圧は他の脊椎動物と同様におよそ300mOsm/kgであり、精漿もこれにほぼ等しい。多くの淡水魚の精子においては、この精漿の浸透圧から淡水の低張にさらされることが、また海水魚の精子においては高張の海水にさらされることが引き金となり、運動を開始することが知られている。精子の遊泳運動は鞭毛の屈曲運動を原動力とするが、これらの引き金が鞭毛運動を開始させる仕組みについてはまだ解明されたとは言いがたい。ところで広塩性魚であるテラピアは淡水から海水にかけて順応できるばかりでなく、生殖も可能であるというきわめてユニークな性質を持っている。すなわち、テラピアの場合は成魚がどちらの環境に順応したかによって、精漿に対して浸透圧が全く逆である二つの環境に適応した運動制御機構を精子が持つということである。守田氏はこの点に着目した。すなわちテラピアの精子は環境順応によってどのような制御機構を持つようになるかを調べることにより、浸透圧による運動制御機構を解明するとともに精子形成のダイナミズムに対する新たな知見が得られるであろうという戦略の下にこの研究を行った。その結果は本論文では3章に分けて記載されている。

まず第一章では、テラピア精子の運動制御機構が、成魚の飼育環境に適した性質を持つようになることを示した。淡水もしくは海水中で1ヶ月以上飼育した二種類のテラピア（以後淡水テラピアおよび海水テラピアとよぶ）の精子運動性の浸透圧による影響を見たところ、淡水テラピア精子は精漿と等浸透圧（等張）もしくはそれ以下の浸透圧下であれば活発な運動を示した。一方、海水テラピア精子は海水程度の高張条件でも運動を示したが、それにはCa²⁺が必要であった。またCa²⁺チャネルの阻害剤によって海水テラピア精子の運動性が低下することから、細胞外Ca²⁺の流入が運動活性化に必要であることが示された。

一方、淡水テラピア精子において、 IP_3 依存的な Ca^{2+} 供給を阻害すると、運動活性化が阻害された。このことから淡水テラピア精子においては細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 供給が重要であることが示唆された。実際、運動が活性化する条件では、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することが蛍光プローブを使う実験で示された。ところで細胞膜を界面活性剤で除去した、いわゆる細胞膜除去モデル精子で鞭毛運動を再活性化させるためには、ATP と Ca^{2+} が必要であった。これは淡水、海水両方のテラピア精子に共通であり、このことは細胞内での Ca^{2+} 上昇が運動活性化に必須であることを示唆している。これらの結果は、テラピア精子の運動活性化に Ca^{2+} が必須であるが、淡水テラピア精子では低浸透圧が何らかのシグナルとなって細胞内のストアから Ca^{2+} を供給するのに対し、海水テラピア精子では主に海水中から Ca^{2+} を得ていることが明らかにされた。さらに、両者において、発現タンパク質の違いも示された。これらは、テラピアが生息環境の違いに順応する過程で、その精子が細胞外シグナルを細胞内シグナルに変換する機構を変え、それによって共通の細胞内シグナル伝達系を駆動しているらしいこと、そしてそのために精子形成においてタンパク質発現すら調節されているということを示唆している。これらは大変重要な発見である。

第二章では、細胞内 Ca^{2+} の上昇が運動活性化に関連すると考えられるタンパク質リン酸化カスケードを調節していることが示された。まず、放射性同位元素 $^{45}Ca^{2+}$ を用いて、鞭毛中の Ca^{2+} 結合タンパク質を調べたところ、カルモジュリンおよびカルモジュリンキナーゼIVと予想されるタンパク質が同定された。このことから Ca^{2+} が一連のタンパク質リン酸化反応と関連している可能性が示唆された。そこで抗リン酸化アミノ酸抗体を用いたウエスタンブロットによって、淡水テラピア精子では分子量 27,32,45,48,60kDa のタンパク質のセリン残基が運動活性化に伴ってリン酸化されるのに対し、海水テラピア精子ではそれらが脱リン酸化されること、またそれらは軸糸に強く結合していることが示された。一方、高イオン強度条件下で抽出されてくる鞭毛タンパク質（これには鞭毛運動に関わる外腕ダイニンが含まれる）に、上記のものとは分子量は同じだが異なったものと考えられる 27,32kDa タンパク質が含まれ、これらは淡水テラピア、海水テラピア精子ともに運動活性化に伴ってリン酸化されることが示された。この低分子量タンパク質は、外腕ダイニンを構成する軽鎖の可能性が高く、鞭毛運動調節にダイニン分子のリン酸化が深く関わっていることを示す重要な発見である。さらに、淡水および海水テラピア精子において、共にカルモジュリンのアンタゴニストである W7 が運動阻害を引き起こすこと、また C キナーゼの阻害剤によって、淡水テラピア精子においてのみ運動活性化とタンパク質リン酸化が阻

害されることが示された。これらの発見は環境順応による精子の運動調節機構が、第一章で示された細胞膜レベルでのシグナル変換機構の変化のみという単純なものではないことを示す大変興味深い発見である。

第三章では、運動調節タンパク質についてのさらに詳しい研究成果を述べている。淡水および海水テラピア精子のタンパク質を二次元電気泳動法によって解析したところ、18kDa タンパク質が海水テラピア精子において多く発現していた。これはアミノ酸解析の結果、Cu/Zn スーパーオキシドジスムターゼと高い相同性を示すことがわかった。そしてこれが鞭毛及び鞭毛基部にあるスリーブ構造に局在することが示された。この酵素はタンパク質のニトロ化と密接に関係があることから、タンパク質のニトロ化を調べた。すると運動活性化に伴い、淡水テラピア精子においてはリン酸化される、先にあげた 5 つのタンパク質がニトロ化されること。一方、海水テラピアにおいてはこれらのタンパク質は活運動活性化に伴って脱リン酸化されるが、同じ条件で脱ニトロ化されることがウエスタンブロットによって示された。また、ダイニン軽鎖と予想される 27,32kDa タンパク質はいずれも運動活性化に伴ってニトロ化されることがわかった。さらに、阻害剤を用いた実験では、ニトロ化に関係する一酸化窒素合成酵素の阻害によって淡水テラピア精子の運動活性化、タンパク質ニトロ化、タンパク質リン酸化が共に阻害された。一方、脱リン酸化が観察される海水テラピア精子においては、一酸化窒素合成酵素の阻害剤は効果が無かった。しかしスーパーオキシドジスムターゼの阻害剤は海水テラピア精子の運動活性化、タンパク質脱ニトロ化、タンパク質脱リン酸化を阻害した。このようなタンパク質のニトロ化が精子の運動性に関与することは、魚類精子については初めての報告であり、大変意義深い発見である。本章における数々の新しい知見は、精子鞭毛運動の分子レベルでの調節機構の複雑な仕組みについて、今後の研究の方向性を指し示す重要なものであるといえる。

以上のように、守田氏の学位論文は広塩性魚というユニークな材料を用い、魚類精子の運動調節機構の統一的理解を目指した優れた研究である。そして生殖、細胞運動、発生にまたがった大変興味ある重要な発見を多く含んでおり、この研究分野における寄与は大変大きいものと考えられる。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。