

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

## Studies on glycolysis and flagellar movement in mouse sperm

(マウス精子における解糖系と鞭毛運動に関する研究)

Chinatsu MUKAI

向井 千夏

精子は、頭部(核)、中片部 (ミトコンドリア) 、尾部(鞭毛)からなる極度に特殊化した細胞で、一般に鞭毛によって遊泳運動を行う。鞭毛運動に必須となるエネルギーは ATP である。ATP 産生の経路としては、細胞質における解糖系、ミトコンドリアにおける呼吸系の2つが主なものである。一分子のグルコースを分解したとき、前者が2分子の ATP、後者が 36 分子の ATP を産生する。両者の効率の違いや、これまでの生化学的手法による報告から、精子鞭毛運動を支持する ATP 供給は、ミトコンドリアによるもの、と考えられてきた。

精子鞭毛は、運動時、基部から先端部まで全体が屈曲する。すなわち、鞭毛全体で ATP を利用した滑り運動が起こっている。中片部ミトコンドリアで産生された ATP は鞭毛全体にどのように供給されるのであろうか。哺乳類精子は細長く (マウス 150  $\mu$  m)、単純拡散では相当高濃度の ATP がミトコンドリアで産生されなければ、鞭毛先端部への供給は不可能である。ウニ精子などでは、ATP の高エネルギーリン酸結合がクレアチンに転移され、クレアチンリン酸によって鞭毛全体に運搬されることが報告されている (クレアチンシャトル Tombes and Shapiro, 1985)。しかしながら、ほとんどの哺乳類精子において、ウニ精子にみられるようなクレアチンシャトルに関する酵素群が検出されておらず、クレアチンシャトルによる ATP 供給は成り立ち得ない。では、哺乳類精子はどのようにして ATP 供給をおこなっているのだろうか。

本論文の目的はマウス精子におけるエネルギー代謝について明らかにすることである。代謝経路に関する阻害実験や運動性の解析と ATP 生産について調べたところ、解糖系こそが鞭毛運動に必要な ATP 供給を行っていることが明らかとなった。

まず、ミトコンドリアの呼吸系を CCCP、Antimycin A で阻害すると、呼吸系での代謝基質である乳酸、ピルビン酸の場合は運動阻害が見られた。一方、解糖系から代謝されるグルコース、フルクトースの場合、運動性は維持された。この結果から、呼吸系を阻害した場合においても解糖系によりエネルギーを獲得し、十分な運動性が維持できることが明らかとなった。また、ATP 量についても、呼吸系を阻害した場合においてもグルコース存在下でじゅうぶんな ATP を生産していることが明らかとなった。

解糖系を阻害するために、グルコースのアナログである 2-Deoxy-D-glucose(DOG)を用いた。DOG は細胞内にとりこまれ、ヘキソキナーゼによってリン酸化されるが、それ以降先の代謝経路へは進めない糖である。DOG はミトコンドリア活性には影響しないが、ピルビン酸存在化での運動性が著しく阻害された。さらに、DOG を用いた場合の ATP 量を調べた。すると、ピルビン酸存在下においても、基質を与えていない場合の ATP 量に等しく、約 200 pmol/10<sup>6</sup>sperm という結果が得られた。ピルビン酸および DOG 存在下では呼吸系は働いていると考えられるので、このときの ATP 量は呼吸系による産生量としてとらえることができる。すなわち、一分子のグルコースからの ATP 産生効率には呼吸系がはるかに高いが、精子の場合、呼吸系による ATP 産生量はきわめて低いものと推測される。また、解糖系の酵素であるグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の阻害剤であるヨード酢酸 (100 μM) を用いたところ、グルコース、ピルビン酸、それぞれの存在下において運動性が著しく阻害された。以上の結果から、鞭毛運動には呼吸系よりもむしろ解糖系が重要な役割を果たしていることが推測された。

ミトコンドリアは中片部に局在するが、解糖系についての詳細はまだ明らかとなっていない。そこで、市販の抗体を用いて解糖系酵素の局在について調べた。その結果、GAPDH が鞭毛全体に存在すること、ピルビン酸キナーゼが先体と鞭毛主部に存在することが明らかとなった。すなわち、鞭毛全体で解糖系によって生産された ATP が、直接軸系ダイニンに供給され消費されている、と考えられる。

マウス精子は受精能を獲得するまで運動を維持しなければならない。その環境は、雌体内の子宮・輸卵管であるが、輸卵管液中の酸素濃度は一般の体液に比べて非常に低いことが報告されている。また、呼吸によって生じる活性酸素によって DNA が損傷されることが広く知られているが、解糖系が ATP 供給をすることで活性酸素の発生が抑えられる。すなわち、オスのゲノムを無傷のまま卵に運ぶという精子の使命がよりよく達成できると考えられる。これまで、エネルギー供給はミトコンドリア、と認識されてきたが、そうではなく、鞭毛運動のエネルギー供給は解糖系が重要な働きをしていることが明らかとなった。