

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者 向井千夏

精子は雄の遺伝情報を雌の遺伝情報を持つ卵へ運ぶ使命を持つ、極端に分化した、そして一般に活発な遊泳運動をする細胞である。この目的のために、遺伝情報を凝縮した頭部、ミトコンドリアを含む中片部、そして運動器官である鞭毛からなる構造を持っている。鞭毛運動は精子を遊泳させるのに欠くことのできない装置であるが、その運動のためには二つの大きな要素が必要である。一つは鞭毛の運動形成機構であり、いかにして鞭毛独特の屈曲運動を形成するかということである。これに関する研究は、運動タンパク質であるダイニンの研究をはじめとして、比較的多くの研究が行われている。もう一つの要素はその運動を維持するためのエネルギー供給機構である。この問題に関しては前者より研究歴はむしろ古く、精子中片部のミトコンドリアで産生された ATP が鞭毛に供給されるとされてきた。この際の問題点は細い鞭毛中を ATP が拡散で運搬されることの困難さである。しかし筋肉と同様なクレアチンリン酸を介した補給系（クレアチンリン酸シャトル）がウニ精子などで明らかにされて、この問題も解決されたと考えられてきた。しかし近年になって、哺乳類精子においてはクレアチンリン酸シャトルを支えるクレアチンキナーゼの働きが低いことが示された。またマウス精子鞭毛はウニなどより 3 倍程度も長く、拡散による供給は困難である。それ故に鞭毛全体への ATP 供給については依然として問題が残されていたといえる。本論文において、向井氏は鞭毛運動に必須な ATP はミトコンドリアにおける呼吸系ではなく、鞭毛全体に存在する解糖系によって主に供給されていること多角的な研究によって明らかにした。

本論文においては、まず解糖系を構成する酵素のうち、グリセリアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) とピルベートキナーゼ (PK) に対する抗体を用い、蛍光抗体法によってそれらの局在を検討している。その結果 GAPDH、PK 共に鞭毛全長にわたって存在することを示した。特に PK に関してはミトコンドリアの存在下では鞭毛主部が染色され、界面活性剤でミトコンドリアを除去処理した後は鞭毛全体が染色されることから、鞭毛軸糸もしくはそのアクセサリーファイバーである外側粗大線維に局在することが明らかになった。また SDS 電気泳動法によって、鞭毛の骨格構造に結合していることも示した。

哺乳類では精液や雌生殖器官液などに果糖、ブドウ糖などが含まれていることが知ら

れている。そこで次に本論文ではこれらエネルギー代謝基質の有無と運動性の関連について調べている。その結果これらの基質が細胞外に存在することで、細胞内 ATP 量は一定に保たれ、また鞭毛も高い鞭毛打頻度（およそ 20Hz）を維持すること、一方、基質が無い状態では、数分以内に鞭毛打頻度は減少し（およそ 1Hz）、ATP 量も減少していることから、鞭毛打頻度と ATP 量に密接な可能性のあることを明らかにした。

続いて阻害剤による実験によって、解糖系と呼吸系の、鞭毛運動に対する関与を検討している。まず、呼吸系を CCCP などにより阻害しても細胞外にブドウ糖がある場合には活発な運動性が維持され、細胞内の ATP 量も阻害剤を加えない状態と同様に高レベルに保たれていた。一方、ピルビン酸を加えた場合では運動性は急激に低下し、ATP 量も低下していた。このことは解糖系が ATP 供給で重要な役割を果たしていることを示唆している。しかし呼吸系が阻害されたために解糖系がそれを補完している可能性がぬぐいきれない。そこで次に解糖系をヨード酢酸やデオキシグルコースによって阻害する実験が行われた。その結果、これらの阻害剤存在下では、たとえピルビン酸存在下であっても運動性は低く、細胞内 ATP 量も少なかった。これらの結果は、解糖系で産生される ATP がマウス精子の鞭毛運動を支えていることを強く支持している。

これらの実験結果から、ミトコンドリアで産生される ATP は大部分がミトコンドリアもしくはそれが存在する鞭毛中片部に留まって鞭毛主部には供給されておらず、鞭毛全体に存在する解糖系によって鞭毛運動に必要な ATP が供給されているという仮説を向井氏は立てた。そして、これを実証するために、以下のような実験も行っている。哺乳類精子は細胞外代謝基質の無い溶液中でも鞭毛運動をある程度持続させるが、これは細胞内にあらかじめ若干の代謝基質を蓄えておけるためであろうと予想される。そこで長時間のインキュベーションで内在性代謝基質を枯渇させ、そこに細胞外部から代謝基質を加えた。すると、ブドウ糖を加えてもピルビン酸を加えてもほぼ同量の ATP 産生が観察されたが、ブドウ糖を加えた場合のほうが鞭毛の振動数が高く、活発な運動を示した。この事実は等量の ATP といっても鞭毛運動への使われ方に差があることを示しており、ミトコンドリアと鞭毛主部が区画化されており、鞭毛主部は解糖系によって独自に ATP を獲得していると考えると都合が良い。

向井千夏氏が提出した本論文は、以上述べたように、解糖系が哺乳類精子鞭毛運動維持のためのエネルギー供給の主役であるということを様々な角度から実験的に検証し、従来から常識的に予想されていた説を覆した、きわめて意義深い研究成果がまとめられたものである。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した。