

論文審査の結果の要旨

氏名 絹川 将史

本論文は、精子の運動調節機構の解明を目的として、まず超活性化の生理的意義を明らかにし、次に、鞭毛の波形を解析することにより、その変化が推進力への増加にどのように関与しているかを明らかにした。さらには細胞内部で起こる波形変化に関与する分子機構についての解析を行い、精子鞭毛を構成する微小管の滑りが有効な推進力を生み出す波形へ変換されるメカニズムを明らかにした。

第1章では、ハムスター精子の運動性に関する解析をおこなった。その結果、培養開始10分の精子よりも4時間経過した精子の方が、運動速度は早まっていた。さらに4時間経過するとその軌跡の直線性が減少していることが示された。次に、超活性化の生理的意義を調べるために、体内における卵管の条件を模倣した高粘性状態をポリアクリルアミドを用いて作り出し、前進運動できる精子の割合を調べた。すると高粘性の条件にて、10分では泳げないが4時間後の超活性化を起こした精子では泳げるようになった。すなわち超活性化に伴い推進力が上昇していることが明らかとなった。

第2章では、鞭毛の屈曲に関する解析を行った。ハムスター鞭毛の屈曲を頭のカギと同じ方向を R-bend、逆の方向を P-bend と定義し、頭部から 30 μ m 毎の領域に分割し頭部と鞭毛の境界点から順に 0 から E の各位置の点を設定した。そして、各位置の接線の補角より部位毎に屈曲角度を算出した。培養開始後の各時間経過時の波形解析より、鞭毛の振りの平均角度は培養時間と共に R 側に非対称的に傾いていた。しかし、屈曲角度の変化率を測ることによって鞭毛微小管の滑り速度の変化を調べたところ、格段に推進力が異なる 10 分と 4 時間の精子との間で滑り速度の増加は認められなかった。さらに 10 分と 4 時間培養後の精子両方で、R から P 側の滑り速度が逆側よりも格段に早くなっていることが明らかとなった。そして、P 側から R 側へ屈曲する時にのみ推進方向に対して正の推進力が生じていた。すなわち、鞭毛の振りには推進力ということに関し有効な屈曲 (P \rightarrow R) と無効な屈曲 (R \rightarrow P) が存在することが明らかとなった。そして、振幅が 10 分よりも超活性化した 4 時間後に増すことより、推進力の上昇が起こるものと考察された。また、4 時間の培養で超活性化した精子では O-A から D-E までスムーズに一番大きい波が伝播していた

が、10分の精子ではB-Cの部位から途中で新たな波が発生していた。このような干渉波の存在は推進力に対し負の作用を与えるものと考えられ、それが存在しない超活性化した精子は推進力に関してより効果的な波形を生み出すと考えられた。

第3章では、細胞内部で起こる波形変化に関与する分子機構についての解析を行った。鞭毛の波形はダイニン ATPase を介した微小管の滑り運動より生じる。そこで界面活性剤にて細胞膜を破壊し、さらに高濃度の DTT(33mM)を添加して微小管の滑り出し状態を解析する方法を開発し、滑り運動に関与する物質の影響を調べた。まず、cAMP は精子の運動開始に必須であるという報告を受け、cAMP が無い状態での微小管滑り出しについて調べた。すると、精子鞭毛の屈曲運動は起こらないものの、微小管の滑り出し自体は生じた。これによって、cAMP は微小管の滑り運動には必須ではなく、駆動力を生み出す調和の取れた波形を生み出すのに必要であることが判明した。次に cAMP の標的である A kinase の運動性への役割を調べた。その結果、A kinase 特異的阻害剤 H89 を入れた条件下で cAMP によって運動性が上昇することが明らかとなった。従って、cAMP の標的として A kinase 以外の存在が浮上したため、A kinase 以外の標的として近年報告のあった Epac について調べてみた。イムノプロットの結果 Epac2、およびその下流で働く Rap2 がハムスター精子にて確認された。次に、Ca²⁺は鞭毛波形の非対称性に関与するとの報告を受け、Ca²⁺の標的である C kinase 特異的なペプチド阻害剤を用いてその微小管の滑りに対する影響を調べた。すると、阻害剤により運動性のみならず微小管の滑り出しすら生じなくなった。これより C kinase はダイニンと微小管の滑り運動そのものを制御することが示唆された。

以上のように、本論文はこれまで明らかにされていなかった精子微小管の滑りが有効な推進力を生み出す波形へと変換されるメカニズムを明らかにしたものであり、精子運動調節機構の解明に大きく寄与するものであると考えられる。

なお、本論文第1章及び第2章の1部は、永田昌男、青木不学との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(生命科学)の学位を授与できると認める。