

論文の内容の要旨

論文題目

Studies on the regulatory mechanism of flagellar motility activation in starfish sperm
ヒトデ精子における鞭毛運動活性化の調節機構に関する研究

氏名 中島綾子

真核生物の鞭毛・繊毛は様々な細胞で見られるが、ほとんどが共通した構造の軸系を持っている。軸系では、約 250 のタンパク質が微小管を主とした緻密な構造をつくり上げている。鞭毛および繊毛運動は、モータータンパク質ダイニンが微小管をすべらせることによって生じる。この相互作用によりもたらされた力が、様々な調節を受け、鞭毛や繊毛の周期的な運動へと変換される。そして、軸系タンパク質のリン酸化が、この鞭毛・繊毛運動の調節機構において重要な役割を果たしていることが知られている。

精子の鞭毛運動は、一般的に精巣内では開始されておらず、放精に伴うイオン環境の変化や、卵由来の精子活性化物質が引き金となり、細胞内のシグナル伝達経路を経て、最終的に活性化される。ヒトデの精巣精子は海水中で運動性を示さないが、ヒスチジンの添加により運動が活性化される。ヒスチジンが Zn^{2+} をキレートし、精子から Zn^{2+} が離脱することによって運動が活性化されると考えられているが、詳しい機構はわかっていない。一方、ウニ、海産硬骨魚類、哺乳類などでは、運動活性化に至るシグナル経路に、精子細胞内の pH ($[pH]_i$) の上昇が含まれていることが報告されている。この $[pH]_i$ の上昇による精子の鞭毛運動活性化機構には、cAMP 依存的なタンパク質のリン酸化が関係していると考えられている。

本研究は、 $[pH]_i$ の上昇によって cAMP に依存することなく生じる鞭毛軸系タンパク質のリン酸化が、ヒトデ精子の運動活性化と関係していることを明らかにした。そして、これまで考えられてきた cAMP 依存的なリン酸化機構とは別の機構が、精子の鞭毛運動を調節している可能性を提示している。第 1 章では、 $[pH]_i$ の上昇がヒトデ精子の運動活性化過程にも含まれるこ

とを示した。さらに除膜精子を使って pH 依存的・cAMP 非依存的な軸系タンパク質のリン酸化を検出した。第 2 章では、1 章で明らかにした pH 依存的な軸系タンパク質のリン酸化と運動活性化が、cAMP に依存しないことを確認した。また、pH 依存的なリン酸化機構と cAMP 依存的なリン酸化機構が、鞭毛運動の活性化においてどのような関係にあるのかを探った。

第 1 章

ヒスチジンによる運動活性化

イトマキヒトデ(*Asterina pectinifera*)の精子は、人工海水中でほとんど運動を行なわなかった(運動率 $1.1 \pm 0.8\%$: 平均 \pm 標準偏差、以下同様)が、ヒスチジンの添加によって濃度依存的な運動率の上昇が観察され、10 mM では $72 \pm 13\%$ の精子が運動を行った。このことから、ヒスチジンが海水中においてヒトデ精子の運動を活性化することが確認された。

さらに、Na-free 人工海水を用いて同様の実験を行なったところ、ヒスチジンによる運動の活性化が見られなかった。このことから、上で観察された運動活性化は Na^+ に依存していることが明らかになった。そして、ウニで報告されているような、 Na^+/H^+ exchanger を介した $[\text{pH}]_i$ の上昇が、運動の活性化に関与している可能性が示唆された。

$[\text{pH}]_i$ の上昇による運動活性化

NH_4Cl は、 Na^+ に依存せずに $[\text{pH}]_i$ を上昇させることが知られている。海水と同程度の浸透圧に調整した塩化コリン溶液中において、 NH_4Cl は濃度依存的に精子の運動を活性化させ、20 mM では $91 \pm 3\%$ の運動率が観察された。このことから、 $[\text{pH}]_i$ を上昇させるとヒトデ精子の運動が活性化することが明らかになった。また、nigericin を用いて、 $[\text{pH}]_i$ を細胞外の pH とつり合わせると、pH 8.0 では $68 \pm 5\%$ の精子が運動を行なったが、pH 7.75 では $1.7 \pm 1.1\%$ しか運動を行ななかった。この結果から、細胞内の pH が 8.0 まで上昇すると、ヒトデ精子の運動が活性化することがわかった。

$[\text{pH}]_i$ の測定

蛍光 pH 指示薬 SNARF-1 を用いて、精子の $[\text{pH}]_i$ を測定した結果、イトマキヒトデ精子の精巣内での $[\text{pH}]_i$ は 7.0 かそれよりやや低い値であると推定された。この精子を塩化コリン溶液に希釈すると $[\text{pH}]_i$ は 7.31 ± 0.02 まで上昇したが運動は活性化されず、 NH_4Cl の添加(20 mM)によって $[\text{pH}]_i$ が 8.10 ± 0.04 まで上昇した時に活性化された。同様に、精子を人工海水中に希釈した時には、 $[\text{pH}]_i$ が 7.47 ± 0.02 まで上昇したが運動は活性化されず、ヒスチジンの添加(10 mM)によって $[\text{pH}]_i$ が 7.81 ± 0.06 まで上昇した時に活性化された。一方、Na-free 人工海水にヒスチジンを添加した時には、 $[\text{pH}]_i$ はほとんど上昇せず(添加前 7.35 ± 0.003 、添加後 7.52 ± 0.07)、運動の活性化も見られなかった。これらのことから、精子の運動活性化に伴って、実際に $[\text{pH}]_i$ が上昇していることが示された。また、以前から知られていたヒスチジンによる運動活性化の際にも $[\text{pH}]_i$ が上昇していることも確かめられた。

pH が除膜精子の運動に与える影響

運動活性化前の精子(塩化コリン溶液に希釈した精子)、運動活性化後の精子(20 mM NH₄Cl を含んだ塩化コリン溶液、もしくは、10 mM ヒスチジンを含んだ人工海水に希釈した精子)、それぞれに対して除膜を行い、様々な pH の再活性化溶液(7.0-8.0)中に希釈して再活性化率を測定した。除膜を行なったのが運動活性化の前か後かに関係なく、pH 依存的な再活性化率の上昇が見られた。しかしながら、運動活性化前に除膜した場合には、pH 7.8 以上においてのみ高い再活性化率(50%以上)が見られたのに対し、運動活性化後に除膜を行なった場合には、より低い pH においても再活性化される傾向が見られた。これらのことから、[pH]_iの上昇によって精子鞭毛の運動が活性化されることが確かめられた。また、運動活性化後の精子に変化が生じていることも示唆された。

除膜精子の運動活性化に伴う軸系タンパク質のリン酸化

運動活性化前の精子、運動活性化後の精子それぞれの鞭毛を除膜した後、[γ-³²P]ATP を含んだ再活性化液(pH 7.0-8.0)を加え、³²P の取り込みを行わせた。再活性化に伴う ³²P の取り込みを検出した結果、再活性化液の pH 依存的に、25, 32, 45 kDa のタンパク質における ³²P の取り込みが増加した。その中でも 25, 32 kDa タンパク質では、運動活性化後に除膜を行った場合、運動活性化前に除膜を行ったものに比べ ³²P の取り込みが著しく少なくなっていた。45k Da タンパク質においても取り込みは減少したが、差はあまり見られなかった。

再活性化液の pH が高くなるのにしたがって、すなわち再活性化率が上昇するのにしたがって、³²P の取り込みが増加していたことは、25, 32, 45 kDa のタンパク質における取り込みが、細胞内 pH 上昇による鞭毛の運動活性化に関係していることを示唆している。そして、25, 32 kDa タンパク質への取り込みが、運動活性化前に除膜した場合より、運動活性化後に除膜した場合に少なかったことは、これらのタンパク質の鞭毛運動活性化への関与を裏付けている。なぜなら、除膜前の運動活性化により生じていたタンパク質のリン酸化により、³²P の新たな取り込みが妨げられたと考えられるからである。また、運動活性化後に除膜した精子では、これらのタンパク質がすでにリン酸化されていたために、より低い pH においても再活性化が見られたと考えられる。

第 2 章

cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素の阻害剤 H-89 が鞭毛運動に与える影響

cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素の阻害剤である H-89 は、intact 精子の運動活性化を阻害しなかった。しかしながら、H-89 で処理していない精子は 2 分以上高い運動率を維持したが、60 μM の H-89 で処理した精子の運動率は、30 秒後の約 90% から 1 分後の約 10% へと急激に減少した。60 μM の H-89 で処理した精子をさらに除膜した場合は、再活性化に影響は見られなかつ

た。これらの結果から、cAMP 依存的なタンパク質のリン酸化は、運動の活性化よりも維持に関係していると考えられた。

cAMP と H-89 が鞭毛軸系タンパク質のリン酸化に与える影響

第 1 章と同様な方法で、除膜精子の運動活性化に伴う鞭毛軸系タンパク質のリン酸化を検出した。再活性化液 (pH 7.0-8.0) のすべてに 25 μ M の cAMP を加えた場合も、pH に依存して 25, 32, 45 kDa タンパク質への 32 P の取り込みが増加した。この pH 依存的なリン酸化は、60 μ M の H-89 によっても阻害されなかった。これらの結果は、1 章で示した pH 依存的なリン酸化が cAMP に依存しないことを明確に示している。

35, 37, 43, 65, 70 kDa タンパク質への 32 P の取り込みは cAMP 依存的に増加し、H-89 によって阻害されたが、運動の活性化とは関係していなかった。

リン酸化タンパク質の局在

ダイニンの外腕は、軸系の高塩濃度抽出により選択的に外れ、ショ糖密度勾配遠心法による分画によって精製されることが知られている。この方法によって鞭毛軸系を分画したところ、pH 依存的にリン酸化される 25 kDa タンパク質が、ダイニンが含まれると考えられる ATPase 活性の高い画分に局在していた。このことは、25 kDa タンパク質がダイニンの構成要素である可能性を示唆している。また、pH 依存的・cAMP 非依存的な軸系タンパク質のリン酸化がダイニンを調節している可能性も示された。