

## 論文審査結果の要旨

論文提出者氏名 中島綾子

真核生物の鞭毛・繊毛のほとんどは、微小管を骨格とする共通したいわゆる“9+2”構造の軸系を持っている。精子はこの鞭毛をもつ代表的な細胞である。精子の鞭毛は、一般的に精巣内では開始しておらず、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。この運動活性化の仕組みの解明は、細胞生物学の分野で重要であるばかりでなく、医学、畜産学など様々な分野においても非常に意義深いものである。

この鞭毛運動の活性化に関するウニ、海産硬骨魚類、哺乳類などの精子を用いた研究で、放精による浸透圧環境の変化や、 $K^+$ の減少、卵からの誘因物質などが引き金になり、細胞内のシグナル伝達経路を経て鞭毛軸系の活性化が引き起こされるといふ大筋が分ってきた。そのなかで特に重要なのはcAMPや $Ca^{2+}$ に依存したタンパク質リン酸化であると考えられ、それに関する研究が進んでいる。一方、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が、従来この $[pH]_i$ の上昇はcAMPや $Ca^{2+}$ の下流にある現象であると考えられてきた。

ところでヒトデの精巣精子はそのままでは海水中に希釈しても運動性を示さない。そしてヒスチジンの添加により運動が活性化されることが知られていた。これはヒスチジンが $Zn^{2+}$ をキレートし、精子から $Zn^{2+}$ が離脱することによると考えられているが、詳しい機構はわかっていなかった。本論文はヒトデ精子を材料に用いて、運動開始機構を調べ、 $[pH]_i$ の上昇がむしろ非常に重要な因子であることを明らかにした、きわめて興味深い研究である。その内容は以下のようにまとめられる。

まず、中島氏はヒトデ精巣精子がヒスチジンによって運動が活性化されることを確認した後、それが細胞外 $Na^+$ に依存していることを明らかにした。このことは $Na^+/H^+$  exchanger を介した $[pH]_i$ の上昇が運動の活性化に関与している可能性を示唆している。これは、 $NH_4Cl$ により $[pH]_i$ を上昇させると、 $Na^+$ に依存せずに精子の運動を活性化させること、またイオノフォアの一つであるnigericinを用いて $[pH]_i$ をpH 8.0まで上昇させるとやはり精子の運動が活性化することから明らかとなった。さらに蛍光pH指示薬SNARF-1を用いて、精子の $[pH]_i$ を

測定した結果、 $[pH]_i$  が 7.8 以上になると、ヒスチジン処理や  $NH_4Cl$  処理など、どの場合も共通して運動が活性化されることが明らかになった。

次に精子の細胞膜を界面活性剤で除膜した後、運動活性化を試みる、いわゆる再活性化実験を行ったところ、この場合も pH 上昇が運動活性化に必須であり、cAMP や  $Ca^{2+}$  は必要ないことが明らかにされた。さらに  $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$  を含んだ再活性化液(pH 7.0–8.0)を加え、 $^{32}P$  の取り込みを調べ結果、再活性化液の pH 上昇および運動活性化に同調して 25, 32, 45 kDa のタンパク質における  $^{32}P$  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、インタクト精子を運動活性化させた後に除膜した場合、運動活性化前に除膜を行ったものに比べ  $^{32}P$  の取り込みが著しく少なくなっていたことから、強い相関が示唆された。

このタンパク質リン酸化は、cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素の阻害剤である H-89 によっては阻害されない。また H-89 はインタクト精子の運動活性化を阻害しないことから、運動活性化に伴うこれらのリン酸化は cAMP 非依存的であることが証明された。また、鞭毛軸糸の高塩濃度抽出画分をシヨ糖密度勾配遠心法により分画した結果、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ることが示され、それ故にこの 25 kDa タンパク質がダイニンの構成要素（軽鎖）である可能性が強く示唆された。このように、pH 依存的・cAMP 非依存的な軸糸タンパク質（特に 25kDa 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が強く示唆されるに至った。

以上のように、本論文においては今まで cAMP などの下流に位置し、ダイニンの ATPase 活性を上げるという半ば補助的な作用と考えられてきた pH 上昇が、タンパク質リン酸化を通して非常に重要な作用をもつことがヒトデ精子で明らかにされた。ところで今まで報告された多くの精子運動活性化現象で、pH 上昇は極めて共通性が高い。このことは実は pH 上昇こそが鞭毛運動活性化に共通する重要な因子であることを示唆するものかも知れない。このように、本論文はこの分野の研究に極めて大きな一石を投じる可能性がある重要な研究である。

なお、本論文の内容は申請者が第一執筆者の論文として一部が既に公表されているが、内容については、申請者の貢献度が最も高い。これらの内容について審査委員会で厳正に審査した結果、審査委員全員一致して、申請者が博士（学術）を授与されるにふさわしいと認定した。