

論文の内容の要旨

論文題目 Studies on motility initiation and energy supply in sperm flagella.

(精子鞭毛における運動開始及びエネルギー供給系に関する研究)

氏名 竹井 元

背景

精子は雄の遺伝情報を雌性配偶子に受け渡すために非常に特殊化された細胞であり、その運動は受精の成功になくてはならない。また精子細胞は個体を離れて活動する唯一の細胞であり、その為受精に伴う細胞外環境の変化に単一の細胞で対応し、運動を調節しなければならない。そこで精子はその多様な生殖環境に応じて様々な運動調節機構を発展させてきた。

精子鞭毛運動は主に三つの段階で調節されている。一つ目は鞭毛軸糸上に整列したダイニン分子の活性・協調に関わる調節である。この調節により鞭毛は、ダイニン分子自身の ATP 加水分解に伴う運動によりダブルレット微小管同士の滑りを引き起こし、そのすべりを鞭毛の屈曲に変換し、鞭毛打波を形成し精子が遊泳する為の推進力を得ている。

二番目に、鞭毛運動開始や波形変化に関わるシグナル伝達がある。特に魚類精子は、放精から受精までが短時間で完了する為、運動開始のタイミングの正確な制御に関わるシグナル伝達機構を多様に発達させてきた。多くの硬骨魚類精子では、放精時に精漿と異なる浸透圧に曝露される事によって運動活性化シグナルの引き金が引かれ、 Ca^{2+} 依存的なシグナル伝達により鞭毛運動が開始される事が知られている。一方サケ科魚類精子では、精漿に含まれる高濃度(40 mM)の細胞外カリウムイオンによって運動が抑制されており、放精に伴う細胞外カリウムイオン減少が運動活性化に引き金となる事が知られてきた。しかし先行研究において、10%のグリセリン溶液で精子を一旦処理する事により、通常は鞭毛運動を抑制する濃度のカリウムイオン存在下(100 mM)においても鞭毛運動が開始される事が報告された(Morita et al., 2005)。このグリセリン処理による運動開始機構は非常に特殊な条件下における運動活性化機構であるが、その解明はサケ科魚類精子鞭毛運動機構を理解する上で有用な情報をもたらす事が期待される。しかし、その詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多く残っていた。

運動を調節する三番目の段階として、鞭毛運動を維持する為に必要な ATP 生産に関

わる代謝系による調節がある。特に哺乳類精子など射精から受精までに長時間を要する生物は、運動維持の為に ATP 生産、及び鞭毛全長へ供給する方法が発達してきた。マウス精子では、近年多くの研究により鞭毛運動に必要な ATP は主に解糖系により生産される事が示されてきたが、相反する報告もあり未だにその全容の解明には至っていない。またウニ精子では、鞭毛基部に局在するミトコンドリアで生産された ATP を鞭毛全体へ供給する為の ATP 輸送機構の存在が報告されているが、ウニ精子(40 μm)より長い鞭毛をもつマウス精子(120 μm)ではその様な ATP 輸送系は報告されていなかった。

これら様々な種の精子の運動調節機構を明らかにすることは、それぞれの種特異的な生殖機構を明らかにするにとどまらず、更には生殖方法の進化・適応を考察する上でも非常に意義深い。そこで私は、これらの運動調節機構について、サケ科魚類精子におけるグリセリン処理による運動開始シグナル伝達機構に関する研究とマウス精子における鞭毛運動とエネルギー供給系の関連に関する研究を行った。本論文では1章においてサケ科魚類精子運動開始機構の結果について、2章においてマウス精子鞭毛運動と供給系の関連の結果について論じていく。

結果及び考察

1章：サケ科魚類精子におけるグリセリン処理による運動開始機構の解明

まず、グリセリン処理のどの様な効果によって運動が活性化しているのかについて調べるために、処理溶液の浸透圧に着目して実験を行った。その結果、グリセリン溶液中のグリセリンを他の物質(塩化ナトリウム、スクロース等)に置き換えた溶液で精子を処理してもサケ科魚類精子は鞭毛運動を開始する事、またその際、運動活性化は処理溶液の浸透圧依存的に起る事が明らかとなった。この結果は、精子を一旦高浸透圧溶液に希釈し、引き続き低浸透圧溶液に希釈する事により起る浸透圧ショックが鞭毛運動開始に必須である事を示している。

次に浸透圧ショックの下流で働くセカンドメッセンジャーについて、 Ca^{2+} に着目して実験を行った。細胞外の Ca^{2+} をキレート剤 EGTA によって除去してもグリセリン処理精子の運動開始に影響は現れなかったが、細胞内の Ca^{2+} をキレート剤 BAPTA-AM により除去するとグリセリン処理精子の運動開始が有意に阻害された。この結果はグリセリン処理精子では浸透圧ショックにより細胞内からの Ca^{2+} 供給が起っている事を示唆している。そこで Ca^{2+} 蛍光プローブ、Fluo-4 を用いて高浸透圧処理に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を追跡した。すると、精子がグリセリン溶液などの高浸透圧溶液に暴露されると細胞

内 Ca^{2+} 濃度が増加し、その後精子が低浸透圧暴露されると細胞内 Ca^{2+} 濃度が急激に減少する事が分かった。一方精子が高浸透圧溶液のみに暴露されたままでは、そのような Ca^{2+} 濃度の急激な減少は見られなかった。高浸透圧溶液に希釈するだけでは精子は運動を開始しない事から、グリセリン処理による運動活性化には細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇だけでなく低下が必要である事が示唆された。この結果は、細胞膜を除去した精子鞭毛運動に対して比較的low濃度($\sim 10^{-8}$ M)の Ca^{2+} が阻害的な効果を及ぼすという Okuno and Morisawa (1989)の報告と一致する。

高浸透圧暴露時に精子細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する事から、この時に精子鞭毛運動に必須である鞭毛軸系タンパクのリン酸化が起っているのではないかと考えた。そこで、精子の細胞膜除去モデルを用いてリン酸化が起っているかどうかを間接的に調べた。サケ科魚類精子の細胞膜除去モデルは通常、cAMP を含まない再活性化溶液中では軸系タンパクのリン酸化が起らない為に運動できない。しかし、サケ科魚類精子を一旦高浸透圧溶液に希釈し、その直後に細胞膜を除去すると cAMP を含まない溶液中でも再活性化する事が分かった。これは高浸透圧暴露により軸系タンパクのリン酸化が起っている事を示唆している。

以上の結果より、高浸透圧溶液ショックによる細胞内カルシウム濃度上昇がサケ科魚類精子鞭毛軸系タンパクのリン酸化等の運動能の獲得、ここでは「成熟」と呼ぶ、を引き起こし、引き続く低浸透圧ショックにより起る細胞内カルシウム濃度の急激な減少が実際の鞭毛運動の引き金になっている事が示唆された。

この結果は、他の淡水魚、海産魚と同様な浸透圧、及び細胞内カルシウム依存的な運動開始機構を、より進化的に古いサケ科魚類精子も保持している事を示唆しており、この事実は魚類精子運動開始機構の進化を考察する上でも非常に興味深い。今後浸透圧ショックによる細胞内カルシウムイオン供給機構を明らかにし、更に他種の魚類精子と比較する事により魚類精子運動開始機構の進化を解明する上で非常に有用な情報が得られる事が期待される。

2章：マウス精子鞭毛運動とエネルギー供給系の関連に関する研究

マウス精子における鞭毛運動をエネルギー代謝系の関連について、鞭毛運動に必要な ATP は主に解糖系により作られているという報告と主に呼吸系により作られているという報告がある。私は、この様な相反する報告は実験間で運動解析方法が異なる事に起因するのではないかと考えた。そこで本研究では、従来測定されてきた運動率、鞭毛打

の振動数に加えて鞭毛の屈曲角を測定し、振動数と屈曲角の積として微小管すべり速度を求めた。微小管すべり速度は ATP 濃度と相関する事が知られているので、このパラメータを用いる事により鞭毛運動とエネルギー代謝系の関連をより正確に評価できると期待される。更に、鞭毛内 ATP 濃度変化の様子をより詳細に調べるため、鞭毛上の各点における局所的な屈曲の変化を測定した。振動数は鞭毛上のどの点においても一定であるため、局所的な屈曲の減少は局所的な微小管すべり速度の減少、すなわち局所的な ATP 濃度の減少を示唆する。

まず解糖系基質(グルコース)、又は呼吸系基質(ピルビン酸、 β ヒドロキシ酪酸)のいずれかのみが存在する条件下における鞭毛運動を解析した。すると、どの基質が存在する条件下でも鞭毛運動に大きな違いが現れない事が解った。この結果はマウス精子が解糖系、呼吸系のどちらでも運動を維持する為に十分な ATP を生産・供給できる事を示している。

次に、解糖系阻害剤 α クロロヒドリン(ACH)により解糖系を阻害した場合の鞭毛運動を解析した。すると解糖系基質存在下だけでなく、呼吸系基質存在下においても解糖系阻害により鞭毛の屈曲角及び微小管すべり速度が減少する事、また特に鞭毛先端部で著しく屈曲が減少する事が解った。この結果は呼吸系基質が豊富に存在する条件下でも解糖系を阻害する事により鞭毛内、特に先端部の ATP 濃度が減少する事を示唆している。

そこで細胞内 ATP 濃度を逆相 HPLC により直接測定した。すると呼吸系基質存在下においても解糖系阻害により鞭毛内 ATP 濃度が減少し、鞭毛内 ADP、AMP 濃度が増加する事が解った。これらの結果はウニ精子において ATP 輸送系を阻害した場合の結果と酷似しており、すなわち鞭毛基部に局在するミトコンドリアで生産される ATP が、解糖系阻害下では鞭毛先端部まで行き渡らない事を示唆している。また、筋肉細胞において解糖系が ATP 輸送系として働いている事を示唆する報告もなされている。これらの事実を基に、私はマウス精子における解糖系の役割として、従来知られていた ATP 生産系としての機能に加えて、ATP 輸送系としての働きも備えているというモデルを提唱する。このモデルを実証する為には更なる研究が必要であるが、このモデルが運動細胞におけるエネルギー恒常性に関して、新たなブレイクスルーになる可能性を秘めている。