

氏名(国籍)	金 銀 哲 (中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2,151号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Purification and Identification of the Epididymal Secretory Proteins, and Their Roles in the Sperm Maturation (精巣上体分泌タンパク質の精製・同定および精子および精子成熟における役割)
主査	筑波大学教授 医学博士 濱口 秀夫
副査	筑波大学教授 博士(医学) 梶 正幸
副査	筑波大学助教授 医学博士 武島 仁
副査	筑波大学助教授 医学博士 白井 忍

論文の内容の要旨

(目的)

精子の運動能と受精能は、卵子と受精するのに必要な基本的な機能である。精子はこの機能を精巣上体頭部から尾部へ移行する間に獲得し、この過程は精子成熟とよばれている。精子成熟に精巣上体の特定部位で分泌されるタンパク質が重要な働きをしていると考えられている。本研究は、精巣上体から分泌されるタンパク質を精製し、精子成熟における役割を解析することを目的とした。

(対象と方法)

ブタ精巣上体分泌液から各種カラムクロマトグラフィーを用いてタンパク質を精製した。タンパク質のアミノ酸配列は Applied Biosystem 477 A Protein Sequencer を用いて決定した。ノーザンブロット法のオリゴヌクレオチドプローブはアミノ酸配列に基づいて合成した。16kDa タンパク質の cDNA のクローニングは、ブタ精巣上体尾部の cDNA ライブラリーを用いて行い、塩基配列を決定した。タンパク質のコレステロール結合活性は Kandutsch and Showm (1981) の方法により分析した。グリコシダーゼ活性は PNP-グリコシドを基質として分析した。分子量は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法とゲルろ過法を用いて測定した。

(結果と考察)

(1) lactoferrin

ブタ精巣上体分泌液から精製した70kDaのタンパク質が、N-末端アミノ酸配列分析結果から lactoferrin と同定できた。また、ノーザンブロット法とウェスタンブロット法による分析結果から、lactoferrin が精巣上体頭部の後半以降で合成されて管腔内に分泌されていることが判明した。一方、精製 lactoferrin に対する家兎抗血清は、精巣上体尾部から得た成熟精子を凝集した。また、成熟精子細胞膜から lactoferrin を抽出できた。しかし抗血清は精巣上体頭部前半の未成熟精子を凝集しなかった。lactoferrin は精液や射出精子細胞膜表層の主要タンパク質として知られている。本研究の結果は、lactoferrin は精巣上体頭部後半以降で分泌される精子表層に付着することを示している。また、精子成熟に関連することを示唆している。

(2) 16kDa cholesterol-binding protein

ブタ精巣上体尾部分泌液から精製した分子量16kDaのタンパク質が、コレステロールを特異的に結合する活性、及び精子細胞膜コレステロールを遊離させる作用を示した。このタンパク質は精巣上体の頭部後半から分泌され

る新規の糖タンパク質であった。このタンパク質は精子表層のコレステロール含量の調節を通して精子成熟に関与している可能性がある。

(3) lysosomal type α -D-mannosidase

精子細胞膜表層の糖鎖は卵との認識・融合過程にかかわっていることから、ブタ精巢上体尾部分泌液中の α -D-mannosidase 活性をもつタンパク質を精製した。精製した酵素は、分子量270kDaであり、N-末端アミノ酸配列及び酵素学的性状からリソソームタイプの α -D-mannosidaseであることが判明した。酵素の至適pHは酸性領域にあるが、精巢上体分泌液の生理的pHにおいても高い活性を示した。この酵素はまた、精巢上体分泌液内の主要な α -D-mannosidaseであった。筆者らは本研究でlactoferrin及び16kDa cholesterol-binding proteinの糖鎖が精巢上体頭部から尾部に移行する間に徐々に分解されることを観察している。このリソソームタイプの α -D-mannosidaseは、精巢上体分泌液糖タンパク質の糖鎖や精子表層の糖鎖の修飾を通して精子成熟に関与している可能性がある。

審 査 の 結 果 の 要 旨

精巢上体から分泌されるタンパク質は、精子成熟に重要な役割を演じていると考えられている。本研究で筆者は、lactoferrinが精巢上体頭部後半以降で合成されて管腔内に分泌され精子表層に付着することを示した。従来lactoferrinは精囊または前立腺由来で、精巢上体には存在しないとされていた。今回の研究結果はすでに英文原著論文(Mol. Reprod. Dev. 47: 490-496, 1997)として発表されている。筆者はまた、精巢上体尾部分泌液中に分子量16kDaの新規のコレステロール結合タンパク質が存在することを明らかにした。さらに、精巢上体分泌液内の主要な α -D-mannosidase活性は、分子量270kDaのリソソームタイプの α -D-mannosidaseによることを示した。本論文は、精子成熟の分子機構の解明に寄与すると考えられる新知見を記載しており、高く評価できる。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。