

氏名(本籍)	やま がた かず お 山 縣 一 夫 (和歌山県)
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	博 甲 第 2282 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	Roles of Sperm Serine Proteases in Mammalian Fertilization (哺乳動物の受精における精子セリンプロテアーゼの役割)
主査	筑波大学教授 農学博士 馬場 忠
副査	筑波大学教授 工学博士 松村 正利
副査	筑波大学教授 農学博士 田仲 可昌
副査	筑波大学教授(併) P h . D . (理学) 多比良 和誠

論文の内容の要旨

哺乳動物の受精の際に、精子はまず卵外破糖タンパク質である透明帯に結合し、アクロソーム反応を起こすことでアクロソームに含まれるさまざまな加水分解酵素を放出して透明帯を限定分解しながら通過する。体外受精試験系に各種プロテアーゼ阻害剤を添加した実験から、この限定分解には精子アクロソーム中のトリプシン様セリンプロテアーゼが関与することが明らかとなっている。アクロシンはその候補として詳しく検討されてきたが、アクロシン欠損マウス精子が媒精後初期での透明帯通過に若干の遅れがあるものの、正常な受精能を有していることが報告され精子の透明帯通過の分子機構は依然として混沌としている。このような背景のもとで、本論文では(1)アクロシンの生体内機能と、(2)精子の透明帯通過に関与するアクロシン以外のセリンプロテアーゼの同定に焦点をあてて研究を行っている。

まずアクロシン欠損マウス精子でみられた媒精後初期での透明帯通過の遅延がどの段階で起きるのかを調べることによって、アクロシンの生体内機能に関して検討した。体外受精試験の結果から、精子の透明帯への付着・結合には欠損マウスと野生型で有為な差は認められなかった。しかし、カルシウムイオノフォアや透明帯を添加することで人為的にアクロソーム反応を起こさせた精子について調べてみると、野生型マウス精子ではアクロソーム反応後にアクロソーム内容物は完全に消失するのに対して、欠損マウス精子では露出したアクロソーム内膜に沿ってタンパク質が残存することが明らかとなった。これらの結果は欠損マウスではアクロソーム反応にともなうタンパク質の放出が野生型に比べて遅れることを明確にしておき、アクロシンのおもな生体内機能はアクロソーム反応にともなうタンパク質の放出を促進することであると結論した。

次に、精子の透明帯通過に関与するアクロシンとは別のセリンプロテアーゼを同定することを目的として、トリプシン様セリンプロテアーゼ阻害剤であるパラアミノベンザミジン (pAB) がアクロシン欠損マウス精子に与える影響を検討した。その欠損マウス精子についてpAB存在下で体外受精試験を行うと、pAB非存在下に比べてその受精と精子の透明帯通過に著しい阻害が認められた。この結果は、透明帯通過にはアクロシン以外のpAB感受性プロテアーゼが関与していることを示唆している。また、シルバートレープ法を用いて精子プロテアーゼ活性の検出を試みたところ、野生型だけでなく欠損マウス精子でもアクロソーム特異的にプロテアーゼ活性が見いだされ、アクロソーム反応後の精子ではそれらが消失していた。さらに、アクロシン欠損マウス精子のアクロソームタンパク質を抽出してゼラチン存在下でのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うと、ゼラチン分

解活性をもつ42キロダルトンプロテアーゼが検出された。このプロテアーゼは、pABによって活性が完全に阻害されることも明らかとなった。以上の結果より、マウス精子アクロソーム中に存在する42キロダルトンプロテアーゼが精子の透明帯通過に関与している可能性が示唆された。

哺乳動物精子の透明帯通過でのプロテアーゼの関与についてより多くの知見を得るために、アクロシンや42キロダルトンプロテアーゼを含むアクロソーム中のセリンプロテアーゼに関して、マウス、ラット、およびハムスターのげっ歯動物間で比較検討を行った。精子抽出物を用いた2次元電気泳動を行ったところ、マウス42キロダルトンプロテアーゼの等電点は5前後であったのに対し、ラットやハムスターではゼラチン分解活性をもつプロテアーゼ活性はすべて等電点8以上であった。ウエスタンブロッティング分析の結果から、等電点8以上のプロテアーゼはアクロシンに相当していることが明らかとなった。また、マウスにおけるアクロシンのゼラチン分解活性は、ラットやハムスターのものに比べて著しく低いことも明確になった。以上の結果から、42キロダルトンプロテアーゼはマウス精子特異的に存在していることと、げっ歯動物間でも精子アクロソームに含まれるセリンプロテアーゼに量的あるいは質的な相違があり、精子の透明帯通過に関わるプロテアーゼの作用機構が異なっていることが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、哺乳動物の受精で重要な役割を果たしていると考えられるアクロシンに関して、その欠損マウスの精子を用いて機能解析を行っている。アクロシン欠損マウス精子はアクロソーム反応直後でのアクロソームタンパク質の放出が著しく遅延していることが観察され、精子アクロソームの消失までに多くの時間を要するか、アクロソーム反応が不完全に終わるかのどちらかであることが明らかとなった。このことはアクロシン欠損マウス精子の表現型、すなわち受精能はあるものの透明帯通過に遅れが見いだされる現象を究明しており、アクロシンがアクロソーム反応の際にその内容物の放出で重要かつ特異的な役割を果たしていることを世界ではじめて明らかにしている。また、精子の透明帯通過に関与するアクロシンとは別のプロテアーゼの検索を行い、マウス精子で42キロダルトンの新規セリンプロテアーゼを同定することにも成功している。さらに詳しい検討から、その42キロダルトンプロテアーゼはマウス精子特異的に存在している可能性も見いだしている。

以上の研究は、哺乳動物精子アクロシンの生体内機能を明らかにしただけでなく、精子の透明帯通過の分子機構に関して新しい理論構築をしたといえる。さらに詳しい検討は必要であるが、未だに不明な点が多く残されている受精の研究分野に本研究が少なからず貢献したことは明らかであり、新しい研究の視点を導いていると判断することができる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。