博士（理　学）　小　俣　節　子

学位論文題名

Studies on the binding of sperm to the vitelline coat (VC) in an anuran, *Bufo japonicus* : its mechanism and molecular entities of VC involved

（ニホンヒキガエルにおける卵膜と精子の結合機序とそれを担う卵膜分子についての研究）

学位論文内容の要旨

多くの動物種の卵を取り囲む糖タンパク質性の細胞外マトリックスはゼリー層、卵膜あるいは透明帯などからなり、精子による種認識の場となるだけでなく、精子の活性化や先体反応の誘起、さらに多精拒否の場としての役割を担うことが知られている。両生類では受精の成立にゼリー層が必須であるばかりでなく、精子の通過性に関して卵膜も顕著な変化を示すことが知られている。すなわち、体腔卵は精子が卵膜を通過できないため受精しないが、輸卵管を通過する際に輸卵管直部からの分泌物によって卵膜が部分分解されるため子宮卵は受精可能となり、さらに受精卵は卵から放出される物質によって卵膜に物理化学的な変化が起こるため再び受精不可能となることが明らかにされている。申請者は、ニホンヒキガエル(*Bufo japonicus*)を用いてゼリー層を取り除いた卵を特定の溶液中で媒精すると、受精可能な子宮卵卵膜には多くの精子が結合するが、受精不可能な体腔卵や付活卵にはほとんど結合しないことを発見した。そこで卵膜への精子の結合を定量的に評価する実験系を確立し、それを利用して卵膜の精子結合能の獲得機構、および卵膜と精子の結合様式とそれを担う卵膜分子の同定を目的として実験を行い、以下の結果を得た。

1．卵膜の精子結合能の獲得機構：ゼリー層を除去した子宮卵は受精環境である淡水に相当する塩溶液中では受精しないが、ゼリー内のイオン組成を再現した塩溶液であるreconstituted salt solution(RSS)中では受精可能である。未受精卵から単離した卵膜をRSS中で媒精し、位相差顕微鏡下で卵膜の単位面積(0.2mm^2)当たりに結合した精子数を数えることによって卵膜への精子の結合を定量化した。この定量法によれば子宮卵卵膜には100から300ヶ前後の精子が結合するが、受精不能な体腔卵の卵膜や低イオン強度下で付活させた子宮卵の卵膜にはその数%の精子しか結合しなかった。これまでの研究により、体腔卵は輸卵管直部の抽出液あるいはその分泌顆粒の内容物で処理すると子宮卵と同様に受精可能となること、またそれは分泌顆粒中のトリプシン様酵素が40-52kDaの卵膜成分を部分分解して36-39kDaに転換させることが1要因となっていることが既に知られている。そこで、体腔卵卵膜を輸卵管直部の抽出液で処理すると子宮卵卵膜と同じレベルの多数の精子が結合するようになり、また分泌顆粒の内容物あるいはゲル濾過によって部分精製したトリプシン様酵素による処理でも卵膜に結合する精子数が増加し、これらの作用はトリプシン阻害剤によって抑制された。以上から、体腔卵卵膜は輸卵管直部から分泌されるトリプシン様酵素により40-52kDa成分が部分分解を受けることによって子宮卵卵膜となり、精子結合能力を獲得することが明らかとなった。

2．卵膜と精子の結合様式：卵膜への精子結合を保証するRSSは比較的高濃度のCa^{2+}, Mg^{2+}を含むため卵膜と精子の結合における2価陽イオンの役割について検討した。RSSか

らCa^{2+}, Mg^{2+}を除去すると子宮卵卵膜に結合する精子数は著しく減少し、Ca^{2+}, Mg^{2+}の濃度に依存して増加したが、これらのイオン単独では結合は不十分であった。ゼリー層を除去した子宮卵は生理的塩類溶液であるDe Boer液やその稀釈液中では受精せず、同時にこれらの条件下では卵膜への精子の結合も起こらないことから、この反応は受精の1ステップを反映したものであることが伺える。卵膜に結合した精子を走査型及び透過型電子顕微鏡で観察した結果、精子はその頭部先端で卵膜と結合しており、また圧倒的多数が先体反応を起こしていなかった。すなわち精子は先体反応なしに卵膜に結合できることがわかった。

3. 精子の結合における卵膜の糖鎖の関与：ヒキガエル子宮卵卵膜は主に112kDa, 61-65kDa,36-39kDaの糖タンパク質から構成されている。子宮卵卵膜をトリプシン, キモトリプシンなどのタンパク分解酵素で処理しても卵膜への精子の結合は影響されなかった。子宮卵卵膜を過ヨウ素酸酸化により糖鎖の還元末端を解離させると精子の結合は著しく減少した。抗卵膜ウサギ血清のIgG分画およびそのFabフラグメントで子宮卵卵膜を処理すると、精子の結合は阻害された。ウェスタンブロットによる解析によればこの抗卵膜抗体はプロナーゼ処理した卵膜には反応するが、トリフルオロメタンスルフォン酸またはペプチド-N-グリコシダーゼFで糖鎖除去を行った卵膜とは反応しないので、卵膜の糖鎖を主に認識していると考えられる。更に子宮卵卵膜を様々なレクチンで処理したところ、卵膜への精子の結合はConAにより最も強く、SBA, DBA, PNA等で強く阻害された。これらの実験より、卵膜糖鎖のうち末端のManあるいはGalNacが重要であることが示唆された。ペロキシダーゼで標識したレクチンを用いて子宮卵卵膜成分のレクチンブロットを行ったところ、ConAは112kDa分子に強く61-65kDa分子に弱く反応し36-39kDa分子にはほとんど反応しなかったのに対して、DBAはすべての卵膜分子に反応した。また子宮卵卵膜を過ヨウ素酸酸化すると、DBAの対する反応は完全に消失するのに対して、ConAに対するそれは部分的に消失するのみであった。ConAに対する結合部位は卵膜表面に数多く存在することが既に確かめられていることから、前記のConAによる精子の結合阻害は糖鎖末端に結合したレクチンによる立体障害に基づくものである可能性が高い。

4. 精子との結合に関わる卵膜分子の同定：子宮卵卵膜を1%SDSを含む緩衝液中で1分間煮沸することにより可溶化して得た卵膜液は、これを精子と共存させると卵膜への精子の結合を阻害し、また抗卵膜抗体Fabフラグメントの持つ卵膜と精子の結合阻害活性を中和した。可溶化した卵膜をSuperose12によりゲル濾過し、112kDaの分画(group I), 112kDaと61-65kDaを含む分画(group II), 61-65kDaと36-39kDaを含む分画(group III), 36-39kDaの分画(group IV), の4グループに分けた。各分画について(a)精子と卵膜の結合を阻害する活性と、(b)抗卵膜抗体Fabフラグメントによる精子と卵膜の結合阻害を中和する活性とを調べた。その結果、活性(a)はgroup IVに著しく強く、また活性(b)はgroup III及びIVにのみにみられた。これらの実験から、group III及びIVに含まれる36-39kDaの卵膜成分が精子の結合に深く関与している可能性が高い。前述したように36-39kDa分子の糖鎖はDBAには反応するがConAには反応しないことを併せて考えると、36-39kDa分子のGalNacを末端に持つ糖鎖が精子の結合に重要であるとみなされる。更に興味深いことに、卵膜成分のうち36-39kDa成分に限ってスフィンゴ糖脂質の糖鎖であるGalNacβ1-4(NeuAcα2-3)Galβ1-4Glcを認識する抗GM2モノクローナル抗体に特異的に反応した。この糖鎖構造はDBAによっても認識されるので、卵膜の36-39kDa成分のうちGalNacを末端に持つ糖鎖が精子の結合に機能している可能性が極めて高い。

本研究で開発された精子と卵膜の結合を測定する方法および得られた結果を基礎に、卵膜の糖タンパク質のうち抗GM2抗体で認識される糖鎖が実際に精子を結合させるのか、また精子の表面上のいかなる分子が卵膜と結合するかなどの解析を通じて、無尾両生類における受精の分子機構の解明が可能になると信ずる。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　片　桐　千　明
副　査　教　授　鈴　木　範　男
副　査　教　授　高　橋　孝　行
副　査　教　授　星　　元　紀
（東京工業大学大学院生命理工学研究科）

学位論文題名

Studies on the binding of sperm to the vitelline coat (VC) in an anuran, *Bufo japonicus* : its mechanism and molecular entities of VC involved

（ニホンヒキガエルにおける卵膜と精子の結合機序とそれを担う卵膜分子についての研究）

受精の際に精子と卵子が首尾よく膜融合できるためには、精子が前もって卵外被と相互作用することが不可欠である。この相互作用は動物種による受精戦略の違いにもとづき見かけ上多様であるが、２、３の無脊椎動物の卵膜および哺乳類の透明帯に対する同種精子の付着または結合（binding）は、普遍性が高い現象として知られるだけその受精における意義は大きいと考えられる。しかしこれらの場合でも、結合に与る卵膜および精子の分子的実体や結合と精子先体反応との関係については不明な点が多い。小俣節子提出の学位論文は、ニホンヒキガエルを用いて生理的な条件下で卵膜と精子の結合が受精の有無と正の対応を持つことを見出したうえで、卵膜と精子の結合を定量化する実験系を確立し、さらにそれを用いて両者の結合にあずかる卵膜分子の同定を試みることを通じて、無尾両生類に特有の輸卵管を介した卵の受精能力獲得機構の解明をめざしたものである。

申請者は、ゼリー層を除去されたヒキガエルの子宮卵がゼリーの代用液である特定の組成の塩類溶液(reconstituted salt solution: RSS)中では受精可能であることに着目して、未受精卵から単離した卵膜をRSS中で媒精し、卵膜の単位面積当たりに付着した精子数を数えることによって、両生類ではじめて精子と卵膜の結合を定量的に測定する方法を確立した。この方法で体腔卵、受精卵などの卵膜に付着する精子数を測定した結果を総合して、同条件下で観察される卵膜と精子の結合が受精に必須のステップをなすと結論しているのは極めて妥当であり、とりわけ体腔卵を受精可能にすることが知られてい

る輸卵管直部由来の抽出液あるいはプロテアーゼ処理によりそれが増加するという観察から提起されている、輸卵管直部のプロテアーゼは卵膜の精子結合サイトを増加させるという仮説は注目され、検証に値するものである。また付着している精子は先体反応を起こしていない、という観察は付着にあずかる精子がわの分子の局在を追求するうえで重要な発見である。申請者はさらに卵膜がわのリガンドの追求を進め、(a) 子宮卵卵膜のプロテアーゼ処理や糖鎖の修飾と卵膜の糖鎖を主に認識する抗体を併用したアッセイからManあるいはGalNacを末端にもつ糖鎖、(b)可溶化後ゲル濾過した卵膜分画の精子結合阻害活性からGalNacを末端にもつ３６－３９kDaの卵膜成分、を精子との結合にあずかる分子の候補としてあげている。

以上の研究は、卵膜と精子の結合の意義を両生類に固有の現象を巧みに利用して鮮やかに提示したところに特徴がある。申請者の研究姿勢は、対象に密着しその生物材料としての特性を生かして解析を進める点で一貫しており、この論文で得られた成果は今後両生類を用いて卵膜と精子の結合に関する研究をすすめるための出発点をなすものとして重要である。特に、ここで提起された卵膜の３６－３９KDa 成分に含まれるリガンドの同定およびその卵膜内における位置づけは、精子との結合にあずかる卵膜の分子的実体の一般的解明に寄与するものとなろう。申請者に対する最終試験は、平成９年１月２８日に多数の大学院担当教官の出席のもとに論文の口頭発表と質疑応答の形で行われ、満足すべき結果であった。　したがって、審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を受けるに十分の資格があるものと認める。