

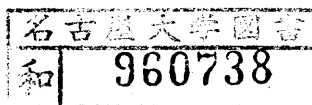
ヒトデ卵ゼリー中に存在する
先体反応誘起物質群の研究

松 井 太 衛

ヒトテ"卵ゼリ一中に存在する
先体反応誘起物質群の研究

名古屋大学理学部生物学教室
動物学第二講座

松井太衛



報告番号	甲第 1828 号
------	-----------

主 論 文

略

号

- A23187 : Ca^{2+} -ionophore A23187
- A. a. : Asterias amurensis (ヒトテ")
- 9-AA : 9-aminoacridine
- A. p. : Asterina pectinifera (イトマキヒトテ")
- ARIS : acrosome reaction-inducing substance (先体反応誘起物質)
- ASW : artificial sea water (人工海水)
- % A. R. : percent of acrosome reaction (先体反応率)
- CFSW : Ca^{2+} -free sea water (Ca^{2+} -欠除人工海水)
- CSFSW : Ca^{2+} , SO_4^{2-} -free sea water (Ca^{2+} , SO_4^{2-} -欠除人工海水)
- Co-ARIS : cofactor for ARIS (ARISの補助因子)
- DEAE : diethylaminoethyl
- DMSO : dimethylsulfoxide
- DW : distilled water (蒸留水)
- EPPS : N-{2-hydroxyethyl}-piperazine-N'-3-propanesulfonic acid
- GGASW : glycylglycine-buffered ASW (グリシルグリシン緩衝-人工海水)
- HPLC : high-performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィ)
- IMX : 3-isobutyl-1-methylxanthine
- J : egg jelly (卵ゼリー)
- M_8 : Fraction M_8 (M_8 画分)
- NFSW : Na^+ -free sea water (Na^+ -欠除人工海水)
- P-ARIS : Pronase-digested ARIS (プロナゼ消化ARIS)
- pH_e : extracellular pH (細胞外pH)
- pH_i : intracellular pH (細胞内pH)
- PIPES : piperazine-N,N'-bis{2-ethanesulfonic acid}
- P- M_8 : Pronase-digested Fraction M_8 (プロナゼ消化 M_8 画分)
- SW : sea water
- Tris : Tris (hydroxymethyl) aminomethane
- TLC : thin-layer chromatography (薄層クロマトグラフィ)
- WGA : wheat germ agglutinin

目 次

要 旨 1

第 1 章：緒 論 4

第 2 章：ヒトデ精子先体反応の
誘起条件 14

第 3 章：ARIS 及び M_8 画分の
精子に対する作用 52

第 4 章：低分子ペプチド成分による
細胞内 pH の上昇と先体反応 84

第 5 章：総 括 113

謝 辞 119

参考文献

先体を持つ精子が、卵外被と反応して起こす先体反応は、受精に不可欠の精子の形態的、生化学的変化の一つである。本研究では、ヒトテの先体反応の誘起条件及び、卵ゼリー中の先体反応誘起物質群と精子との相互作用を調べ、反応の誘起機構を考察した。

ヒトテの先体反応は、正常海水中 (10mM Ca^{2+} , pH8) で卵ゼリー中の ARIS (先体反応誘起物質) と Co-ARIS (ARISの補助因子) によって誘起される。ARIS は見かけの分子量が 10^7 以上の硫酸化糖タンパク質であり、糖鎖及び硫酸基が活性発現に必須であった。先体反応は高 Ca^{2+} 条件 (40mM 以上) や高 pH 条件 (pH 9-10) では ARIS のみでも誘起され、また高 Ca^{2+} 高 pH 同時条件や A23187 によっても誘起できた。

正常海水中、ARIS 単独では先体反応は誘起されないが、ARIS で前処理した精子に卵ゼリーを添加しても、もはや先体反応は誘起されなかった。Co-ARIS を含む卵ゼリー由来の低分子画分 (M_8 画分) によっても同様の前処理効果が認められた。精製された Co-ARIS には、このような

効果はなく、70ナセ感受性であることから、M₈画分中の低分子ペプチド成分に起因することが示された。ARISや低分子ペプチド成分による前処理効果は不可逆的であり、精子と混合後に上清に残る各活性が低下していたことから、これらの成分が精子に吸着する可能性が示唆された。先体反応はCa²⁺チャネル阻害剤によって阻害されるが、前処理した精子では、卵ゼリーによるCa²⁺の取りこみを示さなかった。しかし、この様な精子もA23187によって先体反応を起すことから、前処理によって精子のCa²⁺取りこみ機構(恐らくはCa²⁺チャネル)が不活性化されることが示唆された。

一方、先体反応時に精子の細胞内pH(pH_i)の上昇が起り、これはM₈画分中の低分子ペプチド成分に依存していた。この成分は弱酸性条件(pH6.5)で精子の呼吸を上昇させたことより、精子活性化ペプチドの一種であることが示された。また、高Ca²⁺条件下でARISを用いると、pH_i上昇を伴わずに先体反応が誘起される

ことから、 pH_i 上昇は先体反応に必須ではないことが明らかになった。しかし、 pH_i 上昇を促すモネンシンによつて A23187 による先体反応が促進されること、 Mg 画分が同様の効果を示すことから、 pH_i 上昇を伴う条件下では、より先体反応が起こりやすいと考えられた。

以上の結果から、卵ゼリーに接した精子は、ARIS、G-ARIS と未同定のペプチド成分の三者による作用を同時に受け、速やかに先体反応を起こすものと結論される。ARIS と G-ARIS によつて Ca^{2+} -チャンネルは活性化するか、ARIS とペプチド成分の作用は一過性であり、それぞれが単独で精子に作用すると、 Ca^{2+} -チャンネル活性化機構はやがて不活性状態に不可逆的に移行し、卵ゼリーを添加されても、精子はもはや先体反応を起こせなくなると思われる。また、ペプチド成分は、先体反応の誘起に必須ではないが、ペプチド成分中の一種の精子活性化ペプチドによつて精子の pH_i が上昇し、先体反応が促進されるものと考えられる。

第 1 章

緒 論

1 - 1. 受精における先体反応の意義

多くの生物は、細胞の融合を介して遺伝情報の混合を行ない、多様性を生み出すと同時に細胞(核)の若返りを行なうことが知られている。一般に高等動物では、この現象は生殖と共役しており、配偶子間の細胞融合、すなわち、“受精”をへてなされる。受精した細胞は、新しい個体として発生を開始する。受精は本来、卵・精前核の最終的な融合をもって定義されるが、本論文ではこの分野での習慣に従い、両配偶子間の細胞融合をもって“受精した”と表現する。

受精に到るまでに、精子は一定の形態的機能的変化を遂げる。その中で、最も重要かつ受精に不可欠の変化は、硬骨魚類を除く多くの動物で見られる精子先体反応(acrosome reaction)である。先体反応の本質は、①先体胞(acrosomal vesicle)中に貯えられたライシン(lysin)を放出することによつて、卵外被層を分解し

精子の貫入を容易にするとともに、②卵細胞膜と融合可能な細胞膜(先体胞の内膜)を新たに露出、形成することにある(Dan, 1967)。棘皮動物では、これらの変化は先体胞の開口分泌(exocytosis)及び、引き続き起こるアーク42のG→F転換による、繊維性の先体突起(acrosomal process)の形成と伸長からなる(Tilney S., 1973; 図1-1, 2)。ライシニンとしては、種々のタイプの酵素や、非酵素性の物質が精子頭部から精製されているか(Hoshi, 1985)、②で露出される細胞膜の特性については、よく判っていない。

一般に先体反応を起こした後、精子は極めて急速に受精能を失う(Takahashi & Sugiyama, 1973; Vacquier, 1979; Nakano S., 1984)。言い換えれば、精子は、適正な場所とタイミングで先体反応を起こさねば、受精できないわけである。

この様に、先体反応は、受精の成立に不可欠なことのできない一過性の変化であり、細胞運動や細胞間認識の点でも興味ある問題を数多く包含している。

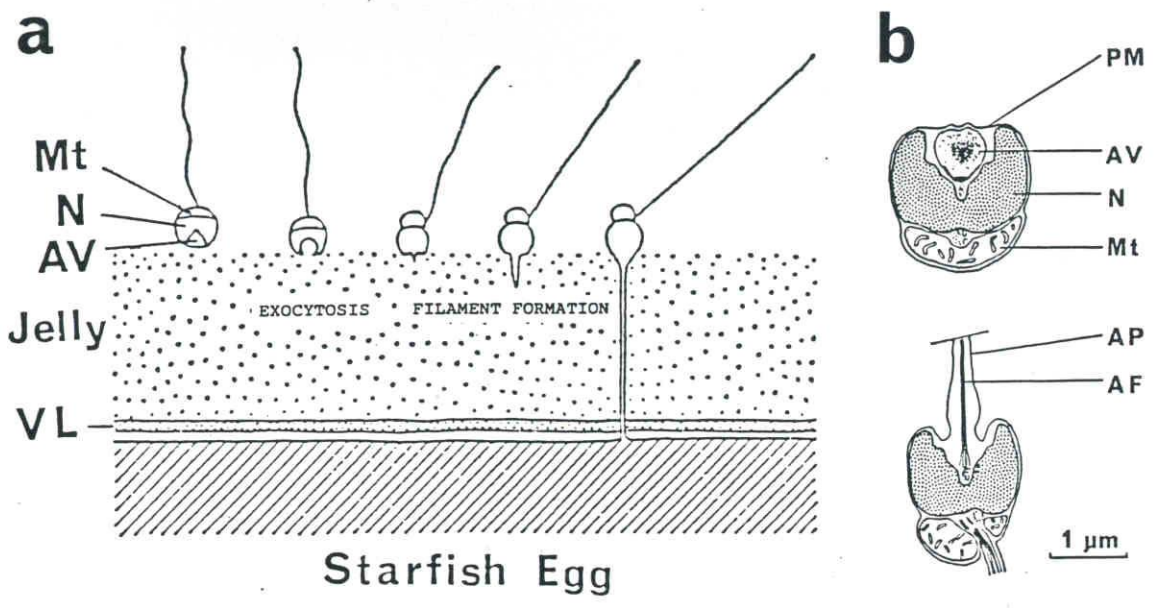


図1-1: ヒトデの精子先体反応と受精過程

a: AV (先体胞), Jelly (卵ゼリー層), Mt (ミトコンドリア)
N (核), VL (卵黄膜)

b: 先体反応前(上)と反応後(下)のヒトデ精子の模式図
(Hagiwara 5, 1967; 国, 1975 より改図)
AF (重合したアクチン線維), AP (先体突起), PM (細胞膜)

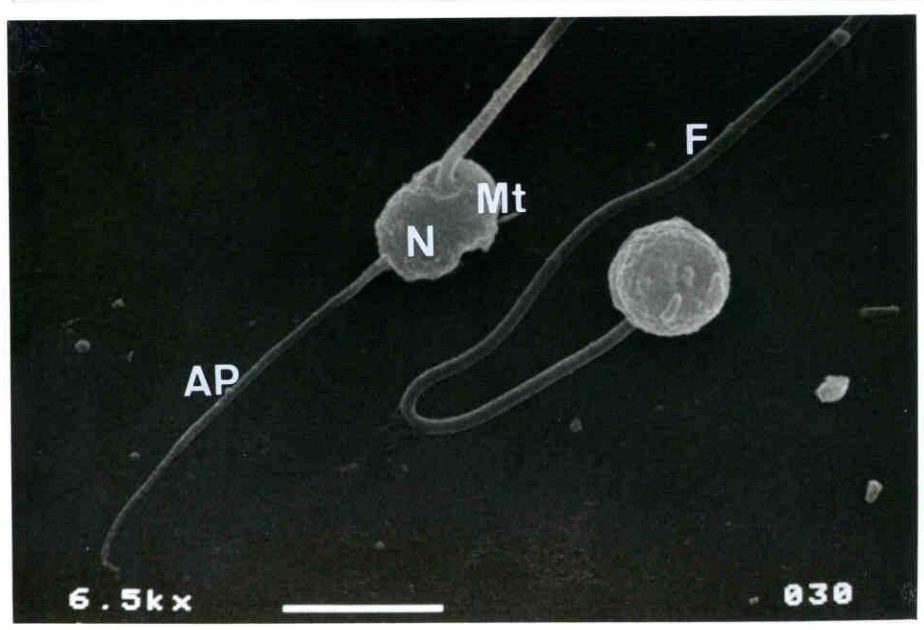


図1-2: ヒトデ精子先体反応の走査電子顕微鏡による観察

精子をグルタルアルデヒド前固定, OsO₄ 後固定, アルコール脱水系列をへて、酢酸イソアミルに置換した。CO₂-臨界点乾燥後、Au-コーティング(約200Å)し、AKASHIの-10型走査電子顕微鏡で観察した。先体反応前(右)と反応後(左)の精子を示す。スケールは3 μm。

AP (先体突起), F (鞭毛), Mt (ミトコンドリア), N (核)

1 - 2. 先体反応研究の略史.

先体反応の研究は、主として、大量の材料を容易に得ることができ、海産無脊椎動物を用いて行われてきた。1952年、J.C. Dan によつて、ウニ精子が卵ゼリー-物質によつて先体反応を起すことが初めて見いだされ、卵ゼリー-は、先体反応の生理的な誘起物質としてその機能が注目されるようになった。先体反応に伴う精子の形態的变化を中心に、受精過程が電子顕微鏡レベルで明らかにされ (Atzelius & Murray, 1957; Dan & Hagiwara, 1967; Colwin & Colwin, 1967)、受精における先体反応の生物学的な意義が、明らかにされた。一方、先体反応は、アルカリ性海水でも誘起されること (Colwin & Colwin, 1956) Ca^{2+} を必要とすること (Dan, 1954) なども見いだされた。

1970年代になつて、生化学的なアプローチが始まり、ウニ卵ゼリー-からシアル酸を含む成分 (Isaka *et al.*, 1970) や、ホリフコ-ス硫酸 (SeGall &

Lennarz, 1979) が、先体反応誘起物質として報告された。また、先体反応に伴って、様々なイオンに対する精子の膜透過性の変化や (Schackmann 5, 1978 ; Schackmann & Shapiro, 1981)、環状ヌクレオチドレベルの上昇 (Kopf & Garbers, 1980) が起こることなども見い出された。表 1-1 に、先体反応に伴う精子の種々の変化を、ウニを中心にまとめた。イオン透過性の変化には、それぞれのイオンチャンネルが介在していると思われる。

先体反応の誘起機構は、今なお、明らかではないが、少なくとも開口分泌には Ca^{2+} の細胞内流入が必須であり (Tilney, 1985)、 Ca^{2+} チャンネルの活性化が重要な意味を持つと考えられている。Shapiro らは、卵ゼリ-によつて、精子細胞膜の脱分極と細胞内 pH (pH_i) の上昇が起こり、双方によつて Ca^{2+} チャンネルが活性化され、先体反応が誘起されると考えている (Christen 5, 1983 ; Kazazoglou 5, 1985)。また、先体突起の伸長には pH_i 上昇が必須であることも示唆されている (Tilney 5, 1978)。

表 1-1 : 棘皮動物の先体反応

INDUCERS	BIOCHEMICAL CHANGES	MORPHOLOGICAL CHANGES
EGG JELLY	DEPOLARIZATION Ca ²⁺ -INFLUX H ⁺ -EFFLUX	EXOCYTOSIS
IONOPHORES Ca ²⁺ -RICH SW	Na ⁺ -INFLUX K ⁺ -EFFLUX	ACROSOMAL PROCESS ELONGATION
ALKALINE SW	PHOSPHOLIPASE ↗	MITOCHONDRIA ROUND UP TO SPHERICAL SHAPE
AMMONIA	PROTEASE ↗	
SURFACTANTS	A,G-CYCLASE ↗	
	RESPIRATION ↘	
	MOTILITY ↘	

棘皮動物の先体反応を、主にウニを例として先体反応誘起因子、
生化学的変化、形態的変化の点からまとめた。

(Dan, 1952,1967; Colwin & Colwin, 1956; Collins & Epel, 1977;
Kopf & Garbers, 1980; Schackmann & Shapiro, 1981; SeGall &
Lennarz, 1981; Tilney, 1985 参照)

1-3. 先体反応研究の問題点.

先体反応の研究は、ウニを材料としたものが圧倒的に多い。これは、ウニが、受精や発生の研究に適し、早くから頻繁に用いられてきたためと考えられるが、先体反応研究には最適な材料とは言いがたい。その理由として、ウニでは、①先体突起が短いため(約 $0.3\mu\text{m}$)、先体反応の有無の判定には、電子顕微鏡によらざるを得ないので、大量処理実験には向かない。②開口分泌と先体突起形成の二つのステップが見分けにくい。③卵ゼリーを通過し、卵膜に到達した精子がそこで初めて先体反応し、受精するという考えもあり(Aketa & Ohta, 1977)受精に関わる精子が、卵ゼリー層のどの部位で先体反応を起こすのか不明である、などの点が上げられる。これに対し、ヒトデ類やナマコ類の精子は、卵ゼリー表面に到達した時点で先体反応を起こし、先体突起が卵ゼリー、卵膜をつき抜けて、卵細胞膜と融合すること

が確かめられている (Colwin & Colwin, 1955; Dale S. 1981)。
また、先体突起は長く (約 $10 \sim 25 \mu\text{m}$)、光学顕微鏡下で迅速に、大量の検定を行うことが可能である。特に先体突起形成に関する研究は、ヒトデヤナマコで進められ、アウキニの重合に起因するところが見い出されている (Tilney S. 1973)。

卵ゼリー中に存在する先体反応誘起活性物質としては、ウニヤヒトデで硫酸化多糖類が報告されている。しかし、例えばウニから単離されたポリフコ-ス硫酸は、正常海水の4倍以上の Ca^{2+} 存在下で初めて、先体反応を誘起する (SeGall & Lennarz, 1979, 1981)。したがって、正常海水中的の生理的な機能については疑問が残る。この様に、先体反応誘起物質が明らかになっていない以上、先体反応誘起機構の解明は困難といえる。

また、表 1-1 に示した先体反応に伴う諸変化は、主として卵ゼリーをそのまま用いた結果であるが、卵ゼリーは均一な物質で構成されてはいない。生理的機能や先体反応との

関係も不明であるが、精子凝集素 (Uno & Hoshi, 1978) や、精子活性化ペプチド (Ohtake, 1976) などの活性物質も含まれている。精子活性化ペプチドにより、精子の pH_i や cGMP レベルが上昇することが報告されており (Repaske & Garbers, 1983)、先体反応に伴う種々の反応が、単一の物質に起因するのか、必須の連鎖反応群であるのか、さらに、それらの間の因果関係など、重要な問題点が不明のままである。したがって、先体反応誘起物質を単離し、その構造と機能の対応を明らかにした上で、先体反応に伴う諸変化の再検討を行なう必要があると考える。さらに、先体反応の誘起機構の解明には、先体反応誘起物質と、卵ゼリ-中の他の活性物質との相互作用を調べることも重要であろう。以下に実験的アプローチについて述べる。

1-4. 本研究の概略

本研究では、ヒトデ (*Asterias amurensis*) の卵
ゼリー中に存在する先体反応誘起物質群 (Acro-
some Reaction-Inducing Substance; ARIS & Cofactor for ARIS;
Co-ARIS) による先体反応誘起機構について記
述する。第2章では Ca^{2+} , pH, イオノフォアな
ど先体反応誘起条件を検討し、第3章では、
ARIS や卵ゼリー中の未同定のペフ4ド成分
で精子を前処理すると、精子は先体反応を起
こせなくなることを示す。第4章では、卵ゼ
リー中のペフ4ド成分中に一種の精子活性化
ペフ4ドが存在し、精子の pH 上昇をひき起
こすことを示す。そして、この物質が、ヒト
デの先体反応に関与する可能性を示す一方、
pH 上昇は先体反応に必須ではないことを示
す。最後に、得られた結果から、ヒトデの先
体反応の誘起機構に関する作業仮説を提示す
る。

第 2 章

ヒトテ精子先体反応の誘起条件

2 - 1 . 序 論

筏井と星 (1981) は、ヒトテ卵ゼリ - 中の 2 種類の物質が、先体反応を誘起する上で必要であることを見い出した。高分子成分 (フコースを主成分とする硫酸化糖タンパク質) を ARIS, 透析性の低分子有機物質を Co-ARIS と名づけた。ARIS や Co-ARIS を、それぞれ単独で精子に作用させても、先体反応はほとんど誘起されないが、両者を併用すると先体反応が誘起される (表 2-1)。しかし、高 Ca^{2+} 条件では、ARIS だけで先体反応が誘起される。酢酸セルロース膜電気泳動的に均一な標品として単離された ARIS は、見かけの分子量は、 10^7 以上の巨大分子であり、ARIS の活性は、プロナーゼ消化後も保持される。Co-ARIS は、最近、西山ら (1985b) によつて完全精製がなされ、その本体は単一ではなく、互いに類似したステロイドサポニン群であることが明らかになった。

本章では、酸性海水により抽出された、

表 2 - 1 : ARIS と Co-ARIS による先体反応

Factors	Acrosome Reaction
Jelly	O
ARIS	X
Co-ARIS	X
ARIS + Co-ARIS	O
High-Ca ²⁺	X
ARIS + High-Ca ²⁺	O
High-pH _e	X

プロテアーゼ消化 ARIS (P-ARIS) も ARIS と同様の活性を示す。

O : 先体反応が誘起される。

X : 先体反応が誘起されない。

卵ゼリー - をもとに、篠井らの方法に準じて、
プロテアーゼで消化した ARIS (以下 P-ARIS) を調製し、
P-ARIS の活性に必須な部分を明らかにする
とともに、Co-ARIS の含まれる卵ゼリーの他
分子画分の生理的役割を考察した。

一方、棘皮動物に限らず、哺乳類でも、
 Ca^{2+} が先体反応に必須であり (Dan, 1954; Yanagi-
machi & Usui, 1974)、 Ca^{2+} -イオノフォアで先体反応
が誘起されることが知られている (Summers 5, 1976)。
さらにウニでは、海水の pH を上昇させただけ
でも、先体反応が誘起されるが (Collins & Epel,
1977)、ヒトでは開口分泌のみが起こることが
報告されている (Ikada; & Hoshi, 1981a)。そこで、
 Ca^{2+} や pH、及びイオノフォアの先体反応に及ぼ
す影響を調べ、先体反応誘起物質群とあわせ
て、反応の誘起条件を検討した。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 実験材料

本研究では、ヒトデ (*Asterias amurensis*; 俗に「ヒトデ」と呼ばれることもあるが、本論文では正式和名「ヒトデ」を用い、ヒトデ類一般を指す時は「ヒトデ類」とした) を主に用いたが、イトマキヒトデ (*Asterina pectinifera*) も一部用いた。それぞれ生殖期に本州各地の沿岸で採集されたものを 8~15°C で飼育し、実験に用いた。

試薬は、特に断わらないう限り、和光純薬片山化学、半井化学などの特級試薬を用いた。

人工海水 (ASTW と略す; 423 mM, NaCl; 9 mM, KCl; 10 mM, CaCl₂; 23 mM, MgCl₂; 26 mM, MgSO₄; 2 mM NaHCO₃) を基本とし、各種濃度の Ca²⁺ を含む海水は、330 mM CaCl₂ 水溶液と、Ca²⁺-SO₄²⁻ 欠除海水 (CSFSW と略す; 420 mM, NaCl; 9 mM, KCl; 50 mM, MgCl₂) を混合して調製した。pH は、10~15 mM グリニルグリニン (pH 8.2) で緩衝化した。高 pH 海水は、グリニン-NaOH (100 mM, pH 8~10) を含む Ca²⁺ 欠除海水 (CFSW と略す; ASTW から 10 mM CaCl₂ を除いたもの) を調製し、10~25 mM で用いた。

2 - 2 - 2 . 卵ゼリー - の調製法

卵巣を取り出し、1 - メチルアデニン(シグマ) $10^{-6} \sim 10^{-7}$ M を含む海水中で細片化した。30 ~ 60 分後にステンレスメッシュを用いて卵巣片を除去し、成熟卵を得た。卵は淨過海水で一度洗った後に 20 ~ 30 % (v/v) 懸濁液とした。卵懸濁液を緩やかに攪拌しながら、HCl (0.1N) を用いて pH 5.0 とし、卵ゼリー - を可溶化した。数分後に遠心 ($2,000 \times g$, 3分) して卵を除去し、上清をさらに遠心 ($27,000 \times g$, 30分) して、透明な上清を得た。この上清の pH を NaOH で 8 ~ 8.2 に戻し、水を卵ゼリー - 溶液として用いた。

卵ゼリー - の濃度は、L-フコースを標準物質として、フェニール硫酸法 (Dubois 5, 1956) を用いてメチルペニトースとして、480 nm での吸光度を測定し、糖濃度 (μg 糖/ml) で示した。

2 - 2 - 3 . 先体反応の検定法

精子は、ヒトデ生体から切り出した精巣

を、"ドライ・スパーム"として $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ で保存し、数時間以内に精子を採取し、使用した。

先体反応の標準検定は、図 2-2 に示す様に、ドライ・スパームを、 10 mM グリシルグリシニンで緩衝化 ($\text{pH} 8.2$) した ASW (以下 GGASW と略す) で、約 200 倍に稀釈後、 $20 \sim 23^{\circ}\text{C}$ で約 3 分間放置した。精子の運動性が良好であることを倒立顕微鏡下で確認後、この精子懸濁液 $25\ \mu\text{l}$ を、 50 mM グリシルグリシニンを含む ASW ($\text{pH} 8.2$) $25\ \mu\text{l}$ 、試験液または ASW を $50 \sim 75\ \mu\text{l}$ と混合した (最終精子濃度; 約 5×10^7 精子/ ml)。 $20 \sim 23^{\circ}\text{C}$ で約 2 分間放置後、 5% カルタール・アルデヒド海水を $25\ \mu\text{l}$ 添加し固定した。 0.5% エリスロシンを 1 滴加え、先体胞の染色を行った後に、ノマルスキー - 微分干渉顕微鏡を用いて検鏡した ($1,000$ 倍)。先体突起の十分伸長している精子を "先体反応した精子" と見なし、少なくとも 2 個体以上のヒトテを用い、各々、100 以上の精子を調べて平均を求め、先体反応率 (% acrosome reaction) とした。卵セリ - ($50\ \mu\text{g}$ 糖/ ml)

Sperm suspension in 10 mM Glycylglycine-ASW (pH8.2) (2×10^8 cells/ml)	25 μ l
+	
50 mM Glycylglycine-ASW (pH8.2)	25 μ l
+	
Test solution in ASW	50 μ l
↓	
Fixed with 1% glutaraldehyde-ASW	
Stained with erythrosin	
Scoring acrosome reaction ratio	

図 2-2 : 先体反応の生物検定法

少なくとも 2 個体から得られた精子を用い、それぞれにつき得られた先体反応率（観察した精子の中で、先体反応しているものの割合）を求め、平均値をもって、先体反応誘起治性を示した。

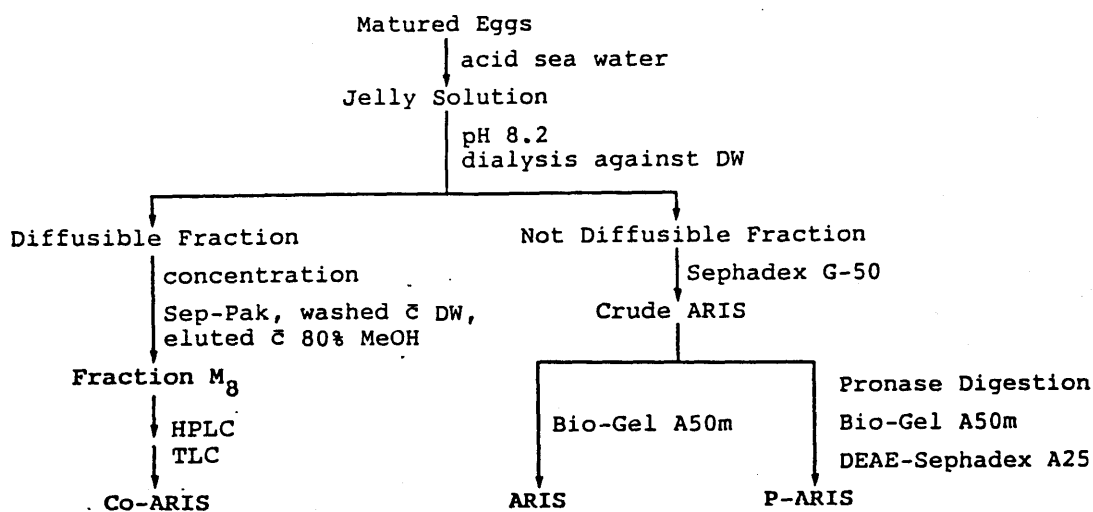


図 2-3 : 卵ゼリーの調製法及び、分画法

詳しくは、「材料と方法」2-2-4, 5 参照

を添加しても60%未満の先体反応率しか得られない精子は、実験に用いなかた。

2-2-4. ARIS 及び P-ARIS の調製法

図2-3に示す様に、基本的には篠井と星(1981, b)の方法に従い、ARISとP-ARISを調製した。卵ゼリー-の分画における、それぞれの先体反応誘起活性は、簡便法として、50 mM Ca^{2+} 存在下で検定した。卵ゼリー-を Sephadex G-50 (フイルマニア; 3.4 x 98 cm; 0.5 M NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 8.2 で平衡化) でゲル濾過後、各画分の糖濃度、タンパク質濃度を、それぞれフェニール硫酸法、紫外吸光法 (A_{280}) でモニターし、また先体反応誘起活性を調べた(図2-4)。高 Ca^{2+} 海水中でのみ高い先体反応誘起活性を示す部分(図中斜線)を集め、これを粗ARISとした。粗ARISは、Bio-Gel A50 m (バイラッド) でさらにゲル濾過し、卵ゼリー-の主要成分である高マンノース型糖タンパク質を除き、均一なARISを得ることができると、一部の実験

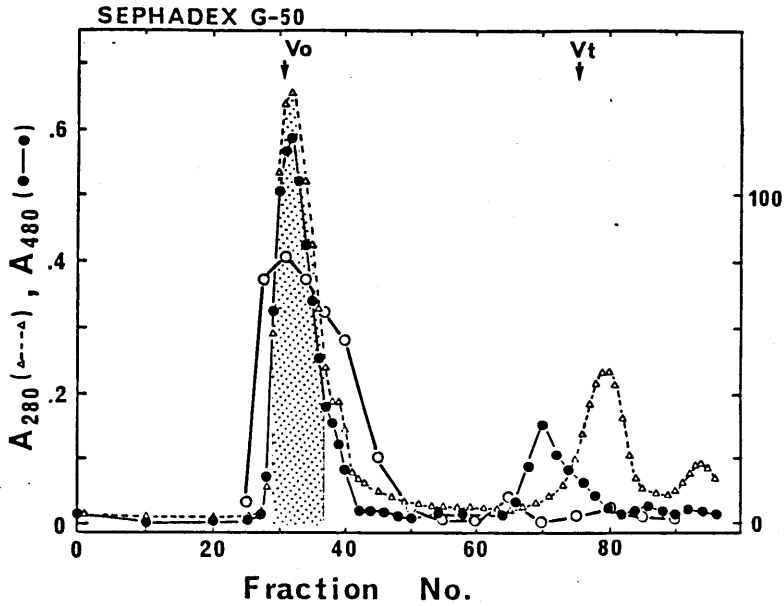


図 2-4: ヒトデ卵ゼリー
の Sephadex G-50 による
ゲル濾過.

ヒトデ卵ゼリーを 0.5M NaCl, 10mM CaCl₂, 10mM Tris-HCl (pH8.2) で平衡化した Sephadex G-50 (3.4 × 98cm) に載せ、同溶液で溶出した。影で示した部分を集め、粗 ARIS 画分とした。Vo (ボイド容量) Vt (全ベッド容量)

- (—●—), フェール硫酸法による 480nm の吸光度
- (--△--), 280nm の吸光度
- (—○—), 50mM Ca²⁺ 存在下での先体反応率

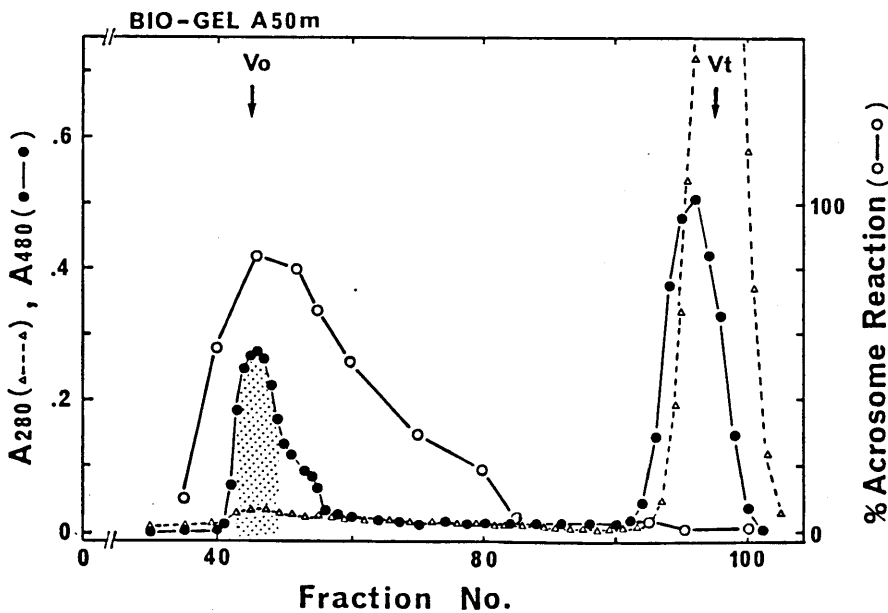


図 2-5: プロナーゼ消化
した ARIS の Bio-Gel
A50m によるゲル濾過

粗 ARIS 画分をプロナーゼ消化し、0.5M NaCl, 10mM Tris-HCl (pH8.2) で平衡化した Bio-Gel A50m (2.7 × 84cm) でゲル濾過した。

影で示した部分を集め次のステップに用いた。

- (—●—), フェール硫酸法による 480nm の吸光度
 - (--△--), 280nm の吸光度
 - (—○—), 50mM Ca²⁺ 存在下での先体反応率
- Vo (ボイド容量), Vt (全ベッド容量)

では、この粗 ARIS 分画をもそのまま ARIS 標品として用いた。

粗 ARIS または 蒸留水 (DW) に対して透析した卵ゼリーの遠心上清を、80% 冷エタノールで沈殿させた。沈殿を集め、50 mM Tris-HCl (またはホウ酸緩衝液) pH 8.2, 10 mM CaCl_2 , 0.3 mg/ml フロナーゼ E (科研製薬), 0.01% NaN_3 に溶かし、少量のトリエニを添加後、37°C で緩やかに攪拌、保温した。40 時間後に同量のフロナーゼ E を追加し、pH を点検後さらに 40 時間消化した。消化物を、ロタリー・エバポレーター (30~40°C) で濃縮し、氷冷後、40 シンなどの不溶物を遠心 (27,000 $\times g$, 30 分, 4°C) により除去した。上清を Bio-Gel A 50 m (バイオラッド; 2.7 \times 84 cm; 0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.2 で平衡化) でゲル濾過した (図 2-5)。素通り画分 (V_0 付近) には、ARIS の消化物が、また、 V_t 付近には高マニース型糖タンパク質に由来する糖ペプチドが溶出された。ARIS 治性の高い部分 (図中斜線) を集め、DEAE-Sephadex A-25 (ファルマシア; 1.5 \times 15 cm; 0.5 M NaCl, 10 mM

Tris-HCl, pH 8.2 で平衡化) にかけた。0.5 ~ 1.2 M の NaCl を含む同緩衝液で、濃度勾配溶出を行うと ARIS 由来の糖ペプチドは、0.7 M の NaCl 付近で単一のピークとして溶出された。この画分を DW に対し透析後、凍結乾燥した。これを以下、P-ARIS と呼ぶ。

ARIS 及び P-ARIS の濃度は、卵ゼリーと同様に、糖濃度で示した。

2-2-5. 低分子成分の調製法

図 2-3 に示す様に、西山ら (1984) の方法を用いて卵ゼリーの低分子成分を調製した。低分子成分の Co-ARIS 活性は、ARIS 存在下での先体反応誘起活性を指標として検定した。

卵ゼリーを 9 倍量の DW に対し 3 日間透析した後、透析外液をロタリー・エバポレーターによって濃縮し、クロロフォルム, メタノール, DW で順次洗浄した Sep-Pak(C₁₈) カートリッジ (ウォーターズ) にせた。Co-ARIS 活性を持つ成分は、Sep-Pak に吸着され、DW で十分洗った後

80%メタノールで溶出される画分に回収された。この画分を、ロータリー・エバポレーターで濃縮乾固し、得られた標品を透析に用いた卵ゼリーの $1/100$ 容のDWに溶解し、これを以下 M_8 画分と呼ぶ。 M_8 画分から、高速液体クロマトグラフ(HPLC)、薄層クロマトグラフ(TLC)の後再びSep-Pakによるシリカゲルの除去を行い(Kubo & Hoshi, 1985)、2種のCo-ARIS (Co-ARIS I及びII)が精製されるが(Nishiyama *ら*, 1985)、ここでは、その詳細には触れない。

2-2-6. 精子への $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取りこみの測定

2.6 mlのGGASWに精子を懸濁し(約 1×10^8 精子/ml)、 $^{45}\text{CaCl}_2$ (NEN) 10 μl (約10 μCi)を添加した。

23 $^{\circ}\text{C}$ で2分後に試験液50 μl を加え、一定時間ごとに0.5 mlずつ分取し、GF/Cフィルター(ワットマン)上に移した。直ちに20 mlの冷ASWでフィルターを洗浄し、乾燥後、フィルターに残存する ^{45}Ca を液体シンチレータ(アマラム, ACS-II)及び、液体シンチレーションカウンター(アロカ, LSC-700)を用いて測定した。

2-2-7. その他の薬剤

Ca²⁺-イオノフォア A 23187 (-カルビオケム=ペ-リンク)、
 3-イソブチル-1-メチルキサンチン (シグマ; 以下
 IMX と略す)、フェルスコリン (カルビオケム=ペ-リンク) は、
 DMSO に溶解し、モネンシン (シグマ) は、95%
 エタノールと DMSO の 1:1 (v/v) 混合液に溶解
 して、2~5 mM の保存液として -20℃ で保存
 した。各保存液は、使用直前に 100 倍以上に
 希釈して使用した。この時、溶媒による先体
 反応の阻害は、観察されなかった。

バラパミル (エーザイ)、ジルクアゼム (田辺
 製薬)、メリチン (シグマ)、マストパラニン (タンパク質
 研究所) 及び、マイトトキニン (東北大学元教授より分与して
 いたいた) は、DW に溶解し、ASW で希釈して用
 いた。

2-2-8. P-ARIS に対する種々の処理

P-ARIS に次の様な処理を行、た後、Mg
 画分存在下、もしくは 50 mM Ca²⁺ 海水中で先体
 反応誘起活性を検定した。

P-ARIS (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) 中でサザエ (*Turbo cornutus*) の混合グリコシターゼ (生化学工業; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) や、カサガイ (*Patella vulgata*) のスルファターゼ (シグマ; 1 unit/ml) により、 37°C 、12時間処理した。反応液の pH を 8.2 に戻し、 100°C 、8分間熱処理して酵素を失活させた後、先体反応誘起活性を調べた。また熱処理 (100°C , 60分, pH 8.2) の効果を調べた。アルカリ処理 (β -脱離反応) としては、P-ARIS (500 μg) を、6 ml の 0.25 N NaOH に加え 4°C 、10日間処理後、中和して活性を検定した。過ヨウ素酸酸化では、P-ARIS (100 μg) を、3 ml の 13 mM NaIO_4 、30 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) 中で、暗黒下 (4°C) 6日間反応させた。反応後中和し、海水に対して十分に透析し残存する活性を測定した。また、その後さらに NaBH_4 で還元後、メタノリシスし、メチルグリコシドとしてからトリメチルシリル誘導体とし、ガスクロマトグラフで糖の組成を調べた。脱硫酸は、Usov's (1971) の加溶媒分解法を用いた。

すなわち、P-ARIS (2mg) を、2% ピリジンに溶解し、2% ピリジンで平衡化した Dowex 50W ×2 (ダウケミカル) のカラムに通し、硫酸エステルをピリジン塩に変えた。ロータリー・エバポレーターで乾固後、2% ピリジンを含む DMSO 5 ml に溶解し、100°C, 8 時間反応させた。反応後、海水に対して十分に透析し、先体反応誘起活性を調べた。加溶媒分解後、残存する硫酸エステルは、1 N, HCl で 100°C, 2 時間加水分解し、 Na_2SO_4 を標準物質として、ロジソン酸ナトリウム法 (Terho & Hartiala, 1971) により測定した。

2 - 3 . 結 果

2 - 3 - 1 . P-ARIS と M_8 画分 による 先体 反 応 の 誘 起 .

図 2-6 に 示 す 様 に、 P-ARIS 単 独、 或 い は M_8 画 分 単 独 で は、 先 体 反 応 は ほ と ん ど 誘 起 さ れ な い。 し か し、 両 者 が 共 存 す る 時 に は、 一 定 の 濃 度 範 囲 内 で は、 そ れ ぞ れ の 濃 度 に 依 存 し て 先 体 反 応 が 誘 起 さ れ た。 ま た、 高 濃 度 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以 上) の M_8 画 分 は、 逆 に 反 応 を 阻 害 し た。 以 下 の 先 体 反 応 誘 起 実 験 で は、 2 μg 糖 / ml 以 上 の P-ARIS 及 び、 10 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の M_8 画 分 を 用 い た。 M_8 画 分 を 用 い な く と も、 高 濃 度 の Ca^{2+} と P-ARIS に よ っ て も 同 様 に 先 体 反 応 が 誘 起 さ れ た (図 2-6. 点 線)。

2 - 3 - 2 . 稀 釈 卵 ゼ リ ー に 及 ぼ す M_8 画 分 の 作 用 .

先 体 反 応 は 卵 ゼ リ ー 濃 度 に 依 存 し て お り、 稀 釈 に よ っ て 先 体 反 応 誘 起 活 性 が 低 下 す る の

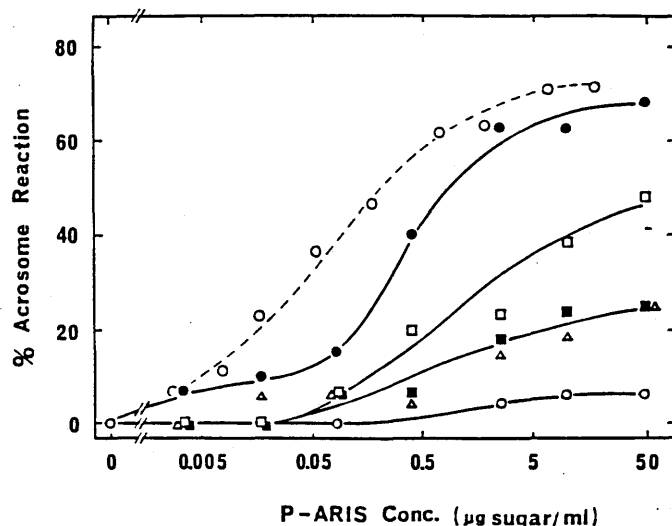


図 2-6 : P-ARIS と M_8 画分による先体反応

M_8 画分の濃度は、(—○—), 0 $\mu\text{g/ml}$; (—■—), 2 $\mu\text{g/ml}$; (—□—), 4 $\mu\text{g/ml}$; (—●—), 20 $\mu\text{g/ml}$; (—△—), 200 $\mu\text{g/ml}$ を示す。(—○—) は、 M_8 画分非存在下、50 mM Ca^{2+} 海水中での先体反応率。卵ゼリー (50 μg 糖/ml) での反応率は 85%。

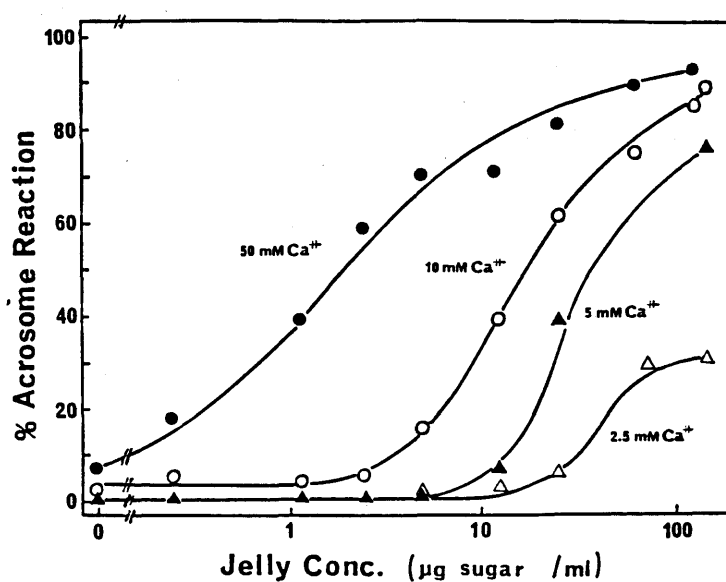


図 2-7 : イトマキヒトデ精子先体反応の卵ゼリー濃度及び、 Ca^{2+} 濃度依存性

2.5 mM ~ 50 mM Ca^{2+} を含む海水中での卵ゼリー濃度と先体反応率。正常海水中の Ca^{2+} 濃度は 10 mM。

は、先体反応誘起物質の減少によるものである。卵ゼリーを稀釈した時に、ARISと低分子成分 (M_8 画分) のどちらによって先体反応率が規定されているかを調べるために、稀釈卵ゼリー溶液に十分量の M_8 画分、ARIS (又は P-ARIS) を添加したもので、先体反応誘起活性を検定した。表 2-2 及び図 2-8 に示した様に、稀釈卵ゼリー溶液に M_8 画分を補うことにより、先体反応率の回復が認められた。しかし、ARIS にはこの様な効果は認められなかった。このことから、稀釈による卵ゼリーの先体反応誘起活性の低下は、まず第一に、 M_8 画分成分の減少によることが示された。すなわち、卵ゼリー中では、低分子成分に比べて ARIS の方が過剰に存在しており、低分子成分の量が、卵ゼリーの先体反応誘起活性を、より強く規定していると考えられる。

2-3-3. Ca^{2+} の先体反応に及ぼす影響

先体反応は、 Ca^{2+} 濃度に依存した反応で

表 2-2 : 稀釈卵ゼリーに対する, ARIS, P-ARIS
M₈画分の作用.

Combination	% Acrosome Reaction
Jelly + ASW	74
Diluted Jelly + ASW	7
Diluted Jelly + ARIS	3
Diluted Jelly + P-ARIS	1
Diluted Jelly + M ₈	45
P-ARIS + M ₈	76

稀釈卵ゼリーの濃度は, 0.8 μg 糖/ml, 卵ゼリー, ARIS
及び P-ARIS の濃度は, 50 μg 糖/ml, M₈画分濃度は 20 μg /ml.

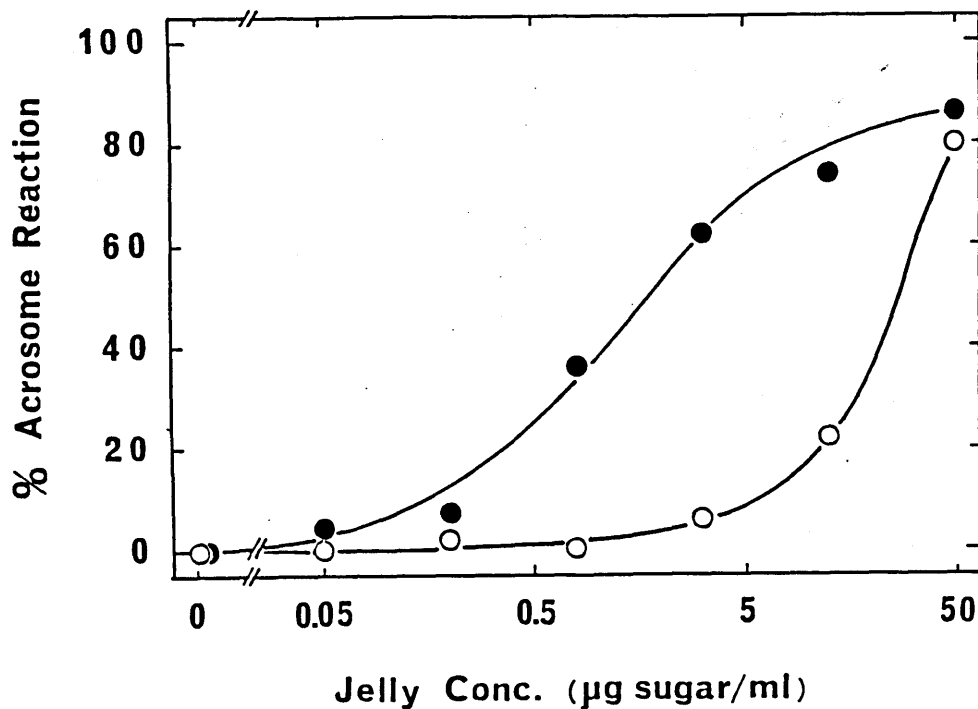


図 2-8 : 稀釈卵ゼリーに対する, M₈画分の補助効果

横軸は, 卵ゼリー濃度を示す。M₈画分 (20 μg /ml) の
存在下 (—●—) 及び 非存在下 (—○—) での
先体反応率を示す。

あり、数 mM 以下の Ca^{2+} では反応しないことがよく知られている (Dan, 1954b)。図 2-7 は、イトマキヒトデの場合であるが、卵ゼリー濃度と Ca^{2+} 濃度の先体反応に及ぼす影響を調べたものである。どの卵ゼリーの濃度においても、 Ca^{2+} 濃度の減少につれて反応率は低下した。図 2-7 から、各 Ca^{2+} 濃度における最大先体反応率の $\frac{1}{2}$ の反応率を与える卵ゼリー濃度を求めると、約 $37 \mu\text{g}$ 糖/ml ($2.5 \text{ mM } \text{Ca}^{2+}$)、約 $19 \mu\text{g}$ 糖/ml ($5 \text{ mM } \text{Ca}^{2+}$)、約 $14 \mu\text{g}$ 糖/ml ($10 \text{ mM } \text{Ca}^{2+}$)、約 $1.7 \mu\text{g}$ 糖/ml ($50 \text{ mM } \text{Ca}^{2+}$) となり、 Ca^{2+} 濃度が高いほど、より低濃度の卵ゼリーでも先体反応が誘起された。このことから、高 Ca^{2+} 条件ではウニとは異なり、それだけでは先体反応に到らないが、より先体反応が起りやすくなる傾向にあることが示された。

ヒトデの場合でも、イトマキヒトデと同様の傾向が見られた。P-ARIS と M₈ 画分に対する Ca^{2+} 依存性を調べたところ、約 40 mM 以上の Ca^{2+} 存在下では、P-ARIS だけで先体反応

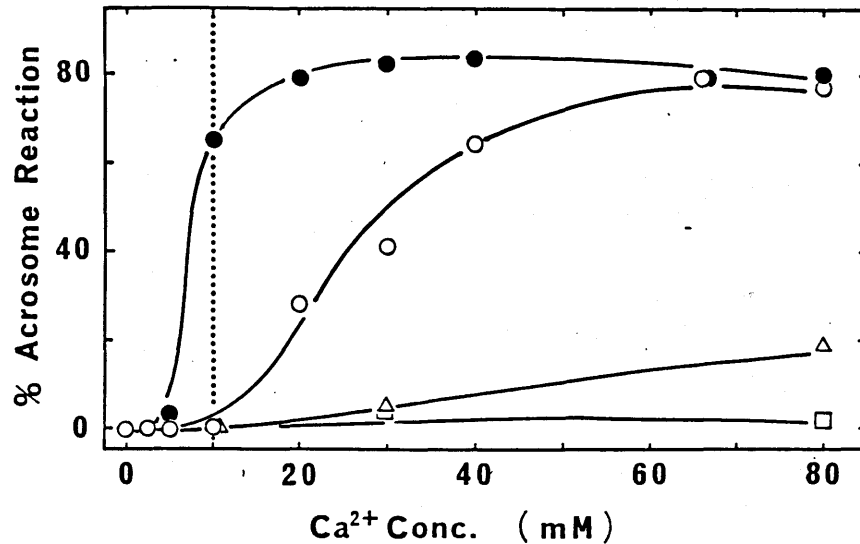


図 2-9: 先体反応における Ca^{2+} 濃度の影響と Mg 画分の効果

(—□—), ASW; (—△—), Mg 画分 ($15 \mu\text{g}/\text{ml}$);
 (—○—), P-ARIS ($40 \mu\text{g}$ 糖/ ml); (—●—), P-ARIS
 ($40 \mu\text{g}$ 糖/ ml) + Mg 画分 ($15 \mu\text{g}/\text{ml}$)

点線は、正常海水中の Ca^{2+} 濃度を示す。

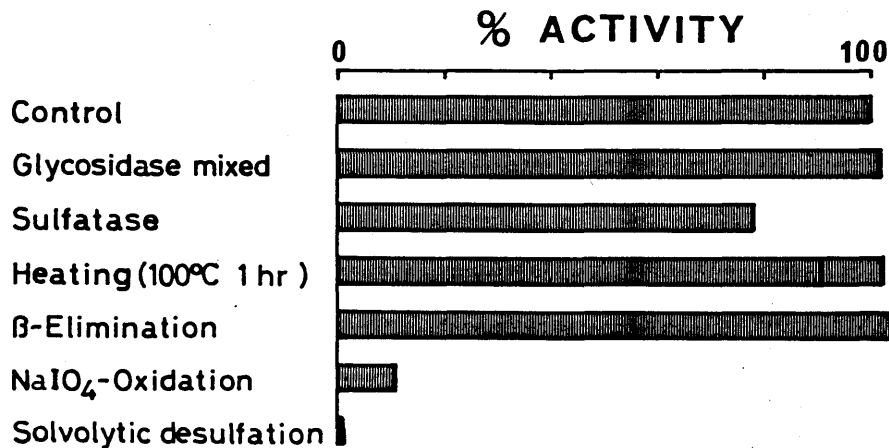


図 2-10: 各種処理による P-ARIS の活性変化

P-ARIS に対して各種の処理を行った後 (詳細は「材料と方法」を参照)、 Mg 画分もしくは高 Ca^{2+} 条件 ($50 \mu\text{M}$) で先体反応誘起活性を調べた。活性は、各処理における対照を 100 として、比活性で示した。

が誘起された (図2-9)。一方、 M_8 画分存在下では、P-ARIS は正常海水中の Ca^{2+} 濃度 (10 mM) でも十分に反応を誘起した。このことから、 M_8 画分によって、精子の Ca^{2+} に対する感受性が著しく高められることが示唆された。しかしながら、 M_8 画分単独では、高 Ca^{2+} 条件下においても先体反応率に有意な上昇は認められなかった。したがって、 Ca^{2+} の流入に関しては、 M_8 画分成分よりも ARIS の方が、より直接的に関与していることが示された。

2-3-4. 先体反応に伴う $^{45}Ca^{2+}$ の取りこみと Ca^{2+} -チャンネル阻害剤の影響.

P-ARIS と M_8 画分を用いた時の $^{45}Ca^{2+}$ の精子への取りこみを調べた。P-ARIS 及び M_8 画分それぞれ単独では、 $^{45}Ca^{2+}$ の取りこみは起こらなかったが、両者を同時に作用させると、急速な $^{45}Ca^{2+}$ の取りこみが認められた (図2-11)。このことから、先体反応の誘起と、 Ca^{2+} の取りこみは、共役していることが示唆された。

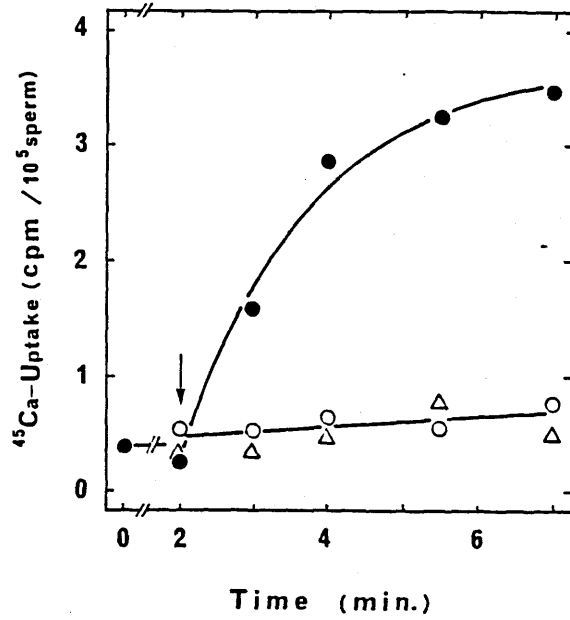


図2-11: 精子への $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取りこみに対するP-ARISとM8画分の影響

^{45}Ca を添加して2分後に各成分を加えた(矢印)。

(—○—), P-ARIS (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$); (—△—), M8画分 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

(—●—), P-ARIS (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) + M8画分 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

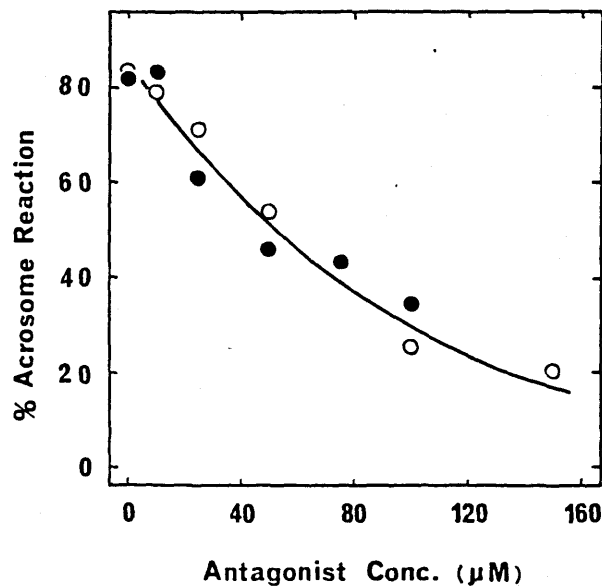


図2-12: 卵ゼリーによる先体反応に対する Ca^{2+} チャンネル阻害剤の影響。

卵ゼリー (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と Ca^{2+} チャンネル阻害剤を混合し、精子に添加した。

(—○—), パラバミル ; (—●—), ジルチアゼム

一方、2種類の Ca^{2+} チェンネル阻害剤の影響を調べたところ、いずれも類似した有効濃度で、卵ゼリ-による先体反応を阻害した(図2-12)。最大反応率の50%を阻害する濃度は、それぞれ約 $80 \mu\text{M}$ であった。イトマキヒトデの場合は、バラパミル(約 $80 \mu\text{M}$) とジルクアセム(約 $120 \mu\text{M}$) で、阻害活性に差が認められた。

2-3-5. 高pH条件と先体反応

ヒトデの精子はウニと異なり、外液のpH (pH_e) を上昇させただけでは先体反応を起さない(Ikadai & Hoshi, 1981a; 図2-13)。しかしながら、高pH条件下でARISやP-ARISを添加すると、先体反応が誘起された。また、高 Ca^{2+} 条件 (50mM) と高pH条件を同時に作用させた場合も、反応が誘起された。精子の細胞内pH (pH_i) を、9-アミノアクリジンを用いて概算したところ (pH_i 測定法については第4章で詳しく述べる)、 pH_e の上昇に伴って、 pH_i も緩やかに上昇した(図2-14)。

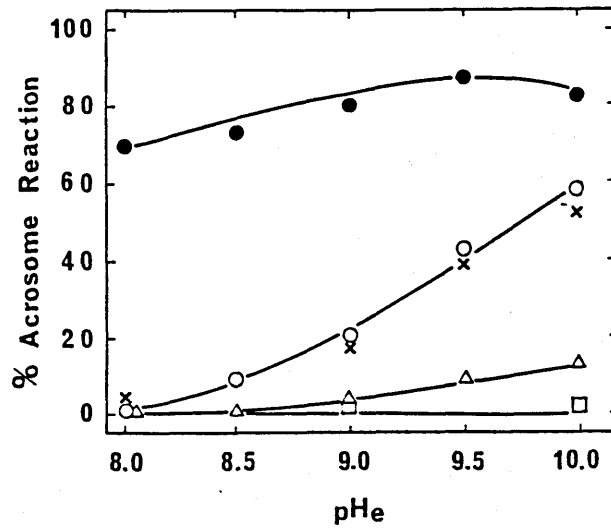


図 2 - 13 : 先体反応における高 pH の効果

用いた緩衝液は、25 mM グリシン-NaOH (pH 8~10), pHe (細胞外 pH)
 (—□—), ASW ; (—△—), Mg 画分 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ;
 (—○—), P-ARIS (50 μg 糖/ml) ; (—X—), 50 mM Ca^{2+}
 (—●—), P-ARIS (50 μg 糖/ml) + Mg 画分 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

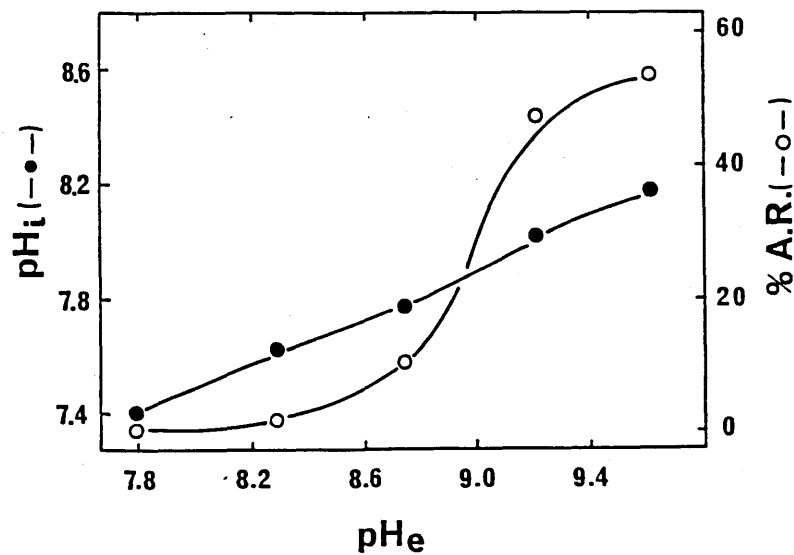


図 2 - 14 : 細胞外 pH (pHe) 変化に伴う 細胞内 pH (pHi) の変化.

(—●—), 9-アリアクリジン法 (第4章) で測定した pHi
 (—○—), P-ARIS (5 μg 糖/ml) 存在下での先体反応率 (%A.R.)

2 - 3 - 6. イオノフォアによる先体反応.

Ca^{2+} -イオノフォアを用いて、 Ca^{2+} を細胞内に導くことにより先体反応を誘起できることは、ウニなどで良く知られている。ヒトテ類もその例外ではなく、A23187によって先体反応が誘起される (Tilney *S.*, 1978; Shirai & Kanatani, 1982; 及び図2-15.a)。一方、モネンシンは、それ自身では先体反応誘起活性をほとんど持たないが、A23187による先体反応を促進させた。 K^+/H^+ 交換を行う、ナイジエリシンによって、先体反応が誘起されることもウニでは知られているが (Schackmann *S.*, 1978)、ヒトテでは顕著な効果は認められなかった (データは示していない)。

P-ARIS 及び M_8 画分と、これらのイオノフォアとの組み合わせを検討したところ、 M_8 画分とA23187を併用した場合、A23187による先体反応が促進された (図2-15.b)。すなわち、 M_8 画分に、モネンシンと類似した効果が見られた。また、イトマキヒトテでは、ARISとモネンシンを併用することで、先体反応が

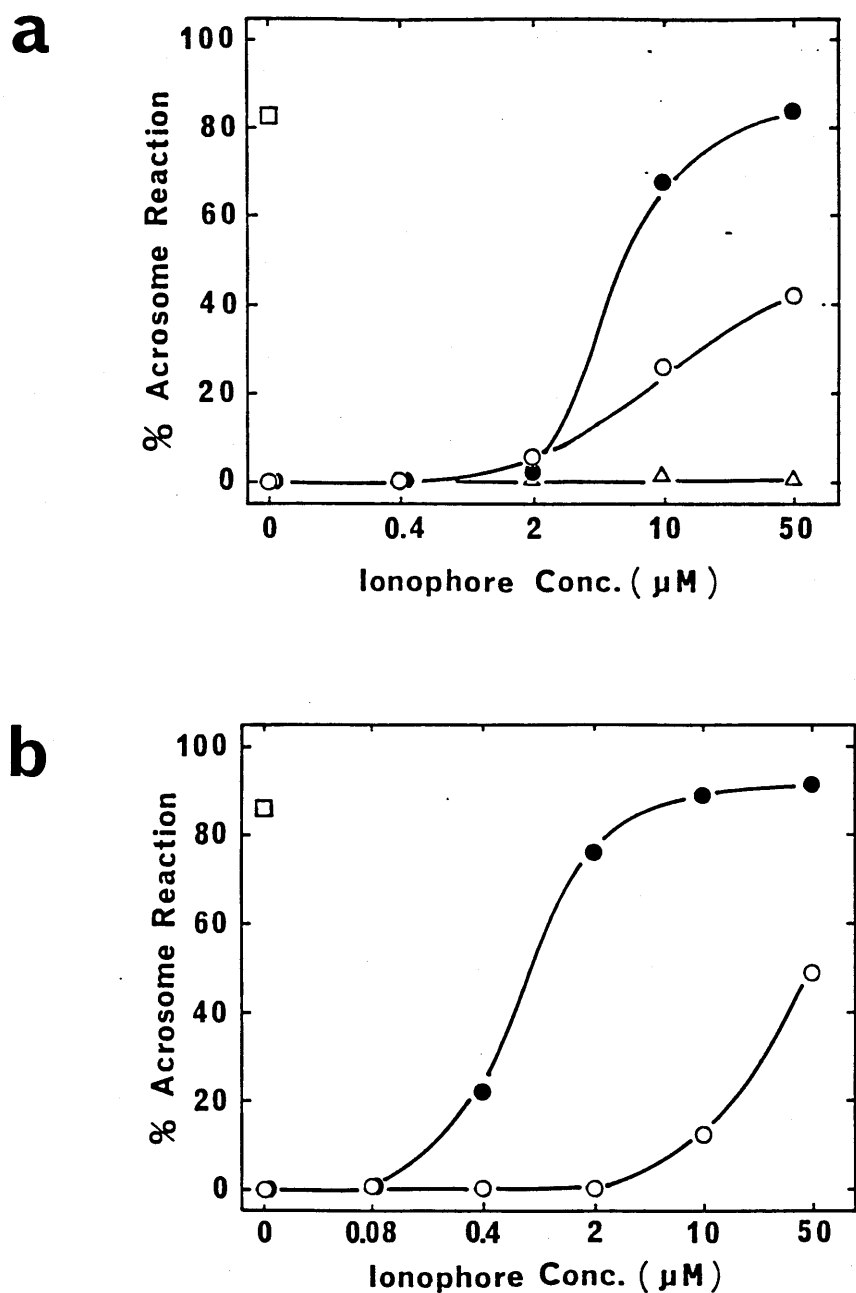


図2-15: A23187による先体反応に及ぼす、モネンシンとM₈画分の影響。

a: 横軸は、イオノフォアの総濃度を示す。
 (—●—), A23187 + モネンシン (1:1); (□), P-ARIS (50 μg/ml)
 (—○—), A23187; (—△—), モネンシン

b: 横軸は、A23187の濃度を示す。
 M₈画分 (50 μg/ml) 存在下 (—●—), 及び非存在下 (—○—)
 での先体反応率。(□), P-ARIS (50 μg/ml) + M₈画分 (50 μg/ml)
 A23187 (2 μM) + P-ARIS (50 μg/ml) では、反応率は9%だった。

誘起されたが、バッチによる差が大きく、明確な結論は得られなかった。

2-3-7. その他の薬剤の影響.

ホスホジエステラーゼの阻害剤である、IMXや、環状ヌクレオチド合成酵素の活性化を行う、フィルスコリンをヒトテの精子に作用させたが、先体反応は誘起されず、精子の運動性の増加のみが光学顕微鏡下で観察された。両薬剤を併用しても、或いは高 Ca^{2+} 条件や、P-ARISとともに作用させても、先体反応が誘起されることはなかった。

ホスホリパーゼ A_2 の活性化剤として知られる、メリチン及びマストパランを精子に添加したところ、 $5 \mu\text{g/ml}$ 以上のメリチンで、運動の停止、ミトコンドリアの変形及び細く短い先体突起の形成が高率で起こった。しかし、マストパラン($12.5 \mu\text{g/ml}$)では、全く何の影響も見られなかった。

一方、 Ca^{2+} -チャンネルの活性化剤と考えら

水 (Takahashi 5, 1982 ; Freedman 5, 1984) 、イカイの精子で先体胞の開口分泌と先体突起形成を誘起する (Nishiyama 5, 投稿中) マイトトキシンは、ヒトテ"の場合、正常海水中ではほとんど影響しなかったが、高 pH 条件 (pH 9.5~) では Ca^{2+} 及びマイトトキシンの濃度に依存して、先体胞の開口分泌を起こした。しかしこの時、先体突起の形成はほとんど起こらなかった。

2-3-8. 種々の処理による P-ARIS の 活性変化.

ARIS は、プロテアーゼ消化後も活性を示し、ゲル濾過的にもみかけの分子量は変化しない。ARIS における活性に必須な部位を明らかにするために、P-ARIS に対して種々の処理を行った。P-ARIS に混合グリコシターゼ処理、糖タンパク質間の O-グリコシド結合を切断する β -脱離反応、或いは熱処理を試みたが、活性には、ほとんど影響が認められなかった (図 2-10)。しかしながら、P-ARIS を過ヨウ

素酸で酸化したところ、P-ARISの活性は、著しく低下し、ARISの糖鎖構造がその活性に重要であることが明らかになった。ガスクロマトグラフィの結果、特にフコース含量の減少(約24%減少)が認められた。

また、P-ARISは重量比で約15~17%の硫酸基を含んでいるため、硫酸基の生物活性に及ぼす影響を調べた。図2-10に示す様に、スルファターゼ処理では、P-ARISの活性の減少は小さかった。しかし、加溶媒分解により脱硫酸を行なったところ、硫酸基の約70%が脱離するとともに、P-ARISの活性は、ほぼ完全に消失した。脱硫酸の前後で、糖含量はほとんど変化せず、糖の分解も起こっていないと考えられた。したがって、ARISの硫酸基(恐らくは、糖に結合していると思われる)もまた、その活性発現に必須であることが初めて明らかになった。

2-4. 考察

ヒトデの卵ゼリー中に存在する先体反応誘起物質が単一ではないことは、既に報告されているが (Ikadai & Hoshi, 1981a)、本研究でも別の方法で得た低分子成分 (M_r 画分) を用いて再確認された。さらに、稀釈による卵ゼリーの先体反応誘起活性の低下は、低分子成分の減少にまず起因すること、及び高濃度の M_r 画分は逆に先体反応率を低下させることが明らかとなった。このことは、少なくともヒトデにおいては、卵ゼリー中の低分子成分は先体反応に必須であるのみならず、その含有量によつて卵ゼリーの先体反応誘起能が、大きく左右されることを示すものである。

ウニでは、前述した様にフコース硫酸ポリマーのみが先体反応誘起物質として報告されている (SeGall & Lennarz, 1979, 1981; Kopf & Garbers, 1980)。この物質は、本研究における ARIS と同様に、高 Ca^{2+} 条件下 (40 μ M以上) では、高い先体反応誘起

活性を示す。これに対し、精製前段階の粗標品では、正常海水中 (10mM Ca^{2+}) でも活性を示す (SeGall & Garbers, 1981)。彼らは、卵ゼリー中には高濃度の Ca^{2+} が含まれており、精製過程で Ca^{2+} が不可逆的に脱離すると考えている。しかし我々の研究室では、ウニの卵ゼリーもゲル濾過によって先体反応誘起活性が低下するが、卵ゼリーの低分子成分を添加することにより反応率が回復することを報告している (Nishiyama 5, 1984)。また、ウニ卵ゼリー中の低分子成分に、先体反応誘起活性が存在しているという新しい知見も最近得られてきている (Glabe 私信)。これらのことは、先体反応が、卵ゼリー中の単一の物質によって誘起されるのではなく、複数の先体反応誘起因子が広く存在している可能性を示すものである。

ARISの化学的性質については、まだ不明な点が多々あるが、本研究で、少なくともARISの糖鎖部分及び硫酸基が活性発現に必須であることが明らかとなった。用いた酵素で

は、ARISが失活しなかったが、これは、酵素の基質特異性とARISの糖鎖構造の不一致による可能性よりも、むしろ多数の硫酸基がARISに存在するため酵素分子が切断部位に作用できなかったからではないかと考えている。硫酸基の結合部位を含めたARISの糖鎖構造の決定は、種特異性や精子の認識機構などを究明する上で不可欠のことと思われるが、ヒトデのARISに限らず、ウニのホリフコース硫酸に関しても構造研究は、ほとんど進展していない。ARISの活性は、種特異性が高く、ヒトデとイトマキヒトデとの間では交叉反応は起こらない。しかし、低分子成分の種特異性は、それほど高くない、イトマキヒトデの低分子成分は、ヒトデに有効であった(Nishiyama *et al.*, 1984)。このことから、低分子成分(恐らくCo-ARIS)は、ヒトデ類間で類似した構造と作用を持つのではないかと考えられる。

ヒトデの先体反応にも、 Ca^{2+} -4 γ ニネルが介在していることが示唆されたが、先体反応

には、この他にも、cAMP (Garbers & Kopf, 1980), カルモジュリン (Sano, 1983), リパーゼ (Dan, 1967) などとも関与してゐると考えられてゐる。アワビなどでは、ホスホジエステラーゼの阻害剤である I M X を用いて先体反応を誘起できる (Kopf & Kopf, 1983)。また、ホスホリパーゼ A₂ の活性化剤として知られるメリチンは (Shier, 1979)、ウニ卵を賦活することから知られてゐる (Shimada & Shimada, 1982)。ヒトテの場合、cAMP や リパーゼ 活性の変動を測定する必要はあるが、cAMP レベルは、むしろ精子の運動に関与すると考えられる (Hoskins & Lindemann, 1978)。また、界面活性剤によつて先体反応が誘起されることが知られており (Yanagimachi, 1975; Nakano & Nakano, 1984)、メリチンの効果は、むしろその強い界面活性作用によると思われ (Argiolas & Pisano, 1983)。

一般に棘皮動物の先体反応は、数 mM 以下の Ca^{2+} + pH 7.5 以下の条件では誘起されなくなる (Decker & Decker, 1976; Shackmann & Shackmann, 1978; Ikadai & Hoshi, 1981a)、ウニやイガイなどでは Ca^{2+} 濃度を 50 mM にしたり、pH 9

に上昇させるだけで70%以上の精子が先体反応を起こすことが知られている (Collins & Epel, 1977; Wada *et al.*, 1956)。これらの精子は、高 Ca^{2+} あるいは高 pH にさらされると、膜の透過性 (特に Ca^{2+} に対する透過性) が変化して先体反応が起こると考えられている。これに対してヒトテ類の精子は、いずれの条件でも膜の透過性が容易に変化しないと思われる。しかし、高 Ca^{2+} や高 pH 条件下では、ARIS だけで先体反応を誘起できること、及び両条件を併用することでも反応を誘起できることから、高 Ca^{2+} や高 pH 条件そのものはヒトテの先体反応を誘起しえないものの、より誘起されやすい状態にするものと結論される。高 pH 条件がもたらすものとして、精子の pH_i 上昇を示した。pH_i 上昇に関しては、これが先体反応に必須であり (Christen *et al.*, 1983)、また、先体突起の伸長に関わることが示唆されているが (Tilney *et al.*, 1978; Schroeder & Christen, 1982)、pH_i 上昇だけでは先体反応は誘起され難い (Schackmann *et al.*, 1981)。すなわち、pH_i の上昇のみでは、 Ca^{2+} -

4_α ニネルは活性化されない。

しかしながら、pH_i 上昇が先体反応を起
こしやすくすることは、イオノフォアを用いた
場合でも示唆された。モネンシンは、 Na^+/H^+
交換を行い、pH_i 上昇を起す作用があるこ
とが知られているが (Maxfield, 1982; Sandeaux *ら*, 1982)、
それだけではヒトデ類の精子は、ウニと同様
に (Schackmann *ら*, 1978; Podell & Vacquier, 1984.b) 先体反応を
起さない。しかし、2価陽イオンの膜透過
性を高める作用を持つ A23187 (Foreman *ら*, 1973;
Pfeiffer & Lardy, 1976) と併用すると、A23187 による
先体反応誘起作用が著しく促進された。モネ
ンシンのこのような効果は、ウニでも報告され
ており (Podell & Vacquier, 1984.b)、ある種のウニ (Arbacia
punctulata) では、pH 8.6 で A23187 によつて、先
体反応が誘起されるが、pH 8.0 では起らない
ことも報告されている (Decker *ら*, 1976)。これまで
に、A23187 の先体反応誘起作用に関する報告
は数多くなされているが (Summers *ら*, 1976; Talbot *ら*,
1976; Green, 1978; Schroeder & Christen, 1982)、生理的条件 (正

常海水中、約 10mM Ca^{2+} , pH 8) での比較では、正常な先体反応とはやや異なる不完全な反応が起こる場合 (Tilney S, 1978)、低率でしか起こらない場合 (Schackmann S, 1978 ; Kinsey S, 1979)、非常に時間のかかる場合 (Shirai & Kanatani, 1982) などとも報告されている。これは、A23187 による単独処理では、先体反応が必ずしも容易に誘起されるわけではないことを示している。しかし、モネンシンを添加したり、pHe を上昇させるなど、十分な pH_i の上昇を伴う条件では、A23187 を用いた場合でも、先体反応がより起こりやすくなる傾向があると言える。

これら、 Ca^{2+} , pH, イオノフォア の先体反応に及ぼす影響や誘起条件から、ARIS 及び M₈ 画分の作用を推測すると、ARIS はそれ自身では Ca^{2+} の流入をひき起こせないものの、 Ca^{2+} の膜透過に深く関与しているものと予想される。一方、M₈ 画分は、高 Ca^{2+} 条件や高 pH 条件が精子に及ぼす作用を生理的な条件下で代行していることが示唆される。高 Ca^{2+} 条件に

対応するものとして、 M_8 画分は直接、膜の Ca^{2+} に対する透過性を変化させるものではないが、 Ca^{2+} に対する精子の感受性を高めるものと考えられる。また、A23187 と併用した時に、 M_8 画分がモノニンと類似した効果を示したことは、 M_8 画分が Na^+/H^+ 交換あるいは K^+/H^+ 交換を行い、 pH_i の上昇を引き起こす可能性を強く示唆するものである。(M_8 画分の pH_i に対する効果は、第4章で述べる)

これらの事実から、ARIS は、 M_8 画分の存在下で、高 Ca^{2+} 、高 pH 条件下では、おそらく Ca^{2+} -チャンネルを活性化し、 Ca^{2+} の流入とともに、先体反応が誘起されるものと結論される。

第 3 章

ARIS 及び M_8 画分の精子に対する作用

3 - 1 . 序 論

Lillie の仮定した "受精素" の存在自体は否定されたが、受精における精子と卵の相互作用に関わる物質が双方に見い出されている。例えば、精子結合タンパク質 (Aketa, 1975) や先体反応後の精子と結合する糖タンパク質 (Rossignol *et al.*, 1984) が、ウニの卵膜より見い出され、精子先体胞からは、卵膜と結合するバイニテン (Glabe *et al.*, 1982) が精製されている。これらは先体反応前後の精子と卵膜との特異的な相互作用に機能すると考えられている。先体反応に比べて、精子と卵膜との結合がより種特異性が高いという Summers と Hylander (1975) の報告なども、精子と卵膜との相互作用に注目させた原因と思われる。しかし、生理的には、精子はまず第一に卵ゼリーと接触し、先体反応を起すわけであり、受容体を介した一般の細胞分泌現象 (日高 *et al.*, 1985) と同様に、先体反応も、何らかの受容体を介した卵ゼリーとの相

相互作用と予想される (星, 1985)。事実、Vacquierらのケル-7は、ウニ精子細胞膜より、先体反応に関与すると思われる糖タンパク質を見出し (Lopo & Vacquier, 1980)、最近その精製に成功した (Podell & Vacquier, 1985)。彼らは、これが卵ゼリーに対する受容体であり、先体反応時の Ca^{2+} の取りこみに重要な働きをになっていると考えている (Podell & Vacquier, 1984b)。

前章で、ヒトデの先体反応の誘起条件を検討した。イオノミアを除き、ARISと Mg 画分、ARISと高 Ca^{2+} 、ARISと高pHなど、常に二つの条件が満たされることが先体反応の誘起に必須であった。本章では、①先体反応に不十分な条件下での卵ゼリー処理、②ARISや Mg 画分などでの単独処理、を行い、この時の精子の反応性を調べ、先体反応における精子と卵ゼリー成分の相互作用を考察した。

3 - 2. 材料と方法

3 - 2 - 1. M_8 画分のフロナーゼ消化 (P- M_8)

M_8 画分 (2mg/ml) を、25 mM EPPS (pH 8.1)、10 mM $CaCl_2$ 、フロナーゼ E (100 μ g/ml) を含む溶液中で、37 °C、10 時間消化後、100 °C、10 分の熱処理を行い酵素を失活させた。対照として、フロナーゼのみ、或いはフロナーゼを含まない条件で同様の処理を行ったものを調製した。

3 - 2 - 2. P-ARIS, M_8 画分と精子を混合放置後に残る活性の検定

精子を ASW で 2 回洗った後、濃厚保存液を調製した。この精子保存液の適当量に、一定量の P-ARIS (10 μ g 糖/ml)、もしくは M_8 画分 (100 μ g/ml) を混合し、20 °C で 5 分間放置した後、エッペンンドルフチューブで、4 °C、15,000 rpm の遠心を行い、上清を得た。この上清に残る P-ARIS や M_8 画分の各活性を、 M_8 画分 (20 μ g/ml) 存在下、もしくは P-ARIS (50 μ g 糖/ml) 存在下

で先体反応誘起活性を調べた。また、各上清で精子を3~4分間処理した後、卵ゼリー(50 μg 糖/ml)を添加し、反応率を測定した。

3-2-3. P-ARIS, M_8 画分で前処理した精子の受精能の検定。

1-メチルアデニン(10^{-7}M)処理で得た成熟卵を4°Cで保存し、4時間以内に使用したが、この間、卵は正常な受精能力を保持した。精子($4\sim 6 \times 10^7$ 精子/ml)を、0~80 μg 糖/mlのP-ARIS、15~25 μg /mlの M_8 画分、或いは、80 μg 糖/mlのイトマキキトテのP-ARISを含む海水中で、20°C、0~5分間放置した。その25 μl を卵懸濁液(1×10^4 卵/ml)と混合し(最終的に $2\sim 3 \times 10^6$ 精子/ml)、15分後の受精膜形成率によって受精率を測定した。

3-2-4. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取りこみの測定。

P-ARIS(10 μg 糖/ml)、或いは M_8 画分(15 μg /ml)を含む2.6 mlのGGASWに精子を懸濁し(約 1×10^8 精子/ml)、23°Cで3~4分放置後、 $^{45}\text{CaCl}_2$ (NEN)

20 μl (約 2 μCi) を添加した。1 分毎に 0.5 ml ずつ分取し、2 分後に卵セリ - (20 μg 糖/ml) を加えた。分取した精子は、前章 (2-2-6) と同様に処理し、液体シンチレーションカウンタ - (アロカ LSC-673) で測定した。

3 - 2 - 5 . 精子の呼吸率の測定 .

精子の呼吸率の測定は、酸素電極 (イロースアリニク) を用いて、セル内の溶存酸素量変化を指標として行った (Hino 5, 1980)。5 倍に希釈した精子保存液の 50 μl を、1.3 ml の GGASW に懸濁し (約 1×10^8 精子/ml)、23 °C で約 3 分間一定速度で攪拌しながら放置した。呼吸率が一定になったことを確認後、P-ARIS, Mg 画分, 卵セリ - など - を一定量添加し、引き続き呼吸率を測定した。少量を採取し、精子の運動能及び先体反応率を調べた。

3-3. 結 果

3-3-1. 稀釈した卵ゼリー及び、低 Ca^{2+} 条件下で卵ゼリーの精子に与える影響。

先体反応率は、卵ゼリーの濃度に依存していることは前章でも述べたが、低濃度の卵ゼリーで処理し、低率の先体反応しか起こしていない精子懸濁液に十分量の卵ゼリーを追加し、反応率が上昇するか否かを調べた。先体反応率が、加えた卵ゼリーの総量に単純に対応しているとする、図3-1の点線で示した反応率に近くなるはずであるが、実際には後から十分量の卵ゼリーを追加しても、反応率は回復せず、図3-1の実線で示した結果を得た。前処理に用いる卵ゼリーの濃度が、約 $0.5 \mu\text{g}$ 糖/ml より稀釈されると、ようやく2回目に加えた卵ゼリー ($50 \mu\text{g}$ 糖/ml) によると思われる先体反応率の上昇が徐々に認められはじめた。

次に、同様の実験を十分量の卵ゼリーを

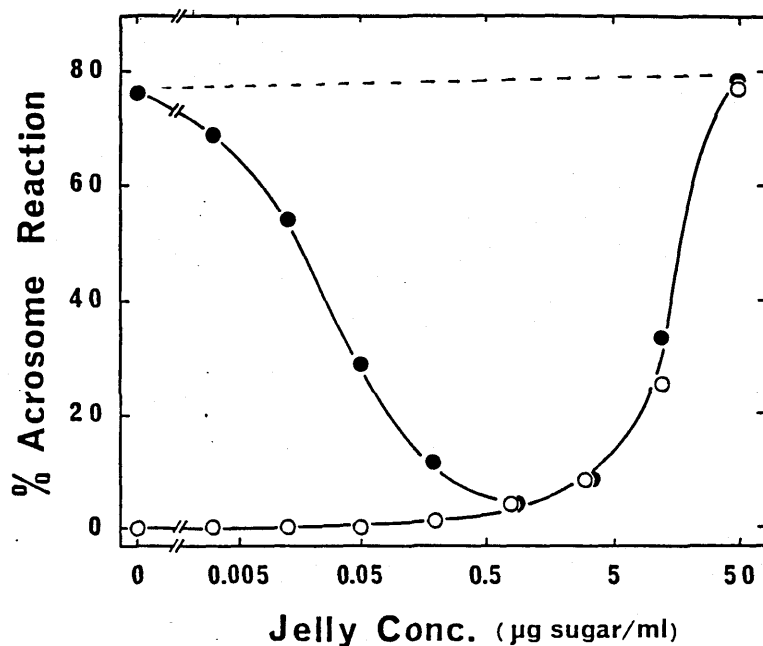


図3-1：稀釈卵ゼリーで前処理した精子の先体反応

横軸に示した濃度の卵ゼリーで3分間処理した後、ASW (—○—) または、十分量の卵ゼリー (50 µg 糖/ml) (—●—) を添加した。点線は、添加した卵ゼリー総量から予想される先体反応率を示す。

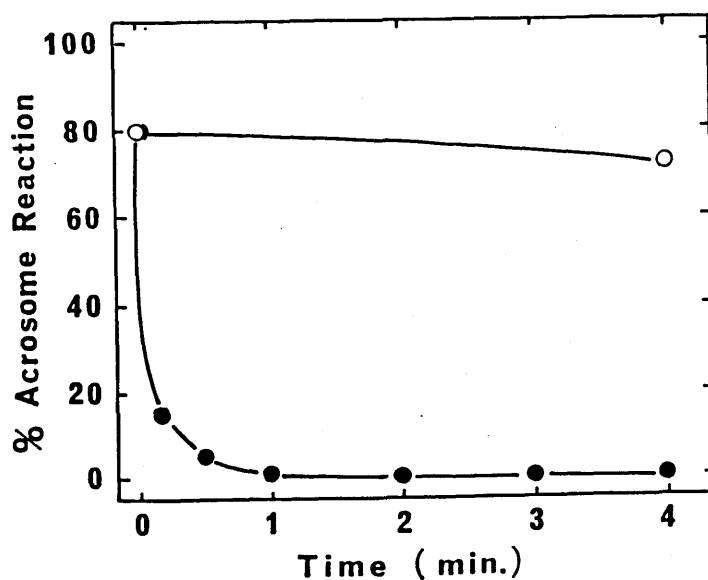


図3-2：低 Ca^{2+} 条件下で卵ゼリー処理した精子に Ca^{2+} を戻すタイミング

卵ゼリーを40倍量のCFSWに対して3時間、2回透析した。精子は、10 mM グリニルグリニンを含むCFSW中に懸濁後、卵ゼリーと混合した。横軸に示した時間は Ca^{2+} を10 mMに戻した (—●—)。また、卵ゼリーと Ca^{2+} (10 mM) を同時に精子に加えた (—○—)。卵ゼリー混合時の Ca^{2+} 濃度は、100 µM以下と思われた。

用いて、低 Ca^{2+} 濃度条件下 ($100 \mu\text{M}$ XF) で行った。
図 3-2 は、低 Ca^{2+} 濃度条件下で、ヒトラーの卵ゼリーを精子に添加してから Ca^{2+} を戻すまでの時間と先体反応率の関係を示している。
卵ゼリーと Ca^{2+} が精子に対して、同時に与えられた時にのみ高い先体反応率が得られたが、数十秒間 Ca^{2+} 不十分条件下で卵ゼリーと接した精子は、たとえ Ca^{2+} 濃度を正常に戻してもはや先体反応しなかった。また、光学顕微鏡で観察した限り、このような処理によって先体反応できなくなった精子の運動性には影響が見られなかった。

これらのことから、稀釈した卵ゼリーで処理された精子や、低 Ca^{2+} 濃度条件下で卵ゼリーと接触した精子では、十分条件 (正常濃度) に戻されても、もはや先体反応できなくなる様な、生理的変化が起こると考えられる。このような卵ゼリーの作用について、P-AR-
IS と M_0 画分を用いてさらに解析した。

3 - 3 - 2 . P-ARIS 及び M_8 画分 による 単独 処理の 影響 .

図 3-3 は、P-ARIS と M_8 画分 をそれぞれ精子に添加するタイミングと、先体反応率の関係を示している。P-ARIS と M_8 画分を、精子に対して同時に作用させた時に最も高率で先体反応が誘起され、両者を時間的にずらし加えると先体反応率は低下した。 M_8 画分を先に添加した場合、 M_8 画分の濃度にもよるが数分内の遅れであれば P-ARIS を添加することによ、て、かなりの率で先体反応を誘起でき、P-ARIS 処理より緩やかに反応率が低下した。

図 3-4 は、精子を種々の濃度の P-ARIS を含む海水中で 3 分間放置した後、卵ゼリーを加え先体反応率を測定したものであるが、先体反応は P-ARIS による前処理によ、て、濃度依存的に抑えられた。また、この P-ARIS による前処理効果と、 M_8 画分存在下での先体反応誘起治性との間には対応関係が見られた。

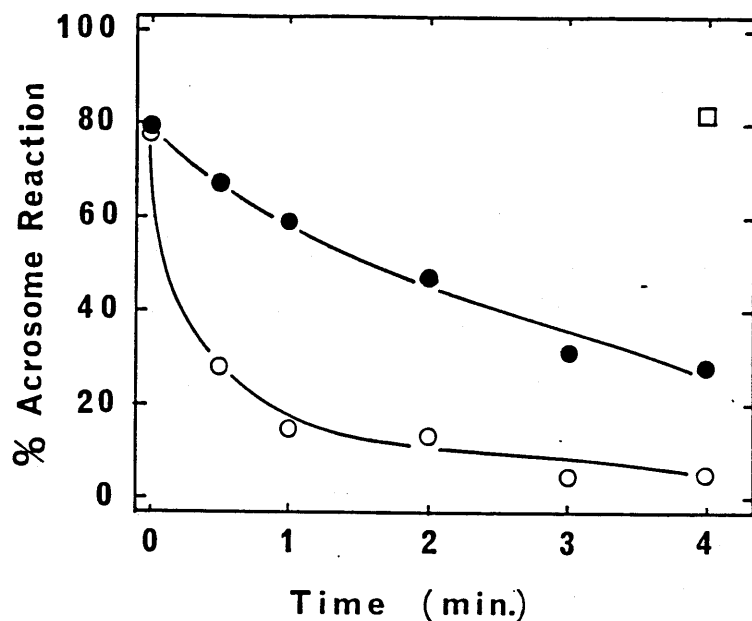


図 3 - 3 : P-ARIS と M₈画分を作用させるタイミングと先体反応.

- (—○—), 精子と P-ARIS (50 μg 糖/ml) を混合し、横軸に示した時間に M₈画分 (50 μg/ml) を添加した。
- (—●—), 同様に M₈画分 (50 μg/ml) で前処理後、P-ARIS (50 μg 糖/ml) を添加した。
- (□), 卵ゼリ- (50 μg 糖/ml) を添加した。

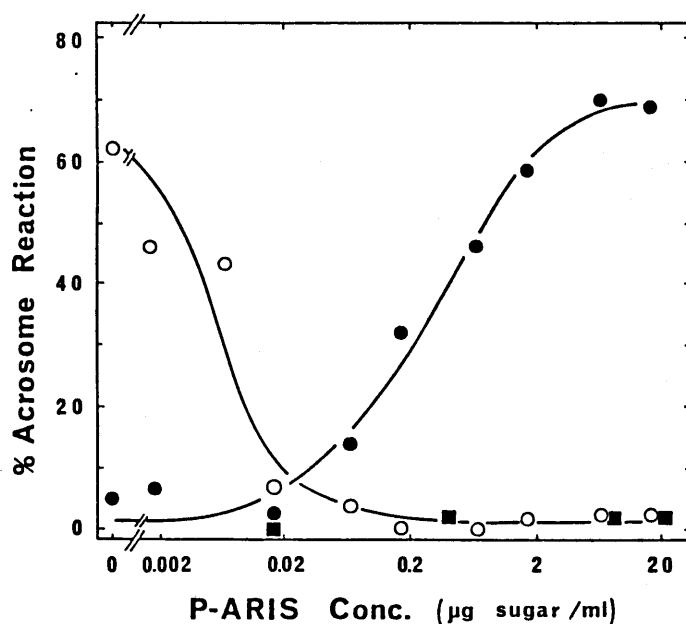


図 3 - 4 : P-ARIS による先体反応誘起治性と前処理効果

- (—○—), M₈画分 (20 μg/ml) 存在下での先体反応.
- (—■—), M₈画分非存在下での先体反応.
- (—○—), 各濃度の P-ARIS で 3 分間前処理後、卵ゼリ- (50 μg 糖/ml) を添加した.

また、P-ARIS によつて高 Ca^{2+} 条件もしくは高 pH 条件で先体反応が誘起されるか、精子を P-ARIS で前処理してから高 Ca^{2+} 条件にしても (図 3-5)、あるいは高 pH 条件にしても (表 3-1)、先体反応は誘起されなかった。P-ARIS のこのような前処理効果は、約 1 分間の処理で十分にあらわれた (図 3-5)。 M_8 画分による前処理もまた、濃度依存的に精子の卵ゼリーに対する反応性を低下させた (図 3-6)。

この様に、P-ARIS や M_8 画分で単独処理された精子は、それぞれ M_8 画分や P-ARIS などの欠如成分を補足されても先体反応しなくなるのみならず、卵ゼリーに対する反応性までも失うことが明らかになった。

3-3-3. P-ARIS 及び M_8 画分の化学的処理と前処理効果

P-ARIS による前処理効果は、前章で述べた先体反応誘起活性と同様に、P-ARIS を過ヨウ素酸酸化、あるいは脱硫酸すること

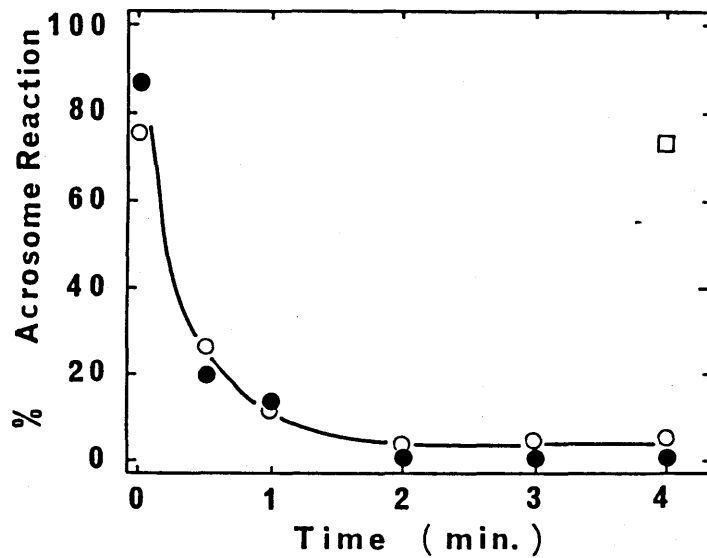


図 3 - 5 : P-ARIS の前処理時間と先体反応

P-ARIS (40 μg 糖/ml) で横軸で示した時間処理した後、
卵ゼリー (40 μg 糖/ml) (—○—), または 50 mM Ca²⁺ (—●—) を
添加した。 (□), P-ARIS 非存在下で卵ゼリー (40 μg 糖/ml) を添加した。

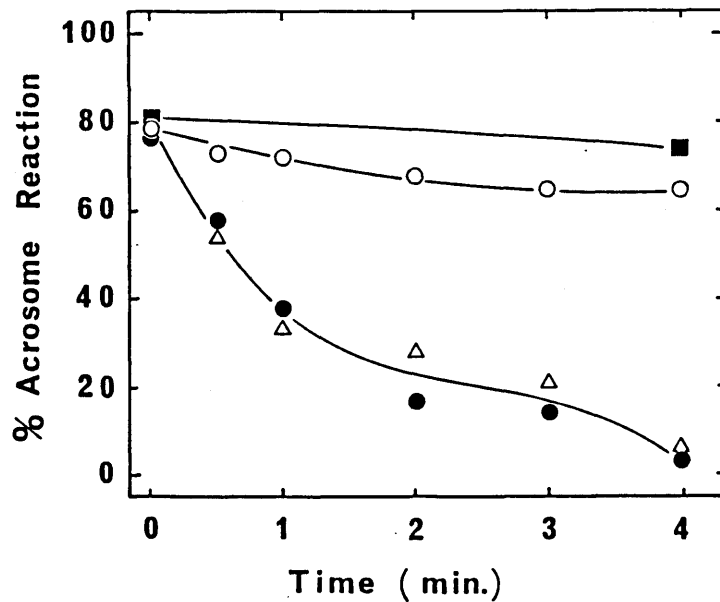


図 3 - 6 : M₈ 画分の前処理時間と先体反応.

各濃度の M₈ 画分で前処理後、横軸に示した時間に卵ゼリー (50 μg 糖/ml) を添加した。

(—■—), 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; (—○—), 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; (—△—)
20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; (—●—), 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の M₈ 画分を示す。

より消失した(表3-2)。イトマキヒトテのP-ARISはヒトテの精子に対して前処理効果を持たず、逆にヒトテのP-ARISもイトマキヒトテの精子先体反応を阻害しなかった。またARISの主要構成糖(フコース、ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン)及び、ARISと物理化学的性質の類似した多糖類(フコイジン、ヒアルロン酸など)などでは、前処理による先体反応の阻害効果は、認められなかった。

一方、 M_r 画分中には2種類の C_0 -ARIS(C_0 -ARIS I及びII)が含まれている。精製されたこれらの C_0 -ARISと精子を混合し、5分後に卵ゼリーを添加したところ先体反応が誘起された(表3-2)。また、 C_0 -ARISはステロイドサポニンであり、フロナーゼにより失活しないが、 M_r 画分をフロナーゼ処理したところ、前処理効果が低下した。したがって、 M_r 画分による前処理効果は、アポ4ド性の物質に起因することが示唆された。

表3-1: P-ARIS と高pH処理のタイミング

1st	Addition	2nd	% Acrosome Reaction
P-ARIS / pH9.5		None	50
P-ARIS		Buffer (pH9.5)	4
Buffer (pH9.5)		P-ARIS	55
Buffer (pH9.5)		None	2

・25 mM グリシン-NaOH (pH9.5) 緩衝液を用いた。

P-ARIS (50 μg 糖/ml) もしくは、高pH海水 (pH9.5) で精子を3分間前処理後、緩衝液 (pH9.5) または、P-ARIS を添加した。

表3-2: 卵ゼリー成分の化学的処理と前処理効果

PRETREATMENT	ACROSOME REACTION (% Control)
ASW	100
ARIS	20 μg sugar/ml 11
P-ARIS	20 μg sugar/ml 16
<u>Asterina</u> P-ARIS	100 μg sugar/ml 89
Oxidized P-ARIS	4 μg sugar/ml 100
Desulfated P-ARIS	50 μg sugar/ml 88
M ₈	20 μg /ml 8
P-M ₈	20 μg /ml 89
Co-ARIS I	20 μg /ml 105
Co-ARIS II	20 μg /ml 114

精子を各成分で3~5分間前処理した後、卵ゼリー (20 μg 糖/ml) を添加し、先体反応率を測定した。無処理 (ASW処理) で卵ゼリーを添加したものの先体反応率を100%とし、比活性を示した。P-M₈ (70%消化 M₈成分)

3 - 3 - 4. P-ARIS, M_8 画分による前処理 効果の不可逆性。

精子を、正常海水中において P-ARIS あるいは M_8 画分で、また低 Ca^{2+} 条件 ($0.5mM$) にて卵ゼリー - でそれぞれ 20こで 5分間前処理した後、十分に海水で洗い、卵ゼリー - を加えたが依然として先体反応は起こらなかった (表3-3)。

したがって、①海水で洗浄後もこれらの成分が精子に吸着している、②前処理によって精子側に何らかの不可逆的な変化が生じている、③その双方が起こっていることが考えられた。

①の可能性を検討するため、P-ARIS に対して ^{14}C -無水酢酸でのラベルを試みたが、十分量の放射活性が入らなかった。また、前処理効果を持つ M_8 画分中の有効成分は、まだ単離されてない。そこで次善策として、前処理後、精子を遠心除去し、上清中の P-ARIS あるいは M_8 画分の残存活性を調べた。図3-7及び表3-4に示すように、P-ARIS, M_8 画分いずれの場合も、前処理に用いた精子濃度に依

表3-3: 卵ゼリ-成分による前処理の不可逆的效果

1 st	Incubation	2 nd	Acrosome Reaction (% Control)
ASW		Jelly	100
Jelly /	0.5mM Ca ²⁺	Jelly	5
ARIS		Jelly	4
P-ARIS		Jelly	7
M ₈		Jelly	3

精子を ARIS (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$), P-ARIS (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), M₈ 画分 (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) または、0.5mM Ca²⁺ 条件で卵ゼリ- (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と混合し、5分後に100倍量の ASW で精子を2回洗った。卵ゼリ- (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し、ASW で同様に処理した精子の反応率を100とし、比治性で示した。

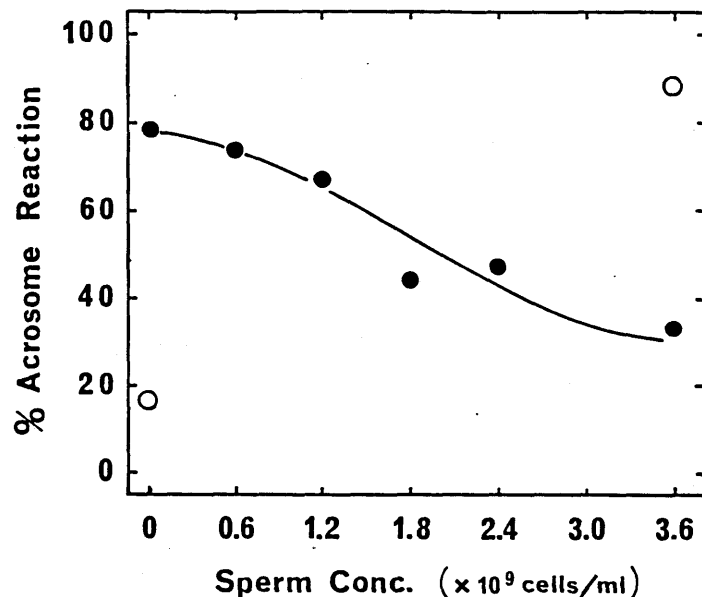


図3-7: 精子と混合した後のP-ARISの残存治性。

P-ARIS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を横軸に示した濃度の精子懸濁液中で20分、5分間放置後、遠心して上清を得た。

(—●—), M₈画分 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 存在下での上清による先体反応率。

(○), 精子を上清で3分間前処理後、卵ゼリ- (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加した。

存して上清中の残存活性は、先体反応誘起活性、前処理効果ともに低下した。すなわち、P-ARIS 及び M_8 画分中の有効成分は、いずれも精子によって吸収、または失活させられたものと考えられる。

3-3-5. 先体反応及び前処理に伴う精子の呼吸率変化.

先体反応に伴う精子の生理的、生化学的変化を知るために、卵ゼリー、P-ARIS と M_8 画分による精子の呼吸変化を酸素電極法を用いて測定した。正常海水中 (pH8.2) に稀釈されると、それまでほとんど運動を停止していた精子は一斉に運動を開始し、数分内に酸素消費率はほぼ一定となった。この状態の精子に、卵ゼリー、或いは P-ARIS と M_8 画分を添加したとこゝろ、約 90 秒後より、酸素消費すなわち呼吸率が低下し始め、やがて、一定の低い呼吸率に落ち着いた (図 3-8)。この時の精子を光学顕微鏡で観察すると、精子の運動はほぼ

表3-4: 精子と混合した後のM₈画分の残存活性

SPERM CONC. (cells/ml)	AR-INDUCING ACTIVITY #	PRETREATMENT ACTIVITY *
2.9 X 10 ⁹	17	76
5.7 X 10 ⁸	52	63
1.1 X 10 ⁸	49	13
0	59	15

M₈画分 (10 μg/ml) を各濃度の精子懸濁液と混合し、20℃
5分間放置した後、遠心して上清を得た。

井: P-ARIS (50 μg糖/ml) と上清による先体反応率

＊: 上清で精子を4分間前処理後、卵ゼリー (50 μg糖/ml) を
添加した時の先体反応率

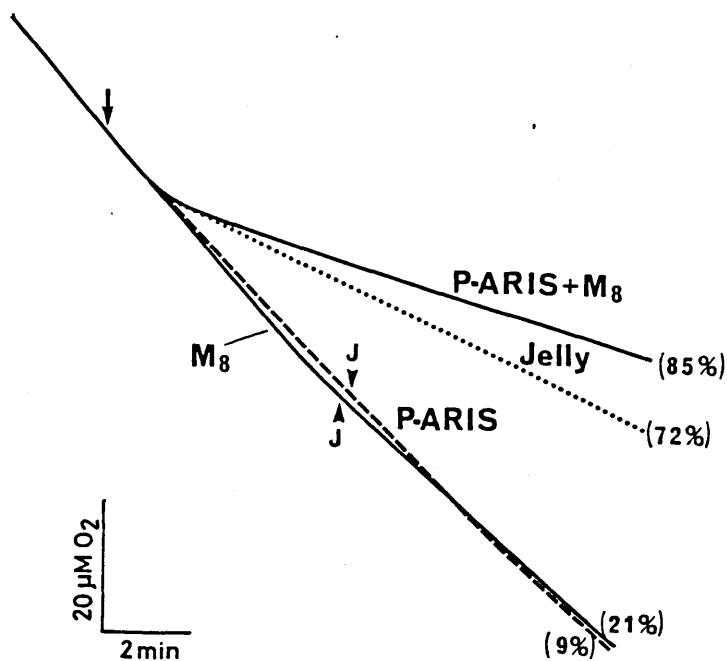


図3-8: 先体反応に伴う、精子の呼吸変化とP-ARIS、
M₈画分処理の呼吸に及ぼす影響

pH 8.2 における精子の呼吸率を、 1×10^8 精子/ml あたりの溶存酸素量変化で示す。
P-ARIS (20 μg糖/ml), M₈画分 (20 μg/ml), 卵ゼリー (20 μg糖/ml)
を矢印で添加した。また、M₈画分あるいは、P-ARIS を添加後、
卵ゼリー(J)を添加した(矢戻)。()内は先体反応率を示す。

停止してあり、また、高率で先体反応を起こしていった。ただし、先体反応は卵ゼリー-添加後、数秒で完了するが、呼吸や運動が低下するには、1分以上必要であった。

一方、精子に P-ARIS や M_8 画分を単独で添加した場合は、精子の呼吸にはほとんど影響が認められなかった(図3-8)。この様な処理をした精子に卵ゼリー-を追加しても、呼吸に変化は見られず、運動の停止も先体反応も低率でしか起こっていかなかった。つまり、P-ARIS や M_8 画分による単独処理は、正常海水中では、精子の呼吸や運動能には直接影響を与えず、先体反応のみを抑制した。また、卵ゼリー-或いは、P-ARIS と M_8 画分を精子に与えることによつて起こされる呼吸や運動の低下は、先体反応の結果であると結論された。

3-3-6. P-ARIS, M_8 画分で前処理した精子の受精能

P-ARIS 或いは、 M_8 画分で前処理された精子の受精能を調べた。約 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の P-ARIS で 3 分間前処理した精子を卵に与えても、受精は起こらなかった (図 3-9a)。しかし、無処理の精子を追加したところ、正常の場合と同様に受精した。P-ARIS を含む卵懸濁液に直接媒精した場合でも、P-ARIS 濃度によつては受精が起こらなかった (表 3-5)。受精阻害を起す P-ARIS の前処理濃度は、ほぼ先体反応阻害濃度に等しく、また、イトマキトテとの間では種特異性が認められた (図 3-9a)。 M_8 画分で前処理した精子も、同様に受精能を失った (図 3-9b)。

以上の結果より、前処理された精子は、in situ の卵ゼリーに接しても先体反応できず、そのために受精できないと結論された。

3-3-7. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の精子への取りこみに対する前処理の影響とイオノフォアの効果
図 3-10 に示す様に、卵ゼリーを添加する

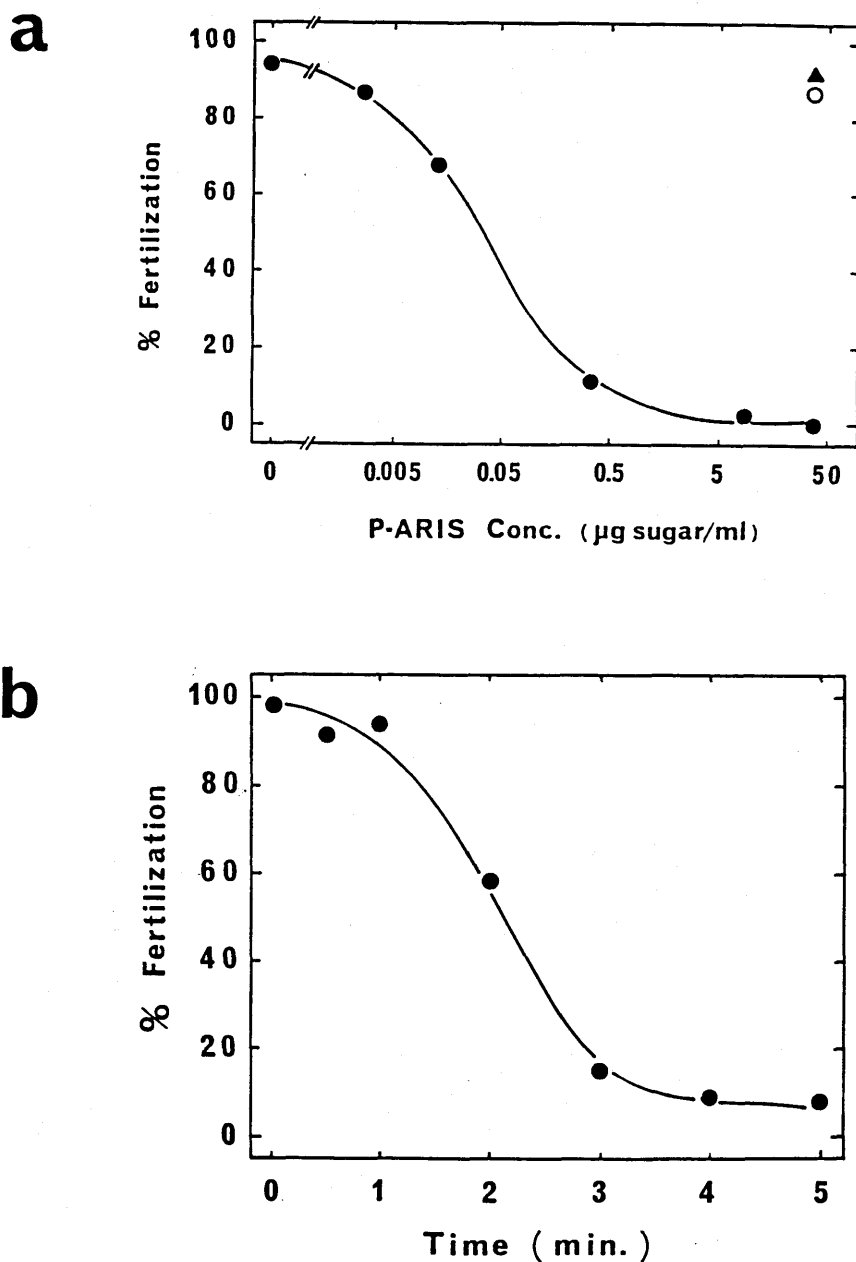


図3-9: 前処理精子による受精.

a: P-ARIS で前処理した精子による受精 (媒精時の精子濃度 2×10^6 精子/ml)

(—●—), 各濃度の P-ARIS で3分間精子を前処理後媒精した。

(○), $40 \mu\text{g}$ 糖/ml の P-ARIS で3分間前処理した精子を媒精後, 2分に無処理の精子を添加した。

(▲), $80 \mu\text{g}$ 糖/ml の イトマキヒトデ の P-ARIS で3分間前処理した精子を媒精した。

b: M_8 画分での前処理時間と精子の受精能 (媒精時の精子濃度 3×10^6 精子/ml)

精子を M_8 画分 ($25 \mu\text{g}/\text{ml}$) で 横軸に示した時間前処理した後卵に添加した。

と、精子への急激な Ca^{2+} の取りこみが起こったが、P-ARIS や M_8 画分で前処理した精子に卵セリンを添加しても、 Ca^{2+} の取りこみは、ほとんど起こらなかった。このことから、前処理によって精子が先体反応できなくなるのは、精子が Ca^{2+} を取りこめなくなるためと予想された。

前章でイオノフォアを用いて先体反応を誘起できることを示したが、P-ARIS や M_8 画分で前処理した精子でも、イオノフォアを添加することによって先体反応が誘起された(表3-6)。すなわち、前処理の結果、不活性化されてしまった Ca^{2+} の取りこみ機構を、イオノフォアによってバイパスしてやれば、先体反応を誘起できることが示された。また、前処理を受けた精子は、開口分泌及びアクチンの $G \rightarrow F$ 転換のための機構そのものが損なわれているわけではないことが明らかになった。

表 3 - 5 : P-ARIS 存在下での受精

P-ARIS ($\mu\text{g sugar/ml}$)	% Fertilization
0	98
10	32
40	22
80	6

0 ~ 80 μg 糖/ml の P-ARIS 存在下で媒精した時の受精率を示す。(媒精時の精子濃度, 6×10^6 精子/ml)

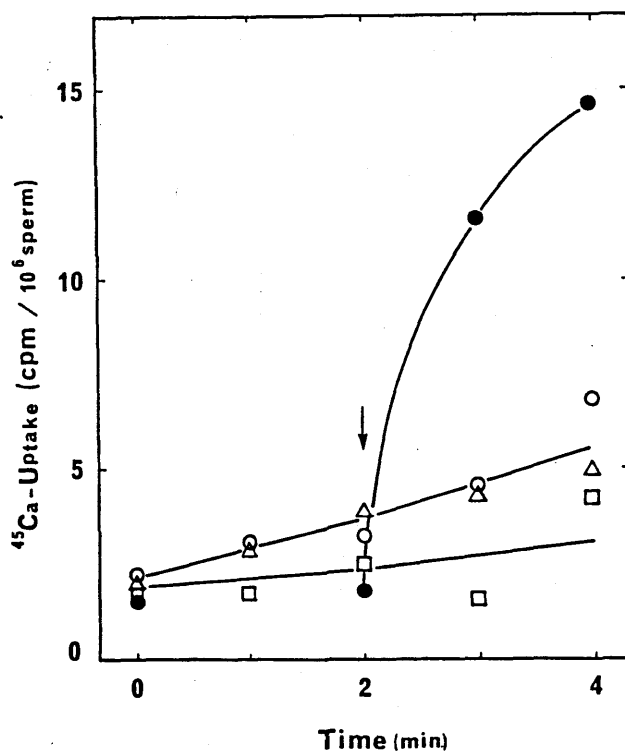


図 3 - 10 : 卵セリ- による $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の精子への取りこみに対する P-ARIS, M8 画分での前処理の影響。

- (—□—), 無処理の精子 (卵セリ- も添加しない)
- (—●—), 無処理の精子に対して矢印で卵セリ-(20 μg 糖/ml) を添加した。
- (—○—), P-ARIS (10 μg 糖/ml) で 3 分間前処理後, 矢印で卵セリ- を添加した。
- (—△—), M8 画分 (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 4 分間前処理後, 矢印で卵セリ- を添加した。

表 3-6 : P-ARIS, M_8 画分で前処理した
精子に対するイオノファアの効果

1st	Addition	2nd	Acrosome Reaction (% Control)
ASW		Jelly	100
ASW		Monensin	0
ASW		A23187	37
ASW		Monensin & A23187	70
P-ARIS		ASW	8
P-ARIS		M_8	15
P-ARIS		Jelly	14
P-ARIS		50mM Ca^{2+}	4
P-ARIS		A23187	46
P-ARIS		Monensin & A23187	82
M_8		ASW	0
M_8		Jelly	10
M_8		A23187	53
M_8		Monensin & A23187	62

P-ARIS (40 μg 糖/ml) で 3 分間, もしくは, M_8 画分
(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 4 分間前処理した後, 各物質を添加した。
卵セリ- は 50 μg 糖/ml, イオノファアは 50 μM で使用した。
ASW で同様に前処理し, 卵セリ- を加えた時の先体反応率
を 100 とし, 比活性で示した。

3-4. 考 察

先体反応には不十分な濃度の卵ゼリー、
或いは不十分な濃度の Ca^{2+} 条件下で卵ゼリー処
理した精子は、それぞれの条件が改善された
後も先体反応できなくなることが示された。
萩原と団(1969)は、ヒトデを用いて、 Ca^{2+} を
含まない海水中で卵ゼリーと精子を混合して
も、形態的には全く変化が見られないことを
電子顕微鏡レベルで明らかにしている。また、
この様な処理を行った精子に、30秒後に Ca^{2+}
を添加すると先体反応が誘起されると結論し
ている。しかしながら、彼女らの実験データ
では、この時の先体反応率は12%にすぎず、
対照実験(正常海水中で精子と卵ゼリーを混合したもの)の反応率
(40%)と比べ、明らかに低下している。
一方ウニの場合は、 Ca^{2+} 欠除海水中で精子と
卵ゼリーを混合し、精子を洗った後、正常海
水中で再び卵ゼリーを添加すると先体反応が
誘起される(Schackmann & Shapiro, 1981)。しかし

Ca^{2+} -キネセル阻害剤の存在下で、弱酸性海水 (pH6.8) 中で精子と卵ゼリーを混合した場合は、精子を洗って再び卵ゼリーを添加しても先体反応は起こらないことを報告している。彼らは、精子が Ca^{2+} 存在下で卵ゼリーによって、先体反応の最初のステップ (これを彼らは State X と呼んでいる) に入ると、たために、条件を改善してから卵ゼリーを再添加しても、もはや次のステップに進めなくなると考えている。ヒトデの場合も、卵ゼリーの作用を受けると、精子は半ば不可逆的に活性化され、そのまま定常状態にとどまるのではないかと考えられる。

不十分な条件下で卵ゼリーによってもたらされる精子の不可逆的な部分活性化は、主に ARIS によることが明らかになったが、このほかに、M₈画分中の低分子ペプチドと思われる未同定の因子にも起因することが明らかとなった。精製された C₀-ARIS には、このような不可逆的な不十分賦活作用は認められなかったが、高濃度 (C₀-ARIS I, 200 μg/ml) では、やはり

精子の反応性を失わせる(第4章)。しかしながらこの濃度では、 M_8 画分による前処理効果を説明できず、ペプチド成分とは異なる反応を誘起している可能性がある。

先体反応は、ARIS と Co -ARIS だけで誘起されることから、低分子ペプチド成分は、先体反応に不可欠の因子ではないと考えられる。しかし、本章で明らかになった様に、二の低分子ペプチド成分の作用によって、精子は先体反応能を失うから、当然この物質もまた、生理的な状況では先体反応に関与するものと考えられる。事実、この因子の存在下では、先体反応に必要な Co -ARIS の濃度が低下する(第4章)。

前章で、 M_8 画分は、高 Ca^{2+} や高 pH 条件がもたらす効果を代行することを示したが、高 Ca^{2+} や高 pH 条件は、精子に不可逆的な状態変化を起ささない。この意味で、ARIS や低分子ペプチド成分による前処理効果は、更に特異的であり、精子側に質的な変化を誘導する

ものと考えられる。精子側にどのような状態変化が起こるのかについては、現在のところ明らかではないが、本研究で一つの実事として精子の Ca^{2+} 取りこみ能が前処理によって失われることが示された。先体反応時の Ca^{2+} の取りこみは、 Ca^{2+} - Ca_v チャンネルを介して行なわれるので、前処理によって Ca_v チャンネルが不活性化されるのではないかと考えている。これは、前章で述べたことと一見矛盾する。しかし、例えば ARIS の場合、先体反応誘起活性と前処理効果は、濃度依存性及び化学的安定性において、常に対応している。このことは、つまり、ARIS や低分子ペプチド成分の単独処理による作用は、卵セリール中で各々が引き起こす作用と同質であることを示唆している。これらと Ca_v -ARIS がカップルして作用する場合、もしくは、ARIS の作用時に高 Ca^{2+} や高 pH 条件が満たされている時に限って、 Ca^{2+} - Ca_v チャンネルが活性化されると考えられる。

これらの因子の作用機作及び、 Ca^{2+} - Ca_v チ

ネル活性化のためのターゲットに関しては、現在不明である。前述した様に、ウニの精子細胞膜から卵ゼリーに対する受容体と考えられる物質が精製されている (Podell & Vacquier, 1985)。この受容体は、分子量 210 K で、小麦胚芽レクチン (WGA) に対して親和性を持ち、フロテアーゼで分解されることから、糖タンパク質と考えられている (Podell & Vacquier, 1984a)。また、WGA や、この受容体に対する特異的抗体によって先体反応が阻害されるが、このような精子に、A23187 とモネンシンを添加すると先体反応を誘起できることも報告されている (Podell & Vacquier, 1984a, b; Trimmer & Trimmer, 1985)。彼らは、WGA や抗体で処理後、卵ゼリーを添加しても、 Ca^{2+} の精子への取りこみも、 H^+ の放出も起こらないことから、この受容体が Ca^{2+} - 4H^+ ニネルの開口と、 Na^+/H^+ 交換反応に機能すると考えている。Darszon & (1984) は、実際に、ウニ精子の細胞膜成分をリポソームに組みこみ、これが卵ゼリーによって種特異的に Ca^{2+}

や Na^+ を取りこむことを示している。この様に、精子側から先体反応に機能すると考えられる物質が抽出されているが、これらの受容体に結合する卵ゼリー中の本体については、全く言及されていない。

ウニで示された様な受容体が、ヒトデの精子にも存在しているか否かは、先体反応誘起機構を解明するうえで不可欠の問題である。そのためには、 ^{125}I でのラベルや、軽い過ヨウ素酸処理による糖鎖の開裂部位を ^3H -水素化ホウ素ナトリウムで還元しラベルしたり、抗体を作製するなどして、ARIS や Co-ARIS、低分子ペプチド成分が精子に結合することを直接的に、かつ定量的に示す必要がある。ウニのポリフコース硫酸も厳密には、精子に結合することは確かめられていない。これもやはり、アイソトープでラベルされにくいためである (SeGall & Lennarz, 1981)。

P-ARIS や M_8 画分による前処理が不可逆的であり、各成分と精子を混合した後に残る

各活性が低下することから、各成分が、①精子の持つ酵素で分解された可能性、②精子と不可逆的に結合した可能性、が示された。各種酵素に対する、これらの成分の感受性から、これらが短時間で分解されてしまうとは考えにくい。ARISは硫酸基によると思われる強い負の荷電を持っており、精子の表面も負に荷電していると考えられるので、両者の間には、静電的な反発が生じるであろう。このような状況下でのARISと精子の相互作用は、特異性が高いはずであり、事実、高い種特異性が示された。また、ARISは分子量が 10^7 以上と推定される巨大分子であり、このような分子が細胞膜をたやすく通過して細胞内に入るとは考えにくい。さらに、予備的な実験で、精子をプロナーゼなどで軽く処理すると、精子の運動性は低下しないが、卵ゼリーによる先体反応は起こらなくなった(データは示していない)。以上のことから、ARISは、精子細胞膜上の受容体を介して精子の生理的变化を誘導して

いる (トランス・メンブレン・コントロール) 可能性が高い。

M_r 画分は、弱い疎水性を示すことから、Co-ARIS や低分子ペプチド成分は、精子の細胞膜に比較的容易に吸着されるのではないかと予想される。しかし、これらの因子に関しても、ウニなど知られる精子活性化ペプチド (Dangott & Garbers, 1984) や、ヒトテ類の卵成熟機構におけるカスケード系 (Kanatani & Nagahama, 1980) と同様に、特定の受容体に作用して、活性変化を導いていることも考えられる。これら、受容体を含めた精子側からのアプローチが、今後の課題である。

第 4 章

低分子ペプチド成分による
細胞内 pH の上昇と先体反応

4-1. 序 論

細胞の機能分化に伴って、細胞内 pH (pH_i) が変動することが知られているが (L'Allemain *et al.*, 1984; Mills *et al.*, 1985)、精子もその例外ではない。ウニヤトテでは、精巣内で静止していた成熟精子は、海水で稀釈されると、活発な運動を開始するが、この時 Na^+/H^+ 交換を通して精子の pH_i が上昇し (Christen *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 1983; Bibring, 1984)、細胞内の Na^+ は、 Na/K ポンプを介して速やかに細胞外に出される (Gatti & Christen, 1985)。同様に、卵ゼリー中に見出される精子活性化ペプチド (その真の生理的意義は不明) もまた、 pH_i を上昇させることにより、弱酸性海水中 ($pH 6\sim 7$) で精子の呼吸を上昇させることが報告されている (Repaske & Garbers, 1983)。一方、先体反応に伴って pH_i の上昇と引き続く再酸性化がウニ精子で明らかにされており (Schackmann *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1983)、また、酸性海水中では先体反応が起こらないことから

pH_i上昇は、先体反応に必須条件であると考えられてきた (Christens, 1983)。しかし、pH_i変動が常に細胞の生理的活性変化の第1原因とは限らず (Mills, 1985)、先体反応の場合でも未だ不明な点が多い。

第2章では、pH_iの上昇を伴う条件では、先体反応が起こりやすくなること、及びM_g画分がpH_i上昇を起こす可能性を示した。また、第3章では、M_g画分中に、ペプチド性の低分子物質が存在することを示した。本章では、先体反応に伴うヒトテ精子のpH_i変動について記載した。さらに、pH_i上昇を起こす卵セリ-中の因子に注目し、ウニなどでよく知られる精子活性化ペプチド (Suzuki, 1981) との類似性、及び先体反応に及ぼす影響から、その生理的機能を考察した。

4 - 2 . 材料と方法

4 - 2 - 1 . Na^+ 欠除海水の調製

ASW中の NaCl を、塩化コリンで置換した。以下 NFSW と略す (423 mM , Choline-Cl ; 9 mM , KCl ; 10 mM CaCl_2 ; 23 mM , MgCl_2 ; 26 mM , MgSO_4) 。 また、グリシルグリニン-KOH (10 mM , pH8.2) で緩衝した。

4 - 2 - 2 . 精子の細胞内 pH (pH_i) の測定

蛍光性フロロ-7" を用いて、精子の pH_i を測定した。これは、非解離状態のフロ-7" のみが膜を透過できるが、細胞内に入ったフロ-7" は、 pH_i に依存して解離すること、及び細胞内のフロ-7" は消光されることを利用したものである (Schuldiner 5, 1972 ; Lee 5, 1983) 。

海水で5倍に希釈したドライ・スパーム $15 \sim 25 \mu\text{l}$ を $2.5 \mu\text{M}$ 9-アミノアクリジン (シグマ以下 9-AA と略す) を含む GGASW (pH8.2) 2.5 ml に懸濁した。 20°C で、励起波長 (382 nm)、測定波長 (454 nm) を用い、蛍光光度計 (日立 MPF-2A) で 9-AA

による蛍光変動をモニターした。図4-1に示す様に、9-AAによる蛍光変動がフラットに達する約10分後に、卵ゼリー、P-ARIS、M₈画分などの試験液25~100 μ lを添加し、さらに蛍光変動をモニターした。先体反応率測定用に、25 μ l採取し固定した。反応後、4%トリトンX-100を10 μ l加え、細胞膜内外のpH勾配を壊し、pH勾配によって精子に保持された9-AAを放出させた。厳密には、精子の水相の体積を求める必要があるが、Christenら(1982)の求めた値と大差ないものとして仮定し、図4-1の式に各値を代入して精子のpH_iを求めた。

4-2-3. 細胞外pH(pH_e)の測定

微弱な緩衝液(0.5mM PIPES, pH8.0 または、2mM グリシン-NaOH, pH8.3)を含むASW, CFSW, NFSW 4mlに、5倍に希釈したドライスパーム30~50 μ lを懸濁した。一定速度で攪拌しながら、23 $^{\circ}$ Cの恒温条件下で、pHメーター(堀場, M8S)及びレコーダー(理研電子, SP-H3C)を用いてpH_eをモニターした。

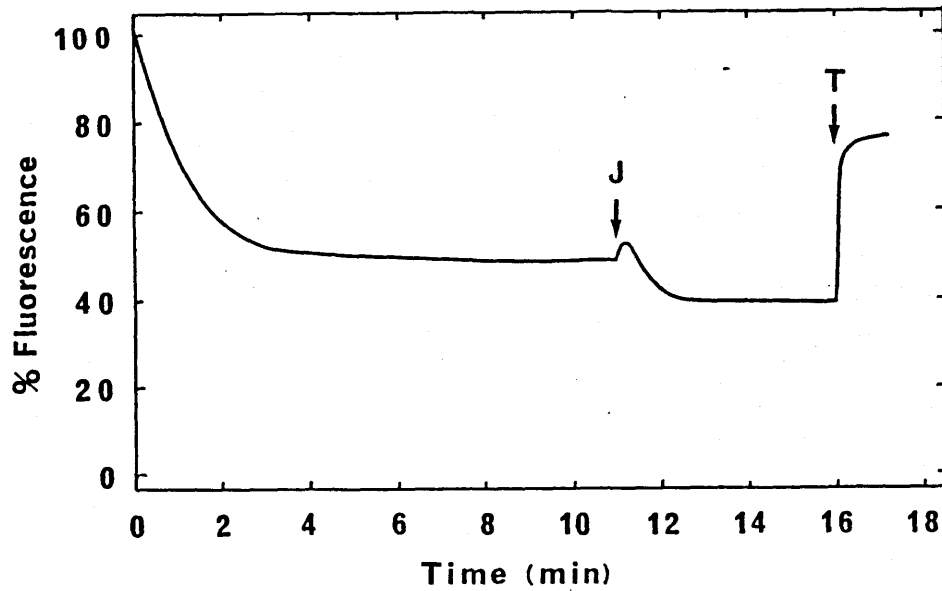


図4-1: 9-アミノアクリジン(9-AA)による
細胞内pH(pH_i)の測定

時間経過に伴う、9-AAの精子による蛍光量の変動を示す。蛍光の減少がほぼプラトーとなる10~12分後に、卵ゼリー(J)を添加した。蛍光変動の終了後、トリトンX-100(T)を添加した。10分における相対蛍光量(F)は約0.48, トリトンX-100添加後の相対蛍光量(F')は、約0.77を示している。(E_m: 382 nm, E_x: 454 nm)

$$pH_i = pHe - \log \left[\frac{1-F}{F} \cdot \frac{F'}{1-F'} \right]$$

pH_i ; 細胞内pH

pHe ; 細胞外pH

F ; 各時間における相対蛍光量

F' ; トリトンX-100添加後の相対蛍光量

(Schackmann S, 1981 ; Christen S, 1982)

10分における pH_i は、pHe 8.2 の時、上式より、約 7.64 と計算される

4 - 3 . 結 果

4 - 3 - 1 . 先体反応に伴う精子の細胞内 pH (pH_i) の変動.

外液の pH (pH_e) が 8.2 の時、精子の pH_i は約 7.44 ± 0.06 ($n=8$) で、ウニの精子と同様に、外液に比べてやや pH_i が低いことが示された。精子に卵ゼリー、或いは P-ARIS と M_8 画分を添加すると、添加後数秒以内に pH_i は約 0.06 ± 0.01 pH 単位上昇し、その後減少が始まり、2 ~ 3 分後には pH_i は、約 7.24 ± 0.06 ($n=11$) を示した。 pH_i 変動は、以後、図 4-2 に示した様に、試験液を添加後数分間の蛍光変動を、 pH_i 変動に換算して示してあり、Y 軸方向は pH_i 上昇を示す。図 4-2, a に、卵ゼリー及び P-ARIS と M_8 画分による先体反応時の pH_i 変動を示した。P-ARIS と M_8 画分による先体反応の場合、卵ゼリーの場合に比べて、 pH_i の上昇量がやや大きく (表 4-1)、また、 pH_i の減少は、やや遅れて起こった。 pH_i の減少量

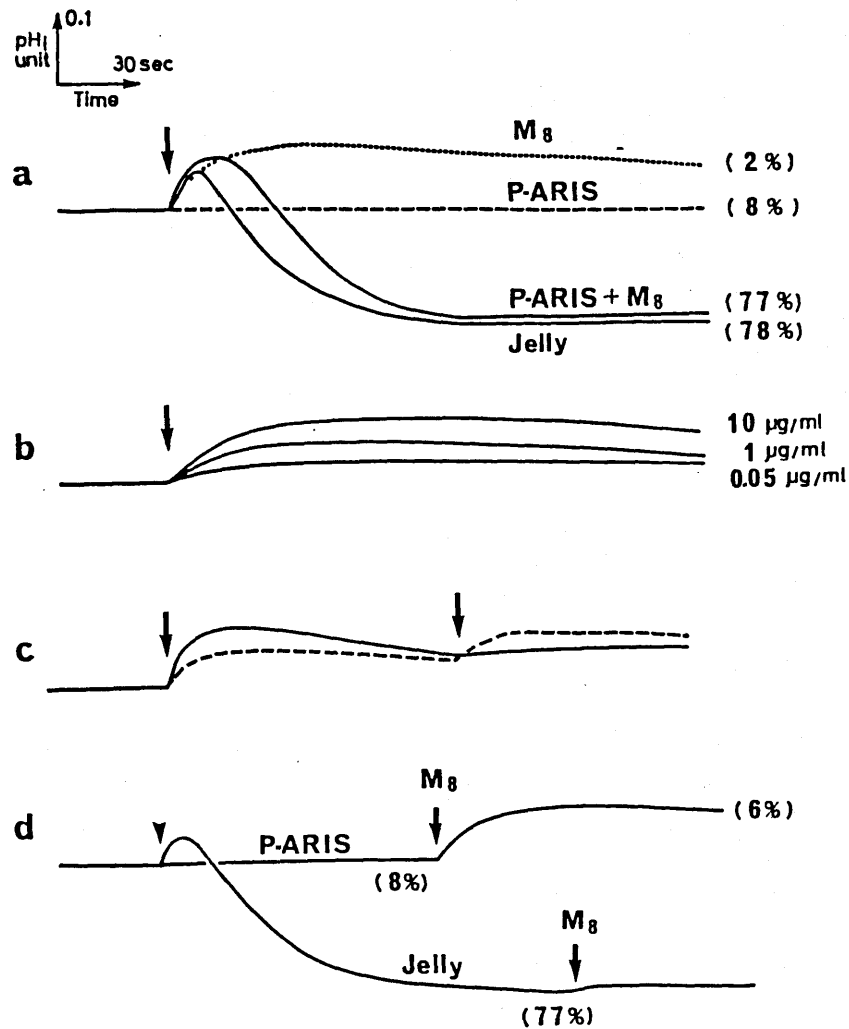


図4-2：先体反応に伴う pH 変動と、卵ゼリー成分の効果。

() 内は、先体反応率を示す。

a：卵ゼリー (20 µg 糖/ml)，P-ARIS (20 µg 糖/ml)，M₈ 画分 (20 µg/ml) などとを矢印で精子に添加した。

b：0.05 ~ 10 µg/ml の M₈ 画分を添加した。

c：実線は、20 µg/ml の M₈ 画分を矢印でそれぞれ添加した。
破線は、2 µg/ml の M₈ 画分を矢印でそれぞれ添加した。

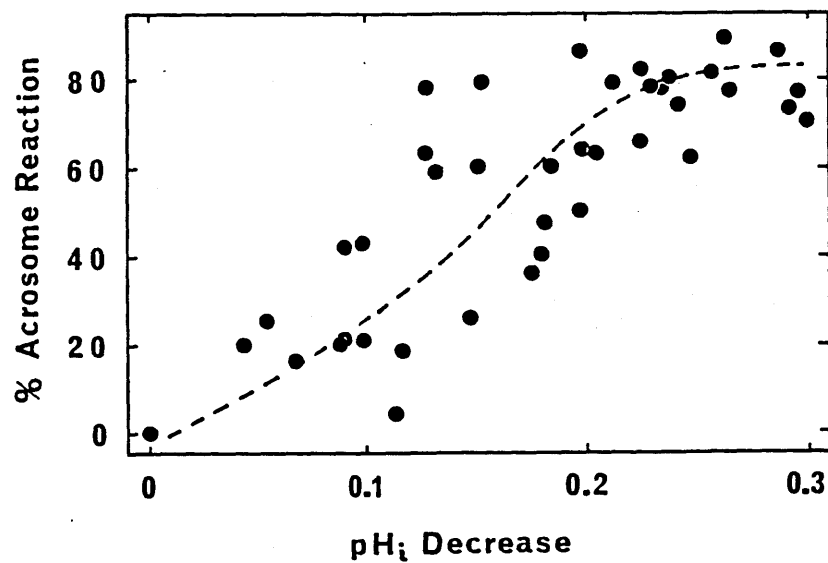
d：P-ARIS (25 µg 糖/ml) または、卵ゼリー (20 µg 糖/ml) を添加後 (矢印)、M₈ 画分 (10 µg/ml) を添加した (矢印)。

表4-1: 先体反応に伴う pH_i 変動量

Inducer	pH_i -Increase*	pH_i -Decrease*	%Acrosome Reaction
Jelly	0.06 ± 0.01	0.20 ± 0.06	71 ± 8 (n=11)
P-ARIS + Mg	0.08 ± 0.02	0.25 ± 0.04	72 ± 9 (n=7)
P-ARIS + 50mM Ca^{2+}	0	0.31 ± 0.09	76 ± 5 (n=7)

* ; pH 単位.

pH_i 上昇量は、 pH_i の最大値と添加前の pH_i との差を示す。
 pH_i 減少量は、 pH_i の最大値と、添加後の最小値（約3分後の
 フォット-値）との差を示す。

図4-3: pH_i の減少量と先体反応率

卵ゼリー、または P-ARIS と Mg 画分による先体反応時の先体反応率と pH_i 減少量（ pH_i の最大値と最小値との差、 pH 単位で示す）との相関を示す。

(pH_i 上昇時の最大値と pH_i 減少時(約3分後)の最小値との差)と先体反応率との関係を調べると、図4-3に示す様に相関が見られ、先体反応率が高いほど pH_i 減少量は大きくなった。このことから、 pH_i の減少は、先体反応の途上、もしくは先体反応後に起こると考えられた。

4-3-2. 先体反応に伴う細胞外 pH (pHe) の変化.

先体反応に伴う pHe の変化を pH x-ターゼモニターしたところ、 pH_i の変動に伴って pHe もわずかながら変動した(図4-4)。この場合、緩衝液の濃度を低くしてあるので、呼吸による炭酸ガス発生による pHe の減少が見られるが、卵セリ-などの添加直後に、明らかな pHe の低下が起こり、また、この時呼吸の上昇は特に認められないので(第3章)、この pHe の低下は、 pH_i 上昇に伴う H^+ の放出によるものと考えられた。この様に、ヒトテの精子に対して卵セリ-などを添加すると、直後に H^+

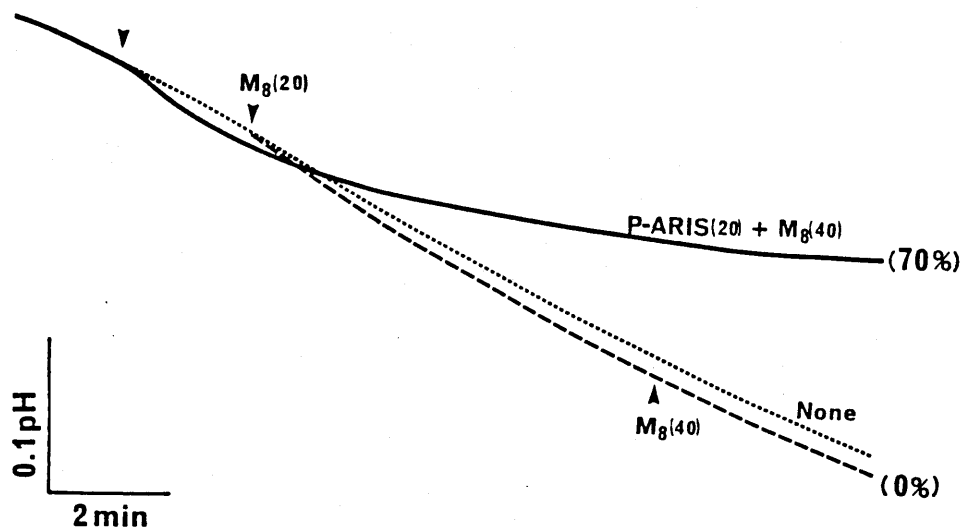


図4-4: 先体反応及び M_8 画分添加に伴う細胞外pH (pHe) の変動.

0.5mM PIPES (pH8.0) を含むASWに精子を懸濁し、23℃でpHeをモニターした。()内は、P-ARIS、 M_8 画分の濃度 (μg 糖/ml 及び $\mu\text{g}/\text{ml}$) \times 先体反応率 (%) を示す。矢印は、それぞれの添加位置を示す。

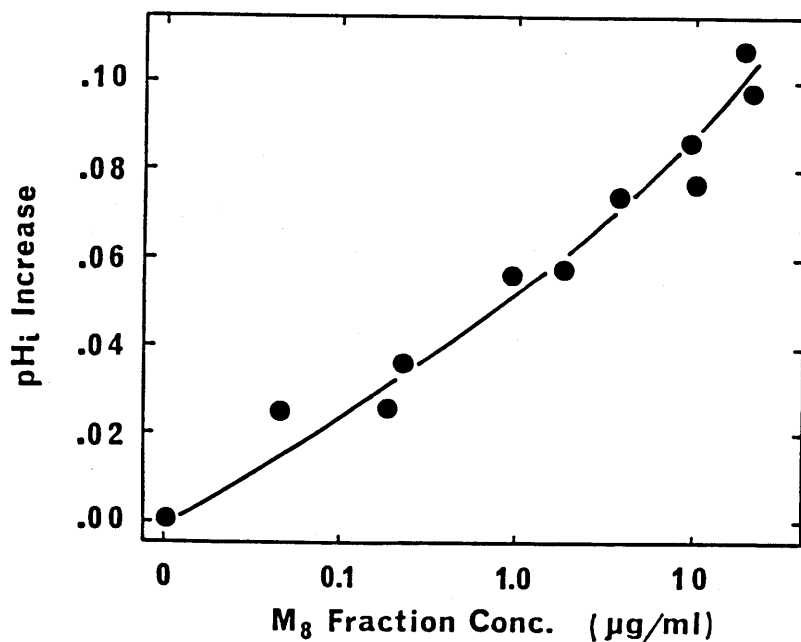


図4-5: M_8 画分によるpHi上昇.

pHi上昇量は、 M_8 画分添加後に得られるpHiの最大値と、添加前のpHiとの差で示した。(pH単位でない)。

放出によると思われる pH_i の上昇が起こり、その後、先体反応の進行に伴って細胞内の再酸性化が起こることが示された。イトマキトテでも同様の pH_i 変動が認められた。

4-3-3. M_8 画分による pH_i の上昇

前節で観察された pH_i の変動と先体反応誘起因子の関係を調べた。図4-2.a で示す様に、ARIS や P-ARIS 単独では、全く pH_i 変動は起こらなかったが、 M_8 画分単独で pH_i 上昇が起こり、その後緩やかに減少した。この M_8 画分による pH_i 上昇は、 M_8 画分濃度に依存していた(図4-2.b, 4-5)。低濃度の M_8 画分を添加した場合、添加毎に pH_i の上昇が起こったが、高濃度 ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) の場合は、2回目の添加による pH_i 上昇は、ほとんど起こらなかった(図4-2.c)。P-ARIS 添加後、 M_8 画分を添加した場合にも pH_i 上昇は認められたが、先体反応は起こらなかった(図4-2.d)。また、卵ゼリーなどで既に先体反応し、 pH_i の減少した精子

に、 M_8 画分を添加しても、もはや pH_i の上昇は起こらなかった (図4-2.d)。

M_8 画分中には、 C_0 -ARIS である 2種類のステロイドサポニン (C_0 -ARIS I & II) と、第3章で示された低分子ペプチド成分などが、存在している。精製された 2種類の C_0 -ARIS を精子に添加しても、 pH_i の変動は、全く起こらなかった (図4-6.a)。これらの精子にさらに卵ゼリーを加えると、 pH_i 変動が正常に起こり、先体反応が誘起された。高濃度 ($200 \mu\text{g}/\text{ml}$) の C_0 -ARIS I を添加した場合は、後から卵ゼリーを添加することにより、 pH_i 上昇が起こったが、 pH_i 減少と先体反応は起こらなかった。一般にサポニンには界面活性作用があることが知られており、トリトン X-100 などの界面活性剤で細胞膜に傷害を与えると、9-AA が細胞外に流出し、みかけ上 pH_i が上昇した様に見える。しかし、図4-6.b で示した様に、高濃度 ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) の植物由来のサポニンを添加しても、 pH_i 変動は起こらなかったことから

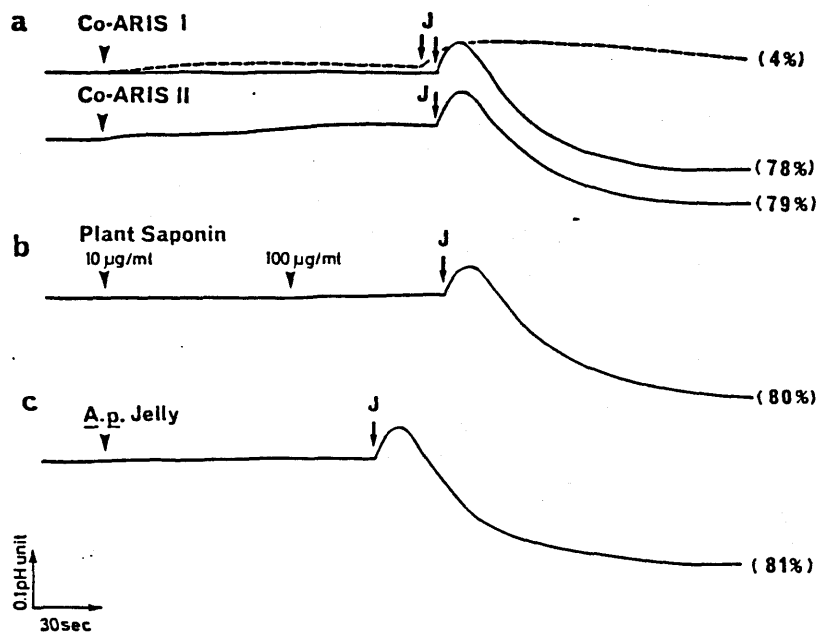


図4-6: Co-ARIS, 植物サポニン, イトマキヒトデの卵ゼリーの pH: 変動に及ぼす影響.

()内は先体反応率を示す。矢印は卵ゼリー(J, 20µg糖/ml)添加を示す。

a: 10 µg/ml (実線), 200 µg/ml (破線)

b: 植物サポニン

c: イトマキヒトデの卵ゼリー

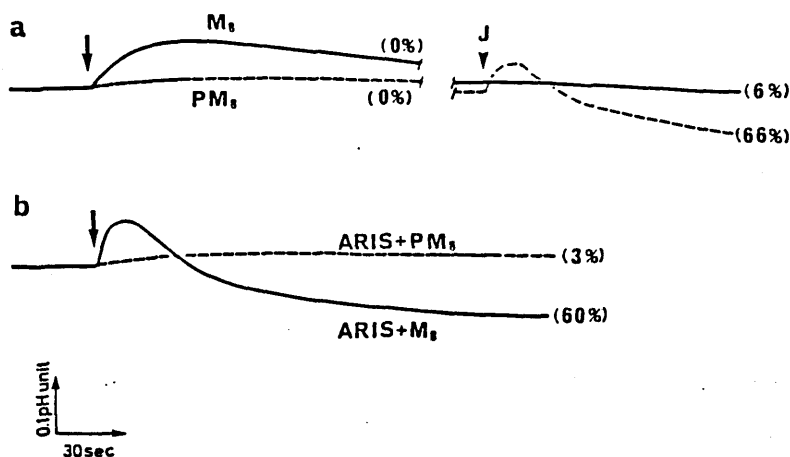


図4-7: フロト-セ"消化した M₈画分 (P-M₈)による pH: 変動.

a: M₈画分 (対照, 20 µg/ml) もしくは フロト-セ"消化 M₈画分 (PM₈, 20 µg/ml) 添加後 (矢印), 卵ゼリー (J, 20 µg糖/ml) を添加した。

b: ARIS (10 µg糖/ml) と M₈画分 (20 µg/ml) または, PM₈ (20 µg/ml) による pH: 変動。

()内は先体反応率を示す。

この様な可能性は一応否定された。ヒトテ類は一般に、大量のサポニンを含んでいるため (Ikegami: 5, 1972)、精子や卵自身かなり高濃度のサポニンでも影響されにくいのかも知れない。

イトマキヒトテの卵ゼリーによつて、ヒトテ精子の pH_i は、ほとんど変化せず、ヒトテの卵ゼリーを追加することによつて、正常に反応した (図4-6.c)。このことから、種特異的な成分が pH_i 変動に関与しているものと考えられた。

一方、 M_8 画分をフロナーゼ消化したとこで、その pH_i 上昇活性は失われた (図4-7)。また、十分量の M_8 画分で精子を処理した後に、 M_8 画分 (図4-2.c) や、卵ゼリー (図4-7.a) を添加しても、 pH_i 上昇や先体反応は誘起されないが、フロナーゼ消化した M_8 画分で精子を処理した後に、卵ゼリーを添加したとこで、 pH_i 変動、及び先体反応が誘起された (図4-7.a)。これらのことから、 M_8 画分中の pH_i 上昇をひき起こす物質 (pH_i 上昇因子) は、明らかに Co-

ARIS とは異なり、 pH 4 程度の性質の物質であることが示された。70 ^\circ で消化した M_8 画分と ARIS を混合し、精子に添加したところ、 pH 変動も先体反応も誘起されなかった (図4-7.b)。 Co-ARIS はステロイドサポニンであり、70 ^\circ で消化後も活性を保持することが示されている (Nishiyama *et al.*, 1984)。したがって、70 ^\circ で消化された M_8 画分でも、ARIS と併用すれば先体反応が起こるはずである。恐らくこの結果は、 M_8 画分中の Co-ARIS 量が不十分なため、この様な状況では、 pH 4 程度の性質の pH 上昇因子が必要となるものと考えられる。言い換えれば、卵ゼリー中に存在する Co-ARIS と pH 上昇因子の量比によれば、 pH 上昇因子も積極的に先体反応の誘起に関与しているものと予想される。

4-3-4. pH 上昇に及ぼすイオンの影響。

M_8 画分による pH 上昇に及ぼす、 Ca^{2+} と Na^+ の影響を調べた。図4-8 に示す様に Ca^{2+}

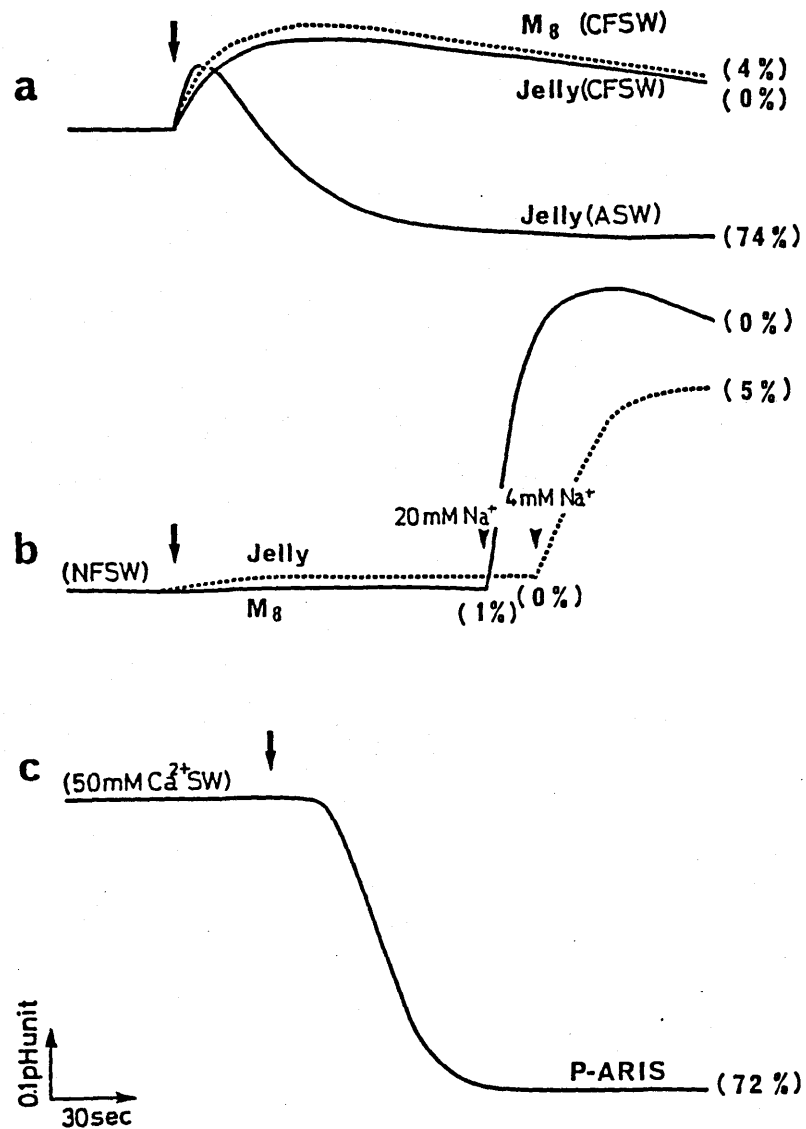


図4-8: pH変動に及ぼす Ca^{2+} , Na^+ の影響.

()内の数字は先体反応率を示す.

a: Ca^{2+} 欠除海水 (CFSW) または、正常海水 (ASW) 中で卵ゼリー (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), M_8 画分 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加した.

b: Na^+ 欠除海水中 (NFSW) で、 M_8 画分 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) や卵ゼリー (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し (矢印)、ASW を加えて Na^+ 濃度を 4mM、もしくは 20mM とした (矢印).

c: 50mM Ca^{2+} 海水中で、P-ARIS (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加した (矢印).

欠除海水中 (CF5W) でも、 M_2 画分や卵ゼリーを精子に添加すると、 pH_i の上昇が起こった。卵ゼリーの場合もCF5W中では、後半の pH_i 減少は起こらず、 pH_i 減少は先体反応中、もしくは反応後に起こることが、ここでも示された。また、CF5W中では、卵ゼリーによる pH_i 上昇量が正常海水中に比べて、約40%増加した(図4-8.a)。これは、先体反応の結果起こる pH_i の減少による相殺がないためと考えられ、実際の先体反応においても、精子は、この程度 pH_i が上昇していると思われた。

Na^+ をコリンで置換した、 Na^+ 欠除海水(NF5W)を用いると、精子の運動性は著しく低下し、 pH_i も 7.08 ± 0.02 ($n=3$, $pHe 8.2$)を示した。外液の Na^+ 濃度と pH_i の関係を調べたところ、図4-9に示す様に、 Na^+ 濃度の上昇とともに pH_i も上昇し、約10 mMの Na^+ が存在すれば、 pH_i の値は正常海水中(約425 mM Na^+)での値とほぼ等しくなることが示された。 Na^+ 濃度を0 mMから順次上昇させても、それだけでは先

体反応は、誘起されなかつたが、ミトコンドリアの変形が光学顕微鏡下で観察された。この変形の意味するところは、目下不明である。NFSW中ではM₈画分を添加しても、pH_i上昇は起こらなかつた(図4-8b)。また、卵ゼリーを添加した場合でもpH_i変動は起こらず、先体反応も起こらなかつた。この様な精子に対してNa⁺(ASW)を加えると、pH_iの急激な上昇が認められた(図4-8b)。

以上、M₈画分によるpH_iの上昇はCa²⁺に非依存的であり、Na⁺に依存していた。したがってpH_iの上昇は、Ca²⁺/H⁺交換ではなく、ウニの卵(Johnson 5, 1976)や、精子(Bibring 5, 1984)、その他多くの細胞(Frelin 5, 1985; Jean 5, 1985)のpH_i上昇に共通するNa⁺/H⁺交換によって起こることが示唆された。

一方、高濃度(50mM)のCa²⁺を含む海水に精子を懸濁し、ARIS(P-ARIS)を添加したところ、約20秒後にpH_iの急激な減少のみが起こった(図4-8c)。この時、pH_iの減少量は、

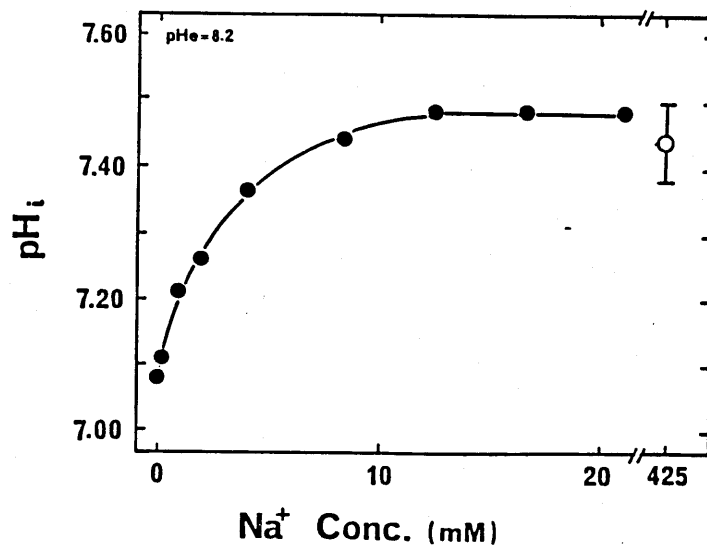
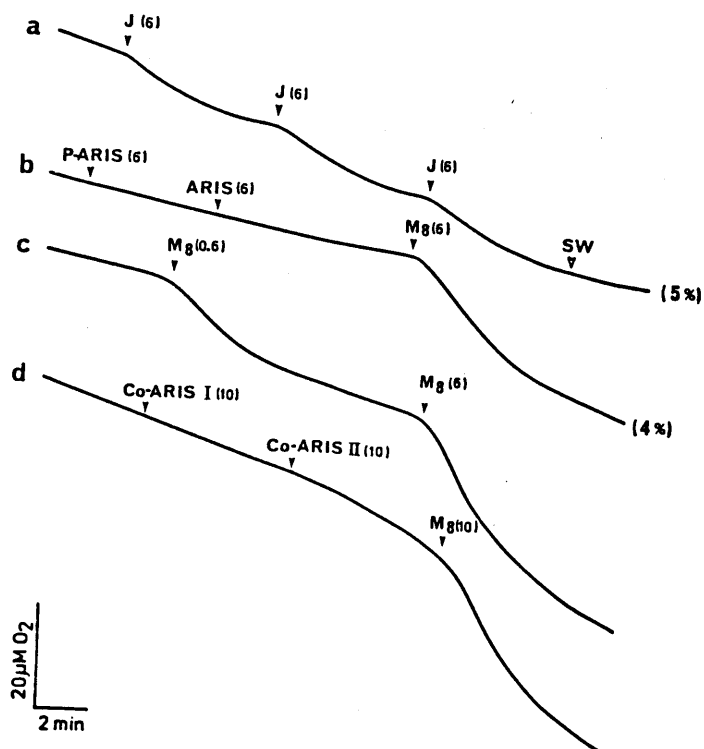


図4-9: pH_iのNa⁺依存性

NFSW中に精子を懸濁し、ASWを添加することにより、Na⁺濃度を上昇させ、pH_iの変動を測定した(—●—)(○), ASW(425mMNa⁺)中でのpH_i

図4-10: 弱酸性海水(pH6.5)条件での精子の呼吸率変化



精子は10mM PIPES (pH6.5)を含むASWに懸濁し、 1×10^8 精子/mlあたりの呼吸率変化を調べた。()は、それぞれの濃度もしくは、先体反応率(%)を示す。

a: J (4μせり-)、SW (ASW) を矢戻のときに添加した。

b: P-ARIS, ARIS を添加後、Mg画分を添加した。

c: 0.6 及び 6 μg/ml の Mg画分を添加した

d: Co-ARIS I 及び II を添加後、Mg画分を添加した。

正常海水中の場合の約1.5倍を示した(表4-1)。すなわち、高 Ca^{2+} 条件下でARISを作用させた場合、pHの上昇を伴わずに、先体反応が誘起される。また、pHの減少(細胞内再酸性化)には、 Ca^{2+} が関与していると考えられた(Christen 5, 1983)。

4-3-5. 弱酸性海水における M_2 画分の精子の呼吸に及ぼす影響。

M_2 画分中のペプチド成分により、 Na^+ に依存したpHの上昇が起こることから、ウニなどで知られている精子活性化ペプチドが存在することが予想された。そこで弱酸性条件下での、卵セリ-ンによる精子の呼吸の活性化の有無を、酸素電極法で調べた。常法通り精子を弱酸性海水(pH6.5)に懸濁すると、精子の呼吸、運動ともに低下した状態になった(正常海水中、pH8.2,での呼吸率の約20%)。この状態の精子に、卵セリ-ン(6 μ g糖/ml)を添加すると、添加毎に一時的な呼吸の上昇が認められた(図4-10.a)。弱酸性海水中で、ARIS, P-ARIS,

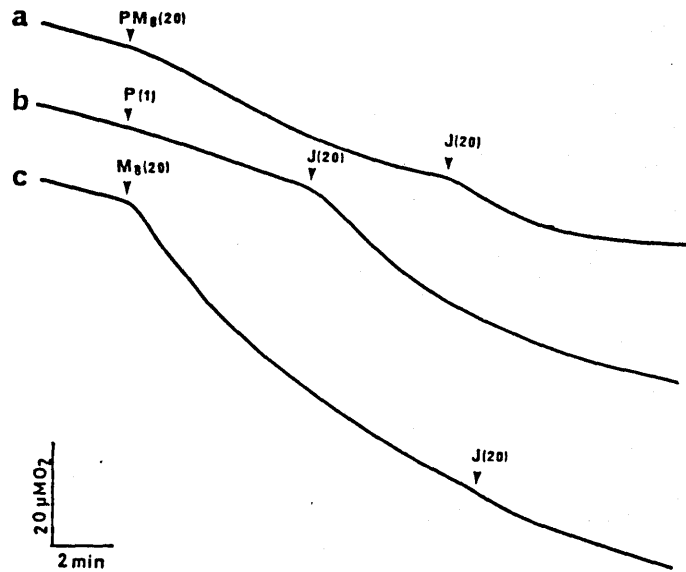


図4-11: フロナーゼ消化したMg画分(P-Mg)による弱酸性海水中(pH6.5)での精子の呼吸率変動

()内は、それぞれの濃度を示す。1×10⁸精子/mlあたりの呼吸率を示す。

a: PMg (フロナーゼ消化Mg画分, 20 μg/ml); J (卵ゼリー, 20 μg 粒/ml)

b: P (フロナーゼのみの対照, 1 μg/ml)

c: Mg (フロナーゼを含まない条件で同様の処理を行った Mg画分, 20 μg/ml)

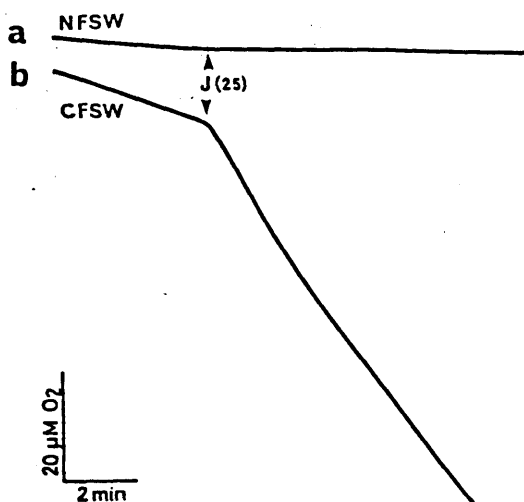


図4-12: 弱酸性条件(pH6.5)での呼吸率の変化に及ぼす、Ca²⁺, Na⁺の影響。

a: NFSW中に精子を懸濁後、卵ゼリー(25 μg 粒/ml)を添加した(矢印)。

b: CFSW中に精子を懸濁後、卵ゼリーを添加した。

C₀-ARIS, M₈画分を精子に添加すると、M₈画分によつてのみ、精子の呼吸上昇が起こった(図4-10.b,d)。M₈画分の濃度により、呼吸上昇の割合も変化した(図4-10.c)、高濃度では、かえつて呼吸上昇率は低下した(データは示していない)。また、バッチによつては、M₈画分や卵ゼリーによる呼吸の上昇は、一過性ではなく、上昇したままになった。

M₈画分をプロナーゼ消化すると、その呼吸上昇活性は、大部分失われたことより(図4-11)、M₈画分中のペプチド成分が呼吸促進に関与していることが示唆された。また、CF-SW中でも卵ゼリーによる呼吸上昇は起こったが、NFSW中では起こらなかった(図4-12)。イトマキヒトデの卵ゼリー由来のM₈画分は、ヒトデの精子の呼吸をわずかに促進させた。

これらのことより、ウニなどの卵ゼリー中から見い出されている精子活性化ペプチドと類似の物質が、M₈画分中にも存在していることが明らかになった。

4-4. 考察

M₈画分には、モネンシンと同様に精子の pH_i を上昇させる活性が存在することが、第2章で示唆されたが、本章で実際に pH_i 上昇が起こることが明らかとなった。pH_i 上昇が Ca²⁺ に非依存的に、また先体反応とは無関係に起こることから、先体胞の開口分泌による 9-AA の細胞外リークや、先体胞中の酸性物質 (Meizel & Deamer, 1978) の放出によるみかけ上の pH_i 上昇である可能性は否定される。

M₈画分中の pH_i 上昇を起こす因子の本体は、プロトセ感受性、熱安定性、及び精製された Co-ARIS での活性の欠如などの点から、熱に安定な、オリゴペプチドと考えられる。第3章で述べた、前処理効果を持つペプチド成分と、pH_i 上昇を促すペプチド成分が同一のものであるか否かは、現時点では結論できない。単に、pH_i 上昇状態にさらされただけでは、精子は卵セリーに、不応答になるわけ

ではないので、両者は別のものである可能性もある。いずれにしても、これらペプチド成分の精製がこれからの課題である。

精子活性化ペプチドは、1970年代後半より、大竹(1976)、鈴木ら(1981)及び Garbersら(1975)のグループによつて、ウニ卵ゼリーを中心に見い出され、pH6~7の弱酸性海水条件で低下した精子の呼吸を、正常海水中(pH8)の呼吸とほぼ同程度にまで上昇させる活性を持つ。これらの物質は、Echinus類では、SAP(Sperm Activating Substance; Suzukiら, 1981; Nomuraら, 1983)、スパラクト(Garbersら, 1982)などと呼ばれているが、Arbacia類のレスアクト(Suzuki & Garbers, 1984)は、これらと著しく構造が異なる。いずれも、熱に強く、プロテアーゼによつて大部分失活する、透析性のオリゴペプチドである。また、モネンシンが精子活性化ペプチドと類似の作用を示し(Hansbrough & Garbers, 1981)、精子活性化ペプチドが、精子から Na^+ に依存した H^+ 放出を促すことから、精子のpH_iを上昇させることによつて

精子の呼吸を促進させると考えられている (Repaske & Garbers, 1983 ; Nomura S., 1983)。Repaske & Garbers (1983) は、スペラクトにより、弱酸性条件 (pH 6.6) で、 pH_i は 7.0 から 7.4 に上昇することを示しているが、pH 7.9 (pH_i : 7.7) では、スペラクトによる pH_i 変化のデータをなぜか示していない。しかしながら、pH 8 においても、 H^+ の放出は示されているので、pH 7.9 でもスペラクトにより、 pH_i が上昇するものと予想される。ところで、 M_8 画分中のペプチド成分は、弱酸性海水中 (pH 6.5) で、精子の呼吸を著しく上昇させた。したがって、観察された pH_i 上昇は、 M_8 画分中の一種の精子活性化ペプチドに起因すると結論される。

これまでに、精子活性化ペプチドと先体反応の関連性についての報告は、ほとんどない。これは、ウニの先体反応にはポリフコース硫酸のみが関与すると考えられてきたからである。しかしながら、本研究でこれまでにウニで報告されている、先体反応に伴う pH_i

の上昇は、実は卵ゼリー中の精子活性化ペプチドによるものである可能性が示された。この様に、 pH_i 上昇因子が存在し、 pH_i 上昇と先体反応を切り離して考えることができるが、そうすると先体反応に pH_i 上昇が必須であるとする従来の仮定に疑問が生ずる。まず、 pH_i の減少は、先体反応の結果起こるとしても、 pH_i 上昇が先体反応のどの時期に起こるのかについては不明である。判っているのは、 pH_i 上昇因子によって誘起される pH_i 上昇だけでは、先体反応は誘起されないということのみである。さらに、高 Ca^{2+} 条件で、ARIS によって誘起される先体反応では、 pH_i 上昇が観察されず、 pH_i 減少のみが起こった。このことは、先体反応において、 pH_i 上昇が不可欠ではないことを示す。精製された ARIS 及び Co-ARIS では、 pH_i に変動が認められないことから、ARIS と Co-ARIS による先体反応では、 pH_i は上昇しないと予想される。

この様に、 pH_i 上昇(因子)は、先体反応

に必須のものではないと考えられる。しかしながら、この精子活性化ペプチド様物質が、ヒトテの先体反応では、補助的な役割を果たしていることを強く示唆するデータも得られた。プロナーゼで消化した M_8 画分 ($20 \mu\text{g/ml}$) では、先体反応が低下するからである。このことは、 M_8 画分中の Co-ARIS 量が不十分なためと考えられ、この様な状況下では、ペプチド成分が関与していることを示す。実際、精製された Co-ARIS は、先体反応のための至適濃度として、 $125 \sim 250 \mu\text{g/ml}$ (Co-ARIS I)、 $30 \sim 60 \mu\text{g/ml}$ (Co-ARIS II) 必要であり (Nishiyama S, 1985)、 M_8 画分には比して有効濃度が極めて高い。この理由として、Co-ARIS 群による相加効果の他に、ペプチド成分が補助的に作用し、Co-ARIS の至適濃度を低下させるのではないかと考えている。その作用の一つが、 pH_i の上昇である。第2章で述べた様に、 pH_i が上昇した状態では先体反応が起こりやすいと考えられる。先体反応に関わる酵素活性の制御や、先

体突起の伸長に pH 上昇が関与してゐることも考えられる (Tilney S, 1978)。

精子活性化プロテクトの生理的機能に関しては、例えば卵ゼリーによって低下する精子の呼吸を上昇させる作用や (Suzuki & Garbers, 1984)、cGMP レベルを上昇させる作用 (Kopf S, 1979) などが報告されてゐる。しかし、ほとんどの報告が、in situ の卵ゼリーは弱酸性環境にあるという考えに基づいてゐる。なぜなら、精子の呼吸は、pH 8 ではほぼ上限に達してあり、精子活性化プロテクトによる呼吸上昇は認められないからである。M₂ 画分も pH 8.2 では、精子の呼吸に影響しないことを既に第 3 章で示した。卵ゼリーが、硫酸基やシアル酸などの酸性基を豊富に含んでいることも、この仮定に影響を与えたのであろう。しかし、卵ゼリーが弱酸性条件だとすれば、先体反応は極めて起こりにくいはずである (Decker S, 1976; Collins & Epe1, 1977)。また、最近、微小 pH 電極 (直径、1~10 μm) を用いて in situ での卵ゼリーの pH を

測定したところ、海水とほとんど差がないことが、ウニ (Holland & Cross, 1983) やヒトデの一種 (星; 未発表データ) で確かめられた。したがって、生理的には呼吸上昇と因果関係を持つとは考えにくく、むしろその意義は、別のところにあるものと思われる。すなわち、卵ゼリー中に含まれる一定量の ARIS や Co-ARIS でも、十分に確実な先体反応の誘起を可能にするところにあるのではないかと考える。今後、精製されたペプチド成分を用いて、 pH 上昇、先体反応及び前処理効果の関係を明らかにしていく予定である。

結論として、①先体反応に伴う pH 上昇は、卵ゼリー中の精子活性化ペプチドの一種によって引き起こされる、② pH 上昇は、先体反応に必須のものではない、③しかし、精子活性化ペプチドによってもたされる pH 上昇は、先体反応をより起こしやすくする、もしくは、反応をスムーズに運ぶことに機能しているものと考えられる。

第 5 章

總 括

総 括

本研究で述べたことを、卵ゼリー成分、イオノフォアを用いた場合、及び高 Ca^{2+} 、高pH条件での先体反応、pH:上昇、 Ca^{2+} の取りこみの有無についてまとめた(表5-1)。()内は、実際にデータは得られていないが、予想されるものを示す。 Ca^{2+} の取りこみは、恐らく例外なく先体反応に伴うと考えられるが、第4章で述べた様に、pH:上昇は、必ずしも先体反応に伴う必要はない。ただし、pH:が上昇する条件では、先体反応が誘起されやすく、生理的な先体反応の誘起においては、常にpH:の上昇は起こっているのではないかと思われる。卵ゼリーの先体反応誘起能が、低分子成分によって規定されてあり(第2章)、しかも、ARIS存在下でのM₈画分の先体反応誘起能は、Co-ARISのみならずペプチド成分にも依存している(第4章)。したがって、自然の状態では、ARIS、Co-ARIS、ペプチド成分

表5-1: 卵ゼリー-成分及びイオノフォアによつて誘起される現象

Factors	Acrosome Reaction	pH _i -Increase	⁴⁵ Ca ²⁺ -Uptake
Jelly	O	O	O
ARIS	X	X	X
Co-ARIS	X	X	(X)
Mg	X	O	X
P-Mg	X	X	(X)
High-Ca ²⁺	X	X	(X)
High-pH _e	X	O	(X)
ARIS + Co-ARIS	O	(X)	(O)
ARIS + Mg	O	O	O
ARIS + P-Mg	X	X	(X)
ARIS + High-Ca ²⁺	O	X	(O)
ARIS + High-pH _e	O	O	(O)
Monensin	X	(O)	(O)
A23187	O	(O)	(O)
A23187 + Monensin	O	(O)	(O)
ARIS + Monensin	X	(O)	(X)
Mg + A23187	O	(O)	(O)
High-Ca ²⁺ + High-pH _e	O	(O)	(O)

pH_e上昇が起こる場合, pH_e6.5での呼吸上昇も観察される。

O, 誘起されることを示す; X, 誘起されないことを示す。

(), 実際のデータはないが予想されることを示す。

表5-2: 精子に対する前処理効果

Factors	Pretreatment effect
Insufficient Jelly	O
Jelly in Ca ²⁺ -Deficient	O
ARIS	O
Co-ARIS	X
Mg	O
P-Mg	X
High-Ca ²⁺	X
High-pH _e	X

O, 前処理効果(各因子で前処理後、卵ゼリーを添加しても先体反応が誘起されない)があることを示す。

X, 前処理効果がないことを示す。

のいずれもが、先体反応の誘起に積極的に関与していると考えられる。

表 5-2 は、精子を前処理した場合の、精子の反応性をまとめたものである。ARIS 或いは M_9 画分中の低分子ペプチド成分による前処理によって、精子の Ca^{2+} 取り込み機構が不応状態になり (第3章)、卵ゼリーによる先体反応性が失なわれる。卵ゼリー中の未同定ペプチド成分をペプチド X とし、ARIS, Co-ARIS, ペプチド X のそれぞれが受容体を介して作用すると考え、得られた知見をもとに、ヒトデの先体反応誘起機構に関する作業仮説を示す (図 5-1)。ARIS と ARIS 受容体 (A_1) が結合すると、 A_1 は Ca^{2+} -チャンネル活性化因子の一つである A_2 を活性化すると考える。この時、同時に Co-ARIS が受容体 (C_1) に結合し、 C_1 が別の Ca^{2+} -チャンネル活性化因子 C_2 を活性化すると初めて Ca^{2+} -チャンネルが十分に活性化された状態になり、 Ca^{2+} の細胞内流入が起り、先体反応が誘起されるのではないかと考えてい

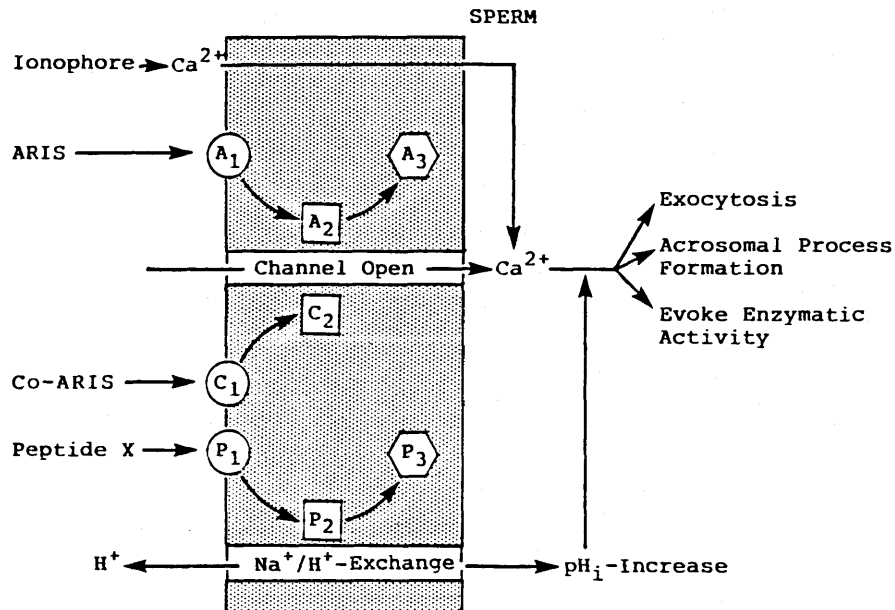


図5-1：ヒトデの先体反応誘起機構に関する作業仮説。

A_1 : ARIS 受容体 , A_2 : Ca^{2+} -チャネル活性化因子

A_3 : Ca^{2+} -チャネル活性化因子が不活性化したもの。

C_1 : Co-ARIS 受容体 , C_2 : Ca^{2+} -チャネル活性化因子

P_1 : ペプチド X 受容体 , P_2 : Na^+/H^+ 交換反応活性化因子

P_3 : Na^+/H^+ 交換反応活性化因子が不活性化したもの。

Ca^{2+} -チャネルは、 A_2 , C_2 の双方が活性化された時にのみ十分に活性化を受け、機能できる。

る。ARIS 単独処理による反応性の低下は、ARIS 刺激によって活性化される A_2 が、短時間で不活性状態 A_3 に不可逆的に変化すると考えられると理解できる。また、高 Ca^{2+} や高 pH 条件では、例えば G_0 -ARIS 受容体 C_1 を介さなくとも C_2 が活性化されるのではないかと考え、この状態では ARIS だけで先体反応が誘起される。 G_0 -ARIS の作用機作は、高濃度の場合を除き、不可逆的ではないと思われる。一方、ペプチド X も、受容体 (P_1) に結合すると、 P_1 は、 Na^+ / H^+ 交換反応系を不可逆的に活性化し、pH_i の上昇を促すと考える。しかし、一部は単独処理の場合に、 Ca^{2+} -チャンネル活性化機構に作用し、最終的に不活性状態にするのではないかと考えている。

この様な、受容体を介した一種のトランスメンブレンコントロールによる先体反応誘起機構は、現在のところ作業仮説に過ぎないが、これまでにしたデータをある程度説明できるのではないかと考えている。Shapiro ら

によつて提示された先体反応誘起モデルでは、 Ca^{2+} -チャンネルは、膜の脱分極と pH 上昇の両作用により駆動する (Kazazoglou 5, 1985)。ARIS、 Co-ARIS が膜の脱分極をひき起こすか否かは興味ある問題である。今後、低分子ペプチド成分の完全精製がなされ、さらに精子側から各成分に対する特異的な受容体が得られてくれば、これら複数の因子を介した複雑な精子先体反応の誘起機構も、分子レベルで理解され、新しいモデルが作られるものと期待される。

謝 辞

本研究をまとめるにあたり、有意義な御指導と御助言を与えて下さった、名古屋大学理学部生物学教室動物学第二講座教授、中埜栄三博士と、菅島臨海実験所教授、佐藤英美博士に深い感謝の意を表します。本研究全体を通して適切な御助言、御討論をいただいた、星元紀博士（東京工業大学理学部生物学教室教授）と、日野晶世博士（名古屋大学理学部生物学教室助手）に心から感謝の意を表します。また、本研究において常に協力していただいた西山一朗修士（名古屋大学理学部生物）と、本論文執筆にあたり、暖かいはげましを与えて下さった公保郁子技官（名古屋大学理学部生物）に深く感謝致します。

Ca^{2+} チャンネル阻害剤を恵与していただいた黒田英世博士（名古屋大学理学部菅島臨海実験所助教授）、9-AA 及び v_i pH_i 測定法を御教示していただいた Bennett, M. Shapiro 博士（ワシントン大学医学部教授）、フォルスコリンを恵与して下さった佐野護博士（愛知県

コロニ-飛達障害研究所)、マイトトキシンを恵与して下さった安元健博士(東北大学農学部教授)に、深く感謝致します。

ヒトデの採集に御協力をいただいた、北海道大学理学部厚岸臨海実験所、東京大学海洋研究所大槌海洋センター、同理学部三崎臨海実験所、岡山大学理学部牛窓臨海実験所、お茶の水女子大学理学部館山臨海実験所、名古屋大学理学部菅島臨海実験所のスタッフ及び職員の皆様、そして、愛知県南知多郡篠島漁協、石川県七尾市石崎漁協の職員の皆様に心から感謝致します。

参考文献

- Afzelius, B. A. and A. Murray. (1957) The acrosomal reaction of spermatozoa during fertilization or treatment with egg water. *Exp. Cell Res.* 12, 325-337.
- Aketa, K. (1975) Physiological studies on the sperm surface component responsible for sperm-egg bonding in sea urchin fertilization II. *Exp. Cell Res.* 90, 56-62.
- Aketa, K. and T. Ohta. (1977) When do sperm of the sea urchin, *Pseudocentrotus depressus*, undergo the acrosome reaction at fertilization? *Develop. Biol.* 61, 366-372.
- Argiolas, A. and J. J. Pisano. (1983) Facilitation of phospholipase A₂ activity by mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasp venom. *J. Biol. Chem.* 258, 13697-13702.
- Bibring, T., J. Baxandall and C.C. Harter. (1984) Sodium-dependent pH regulation in active sea urchin sperm. *Develop. Biol.* 95, 317-324.
- Christen, R., R. W. Schackmann and B. M. Shapiro. (1982) Elevation of the intracellular pH activates respiration and motility of sperm of sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Biol. Chem.* 257, 14881-14890.
- Christen, R., R. W. Schackmann and B. M. Shapiro. (1983) Interactions between sperm and sea urchin egg jelly. *Develop. Biol.* 98, 1-14.
- Collins, F. and D. Epel. (1977) The role of calcium ions in the acrosome reaction of sea urchin sperm. regulation and exocytosis. *Exp. Cell Res.* 106, 211-222.
- Colwin, A. L. and L. H. Colwin. (1955) Sperm entry and the acrosome filament (*Holothuria atra* and *Asterias amurensis*) *J. Morphology.* 97, 543-567.
- Colwin, L. H. and A. L. Colwin. (1956) The acrosome filament and sperm entry in *thyone briareus* (Holothuria) and *asterias*. *Biol. Bull.* 113, 243-257.
- Colwin, L. H. and A. L. Colwin. (1967) Membrane fusion in relation to sperm-egg association. "Fertilization" Vo.1, eds. by C.B. Metz and A. Monroy, Academic Press, New York, pp.295-367.
- Dale, B., M. Dan-Sohkawa., A. De Santis and M. Hoshi. (1981) Fertilization of the starfish *Astropecten aurantiacus*. *Exp. Cell Res.* 132, 505-510.
- Dan. J. C. (1952) Studies on the acrosome I. reaction to egg-water and other stimuli. *Biol. Bull.* 103, 54-66.

Dan, J. C. (1954) Studies on the acrosome III. effect of calcium deficiency. Biol. Bull. 107, 335-349.

Dan, J. C. and Y. Hagiwara. (1967) Studies on the acrosome IX. course of acrosome reaction in the starfish. J. Ultrastruct. Res. 18, 562-579.

Dan, J. C. (1967) Acrosome reaction. "Fertilization" Vo. 1, eds. by C.B. Metz and A. Monroy, Academic Press, New York, pp.237-293.

田 仁子. (1975) 精子先体反応「卵と精子」日本動物学会編 89-119.

Dangott, L. J. and D. L. Garbers. (1984) Identification and partial characterization of the receptor for speract. J. Biol. Chem. 259, 13712-13716.

Darszon, A., M. Gould, L. De De La Torre & I. Vargas. (1984) Response of isolated sperm plasma membranes from sea urchin to egg jelly. Eur. J. Biochem. 144, 515-522.

Decker, G. L., D. B. Joseph and W. J. Lennarz. (1976) A study of factors involved in induction of the acrosomal reaction in sperm of the sea urchin, Arbacia punctulata. Develop. Biol. 53, 115-125.

Dubois, M., K. A. Cilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350-356.

Foreman, J. C., J. L. Mongar and B. D. Gomperts. (1973) Calcium ionophores and movement of calcium ions following the physiological stimulus to a secretory process. Nature 245, 249-251.

Freedman, S. B., R. J. Miller, D. M. Miller and D. R. Tindall. (1984) Interactions of maitotoxin with voltage-sensitive calcium channels in cultured neuronal cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4582-4585.

Frelin, C., P. Vigne and M. Lazdunski. (1985) The role of the Na^+/H^+ exchange system in the regulation of the internal pH in cultured cardiac cells. Eur. J. Biochem. 149, 1-4.

Garbers, D. L. and J. G. Hardman. (1975) Factors released from sea urchin eggs affect cyclic nucleotide metabolism in sperm. Nature 257, 677-678.

Garbers, D. L. and G. S. Kopf. (1980) The regulation of spermatozoa by calcium and cyclic nucleotides. Advan. Cyclic Nuc. Res. 13, 251-306.

Garbers, D. L., H. D. Watkins, J. R. Hansbrough, A. Smith and K. S. Misono. (1982) The amino acid sequence and chemical synthesis of speract and of speract analogues. J. Biol. Chem. 257, 2734-2737.

Gatti, J. L. and R. Christen. (1985) Regulation of internal pH of sea urchin sperm. A role for the Na/K pump. J. Biol. Chem. 260, 7599-7602.

Glabe, C. G., L. B. Grabel, V. D. Vacquier and S. D. Rosen. (1982) Carbohydrate specificity of sea urchin sperm binding: a cell surface lectin mediating sperm-egg adhesion. J. Cell Biol. 94, 123-128.

Green, D.L.P. (1978) The induction of the acrosome reaction in guinea pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. J. Cell Sci. 32, 137-351.

Hagiwara, Y., J. C. Dan and A. Saito. (1967) Studies on the acrosome VIII. the intact starfish acrosome. J. Ultrastruct. Res. 18, 551-561.

Hagiwara, Y. and J. C. Dan. (1969) Effect of lack of calcium on the starfish acrosome. Develop. Growth and Differ. 11, 29-39.

Hansbrough, J. R. and D. L. Garbers. (1981) Sodium-dependent activation of sea urchin spermatozoa by speract and monensin. J. Biol. Chem. 256, 2235-2241.

日高 弘義, (1985) 「分泌現象の細胞生物学 - レセプターの働き」 講談社.

Hino, A., A. Fujiwara and I. Yasumasu. (1980) Inhibition of respiration in sea urchin spermatozoa following interaction with fixed unfertilized eggs I. change in the respiratory rate of spermatozoa in the presence of fixed eggs. Develop. Growth and Differ. 22, 421-428.

Holland, L. Z. and N. L. Cross. (1983) The pH within the jelly coat of sea urchin eggs. Develop. Biol. 99, 258-260.

星 元紀, (1985) 「受精におけるトランスメンブレンコントロール」 生体の科学, 36, 38-44.

Hoshi, M. (1985) Lysins. "Biology of fertilization" Vo.2, eds. by C. B. Metz and A. Monroy, Academic Press, New York, pp.431-462.

Hoskins, D. P., M. L. Hall and D. Munsterman. (1975) Induction of motility in immature bovine spermatozoa by cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors and seminal plasma. Biol. of Reprod. 13, 168-176.

Ikadai, H. and M. Hoshi. (1981a) Biochemical studies on the acrosome reaction of the starfish, Asterias amurensis I. factors participating in the acrosome reaction. Develop. Growth and Differ. 23, 73-80.

Ikadai, H. and M. Hoshi. (1981b) Biochemical studies on the acrosome reaction of the starfish, Asterias amurensis II. purification and characterization of acrosome reaction-inducing substance. Develop. Growth and Differ. 23, 81-88.

Ikegami, S., Y. Kamiya and S. Tamura. (1972) Isolation and identification of spawning inhibitors from ovaries of the starfish, Asterias amurensis. Agr. Biol. Chem. 36, 1087-1089.

Isaka, S., K. Hotta and M. Kurokawa. (1970) Jelly coat substances of sea urchin eggs I. sperm isoagglutination and sialopolysaccharide in the jelly. Exp. Cell Res. 59, 37-42.

Jean, T., C. Frelin, P. Vigne, P. Banbry & M. Lazdunski. (1985) Biochemical properties of the Na^+/H^+ exchange system in rat brain synaptosomes. interdependence of internal and external pH control of the exchange activity. J. Biol. Chem. 260, 9678-9684.

Johnson, J. D., D. Epel and M. Paul. (1976) Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilization. Nature 262, 661-664.

Kanatani, H. and Y. Nagahama. (1980) Mediators of oocyte maturation. Biomedical Res. 1, 273-291.

Kazazoglou, T., R. W. Schackmann, M. Fosset and B. M. Shapiro. (1985) Ca-channel antagonists inhibit the acrosome reaction and bind to plasma membranes of sea urchin sperm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1460-1464.

Kinsey, W. H., G. K. SeGall and W. J. Lennarz. (1979) The effect of the acrosome reaction on the respiratory activity and fertilizing capacity of echinoid sperm. Develop. Biol. 71, 49-59.

Kopf, G. S., D. J. Tubb and D. L. Garbers. (1979) Activation of sperm respiration by a low molecular weight egg factor and by 8-bromoguanosine 3',5'-monophosphate. J. Biol. Chem. 254, 8554-8560.

Kopf, G. S. and G. L. Garbers. (1980) Calcium and a fucose-sulfate-rich polymer regulate sperm cyclic nucleotide metabolism and the acrosome reaction. Bio. of Reprod. 22, 1118-1126.

Kopf, G. S., C. A. Lewis & V.D. Vacquier. (1983) Regulation of abalone sperm cyclic AMP concentrations and the acrosome reaction by calcium and methylxanthines. Develop. Biol. 98, 28-36.

Kubo, H. and M. Hoshi. (1985) Elimination of silica gel from gangliosides by using a reversed-phase column after preparative thin-layer chromatography. J. Lipid Res. 26, 638-641.

L'Allemain, C., A. Franchi, E. Cragoe Jr and J. Pouyssegur. (1984) Blockade of the Na^+/H^+ antiport abolishes growth factor-induced DNA synthesis in fibroblasts. structure-activity relationships in the amiloride series. J. Biol. Chem. 259, 4313-4319.

Lee, H. C., C. Johnson and D. Epel. (1983) Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of

sea urchin sperm. *Develop. Biol.* 95, 31-45.

Lindemann, C. B. (1978) A cAMP-induced increase in the motility of demembrated bull sperm models. *Cell.* 13, 9-18.

Lopo, A. C. and V. D. Vacquier. (1980) Antibody to a sperm surface glycoprotein inhibits the egg jelly-induced acrosome reaction of sea urchin sperm. *Develop. Biol.* 79, 325-333.

Maxfield, F. R. (1982) Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts. *J. Cell Biol.* 95, 676-681.

Meizel, S. and D. W. Deamer. (1978) The pH of the hamster sperm acrosome. *J. Histochem. Cytochem.* 26, 98-105.

Mills, G. B., E. J. Cragoe Jr, E. W. Gelfand and S. Grinstein. (1985) Interleukin 2 induces a rapid increase in intracellular pH through activation of a Na^+/H^+ antiport (cytoplasmic alkalization is not required for lymphocyte proliferation). *J. Biol. Chem.* 260, 12500-12507.

Nakano, E., A. Hino and K. Furuse. (1984) Effects of surfactants on the fertilizing capacity and acrosome reaction of sea urchin sperm. *Gamete Res.* 9, 115-125.

Nishiyama, I., T. Matsui and M. Hoshi. (1984) Co-ARIS, a cofactor for acrosome reaction-inducing substance, in the jelly coat of *Asterias amurensis*. *Zool. Sci.* 1, 918.

Nishiyama, I., T. Matsui and M. Hoshi. (1985) Isolation and characterization of Co-ARIS. *Develop. Growth and Differ.* 27, 489.

Nomura, K., N. Suzuki, H. Ohtake and S. Isaka. (1983) Structure and action of sperm activating peptides from the egg jelly of a sea urchin, *Anthocidaris crassipina*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 147-153.

Ohtake, H. (1976a) Respiratory behaviour of sea-urchin spermatozoa I. effect of pH and egg water on the respiratory rate. *J. Exp. Zool.* 198, 303-322.

Ohtake, H. (1976b) Respiratory behaviour of sea-urchin spermatozoa II. sperm-activating substance obtained from jelly coat of sea-urchin eggs. *J. Exp. Zool.* 198, 313-322.

Pfeiffer, D. R. and H. A. Lardy. (1976) Ionophore A23187: the effect of H^+ concentration on complex formation with divalent and monovalent cations and demonstration of K^+ transport in mitochondria mediated by A23187. *Biochem.* 15, 935-943.

Podell, S. B. and V. D. Vacquier. (1984a) Wheat germ agglutinin blocks the acrosome reaction in *Strogylocentrotus purpuratus* sperm by binding a 210,000-mol-wt membrane protein. *J. Cell Biol.* 99, 1598-1604.

Podell, S. B. and V. D. Vacquier. (1984) Inhibition of sea urchin sperm acrosome reaction by antibodies directed against two sperm membrane protein (characterization and mechanism of action). *Exp. Cell Res.* 155, 467-476.

Podell, S. B. and V. D. Vacquier. (1985) Purification of the Mr. 80,000 and Mr. 210,000 proteins of the sea urchin sperm plasma membrane. evidence that the Mr. 210,000 protein interacts with egg jelly. *J. Biol. Chem.* 260, 2715-2718.

Repaske, D. R. and D. L. Garbers. (1983) A hydrogen ion flux mediates stimulation of respiratory activity by speract in sea urchin spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 258, 6025-6029.

Rossignol, D. P., B. J. Earles, G. L. Decker and W. J. Lennarz. (1984) Characterization of the sperm receptor on the surface of eggs of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Develop. Biol.* 104, 308-321.

Sandeaux, R., J. Sandeaux, C. Gavach and B. Brun. (1982) Transport of sodium ion by monensin across bimolecular lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 684, 127- .

Sano, M., S. Kitajima and A. Mizutani. (1983) Activation of adenylate cyclase by forskolin in rat brain and testis. *Arch. Biochim. Biophys.* 220, 333-339.

Sano, K. (1983) Inhibition of the acrosome reaction of sea urchin spermatozoa by a calmodulin antagonist, N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W-7). *J. Exp. Zool.* 226, 471-473.

Schackmann, R. W., E. M. Eddy and B. M. Shapiro. (1978) The acrosome reaction of *Strongylocentrotus purpuratus* sperm. ion requirement and movements. *Develop. Biol.* 65, 483-495.

Schackmann, R. W. and B. M. Shapiro. (1981) A partial sequence of ionic changes associated with the acrosome reaction of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Develop. Biol.* 81, 145-154.

Schackmann, R. W., R. Christen and B. M. Shapiro. (1981) Membrane potential depolarization and increased intracellular pH accompany the acrosome reaction of sea urchin sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6066-6070.

Schroeder, T. E. and R. Christen. (1982) Polymerization of actin without acrosomal exocytosis in starfish sperm. visualization with NBD-phalloidin. *Exp. Cell Res.* 140, 363-371.

Schuldiner, S., H. Rottenberg and M. Avron. (1972) Determination of pH in chloroplasts 2. fluorescent amines as a probe for the determination of pH in chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 25, 64-70.

SeGall, G. K. and W. J. Lennarz. (1979) Chemical characterization

of the component of the jelly coat from sea urchin eggs responsible for induction of the acrosome reaction. *Develop. Biol.* 71, 33-48.

SeGall, G. K. and W. J. Lennarz. (1981) Jelly coat and induction of the acrosome reaction in echinoid sperm. *Develop. Biol.* 86, 87-93.

Shier, W. T. (1979) Activation of high levels of endogenous phospholipase A₂ in culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 195-199.

Shimada, H., H. Terayama, A. Fujiwara and I. Yasumasu. (1982) Melittin, a component of bee venom, activates unfertilized sea urchin eggs. *Develop. Growth and Differ.* 24, 7-16.

Shirai, H. and H. Kanatani. (1982) Effect of 1-methyladenin on responses of spermatozoa to egg jelly in starfish. a convenient method for counting the rate of acrosome reaction and for measuring sperm motility. *Zoological Magazine* 91 272-280.

Summers, R. G. and B. L. Hylander. (1975) Species-specificity of acrosome reaction and primary gamete binding in echinoids. *Exp. Cell Res.* 96, 63-68.

Summers, R. G., P. Talbot, E. M. Keough, B. L. Hylander & L. E. Franklin. (1976) Ionophore A23187 induces acrosome reactions in sea urchin and guinea pig spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 196 381-385.

Suzuki, N., K. Nomura, H. Ohtake and S. Isaka. (1981) Purification and the primary structure of sperm-activating peptides from the jelly coat of sea urchin eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99, 1238-1244.

Suzuki, N. and D. L. Garbers. (1984) Stimulation of sperm respiration rates by speract and resact at alkaline extracellular pH. *Biol. of Reprod.* 30, 1167-1174.

Takahashi, M., Y. Ohizumi and T. Yasumoto. (1982) Maitotoxin, a Ca²⁺ channel activator candidate. *J. Biol. Chem.* 257, 7287-7289.

Takahashi, Y. and M. Sugiyama. (1973) Relation between the acrosome reaction and fertilization in the sea urchin I. fertilization in Ca²⁺-free sea water with egg-water-treated spermatozoa. *Develop. Growth and Differ.* 15, 261-267.

Talbot, P., R. G. Summers, B. L. Hylander, E. M. Keough and L. F. Franklin. (1976) The role of calcium in the acrosome reaction: an analysis using ionophore A23187. *J. Exp. Zool.* 198, 383-392.

Terho, T. T. and K. Hartiala. (1971) Method for determination of the sulfate content of glycosaminoglycans. *Anal. Biochem.* 41, 471-476.

Tilney, L. G., S. Hatano, H. Ishikawa and M. S. Mooseker. (1973)

The polymerization of actin: its role in the generation of the acrosomal process of certain echinoderm sperm. *J. Cell Biol.* 59, 109-126.

Tilney, L. G., D. P. Kiehart, C. Sardet and M. Tilney. (1978) Polymerization of actin IV. role of Ca^{2+} and H^+ in the assembly of actin and in membrane fusion in the acrosomal reaction of echinoderm sperm. *J. Cell Biol.* 77, 536-550.

Tilney, L. G. (1985) The acrosomal reaction. "Biology of fertilization" Vo.2, eds. by C.B. Metz and A. Monroy, Academic Press, New York, pp.157-213.

Trimmer, J. S., I. S. Trowbridge and V. D. Vacquier. (1985) Monoclonal antibody to a membrane glycoprotein inhibits the acrosome reaction and associated Ca^{2+} and H^+ fluxes of sea urchin sperm. *Cell* 40, 697-703.

Uno, Y. and M. Hoshi. (1978) Separation of the sperm agglutinin and the acrosome reaction-inducing substance in egg jelly of starfish. *Science* 200, 58-59.

Usov, A. I., K. S. Adamyants, L. I. Miroshnikova, A. A. Shaposhnikova and N. K. Kochetov. (1971) Solvolytic desulphation of sulphated carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 18, 336-338.

Vacquier, V. D. (1979) The fertilizing capacity of sea urchin sperm rapidly decreases after induction of the acrosome reaction. *Develop. Growth and Differ.* 21, 61-69.

Vasseur, E. (1954) The chemistry and physiology of the jelly coat of the sea urchin egg. pp. 32, Kihlströmstryck. A. B. Stockholm.

Wada, S. K., J. R. Collier and J. C. Dan. (1956) Studies on the acrosome V. an egg-membrane lysin from the acrosomes of Mytilus edulis spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 10, 168-180.

Yanagimachi, R. and N. Usui. (1974) Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 89, 161-174.

Yanagimachi, R. (1975) Acceleration of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa by detergents and other reagents. *Biol. of Reprod.* 13, 519-526.