

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 ブタ精子マイクロドメインに存在する高度糖鎖修飾糖タンパク質 WGA-gp の構造と機能

氏名 金澤 尊

論文内容の要旨

生物の細胞表面には数多くの糖鎖が発現しており、細胞接着や免疫応答、分化・増殖、受精現象などの多岐にわたる生命現象に関与している。哺乳類の受精においては、精子-卵相互作用が精子の卵透明帯タンパク質の糖鎖への結合によって起こり、とりわけその種特異的相互作用の一端が糖鎖構造の違いによって担われていることが知られている。したがって、受精は糖鎖機能の探求の対象として興味深い生物学的現象である。一般に、糖鎖の機能はその糖鎖の結合分子との相互作用によって開始されること、この相互作用は糖鎖が集合化して糖鎖結合分子との結合が増強されることによって成立することが知られている。糖鎖機能を発揮する細胞膜上の場として、糖タンパク質や糖脂質が集積する微小膜領域である生体膜マイクロドメイン（以下、マイクロドメイン）が注目されている。マイクロドメインは、コレステロールやスフィンゴ脂質、glycosylphosphatidylinositol (GPI)アンカー型タンパク質に富む特徴のほか、細胞接着分子や種々の受容体と情報伝達分子が共局在しており、細胞表面における情報伝達の間であると認識されている。したがって、糖鎖機能の視点からは、マイクロドメインは糖鎖を介する相互作用と情報伝達の間とみなすことができる。私は、このようなマイクロドメインの特徴を鑑み、マイクロドメインに局在する糖鎖の機能を紐解くことによって、受精における糖鎖の新たな役割の解明につながると考えて、ブタの精子を材料にして研究を行った。精子マイクロドメイン局在糖鎖に関する研究として、ウニの精子マイクロドメインに存在する高度に糖鎖付加された糖タンパク質 **flagelliasialin** がある。**flagelliasialin** は 40-80 kDa の糖タンパク質で、全重量の 90% を糖鎖が占め、一分子あたり α 2,9-結合ポリシアル酸鎖をもつ 6~7 本の糖鎖からなる。ウニ精子に対して α 2,9-結合ポリシアル酸を認識する抗体を添加すると、精子の細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) が増加して、運動停止することから、**flagelliasialin** は糖鎖を介してカルシウム制御に関わることが示唆されている。糖鎖がカルシウム濃度の制御機構に関わ

ることは他に例がなく、きわめて興味深い。精子機能におけるカルシウム制御の重要性は広く様々な生物で知られており、糖鎖によるカルシウム制御機構が普遍的に存在するかどうかの解明は重要である。そこで本研究では、哺乳類ブタの精子を用いて、flagellisialin 様分子の探索とその機能解明を目的として取り組んだ（第一章）。

第一に、ブタ精子における flagellisialin 様分子の探索を行った（第二章）。flagellisialin のアミノ酸及び cDNA 配列に基づく検索では見出されなかったため、flagellisialin の特徴、つまり(1) 鞭毛に存在すること、(2) マイクロドメインに存在すること、(3) 高度に糖鎖修飾されており広い分子量分布を示すこと、を満たす分子の探索を生化学的に行った。その結果、ブタ精子のマイクロドメインから 15-25 kDa で WGA レクチンによって検出される分子を見出し、WGA-gp と命名した。また、WGA-gp を精製して諸性質を調べた結果、N 及び O 型糖鎖を併せ持つ糖含量の高いこと、マイクロドメインに局在し、鞭毛部を含む精子全体に分布していることが明らかになった。

第二に、WGA-gp の同定及び構造解析を行った（第三章）。まず、WGA-gp に対するモノクローナル抗体 mAb.4D1 を調製し、この抗体が WGA-gp の Gal α -Gal β 構造を含む N 型糖鎖を認識することを明らかにした。mAb.4D1 を用いた発現組織解析から WGA-gp が精巣上体尾部で合成されること、生殖組織を用いた免疫化学的染色によって精巣上体の上皮細胞及び精巣上体管の精子表面に局在することが明らかになった。また、精子は雌性卵管内で受精能獲得、先体反応を経て、卵との結合にいたることが知られており、人為的な受精能獲得、先体反応における精子表面 WGA-gp の局在変化の有無を免疫染色によって解析した。その結果、WGA-gp は常に精子鞭毛には存在するものの、頭部においては受精能獲得前に存在しているが、受精能獲得後では消失し、先体反応後には、頭部の少し異なる部位に再び出現することが示され、WGA-gp は受精過程で局在を変化させることがわかった。次に、精巣上体の cDNA ライブラリーを作製し、WGA-gp の N 末端からのアミノ酸配列から設計した縮重プライマーを用いて cDNA クローニングを行った結果、63 アミノ酸からなり、N 末端にシグナルペプチド配列を、C 末端に GPI アンカーシグナルをもつ遺伝子にコードされており、ブタ CD52 の cDNA 配列と一致することが判明した。phosphatidylinositol-phospholipase C に対する感受性を示すこと、及びアミノ酸配列、糖鎖構造解析の結果と考え併せると、WGA-gp は翻訳後シグナルペプチドと GPI アンカーシグナルが除去された 10 アミノ酸残基からなる GPI-アンカーペプチドであり、1 つの N 型糖鎖と 2 つの O 型糖鎖をもつことが明らかとなった。各種レクチンや質量分析の結果から、N 型糖鎖には末端 α -Gal とコア Fuc 残基が存在し、O 型糖鎖には硫酸基が存在するのが特徴である。さらに、flagellisialin は再度解析したところ GPI アンカー型タンパク質であることが判明し、CD52 の成熟分子 WGA-gp と flagellisialin は、高い糖鎖含量、GPI アンカーペプチド構造、マイクロドメイン局在性において構造的特徴が一致することが明らかになった。また、本研究により初めてブタ精子 CD52 の実体が解明された。

第三に、WGA-gp と細胞内カルシウム濃度[Ca²⁺]_i調節との関係を調べた（第四章）。WGA-gp が flagellisialin のように精子[Ca²⁺]_iを調節するか否かを明らかにするために、

まず、カルシウム蛍光指示薬 Fura-2 を取り込ませた精子懸濁液に mAb.4D1 を添加して、蛍光分光光度計で $[Ca^{2+}]_i$ をモニターした。mAb.4D1 添加後、 $[Ca^{2+}]_i$ のオシレーションの強度が顕著に増加することが観察された。このオシレーションの発生は WGA-gp を認識する WGA や GSI-B4 でも起こるが、精子上に存在する糖鎖構造を認識する 3G9 抗体では起こらないため、WGA-gp に特異的な現象である。このオシレーションは、カルシウムポンプ PMCA や L-type カルシウムチャネルに対する阻害剤共存下では抑制され、カルシウムポンプやチャネルが関わりと推定された。また、mAb.4D1 は精子凝集も誘起しており、実際、WGA-gp 特異的な精子凝集がこのオシレーションと相関関係があることが示唆された。次に、単一細胞レベルでの $[Ca^{2+}]_i$ 変動を調べるために、Fluo-4 を取り込ませた精子をカルシウムイメージング法で観察した。単一精子では、mAb.4D1 によるカルシウムオシレーションは起こらず、一過的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇がみられた。この一過的 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は上記 3G9 抗体では起こらず、WGA-gp 特異的であることが示唆された。以上のことから、WGA-gp はその糖鎖を介してカルシウム調節に関わっている可能性が考えられる。

第四に、WGA-gp の糖鎖が機能を発揮する機構を解明するために、精子上で WGA-gp と相互作用する分子を探索した（第五章）。そのために WGA-gp および mAb.4D1 をリガンドとするアフィニティー精製を行ったところ、カルシウムポンプやチャネルは見出されなかったものの、精子と卵の結合や融合に関わる分子 (MFG-E8, ADAM2, AQN1, AQN3)、卵透明帯の分解に関わる分子 (F-box/LRR-repeat protein C02F5.7-like, acrosin precursor, acrosin binding protein, acrosin inhibitor)、GPI アンカータンパク質のプロセスに関わる分子 (GPI transamidase component PIG-T-like) が見出された。また、これらの多くはブタ精子マイクロドメインに存在する分子である。以上のことから、WGA-gp はカルシウムイオン調節の他にも卵との結合・融合や透明帯貫通に関わる分子をマイクロドメインに集積する足場として機能している可能性がある。

以上のように、本研究はウニ精子 flagelliasialin 類似分子としてブタ精子において WGA-gp を発見し、それが CD52 であることを示し、ユニークな糖鎖構造をもつ GPI アンカーペプチドであることを明らかにした。また、WGA-gp がその糖鎖を介してカルシウム調節と卵との相互作用の足場として働くことを示した。ブタの精子における CD52 の発見とその機能に関する包括的知見を得たのは、本研究が初めてである。また、本研究が得たブタ WGA-gp とウニ flagelliasialin の構造的・機能的類似性は、高度に糖鎖修飾された GPI アンカーペプチドの進化を考える上で重要な知見である。