

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 金 澤 尊

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

論文審査担当者

主 査	名古屋大学教授	北 島	健
委 員	名古屋大学教授	松 田	幹
委 員	名古屋大学准教授	佐 藤	ちひろ
委 員	名古屋大学教授	澤 田	均
委 員	名古屋大学教授	古 川	鋼 一

哺乳類の受精において、精子と卵の相互作用は、精子の卵透明帯タンパク質の糖鎖への結合によって開始する。とりわけ、糖鎖は受精における種特異的相互作用の一端を担うことが知られている。近年、糖鎖に関わる相互作用が起こる細胞膜上の場が、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）であることが例証され、現在、その相互作用機構の解明が重要な課題となっている。マイクロドメインは、脂質ラフトとも呼ばれ、コレステロール、スフィンゴ脂質、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカータンパク質に富むという特徴をもつほか、種々の細胞接着分子や受容体と情報伝達分子が共局在しており、細胞外から細胞内への情報伝達が起こる場として広く認識されている。糖鎖機能の視点からは、マイクロドメインは、そこに集積する糖鎖を介する相互作用と情報伝達のプラットフォームとして注目されている。金澤尊は、受精における糖鎖の役割を分子レベルで理解することを目指しており、マイクロドメインに局在する糖鎖に着目してその機能を紐解くという新しい研究アプローチによって課題解決に取り組んだ。精子マイクロドメイン局在糖鎖の機能については、ウニの精子マイクロドメインに存在する糖タンパク質flagelliasialinの先行研究がある。flagelliasialinは、40-80 kDaの糖タンパク質で、全重量の90%をユニークな α 2,9-結合ポリシアル酸鎖をもつ糖鎖が占める。その糖鎖に対する抗体が精子細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を増加させる効果があることから、糖鎖を介して $[Ca^{2+}]_i$ の制御に関わることが示唆されている。糖鎖が $[Ca^{2+}]_i$ 制御に関わる例は珍しく、きわめて興味深い。一方、精子機能における $[Ca^{2+}]_i$ 制御の重要性は様々な生物においてよく知られており、糖鎖による $[Ca^{2+}]_i$ 制御機構にも普遍性があるのか、またその分子機構は如何なるものかという課題の解決は重要である。そこで本研究では、ブタの精子を用いて、flagelliasialin様分子の探索、その構造と機能の解明を目的として研究を遂行した。

第一に、ブタ精子におけるflagelliasialin様分子の探索を行った(第二章)。flagelliasialinのアミノ酸およびcDNA配列に基づく検索では見出されなかったため、flagelliasialin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、(4) $[Ca^{2+}]_i$ の制御に関与すること、を満たす分子の探索を生化学的に行った。その結果、上記(1)~(3)の特徴をもつ分子をブタ精子のマイクロドメインに見出し、WGAレクチンによって15-25 kDa領域に検出されることからWGA-gpと命名した。また、この分子は上記特徴(4)の $[Ca^{2+}]_i$ の変化に関わることも証明され(第四章)、flagelliasialin様分子であることが判明した。

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の糖鎖部分に対するモノクローナル抗体mAb.4D1を調製し、この抗体を用いた免疫染色解析からWGA-gpが精巣上体尾部で合成されること、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、精子上においては、WGA-gpは精子鞭毛には常に存在するものの、頭部においては、受精能獲得後に消失し、先体反応後に再度出現することがわかった。次に、精巣上体のcDNAライブラリーを作製して、それを利用してcDNAクローニングを行った。その結果、WGA-gpは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。GPIアンカーの存在証明実験、アミノ酸配列、糖鎖構造解析の結果を考えあわせると、WGA-gpは、翻訳後にシグナルペプチドとGPIアンカーシグナルが除去されて10アミノ酸残基からなるGPI-アンカーペプチドに相当し、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。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 $[Ca^{2+}]_i$ 調節との関係について、カルシウム蛍光指示薬を取り込ませた精子を用いて調べた（第四章）。まず、精子懸濁液にmAb.4D1を添加すると、WGA-gpに依存した精子凝集と $[Ca^{2+}]_i$ オシレーションが起こり、そのオシレーション強度が凝集の程度に依存して顕著に増加することが観察された。阻害剤の効果から、このオシレーションには、少なくともカルシウムポンプPMCAとL-typeカルシウムチャンネルが関与することが推定された。次に、カルシウムイメージング法で単一細胞レベルでの $[Ca^{2+}]_i$ 変動を調べた結果、WGA-gp依存的な一過的 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観察された。すなわち、WGA-gpはその糖鎖を介してカルシウム調節に関与することが示唆された。

第四に、マイクロドメイン上でWGA-gpと共局在あるいは相互作用する分子の探索を行った（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法を用いて調べたところ、第三章で共存が推定されたカルシウムポンプとチャン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群、卵透明帯の分解に関わる分子群、GPIアンカータンパク質のプロセスに関わる分子が見出された。これらの結果は、WGA-gpが $[Ca^{2+}]_i$ 調節の他にも、卵との結合・融合、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する可能性を指摘しており興味深い。

以上のように、金澤尊はウニ精子 flagelliasialin 類似分子 WGA-gp をブタ精子に発見し、それが哺乳類精子に遍在する CD52 の成熟分子であり、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 を含むマイクロドメインが精子 $[Ca^{2+}]_i$ 調節と卵成分との相互作用の足場として働くことを示唆した。ブタ精子における CD52 の発見とその機能の包括的解明は、本研究が最初であり学術的貢献は大きい。また、高度糖鎖修飾 GPI アンカーペプチドが生物種を超えて精子マイクロドメインに存在するという本研究の提唱は、基礎および応用科学における今後の展開に高いポテンシャルをもつ。したがって、審査委員会は本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値を有すると認め、論文審査に合格と判定した。