

博士論文

2004年度

キヒトデ精子における ARIS と asterosap の
協調的先体反応誘起機構

慶應義塾大学大学院

理工学研究科 基礎理工学専攻

生命理工学専修 発生・生殖生物学研究室

川瀬 撰

目次

略語表

第 1 章 序論	1
1-1 受精と先体反応	1
1-2 精子活性化ペプチドとグアニル酸シクラーゼ	4
1-3 先体反応誘起物質	6
1-4 先体反応における細胞内シグナル伝達	9
1-5 前処理効果	10
1-6 先体反応の研究における問題点と本研究の目的	11
第 2 章 asterosap 前処理効果の機構解析	12
2-1 緒言	12
2-2 asterosap 前処理による先体反応の抑制	12
2-3 asterosap 前処理精子の asterosap 感受性	14
2-4 asterosap による asterosap 受容体の脱リン酸化	16
2-5 asterosap 前処理精子の ARIS 感受性	17
2-6 ホスホジエステラーゼ阻害剤による asterosap 前処理効果の抑制	19
2-7 ホスホジエステラーゼ阻害剤による asterosap シグナルの維持	22
2-8 細胞内 cGMP 濃度へのホスホジエステラーゼ阻害剤の影響	24
2-9 cGMP 結合タンパク質の探索	28
2-10 考察	31
第 3 章 ARIS と asterosap による協調的先体反応誘起機構	34
3-1 緒言	34
3-2 ARIS、asterosap 併用による細胞内Ca ²⁺ 濃度の持続的上昇	34
3-3 ARIS、asterosap の相互非依存的な細胞内シグナル伝達	36
3-4 先体反応における細胞外Ca ²⁺ の重要性	38

3-5 先体反応における SOC 様チャネルの重要性	40
3-6 ストアCa ²⁺ の減少による先体反応誘起	45
3-7 高pH海水、高Ca ²⁺ 海水中でのARISによる先体反応誘起機構	47
3-8 asterosap による細胞内 pH の上昇と ARIS による先体反応	51
3-9 細胞内 pH の低下による先体反応の抑制	55
3-10 考察	57
第4章 総括および今後の展望	61
材料と方法	63
実験材料	63
海水の調製	63
試薬の調製	63
卵ゼリーおよび ARIS の調製	64
先体反応率の測定	65
細胞内サイクリックヌクレオチド濃度の測定	65
細胞内Ca ²⁺ 濃度および細胞内pHの測定	65
ウェスタンブローディング	66
リン酸の定量	67
cGMP 結合タンパク質の精製と N 末端配列の決定	67
参考文献	69
謝辞	

略語表

本論文では断らない限り次の略語を用いた。

ANP	atrial natriuretic peptide
ARIS	acrosome reaction-inducing substance
asterosap	asteroidal sperm-activating peptide
BPB	bromophenol blue
[Ca ²⁺] _i	intracellular Ca ²⁺ concentration
cAMP	cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate
[cAMP] _i	intracellular cAMP concentration
cGMP	cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate
[cGMP] _i	intracellular cGMP concentration
Co-ARIS	cofactor for ARIS
CPA	cyclopiazonic acid
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediamine- <i>N, N, N', N'</i> -tetraacetic acid
EGTA	ethyleneglycol <i>bis</i> (β-aminoethylether)- <i>N, N, N', N'</i> -tetraacetic acid
EHNA	erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine
EPSP	<i>N</i> -2-hydroxyethyl-piperazine- <i>N'</i> -3-propane sulphonic acid
FSP	fucose sulfate polymer
Fuc	fucose
Gal	galactose
HRP	horseradish peroxidase
HSP	heat shock protein
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
IP ₃	inositol 1, 4, 5-trisphosphate
IVF	<i>in vitro</i> fertilization
NOS	nitric oxide synthase
NPR-A	natriuretic peptide receptor A
PDE	phosphodiesterase
pH _i	intracellular pH

pH _e	extracellular pH
PIPES	piperazine- <i>N, N'</i> -bis(2-ethane sulphonic acid)
PLC	phospholipase C
PP	protein phosphatase
PVDF	poly(vinylidene difluoride)
REJ	receptor for egg jelly
SAP	sperm-activating peptide
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SOC	store-operated Ca ²⁺ channel
Tris	tris(hydroxymethyl)amino methane
V _m	membrane potential
Xyl	xylose

第1章 序論

1-1 受精と先体反応

受精は個体発生の開始点であるとともに、ゲノム混合の場である。ゲノムの混合は種内に多様性を生み、環境変化などにより種が絶滅することを防いでいると考えられる。この極めて重要な生命現象は、時間および空間的に巧妙な卵-精子相互作用の下に行われている。

精子が裸の細胞であるのに対し、卵は1層から数層の外被に包まれている。そのため、硬骨魚類のように卵外被に穴がある動物以外では、精子は化学的または物理的な要因により卵外被を通過しなければならない。精子が卵外被に達すると、精子頭部の先体胞と呼ばれる細胞器官がエキソサイトーシスを起こし、卵外被を通過するための物質を放出し、卵細胞膜に融合するための新たな精子細胞膜を露出する。このような過程を先体反応 (acrosome reaction) と呼び、多くの動物において、受精に必須である (図 1-1、Dan, 1952)。この際、ウニやヒトデなどの棘皮動物をはじめ、多くの無脊椎動物ではエキソサイトーシスの後、アクチン繊維を急速に伸長し、精子先端部の細胞膜を突き上げて先体突起を形成する (図 1-2、Tilney, 1985)。原索動物のナメクジウオや原始的な脊椎動物であるヌタウナギにおいても先体突起の形成が確認されている (Morisawa, 1999; Morisawa *et al.*, 2004)。

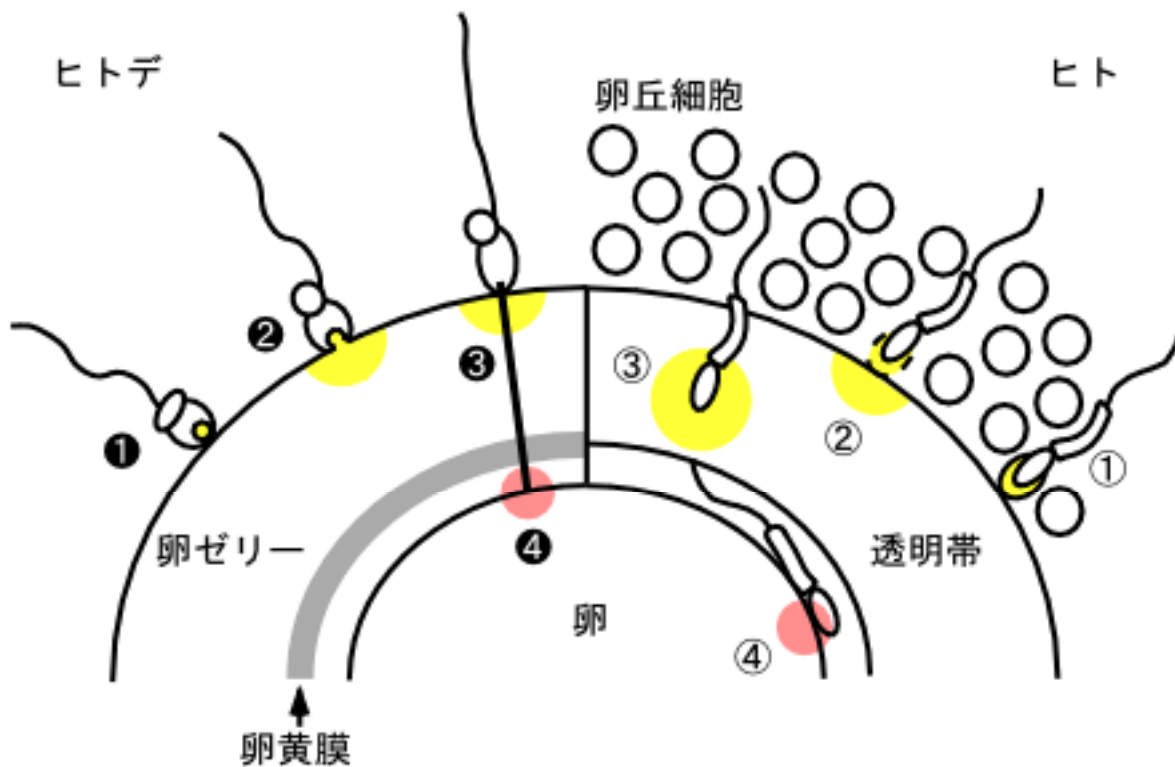


図 1-1 受精と先体反応

卵外被に精子が到達してから受精に至までの過程を示した。卵外被と精子の接触 (①,①)、エキソサイトーシス (②,②)、卵外被の通過 (③,③)、卵と精子の膜融合 (④,④) という過程を経て受精が行なわれる。ヒトデの場合、精子の頭部から 20 μm にも達する先体突起を伸ばし (③)、その先端で膜融合を起こす (④)。また、ヒトデでは②および③の現象を、ヒトでは②を先体反応と呼ぶ。ウニの場合、精子は卵ゼリーに侵入しつつ、1 μm 以下の短い先体突起を形成する。ヒトデでは、卵ゼリー外縁部で先体反応が起こっているが (Dale et al., 1981; Ikadai and Hoshi, 1981a)、哺乳類の先体反応がどこで起こっているのかは正確にはわかっておらず、この図は仮説の 1 つを示している。

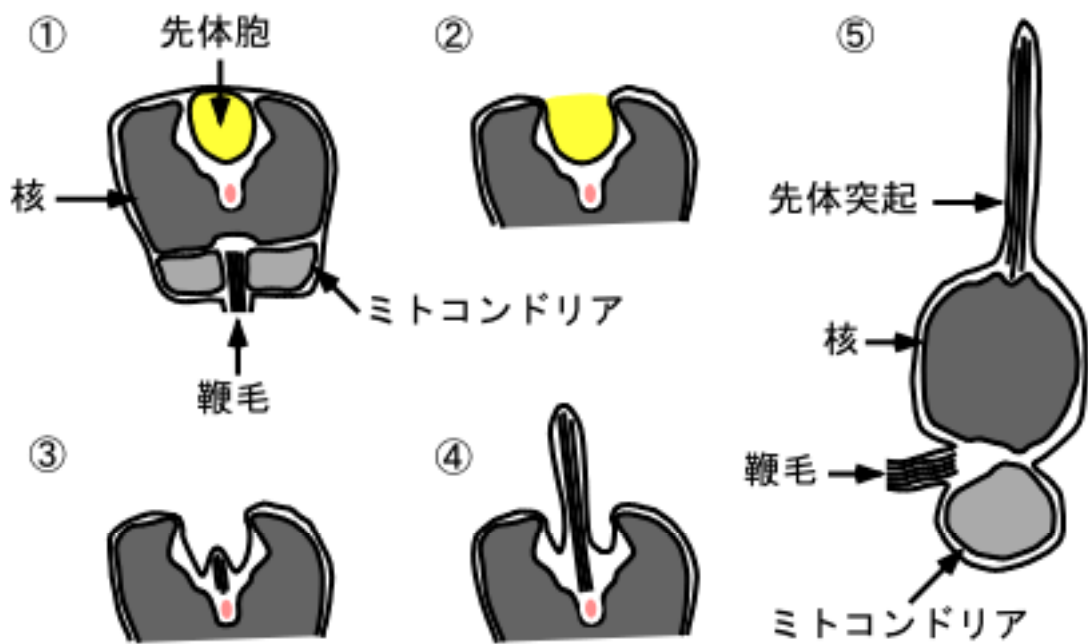


図 1-2 ヒトデ精子の先体反応

未反応の精子 (①) に卵ゼリーを加えると先体胞のエキソサイトーシスが起きる (②)。その後、先体後方からアクチン繊維に裏打ちされた先体突起が伸長し (③, ④)、同時に精子頭部の変形が起こる (⑤)。鞭毛は基部のみを示している。

1-2 精子活性化ペプチドとグアニル酸シクラーゼ

体外受精を行う動物では、放卵放精後、卵と精子は大きく希釈される。また、哺乳類のような動物では、排卵される卵の数も、受精の場に到達する精子も非常に少ない。そこで、卵と精子が遭遇する可能性を高めるために、精子の運動性や代謝を高めたり、精子を卵の方向へ誘導したりするシグナル物質が卵外被などから分泌されると考えられている。

ウニおよびヒトデの精子は低 pH の海水中で運動および呼吸が著しく抑えられる。精子活性化ペプチド (SAP, sperm-activating peptide) は低 pH 海水中で抑えられた精子の運動と呼吸を回復させる因子として、卵外被(卵ゼリー)から単離されてきた。代表的なものとして、バフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) とオオバフンウニ (*Strongylocentrotus purpuratus*) の speract (Gly-Phe-Asp-Leu-Asn-Gly-Gly-Gly-Val-Gly)、*Arbacia punctulata* の resact (Cys-Val-Thr-Gly-Ala-Pro-Gly-Cys-Val-Gly-Gly-Gly-Arg-Leu)、キヒトデ (*Asterias amurensis*) の asterosap (asteroidal sperm-activating peptide、34 アミノ酸からなる環状ペプチド) がある (Suzuki *et al.*, 1981; Garbers *et al.*, 1982; Suzuki *et al.*, 1984; Nishigaki *et al.*, 1996)。*Arbacia punctulata* またはキヒトデの精子は、それぞれ resact または asterosap に対して走化性を示す (Ward *et al.*, 1985; Van *et al.*, submitted)。一方、speract および asterosap は、それぞれの種において精子の先体反応を促進する (Yamaguchi *et al.*, 1987; Nishigaki *et al.*, 1996; Hirohashi and Vaquier, 2002c)。また、これらの受容体は既に決定され、speract 受容体は精子膜上のグアニル酸シクラーゼと複合体を形成している分子量 70 kD 付近のタンパク質、resact および asterosap 受容体は細胞膜型のグアニル酸シクラーゼである (Dangott and Garbers, 1984; Singh *et al.*, 1988; Shimizu *et al.*, 1994; Nishigaki *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2003)。

哺乳類においては、卵胞液および卵丘分泌物に含まれる ANP (心房性ナトリウム利尿ペプチド、atrial natriuretic peptide) が精子の先体反応や走化性を誘起することが報告されている (Zamir *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1995; Rotem *et al.*, 1998)。ANP 受容体も細胞膜型グアニル酸シクラーゼであることから、類似したペプチド性シグナル分子による精子機能の制御が、種を超えて存在していると考えられる (Kuno *et al.*, 1986)。

細胞膜型グアニル酸シクラーゼは細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、キナーゼホモロジードメイン、グアニル酸シクラーゼドメインから成り立っている (図 1-3)。

1-3 先体反応誘起物質

体内受精を行なう動物種においては明確な証拠がないが、少なくとも体外受精を行なう種においては、卵外被に精子が到達すると先体反応を起こすため、卵外被中の成分が先体反応の引き金となっていると考えられる。実際、卵外被から先体反応誘起物質として様々な成分が精製されてきた。

ウニの先体反応誘起物質として、卵ゼリーの成分、フコース硫酸ポリマー (FSP) が得られている (Alves *et al.*, 1998)。オオバフンウニ精子を用いた実験で、FSP は精子鞭毛表面と精子頭部頂点の先体胞付近に存在する 210 kD の糖タンパク質 REJ (sperm receptor for egg jelly) と結合することが示されている (Moy *et al.*, 1996)。また、バフンウニにおいて、speract は FSP による先体反応を促進し、オオバフンウニでは、低 pH 海水中でのみ FSP による先体反応を促進するという報告がある (Yamaguchi *et al.*, 1987; Hirohashi and Vacquier, 2002c)。さらに、FSP による先体反応を促進する物質として卵ゼリー成分の sialoprotein が挙げられている (Hirohashi and Vacquier, 2002b)。いずれの場合においても、speract と sialoprotein は単独で先体反応を誘起することはない。

ヒトデの先体反応誘起物質としては、卵ゼリーの成分、ARIS (acrosome reaction-inducing substance)、Co-ARIS (cofactor for ARIS)、asterosapが決定されている (図 1-4、Hoshi *et al.*, 1994; Nishigaki *et al.*, 1996)。これらはいずれも単独では先体反応を誘起できないが、ARISとCo-ARIS、ARISとasterosapの組み合わせ、もしくはARISのみでも高Ca²⁺海水や高pH海水中では先体反応を誘起できる。先体反応の中樞を担うと考えられているARISは見かけの分子量が 10⁴ kD以上のプロテオグリカン様分子で、フラグメント 1 と呼ばれる、[4-β-D-Xylp-1→3-α-D-Galp-1→3-α-L-Fucp-4(SO₃⁻)-1→3-α-L-Fucp-4(SO₃⁻)-1→4-α-L-Fucp-1] という 5 糖のくり返し構造が活性に重要である (Ikadai and Hoshi, 1981a, b; Koyota *et al.*, 1997; Gunaratne *et al.*, 2003)。糖鎖ならびに硫酸基が活性に重要であることも示されている。また、ARIS 受容体は精子頭部先端側部に存在し、分子量 50 kD近傍の分子であるという知見が得られている (Ushiyama *et al.*, 1993; Kawamura *et al.*, 2002)。Co-ARISは硫酸化ステロイドサポニン群で、硫酸基ならびにステロイド側鎖が活性に重要である (Nishiyama *et al.*, 1987)。asterosapは、1-2 で述べたように、精子活性化ペプチドとして単離精製された分子で、34 アミノ酸の 8 番目と 32 番目のシステイン残基がジスルフィド結合した環状ポリペプチドである (Nishigaki *et al.*, 1996)。このジスル

フィド結合を還元し、開環すると活性を失うが、N末端部は活性には関与していない (Nishigaki *et al.*, 2000)。また、遺伝子上に比活性の等しい、複数のアイソフォームがタンデムにコードされていることが示されている (Matsumoto *et al.*, 1999)。さらに、アフィニティーラベル化法により、asterosap受容体として細胞膜型グアニル酸シクラーゼが決定されている (Nishigaki *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2003)。卵ゼリーに抗フラグメント 1 抗体または抗asterosap抗体を混ぜると、先体反応誘起活性が著しく落ちることから、先体反応誘起においてARISとasterosapが重要な働きをすることが示唆されている (Nishigaki *et al.*, 1996)。

一方、マウスでは、卵外被である透明帯 (zona pellucida) を構成する糖タンパク質 ZP3 が先体反応誘起活性を持っている (Bleil and Wassarman, 1983)。しかし、透明帯ではなく、卵胞液および卵丘分泌物中のプロゲステロンや ANP が先体反応を誘起するという報告もある (Osman *et al.*, 1989; Roldan *et al.*, 1994; Zamir *et al.*, 1995; Rotem *et al.*, 1998)。

1-4 先体反応における細胞内シグナル伝達

1-5 で述べたように、先体反応誘起物質の構造および種類は多様性に富んでいる。しかし、先体反応を誘起する細胞内シグナル伝達には、種を超えた普遍性が存在していると考えられる。

先体反応を引き起こすためにもっとも重要な細胞内の変化は、細胞内Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) の上昇である。先体反応の発見当初から細胞外Ca²⁺の重要性は示唆されていた (Dan, 1954)。一般的に、細胞質のCa²⁺が上昇するには、細胞内Ca²⁺ストアからのCa²⁺放出または細胞外からのCa²⁺流入が必要であるが、これらのCa²⁺の輸送は密接に連携して、細胞の挙動を調節している (Putney *et al.*, 2001)。例えば、IP₃ (inositol 1, 4, 5-trisphosphate) は細胞内Ca²⁺ストアに存在するIP₃受容体に結合し、IP₃受容体を介して細胞内Ca²⁺ストアからCa²⁺を細胞質中に流出させる。すると、細胞内ストアのCa²⁺が減少したという情報が細胞膜に伝わり、細胞膜上に存在するstore-operated Ca²⁺ channel (SOC) が活性化され、細胞外から細胞質へのCa²⁺流入が起こる (Putney, 1986)。このSOCの働きは先体反応誘起に非常に重要な役割を持つと考えられている。

FSPは2種類のCa²⁺チャネルを活性化させ、ウニ精子の先体反応を誘起している (Guerrero and Darszon, 1989; Hirohashi and Vacquier, 2002a)。ベラパミルやジヒドロピリジン類に感受性を示す第1のCa²⁺チャネルは一過的に[Ca²⁺]_iを上昇させ、SKF96365やNi²⁺により阻害される第2のCa²⁺チャネルは持続的な[Ca²⁺]_iの上昇および先体反応を引き起こす (Guerrero and Darszon, 1989)。この時、第1のチャネルの開口が第2のチャネルの開口に必要であり、第2のチャネルはSOCであることが示唆されている (González-Martínez *et al.*, 2001; Hirohashi and Vacquier, 2003)。一方、FSPは細胞内pH (pH_i) の上昇を引き起こし、これも第2のチャネルの活性化に重要だと考えられている (García-Soto and Darszon, 1985; Guerrero *et al.*, 1998)。IP₃受容体を介して細胞内ストアからCa²⁺が流出し、ストアCa²⁺が減少すると、SOCが活性化されるが、ウニ精子から精製されたIP₃受容体様タンパク質は高pH条件で、IP₃と高い親和性を示す (Zapata *et al.*, 1997)。一方、FSPによる先体反応を促進するsperactは単独で精子に作用すると、[cGMP]_iの一過的な上昇とそれに続く膜電位 (V_m) の変化 (過分極およびそれに続く脱分極)、pH_i、[Ca²⁺]_i、細胞内cAMP ([cAMP]_i) の上昇を引き起こす (Darszon *et al.*, 2001)。これらの相互関係については、各種インジケーターおよびケイジドcGMP、ストップフロー法などを用いた検討が行な

われているが、いくつかの研究グループで相反する結果が得られており、混沌としている。同じくFSPによる先体反応を促進するsialoproteinはpH_iを上昇させる (Hirohashi and Vacquier, 2002b)。

ヒトデにおいても、卵ゼリー可溶化物によって精子の先体反応が起こるが、その時、pH_iの上昇および細胞内への⁴⁵Ca²⁺の取り込みが見られる (Matsui *et al.*, 1986a, c)。Ca²⁺イオノフォアで先体反応を誘起でき、Ca²⁺チャネル阻害剤のベラパミルやジルチアゼムによって先体反応が阻害されることから、Ca²⁺の取り込みは先体反応に重要であると考えられる (Matsui *et al.*, 1986a)。また、ARISが高pH海水中で先体反応を誘起することに加え、高pHかつ高Ca²⁺海水中では自発的に先体反応が起きることから、pH_iの上昇は先体反応を促進していると考えられる (Matsui *et al.*, 1986a)。ARISと協調的に先体反応を誘起するasterosapは、精子に作用すると[cGMP]_iの上昇および過分極とそれに続く脱分極、pH_i、[Ca²⁺]_iの上昇を起こす。さらに、ケイジドcGMPを精子内に導入し、UVの照射によって瞬間的に[cGMP]_iを上昇させると、精子の[Ca²⁺]_iが上昇する (Matsumoto *et al.*, 2003)。

マウス卵の透明帯可溶化物も、ジヒドロピリジン類感受性Ca²⁺チャネルおよびNi²⁺感受性Ca²⁺チャネルを活性化し、先体反応を誘起する (Arnoult *et al.*, 1996a, b)。後者はSOCであることが示唆され、精子内でIP₃を産生していると考えられるPLC δ 4 (phospholipase C δ 4) をノックアウトした精子は透明帯可溶化物に対する反応性が著しく低い (O'Toole *et al.*, 2000; Fukami *et al.*, 2001)。また、pH_iの上昇は[Ca²⁺]_iの上昇を促進することも示されている (Arnoult *et al.*, 1996a)。

このように、動物種に関わらず、精子は類似した細胞内シグナル伝達 (特にpH_i、[Ca²⁺]_iの上昇) によって先体反応を起こす。

1-5 前処理効果

卵ゼリーから調製された低分子画分、フラクションM₈ (Co-ARISおよびasterosapを含む) はARISと協調的に先体反応を誘起する (Matsui *et al.*, 1986a)。しかし、一度フラクションM₈またはARISのみで処理した精子を、その後、卵ゼリーで処理しても、先体反応が起こらないという現象が示されている (Matsui *et al.*, 1986b)。この効果を前処理効果と呼んでいる。プロテアーゼで消化したフラクションM₈は先体反応の協調的誘起活性を失うと共に、前処理効果も示さなくなるため、フラクシ

オンM₈のペプチド性成分が先体反応および前処理効果を引き起こしていると考えられる (Matsui *et al.*, 1986b, c)。このことから、自然条件では卵ゼリーの低分子群とARISの作用をタイミング良く受けた精子のみが先体反応を起こし、受精に至ると考えられる。しかし、先体反応誘起物質がなぜこのような相反する効果を示すのか明らかではない。

1-6 先体反応の研究における問題点と本研究の目的

種を超えて、精子は良く似た細胞内の変化（特にpH_i、[Ca²⁺]_iの上昇）に応答して先体反応を起こす。ウニやマウスの実験系においては、FSPやZP3が単独でこれらの変化を引き起こし、先体反応を誘起してしまう。そのため、受精の場に存在する他の因子の効果は注目されていない。ウニにおいてはsperactやsialoprotein、哺乳類においてはANPやプロゲステロンについて述べてきたが、これらの先体反応誘起機構およびこれらとFSPやZP3との協調作用に関する解析はほとんど行なわれていない。しかし、哺乳類を例に挙げると、受精の場に到達する精子数が人為受精（IVF, *in vitro* fertilization）に必要な精子数よりも著しく少ないし、卵に付着した卵丘（cumulus oophorus）がIVFの効率を高めることは明らかである（Van Soom *et al.*, 2002）。そのため、ZP3以外の因子が生理的な条件で先体反応を促進または誘起している可能性は十分にある。

我々が実験に用いているキヒトデの場合、ARIS、Co-ARIS、asterosapのいずれの分子も単独では先体反応を誘起しない。このことは、動物種の中には、複数の物質による協調的な先体反応誘起機構を持つものが存在するということを暗示している。そこで、本研究では、自然界で生理的に起こっている受精の機構を解明することを目指し、キヒトデ精子先体反応誘起機構の解析を行なった。

第2章ではasterosapが前処理効果を示すことを確認した。また、asterosap前処理効果を手がかりとして、先体反応における[cGMP]_iの重要性を検討した。さらに、第3章では、卵ゼリー成分の中で、特に重要な因子であるARISとasterosapがどのように協調的に先体反応を誘起しているのか解析した。

第 2 章 asterosap 前処理効果の機構解析

2-1 緒言

卵ゼリー低分子画分であるフラクションM₈はARISと協調的に先体反応を誘起する (Matsui *et al.*, 1986a)。しかし、フラクションM₈であらかじめ処理した精子は卵ゼリーに対する反応性を失ってしまう (前処理効果、Matsui *et al.*, 1986b)。フラクションM₈をプロテアーゼで処理するとこれらの効果が失われることから、どちらにもペプチド性の成分が働いていると考えられる (Matsui *et al.*, 1986b, c)。卵ゼリー由来の環状ペプチドasterosapはARISと協調的に先体反応を誘起するが、本章ではasterosapが前処理効果を示すことを確認した。また、asterosapで精子を前処理すると一過的に精子の[cGMP]_iが上昇するが、その後、[cGMP]_iが2度と上昇しなくなるため、先体反応が起こらなくなることが示唆された。すなわち、先体反応誘起における[cGMP]_iの重要性が示唆された。なお、すべての実験において、合成されたasterosapアイソフォームの1つP15を用いた (図 1-4)。

2-2 asterosap 前処理による先体反応の抑制

図 2-1A に示したように、精子を人工海水に懸濁し、その精子懸濁液を ARIS または P15 を含む人工海水に加えたが、ほとんど先体反応は起こらなかった。しかし、卵ゼリーを含んだ人工海水に加えると、80%近い先体反応率が得られた。さらに、ARIS、P15 混合物 (ARIS + P15) を含む人工海水に加えると、40%程度に先体反応が起きた。この結果は、ARIS、P15 混合物では、卵ゼリーの半分程度しか先体反応を誘起できないという以前の結果と一致している (Nishigaki *et al.*, 1996)。

一方、P15 を含んだ人工海水に精子を懸濁し、2分または5分後 (P15 前処理)、精子懸濁液を卵ゼリーまたは ARIS、P15 混合物を含む人工海水に移したところ、先体反応が P15 前処理の時間依存的に抑えられた (図 2-1B)。これにより、P15 が先体反応促進と先体反応抑制 (前処理効果) の相反する作用を示すことが確認された。

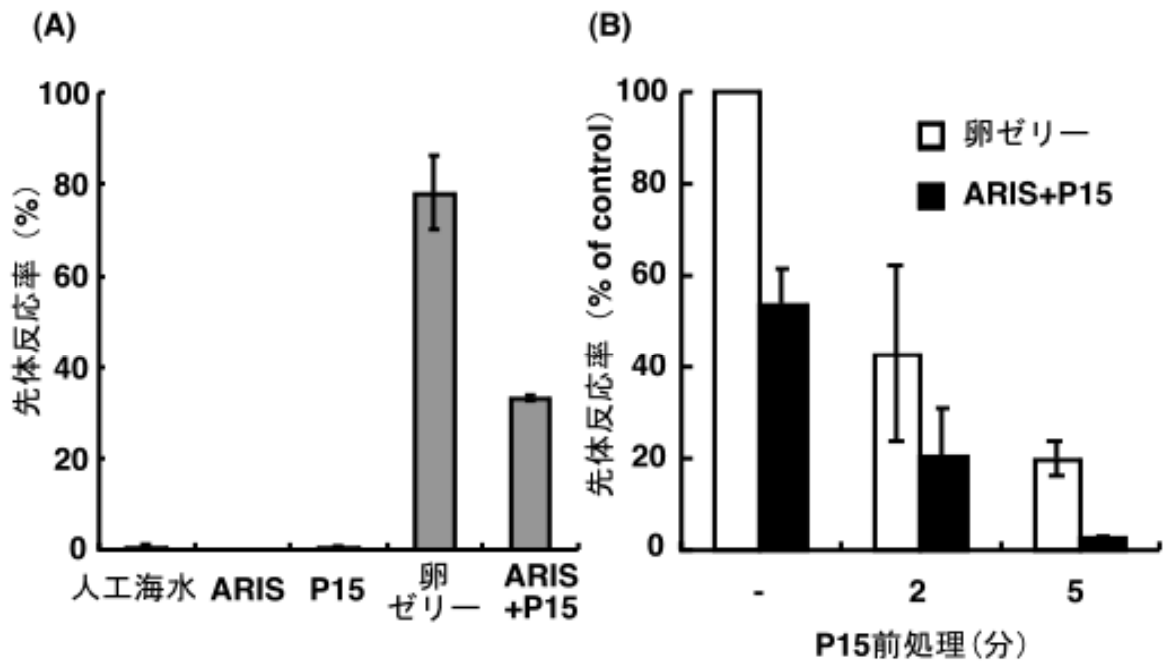


図 2-1 P15 前処理による先体反応の抑制

(A) 精子を人工海水に懸濁し、5 分間静置した後、この精子懸濁液を各条件の人工海水に加えた時の先体反応率 (%) を示した。精子懸濁液を何も含まない人工海水に加えた場合を「人工海水」と示し、ARIS、P15、卵ゼリー、ARIS と P15 の両方を含んだ人工海水に加えた場合をそれぞれ、「ARIS」、「P15」、「卵ゼリー」、「ARIS + P15」と示した。(B) 何も含まない人工海水に精子を懸濁し、5 分後、卵ゼリー (□) または ARIS と P15 の両方を含んだ人工海水 (■) に移した時の先体反応率を「P15 前処理 -」で表した。また、P15 を含んだ人工海水に精子を懸濁し、2 または 5 分後、卵ゼリーを含んだ人工海水 (□) または ARIS と P15 の両方を含んだ人工海水 (■) に精子懸濁液を加え、その時の先体反応率を「P15 前処理 2 分」または「P15 前処理 5 分」で表した。何も含まない人工海水に精子を懸濁し、5 分後に卵ゼリーによって起きた先体反応率 (□の P15 前処理 -) を 100% コントロールとし、3 回以上の独立した実験の平均値 ± 標準偏差を示した。なお、図 2-1 に示した全ての実験では、卵ゼリーおよび ARIS は 0.1 mg sugar/ml、P15 は 1 μM となるように人工海水に溶かして使用した。

2-3 asterosap 前処理精子の asterosap 感受性

resactやナトリウム利尿ペプチドの受容体である細胞膜型グアニル酸シクラーゼは、リガンド刺激によって $[cGMP]_i$ を合成するが、即座に脱リン酸化され、不活性化される (Ward *et al.*, 1986b; Potter and Garbers, 1992)。asterosap受容体にも同様な活性調節機構が存在していると予想される。そこで、P15 で精子を処理した後に、再度P15 で精子を処理した時の $[cGMP]_i$ および $[Ca^{2+}]_i$ の時間変化を測定した。なお、 $[cGMP]_i$ はenzyme immunoassay systemを用いて測定し、 $[Ca^{2+}]_i$ としては、精子内に導入されたfluo-4 の蛍光強度を示した。

1 回目のP15 処理では、急速かつ一過的な $[cGMP]_i$ の上昇が見られたが、2 回目のP15 処理では全く変化が見られなかった (図 2-2A)。同様に、1 回目のP15 処理では $[Ca^{2+}]_i$ のスパイクが見られたが、2 回目には変化が見られなかった (図 2-2B)。このことから、少なくとも $[cGMP]_i$ および $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を指標とする限り、P15 で前処理された精子は、その後、P15 に対して非感受性になることが示された。

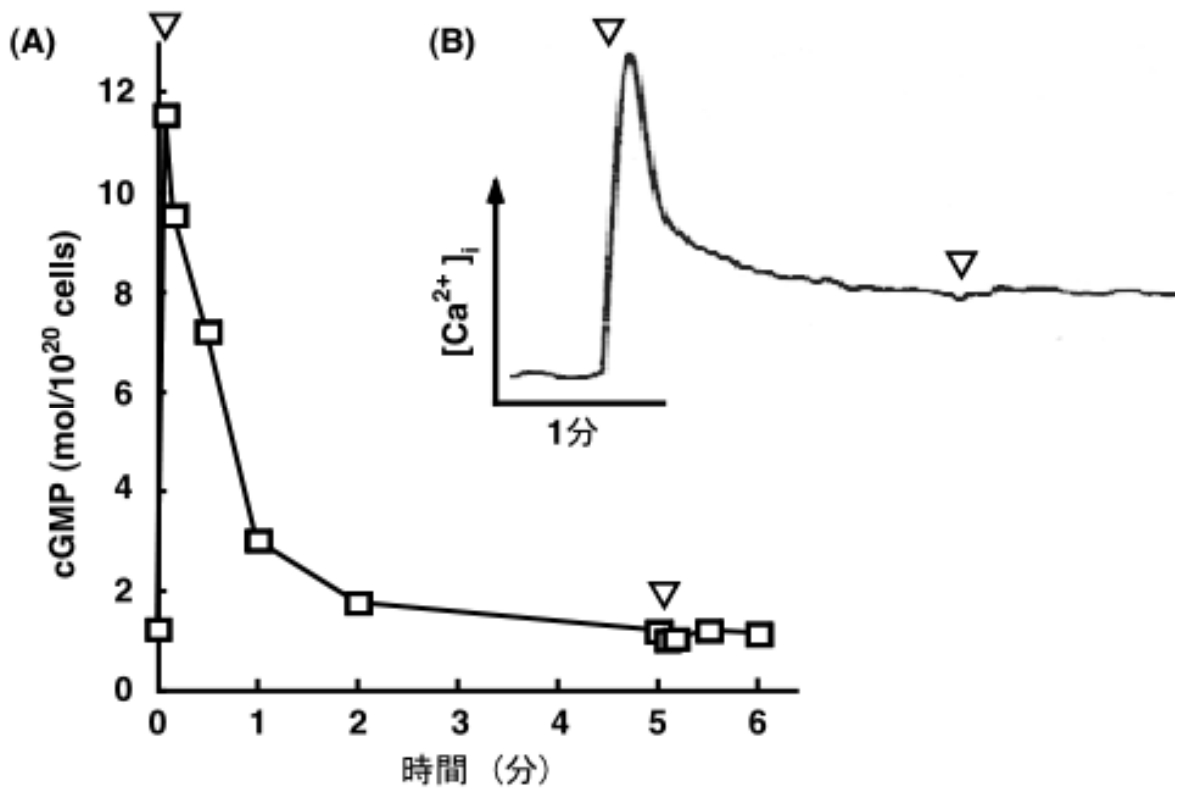


図 2-2 精子をP15 で 2 回処理した時の $[cGMP]_i$ および $[Ca^{2+}]_i$ の変化

(A) 1 μ M の P15 で精子を 1 回処理し、5 分後に再度処理した時の $[cGMP]_i$ の変化を示した。▽はP15 を添加した時間を示している。 $[cGMP]_i$ の値は 2 回の独立した実験の平均値を示した。(B) 1 μ M の P15 で精子を 1 回処理し、2 分後に再度処理した時の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を示した。▽はP15 を添加した時間を示している。 $[Ca^{2+}]_i$ のトレースは独立した 3 回の実験の典型的な例を示した。

2-4 asterosap による asterosap 受容体の脱リン酸化

asterosap処理後、 $[cGMP]_i$ は即座に減少し、二度と上昇しなくなるため、脱リン酸化によるasterosap受容体の不活性化が起こっていることが予想される。そこで、asterosap受容体の分子量変化について、ウェスタンブロッティングを用いて検討を行なった。

P15 処理によって、asterosap受容体の見かけの分子量が減少した (図 2-3)。実際にPVDF膜上のバンドを切り取り、NaOHによって加水分解したところ、含まれるリン酸の量が受容体 1 分子当たり 7.5 ± 1.6 残基から 4.5 ± 1.0 残基 ($n = 3$) に減少していた。この変化はプロテインホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸と界面活性剤ジギトニンを加えることによって抑えられた (図 2-3)。ジギトニンだけを加えても分子量変化を抑えられないことから、この阻害効果はオカダ酸によるものだと考えられる。通常、動物細胞は細胞膜にコレステロールなどのステロール類を含むが、ヒトデ精子の細胞膜は、ステロールの主成分がコレステロールなどの Δ^5 -ステロールではなく、 5α -cholest-7-en-3 β -olなどの Δ^7 -ステロールであることが知られ、また、比較的多量のコレステリル硫酸を含むことが知られている(Goad, 1978)。実際に、膜電位やイオン感受性色素などを細胞内に導入するには、他の動物細胞よりも時間がかかることが知られている。このような点でヒトデ精子の細胞膜は他の細胞とは異なることが示唆される。そのため、精子細胞内への阻害剤の導入が不十分になり、効果が見られないことがある。今回、オカダ酸単独では阻害効果がみられず、ジギトニンとオカダ酸を併用することで、初めて阻害効果が得られたため、ジギトニンがオカダ酸の細胞内への浸透を促進したと考えられる。以上の結果から、asterosap前処理を行なうと脱リン酸化によるasterosap受容体の不活性化が起きることが示唆された。

ジギトニン	-	-	+	+
オカダ酸	-	-	+	-
P15	-	+	+	+

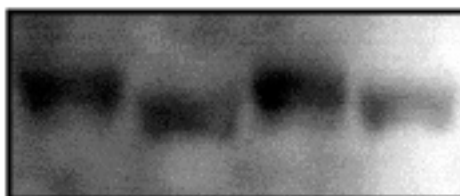


図 2-3 P15 による asterosap 受容体の見かけ上の分子量変化

P15 による asterosap 受容体の見かけ上の分子量変化をウェスタンブロッティングにより検出した。1 μM P15 で 5 分間処理した精子の asterosap 受容体は見かけ上の分子量が小さくなった。また、P15 で精子を処理する前に、あらかじめ 0.01% ジギトニンと 5 μM オカダ酸で 6 時間処理しておくとその変化は抑えられた。

2-5 asterosap 前処理精子の ARIS 感受性

P15 前処理によって、 $[\text{cGMP}]_i$ および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に関して、精子は P15 非感受性となった。そのため、P15 前処理後、ARIS と P15 の混合物や卵ゼリーによる先体反応が抑えられるのかもしれない。しかし、P15 前処理によって ARIS の働きが抑えられるため、先体反応が抑えられている可能性もある。そこで、P15 処理した精子の ARIS に対する感受性を評価するため、精子を P15 で前処理した後、ARIS を含んだ高 pH (pH 9.5) または高 Ca^{2+} 海水に懸濁し、先体反応が起こるか否かを検討した。

精子を P15 で前処理しても、高 pH または高 Ca^{2+} 海水中では ARIS によって先体反応が引き起こされた (図 2-4)。P15 前処理後、高 pH または高 Ca^{2+} 海水に懸濁しただけでは先体反応が起こらなかった。このことから、P15 で前処理した精子は、P15 感受性を失っているが、ARIS 感受性は維持していることが示された。

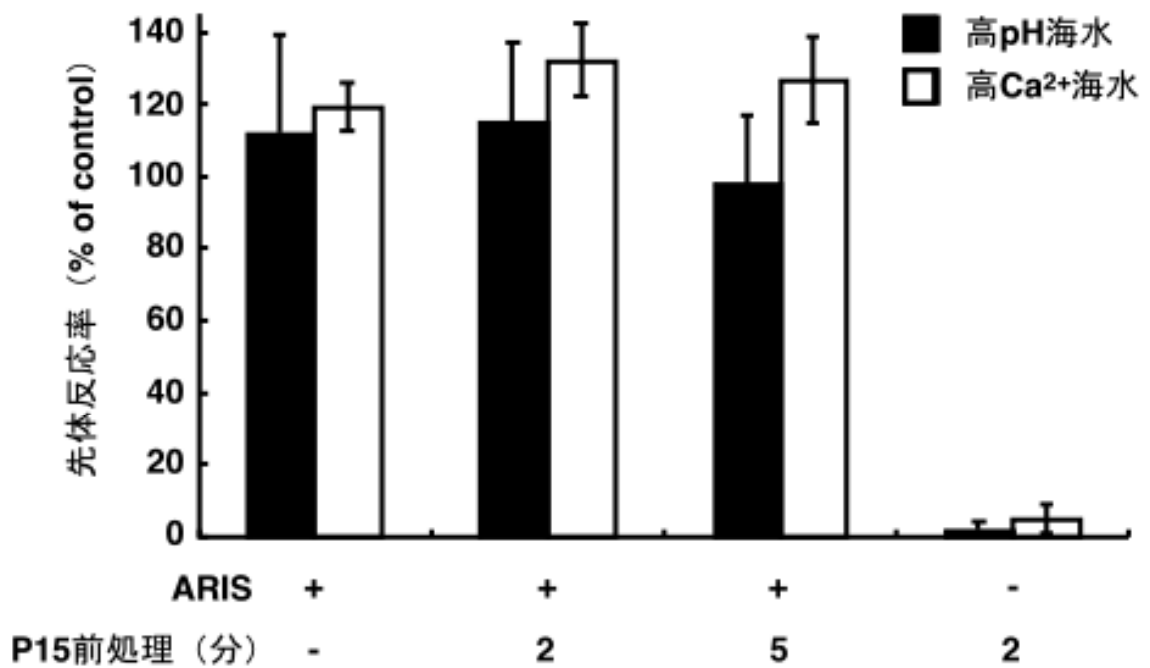


図 2-4 P15 前処理精子の ARIS 感受性

精子を人工海水で 5 分間 (P15 前処理 -)、または 1 μ M P15 を含む人工海水で 2 または 5 分間処理し (P15 前処理 2 分または 5 分)、0.1 mg sugar/ml ARIS を含む高 pH (■) または高Ca²⁺海水 (□) に移した時の先体反応率をもとめた (ARIS +)。また、ARIS を含まない高pHまたは高Ca²⁺海水に移した場合を「ARIS -」と示した。なお、精子を人工海水で 5 分間インキュベートした後、0.1 mg sugar/ml 卵ゼリーを含んだ人工海水に移した時の先体反応率を 100% コントロールとした。3 回以上の独立した実験の平均値±標準偏差を示した。

2-6 ホスホジエステラーゼ阻害剤による asterosap 前処理効果の抑制

[cGMP]_iはグアニル酸シクラーゼによる合成とホスホジエステラーゼ (PDE) による分解のバランスによって調節されている。そのため、精子に存在するcGMP特異的PDEを阻害すれば、asterosapによるcGMPを介した細胞内シグナル伝達が長く維持され、asterosap前処理効果は抑制されるはずである。ここでは、5つのPDE阻害剤、IBMX (非選択的)、ザプリナスト (PDE5 または 6 選択的)、EHNA (PDE2 選択的)、ミリノン (PDE3 選択的)、ビンポセチン (PDE1 選択的) がP15 前処理効果をキャンセルするのか検討した (Torphy, 1998)。

0.1 ~ 1000 μM IBMXまたは0.1 ~ 300 μM ザプリナスト存在下で、精子をP15 で前処理し、2分後に卵ゼリーによって先体反応を誘起した (図 2-5)。その結果、1 ~ 3 μM IBMXまたは5 ~ 30 μM ザプリナスト存在下では、P15 前処理をおこなっても、精子は卵ゼリーに応答して先体反応を起こすことが示された。この時、PDE阻害剤を用いなかった場合 (100% コントロール) と比較して、有意な差が見られた。精製されたPDE5 を阻害する場合、IBMXのIC₅₀値は5-10 μM 程度で、zaprinastのIC₅₀値は200-400 nM程度である (Corbin and Francis, 1999; Wang et al., 2001)。しかし、生きた細胞内のPDEを十分に阻害する場合、数 μM から数百 μM 程度の濃度を用いるのが一般的であるため、本研究では、このような濃度域の阻害剤を用いた。また、zaprinastの方がIBMXよりも高濃度必要であったことは、IBMXの脂溶性がzaprinastに比べて遥かに高く、精子内への浸透量がIBMXの方が多かったためだと予想される。一方、1 ~ 300 μM EHNA、1 ~ 300 μM ミリノンまたは0.1 ~ 100 μM ビンポセチンではP15 前処理効果をキャンセルすることはなかった (図 2-6)。

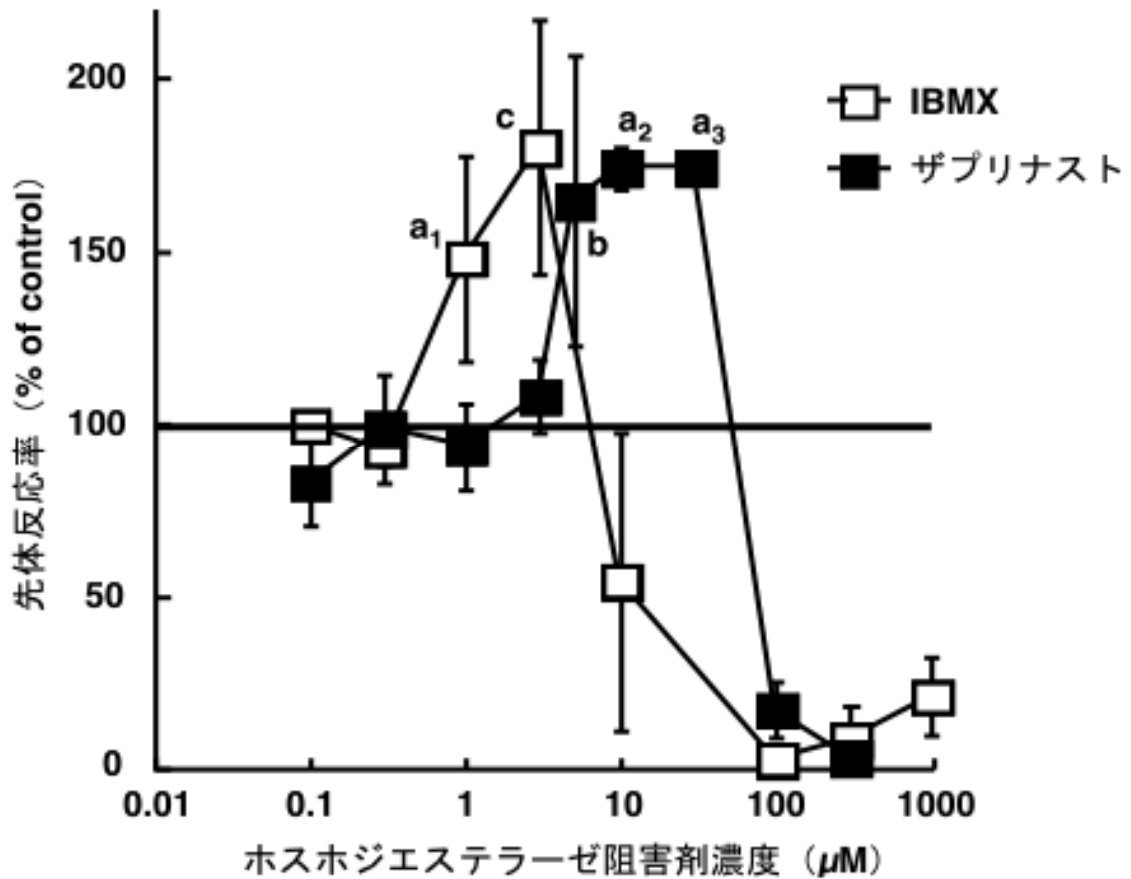


図 2-5 P15 前処理精子に対する PDE 阻害剤の影響 1

1 μM P15 および各濃度の PDE 阻害剤 (IBMX または ザプリナスト) を含んだ人工海水中で 2 分間前処理した後、精子を 0.1 mg sugar/ml 卵ゼリーを含んだ人工海水に移した時の先体反応率をもとめた。PDE 阻害剤無しの条件で P15 前処理を行ない、卵ゼリーを含んだ人工海水中で先体反応を誘起した時の値を 100% とした。2 回以上の独立した実験の平均値 ± 標準偏差を示した。コントロールと有意な差を示した点に印を付けた : a₁ (n = 9), a₂ (n = 3), a₃ (n = 2) P < 0.001、b (n = 6) P < 0.01、c (n = 2) P < 0.1。

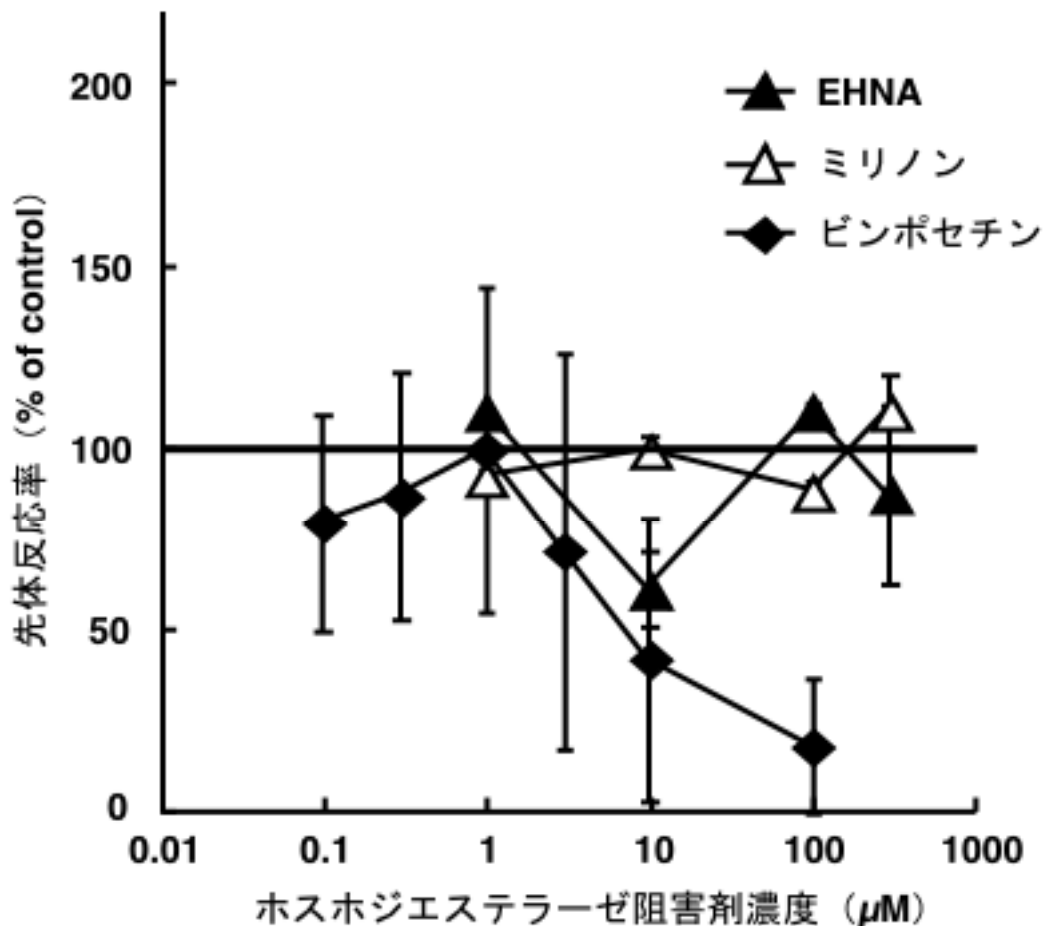


図 2-6 P15 前処理精子に対する PDE 阻害剤の影響 2

1 μM P15 および各濃度の PDE 阻害剤 (EHNA、ミリノンまたはピンポセチン) を含んだ人工海水中で 2 分間前処理した後、精子を 0.1 mg sugar/ml 卵ゼリーを含んだ人工海水に移した時の先体反応率をもとめた。PDE 阻害剤無しの条件で P15 前処理を行ない、卵ゼリーを含んだ人工海水中で先体反応を誘起した時の値を 100% とした。2 回以上の独立した実験の平均値 ± 標準偏差を示した。

2-7 ホスホジエステラーゼ阻害剤による asterosap シグナルの維持

P15 による先体反応誘起に関わる細胞内シグナル伝達は急速に減衰するが、この減衰を抑えることで、**IBMX** やザプリナストは精子の卵ゼリーに対する感受性を維持したと考えられる。もし、このことが正しいならば、**IBMX** やザプリナスト存在下で P15 前処理を行なうと、その後、**ARIS** 単独によっても先体反応が誘起されるはずである。

これらの阻害剤存在下で P15 前処理を行なうと、**ARIS** 単独での先体反応が起こりやすくなった (図 2-7、**ARIS** +)。この時、阻害剤を用いなかった条件 (コントロール) と比較して、有意な差が見られた。しかも、阻害剤存在下で P15 前処理処理を行なっても先体反応は起こらないし (人工海水)、これらの阻害剤は **ARIS**、P15 混合物や卵ゼリーによる先体反応を促進することもなかった (**ARIS** + P15、卵ゼリー)。これらの PDE 阻害剤は非特異的に先体反応を起こり易くするわけではなく、P15 の細胞内シグナル伝達が減衰するのを抑え、**ARIS** との協調作用が起きる細胞内環境を維持することが示唆された。

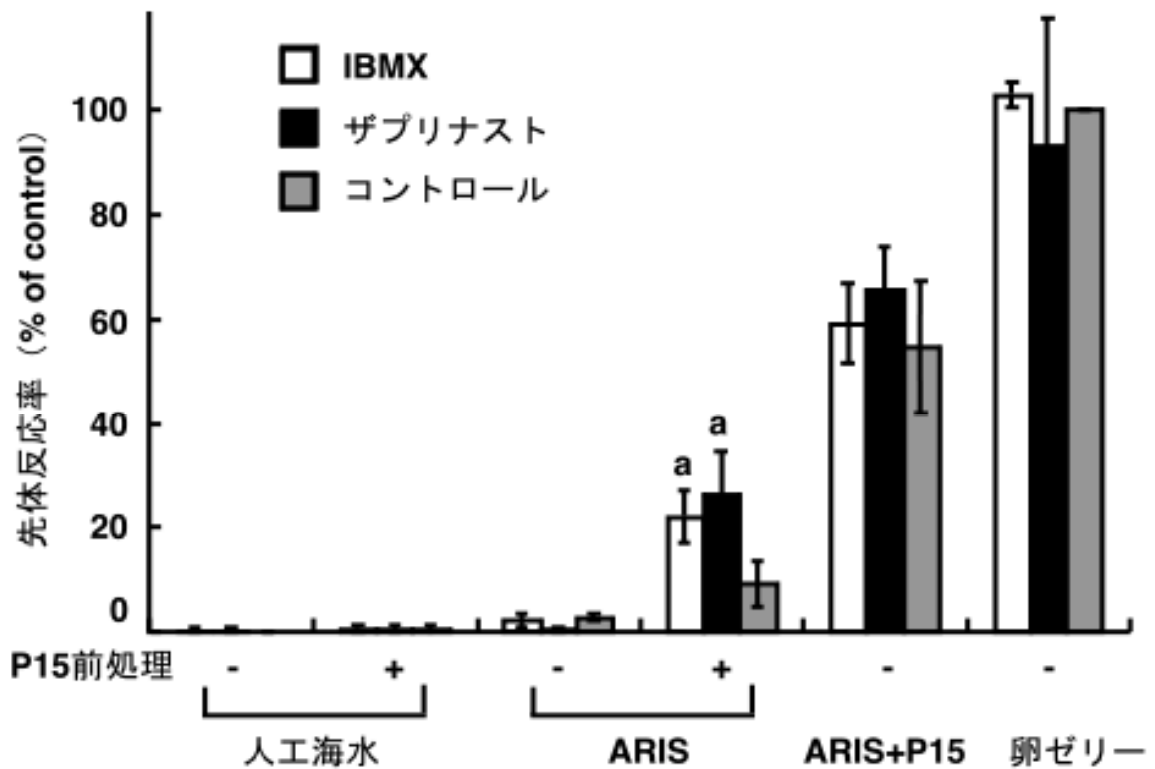


図 2-7 PDE 阻害剤による P15 の効果の持続

人工海水 (-) または P15 を含む人工海水 (+) で 2 分間前処理した精子を、それぞれ、人工海水 (人工海水)、ARIS を含む人工海水 (ARIS)、ARIS と P15 両方を含む人工海水 (ARIS + P15)、卵ゼリーを含む人工海水 (卵ゼリー) に移した時の先体反応率をもとめた (■)。この時の「P15 前処理 -」かつ「卵ゼリー」の条件を 100% コントロールとした。1 μ M IBMX 存在下で前処理を行なった場合を□、5 μ M ザプリナスト存在下の場合を■で示した。なお、卵ゼリーおよび ARIS は 0.1 mg sugar/ml、P15 は 1 μ M で使用した。3 回以上の独立した実験の平均値 \pm 標準偏差を示し、コントロールと有意な差を示した点に印を付けた : a (n = 6) P < 0.001。

2-8 細胞内 cGMP 濃度へのホスホジエステラーゼ阻害剤の影響

IBMXやザプリナストが実際に[cGMP]_iの分解を抑えているのか確認するため、これらの薬剤存在下でP15 処理を行なった際の[cGMP]_i、[cAMP]_i、[Ca²⁺]_iの変化を測定した。

3 μM IBMXまたは 30 μMザプリナスト存在下では、P15 による[cGMP]_iの上昇が著しく増幅され、P15 処理後 2 分が経過しても、コントロール実験のP15 処理 5 秒後より高濃度に[cGMP]_iが保たれていた (図 2-8A)。一方、[cAMP]_iはP15 処理後の上昇が多少増幅されたが、2 分経過するとコントロールとの差が見られなくなった (図 2-8B)。このことは、IBMXやザプリナストがcGMP選択性の高いホスホジエステラーゼに作用していることを示唆している。[Ca²⁺]_iは[cAMP]_iではなく、[cGMP]_iによる制御を受けることが示されているが、やはり、[cGMP]_iと同様に増幅され、2 分程度の間はコントロールと比べて高いレベルを保っていた (図 2-9, Matsumoto *et al.*, 2003)。しかし、2 回目のP15 処理では[Ca²⁺]_iの変化が起こらなかったことから、IBMXやザプリナストが存在していても、精子はP15 感受性を失っていることがわかった。

以上のすべての結果から、精子をP15 で前処理すると、[cGMP]_iの上昇が起こらなくなるため、先体反応が起こらなくなることが示唆された。P15 前処理効果の機構を図示すると、図 2-10 のようなモデルになる。この結論を言い換えると、P15 がcGMPを介しておよぼす精子内の変化は、それだけでは精子の先体反応を誘起しないが、卵ゼリーに応答して精子が先体反応を起こすために必要であると言える。すなわち、asterosapは卵ゼリーによる先体反応誘起に非常に重要であることが示唆される。

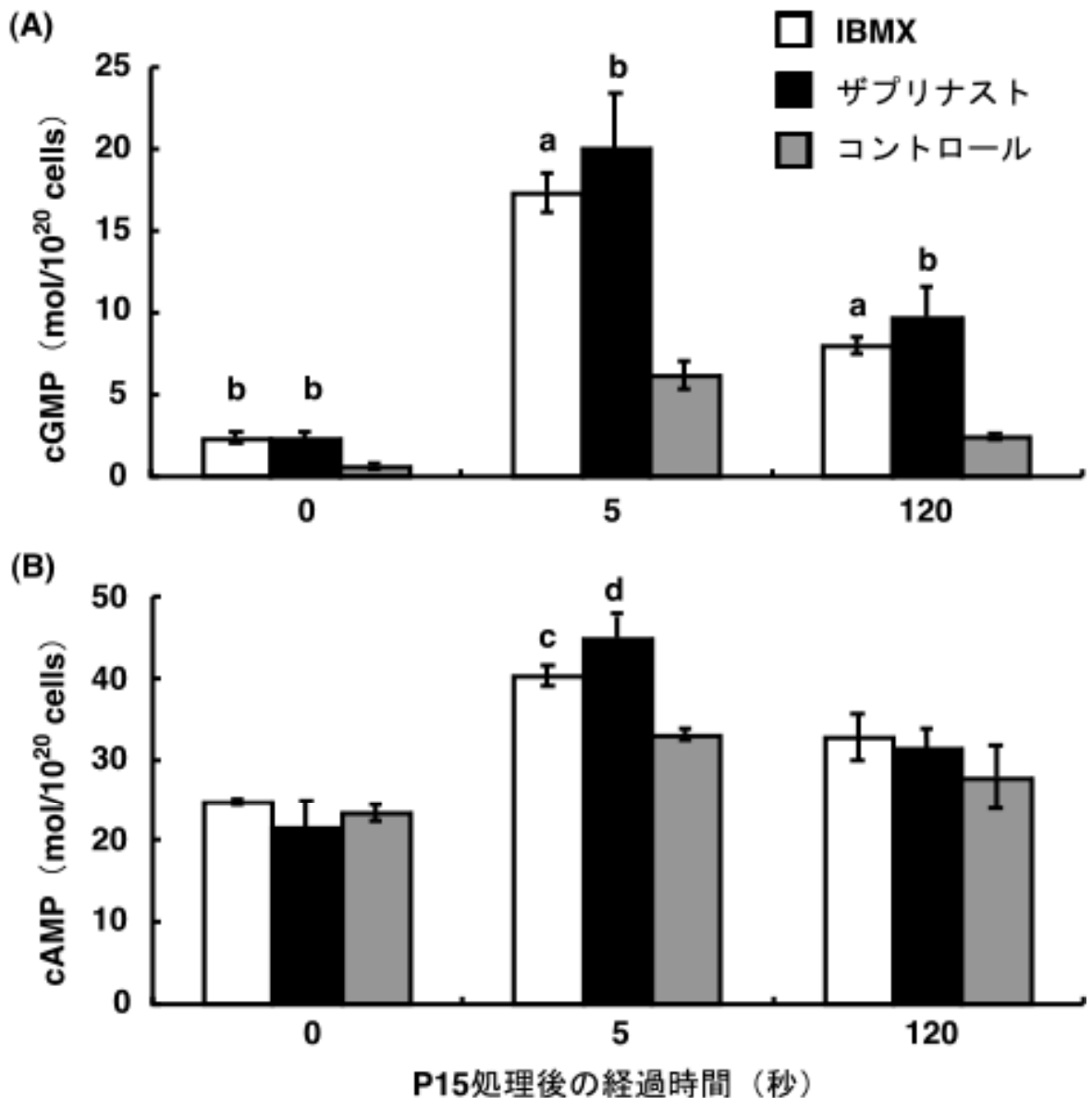


図 2-8 [cGMP]_iおよび[cAMP]_i変化に対するPDE阻害剤の影響

3 μM IBMX (□)、30 μMザプリナスト (■) を含む人工海水、またはそのどちらも含まない人工海水 (■) に精子を懸濁し、1 μM P15 で処理した際の[cGMP]_i (A) または[cAMP]_i (B) 変化を測定した。「時間 0 秒」は精子懸濁液にP15 を添加する直前の値をとった。3 回 (A) または 2 回 (B) の独立した実験の平均値±標準偏差を示し、コントロールと有意な差を示した点に印を付けた:a P<0.001、b P<0.01、c P<0.02、d P<0.05。

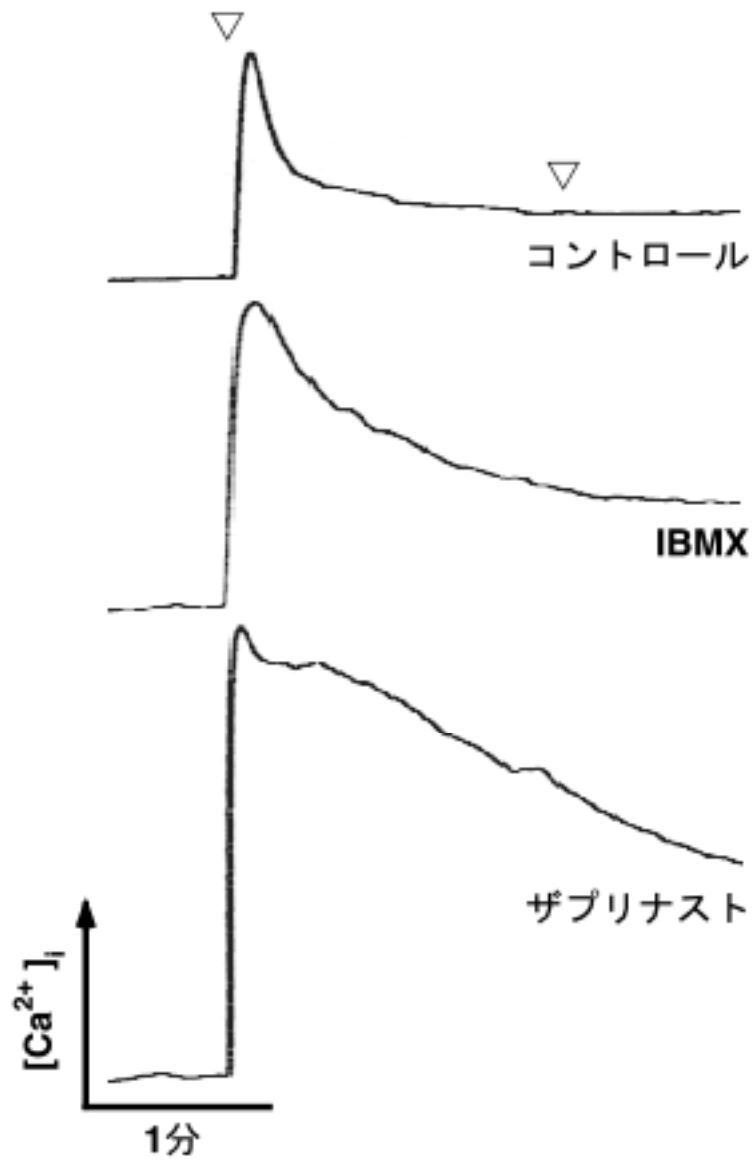


図 2-9 $[Ca^{2+}]_i$ の変化に対する PDE 阻害剤の影響

3 μM IBMX、30 μM ザプリナストを含む人工海水、またはそのどちらも含まない人工海水に精子を懸濁し、1 μM P15 で、2 分間隔で 2 回処理した時の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を検出した。▽は P15 を添加した時間を示している。3 回の実験の典型的なトレースを示した。

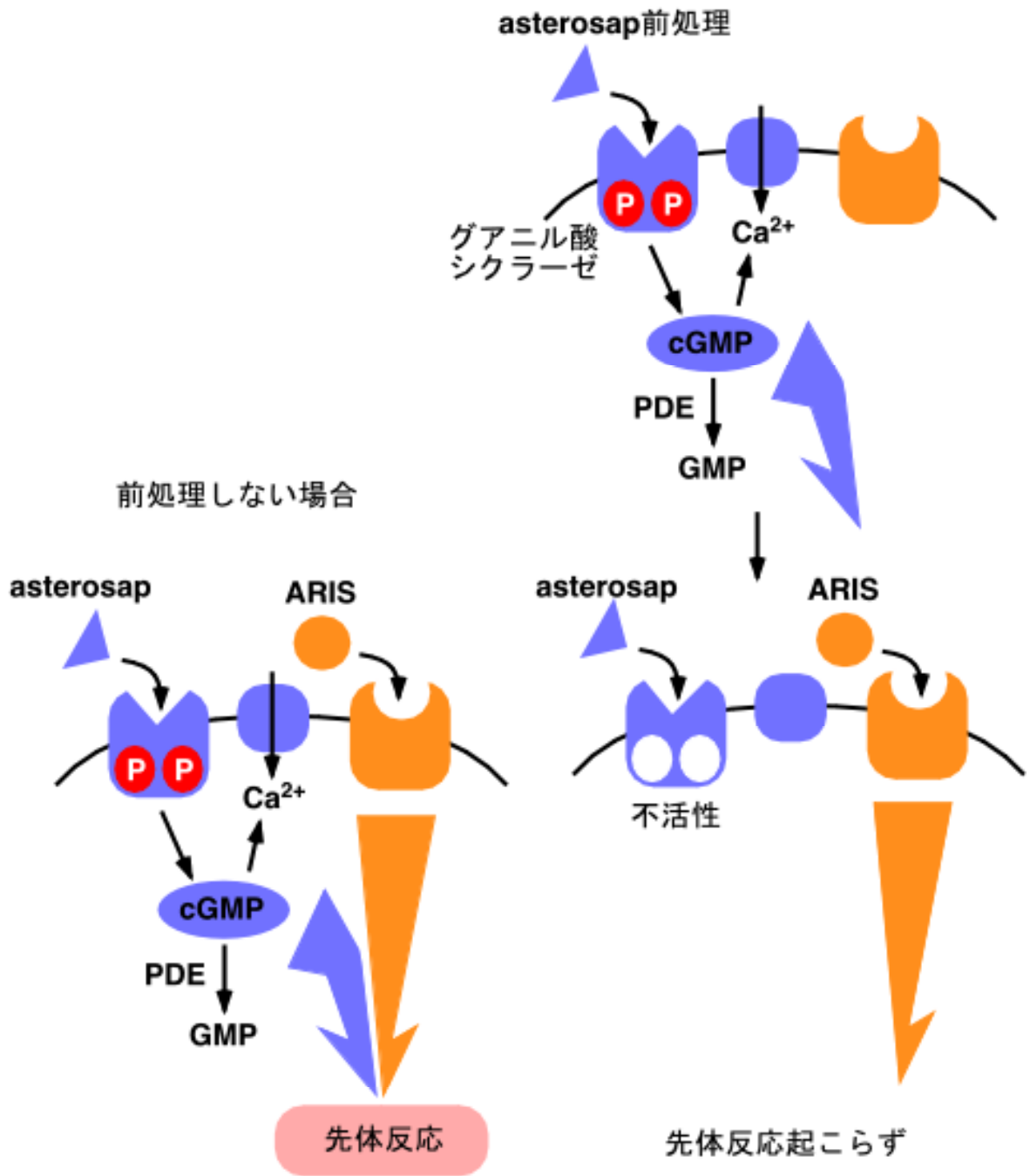


図 2-10 asterosap 前処理効果のモデル

前処理をしない場合は、ARISおよびasterosapが協調的に作用して先体反応を誘起する。一方、asterosap前処理を行なうと、 $[cGMP]_i$ および $[Ca^{2+}]_i$ が急激に上昇するが、その変化はすぐに減衰してしまう。その後、精子のasterosap感受性は失われ、ARISとasterosapによる先体反応は起こらない。

2-9 cGMP 結合タンパク質の探索

[cGMP]_iの上昇が先体反応に重要であることが示唆されたため、cGMPのターゲット分子に興味を持たれる。そこで、cGMPビーズを用いて、精子抽出液からcGMP結合タンパク質の探索を行なった。

43 kD のタンパク質が cGMP ビーズに結合することが示された (図 2-11A)。しかも、精子抽出液に多量の cGMP を加えると、このバンドは現れなかった (図 2-11B)。このことから、43 kD タンパク質は cGMP と特異的に結合していることが示された。

次に、43 kD タンパク質の正体を知るため、アミノ酸配列の決定を行なった。SDS-PAGE 後、このタンパク質のバンドを切り出し、ゲル中でヒドロキシラミンによって処理した。すると、25kD、29kD の断片が得られたため、これを PVDF 膜に転写し北海道大学機器分析センターに送り、N 末端配列の決定を依頼した (図 2-12)。それぞれ、20、22 アミノ酸残基を決定することができ、配列は以下のようになった。

25kD : SIEIPSGLTDLLQDFTVAVL

29kD : GNKVGAYNNTGSGFELALMYNT

この配列を用いて、Blast 検索を行なったところ、cAMP-dependent protein kinase (PKA) type II regulatory subunit (バフンウニ) にホモロジーが非常に高いことが分かった (Hoshino *et al.*, 1997)。この 43 kD タンパク質が、本当に PKA regulatory subunit であるのか、本当に cGMP の上昇により活性化されているのか、などは今後の研究で明らかにするべき重要な問題である。

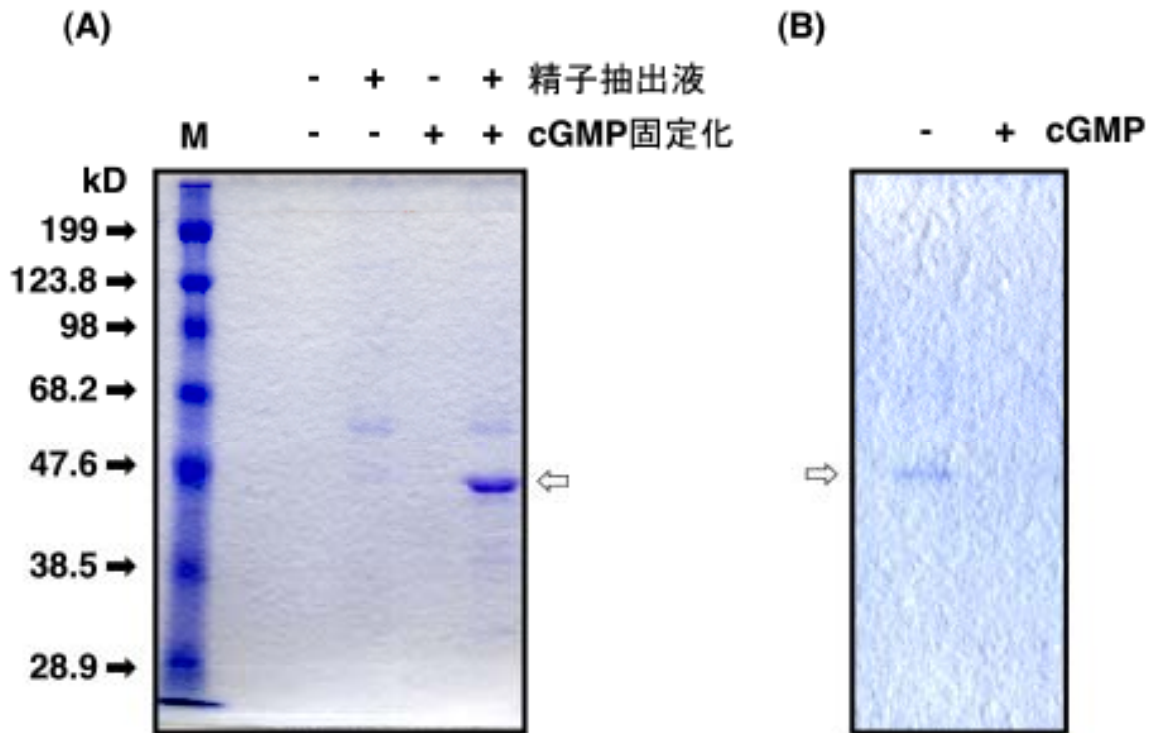


図 2-11 cGMP 結合タンパク質の探索

(A) 精子抽出液中に存在する cGMP 結合タンパク質 (♁) を cGMP ビーズによって精製した。「精子抽出液」の「+」では精子抽出液、「-」では可溶化溶液のみを用いた。また、cGMP をビーズに固定化した場合を「cGMP 固定化 +」、固定していないものを「cGMP 固定化 -」で表した。「M」には分子量マーカを示した。(B) 可溶化溶液で 10 倍に希釈した精子抽出液から 43 kD タンパク質 (♂) を精製したが、その際、10 倍希釈した精子抽出液に 5 mM cGMP を存在させた場合を「cGMP +」、存在させない場合を「cGMP -」と示し、cGMP 存在下で競合阻害が起こるか確かめた。なお、(A)、(B) とともに CBB 染色によりタンパク質を検出した。

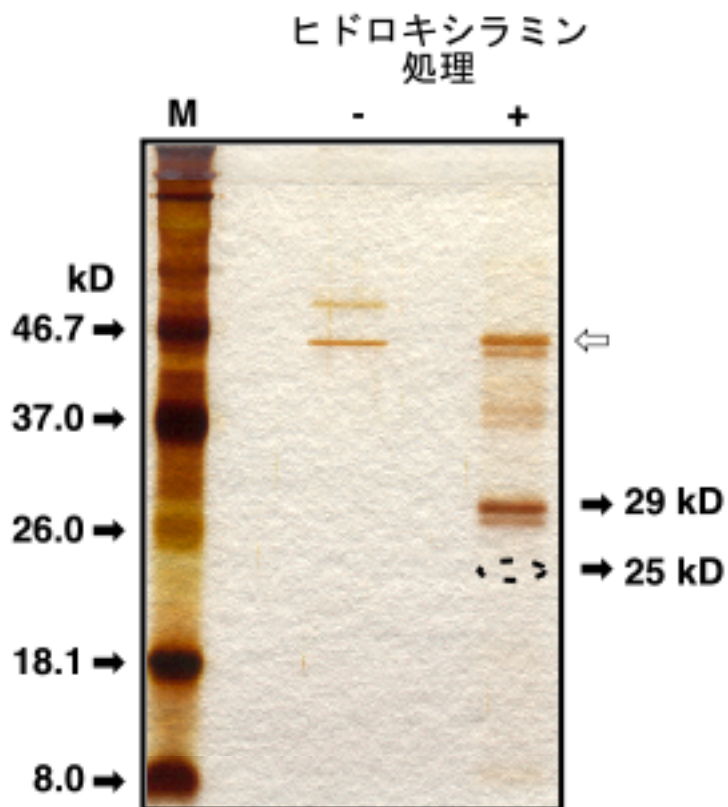


図 2-12 43 kD タンパク質のヒドロキシラミン処理

43 kD タンパク質 (○) をヒドロキシラミンで処理した後 (ヒドロキシラミン処理 +)、タンパク質断片を検出した (29 kD)。破線で囲んだ部分には銀染色では検出されず、CBB 染色では検出されるバンド (25 kD) が存在していた。両染色法による違いは他のバンドにはなかった。「M」には分子量マーカを示した。

2-10 考察

卵ゼリー低分子画分であるフラクションM₈はARISと協調的に精子に作用して先体反応を誘起するが、単独で精子に作用させると、精子の卵ゼリーに対する反応性を低下させる (Matsui *et al.*, 1986a, b)。この相反する効果を担っているのはフラクションM₈に含まれるペプチド性の成分であると考えられてきた (Matsui *et al.*, 1986b, c)。本研究では精子活性化ペプチドとして単離精製されたasterosapがこの一見相反する効果をもたらすことを示した。

しかし、asterosapによる精子の不活性化が生理的にどのような意味をもっているのか明らかではない。ヒトデは生殖シーズンになると、浅瀬に密集して放卵放精することが知られているため、1つの卵に複数の精子が到達する可能性が高い。そのため、ヒトデ特有の多精防止機構が発達してきたのかもしれない。または、精子にとって受精は千載一遇の機会であり、受精に至る過程は一方通行であるため、1回の細胞内シグナル伝達を行なうための用意しか精子は持っていないかもしれない。

asterosapによる[cGMP]_iの上昇は急速かつ一過的である (Matsumoto *et al.*, 2003)。この[cGMP]_i変化のパターンは、グアニル酸シクラーゼの急速な活性化とPDEの強い活性によると思われる。細胞膜型グアニル酸シクラーゼはリン酸化タンパク質で、cGMPの合成を行なうと同時に脱リン酸化によって不活性化されるということが知られている (Ward *et al.*, 1986b; Potter and Garbers, 1992)。しかも、ウニ精子グアニル酸シクラーゼの脱リン酸化はリガンドの作用後 3 秒という短い間に起きることが示されている (Ward *et al.*, 1986a)。本研究では、asterosap作用後、asterosap受容体の見かけの分子量が減少することを示した。この時、asterosap受容体に含まれるリン酸の量が減少することも確認した。このことから、asterosap受容体もリン酸化状態によって活性が制御されていると考えられる。asterosapによる急速かつ一過的な[cGMP]_iの上昇には、グアニル酸シクラーゼの急速な活性化とPDEの強い活性に加え、急速なグアニル酸シクラーゼの不活性化も寄与しているだろう。

しかし、細胞膜型グアニル酸シクラーゼのリン酸化状態およびその調節には、ヒトデとウニで大きな違いがあるかもしれない。キヒトデのasterosap受容体では1分子につき 7.5 ± 1.6 個のリン酸が検出されたが、*A. punctulata*のresact受容体は 17.95 ± 1.24 個であり、バフンウニでは、26 個にも達する (Vaquier and Moy, 1986; Suzuki, 1999)。本研究ではPVDF膜に転写したタンパク質をリン酸の定量に用いたため、アルカリ加水分解が完全に進行していない可能性もあり、今後、リン酸基の数について

ては、さらに詳しく調べる必要がある。また、asterosap受容体の脱リン酸化はオカダ酸によって抑えられたが、バフンウニ精子の場合、speractによる細胞膜型グアニル酸シクラーゼの脱リン酸化はオカダ酸では抑えられないことが示されている (Suzuki, 1999)。ANP受容体は1分子につき6個のリン酸を含み、オカダ酸のターゲットであるプロテインホスファターゼ 2Aによって脱リン酸化されることが*in vitro*で示されている (Potter and Garbers, 1992; Potter and Hunter, 1999b)。これらのことから、asterosap受容体とANP受容体は、似たプロテインホスファターゼを介して制御されている可能性がある。ANP受容体に結合することが報告されているプロテインホスファターゼ 5 (PP5)、ヒートショックプロテイン 90 (HSP90)、p50^{cdc37}などのタンパク質が、ヒト精子にも存在しているか否かは興味深いところである (Chinkers, 1994; Kumar *et al.*, 2001)。

PDE阻害剤は哺乳類の精子に様々な影響を与えるが (Fisch *et al.*, 1998; Ain *et al.*, 1999; Lefièvre *et al.*, 2000)、哺乳類精子には実際にPDE1、3、4が存在していることが示唆されている (Lefièvre *et al.*, 2002)。しかし、cGMPに特異性が高く、ザプリナストに感受性を持つPDE5の存在は示されていない。シルデナフィルもPDE5特異的な阻害剤とされているが、ヒト精子において、PDE5以外のPDEを阻害し、結果的にcAMP上昇を引き起こすという報告がある (Lefièvre *et al.*, 2000)。ヒト精子において、IBMXやザプリナストは[cGMP]_iの分解を阻害し、細胞内シグナル伝達の減衰を抑制することが示唆された。cGMP特異的かつザプリナスト感受性であるPDE、すなわち、PDE5様のPDE活性が精子に存在していることを示唆する初めての例である。今後、このPDEの同定および解析は興味深い課題である。

[cGMP]_iの上昇の大きさや速さは、棘皮動物や哺乳類の中でも様々である。キヒトデでは、1 μM asterosapによって[cGMP]_iが0.4から105 pmol/10⁸ cellsに上昇する (Matsumoto *et al.*, 2003)。*A. punctulata*では、250 nM resactによって1.1から82 pmol/10⁸ cellsになる (Kaupp *et al.*, 2003)。オオバフンウニでは、250 nM speractによって0.07から2.2 pmol/10⁸ cellsになる (Matsumoto *et al.*, 2003)。さらに、ヒト精子では、10 nM ANPによって4.1から7.6 pmol/10⁸ cellsに上昇する (Anderson *et al.*, 1995)。ヒトデとウニの場合では[cGMP]_iは0.4秒でピークに達するが、ヒトの場合には10から30分必要である。これらは測定条件がそれぞれ異なるため、一概に比較することはできないが、これらのペプチド成分が異なる生理活性を持つことは確かであり、[cGMP]_iの変化の相違と生理活性の相違には関係があるかもしれない。resactは精子の走化性を誘起するが、先体反応に関わっているという報告はない

(Ward *et al.*, 1985)。speractは先体反応を促進するが、走化性を誘起するという確かな報告はされていない (Yamaguchi *et al.*, 1987)。asterosapは先体反応を促進すると共に、走化性を誘起する (Nishigaki *et al.*, 1996; Van *et al.*, submitted)。そして、ANPはヒト精子の先体反応と走化性を誘起する (Anderson *et al.*, 1995; Rotem *et al.*, 1998)。今後、single cellのレベルで精子を見て、[cGMP]_iやその他のセカンドメッセンジャーの局所的な変化と精子の振舞いを結び付けるような研究が必要となるだろう。

本研究では、cGMPビーズを作製し、精子抽出液からcGMP結合タンパク質の探索を行なった。結果的にPKA regulatory subunit (PKA-R) に非常に似た分子が精製された。PKAは真核生物の細胞に普遍的に存在し、PKA-RとPKA-C (PKA catalytic subunit) それぞれ 2 分子ずつからなる複合体で、cAMPがPKA-Rに結合すると、PKA-RとPKA-Cが解離し、PKA-Cがターゲット分子をリン酸化する (Taylor *et al.*, 1990)。cAMPのPKAに対する親和性はcGMPよりも数十倍高いといわれているが、これは逆にcGMPが高濃度に存在すれば、PKAが活性化されることを意味している (Jiang *et al.*, 1992)。実際に、astersoapは[cGMP]_iや[cAMP]_iを上昇させるが、[cGMP]_iがピークに達するasterosap処理 0.4 秒後には、cGMPはcAMPの 20 倍以上の濃度である (Matsumoto *et al.*, 2003)。このことから、cGMPを介してPKAの活性化が起きる可能性もあるし、cGMPおよびcAMPが協調的にPKAを活性化しているのかも知れない。PKAが哺乳類精子の鞭毛に存在することや、PKAが精子の運動性の制御に関わっていることはすでに示されている (Garbers and Kopf, 1980; Horowitz *et al.*, 1984; Tash, 1989)。今後、ヒト精子においてもPKAが先体反応や運動性へ関与しているのか、また、どのようにPKA活性が調節されているのか、などを調べていくことが必要である。

asterosap前処理効果の生理的な意味は明らかではない。しかし、この特異な現象を解析したところ、図 2-10 に示したようにasterosapによる[cGMP]_iの上昇が先体反応に必要であることが示唆された。今後、他の種においても、補助因子の重要性について解析が進むことが期待される。

第3章 ARIS と asterosap による協調的先体反応誘起機構

3-1 緒言

前章において、asterosap前処理により精子のasterosap感受性を失わせると、卵ゼリーを用いても精子の先体反応を引き起こせなくなることが示された。これは、卵ゼリーによる先体反応誘起にasterosapが重要な働きをしていることを意味しており、卵ゼリーに抗asterosap抗体を混ぜると、先体反応誘起活性が著しく落ちるといった結果と良く一致している (Nishigaki *et al.*, 1996)。さらに、 $[cGMP]_i$ の上昇がasterosapの活性を担っていることが示唆された。

卵ゼリー成分の中でもARISとasterosapは特に重要な因子である。しかし、ARISの細胞内シグナル伝達について知見はない。また、asterosapは $[cGMP]_i$ の上昇および V_m の変化、 pH_i 、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を引き起こすが、どの要素が先体反応誘起に寄与しているのか明らかではない。本章では、 $[Ca^{2+}]_i$ および pH_i の挙動を手がかりとして、ARISとasterosapによる協調的な先体反応誘起機構を解析した。

3-2 ARIS、asterosap併用による細胞内 Ca^{2+} 濃度の持続的上昇

ARIS、P15 混合物で精子を処理すると先体反応が起きるが、fluo-4 を導入した精子を用いて、 $[Ca^{2+}]_i$ にどのような変化が起こるのか検討した (図 3-1)。

ARISではわずかな $[Ca^{2+}]_i$ の上昇、P15 では一過的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が見られた。ここでは、ARIS単独で精子に起こる変化が初めて検出された。一方、ARIS、P15 混合物では、一過的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇の後、持続的に $[Ca^{2+}]_i$ が上昇し、同時に先体反応も誘起された。このことから、ARISとP15 が同時に作用すると、それら単独の作用では働かない別の機構が活性化され、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇および先体反応を誘起していることが示唆された。

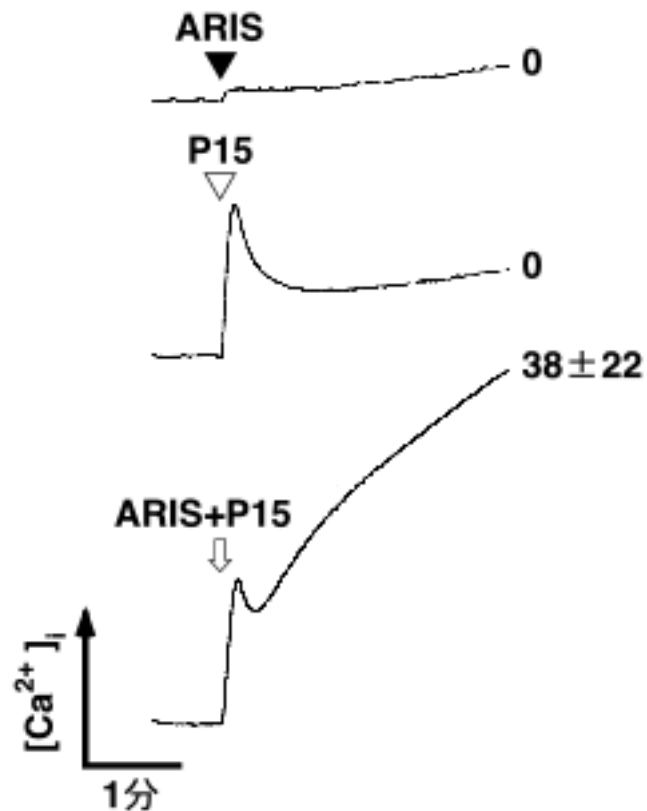


図 3-1 ARISとP15 の同時処理による精子の $[Ca^{2+}]_i$ 変化

精子をARIS (▼)、P15 (▽) またはその両方 (◊) で処理した時の $[Ca^{2+}]_i$ 変化を示した。各曲線の右端に示された数字は測定終了時の先体反応率 (%) を表している。なお、ARISは $10 \mu\text{g sugar/ml}$ 、P15 は $1 \mu\text{M}$ で使用した。3 回の独立した実験を行ない、典型的なトレースおよび先体反応率の平均値 \pm 標準偏差を示した。

3-3 ARIS、asterosap の相互非依存的な細胞内シグナル伝達

図 3-2A に示したように、ARIS と asterosap で同時に精子を処理すると、 $[Ca^{2+}]_i$ の一過的な上昇と、それに続く持続的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇および先体反応が引き起こされた。ARIS と asterosap は同時に作用すれば、精子の先体反応を引き起こすが、ARIS または asterosap で前処理した精子は不活性化されてしまう（前処理効果、Matsui *et al.*, 1986b, c）。このことから、自然条件では、asterosap や ARIS の作用をタイミング良く受けた精子のみが先体反応を起こすと考えられる。そこで、ARIS と asterosap を様々な組み合わせで、間隔をおいて処理した時に、精子の $[Ca^{2+}]_i$ はどのように変化するのか検討した。

P15 で精子を処理すると、一過的な $[Ca^{2+}]_i$ スパイクが見られたが、2 分後に 2 回目の P15 処理を行なっても、全く変化は起こらなかった（図 3-2B）。ARIS で精子を処理すると、 $[Ca^{2+}]_i$ がわずかに上昇したが、2 回目の ARIS 処理ではこの変化は起こらなかった（図 3-2C）。さらに、P15 処理 2 分後に ARIS で処理、または ARIS 処理 2 分後に P15 処理を行なったが、ARIS と P15 による $[Ca^{2+}]_i$ の変化は互いに影響を受けず、いずれの順に処理しても、2 分間の間隔があると先体反応はあまり起こらなかった（図 3-2C, E）。

ARIS と P15 は単独でそれぞれ $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させるが、同時に作用した時だけ持続的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を起こした。また、ARIS と P15 は互いに影響を与えない $[Ca^{2+}]_i$ 上昇機構を持っていることが示された。さらに、ARIS 処理後に ARIS でもう 1 回処理すると、 $[Ca^{2+}]_i$ が上昇しなかったことから、ARIS 前処理効果も asterosap 前処理効果と同様な機構であることが予測される。しかし、これが事実であるかは今後の検討を待ちたい。

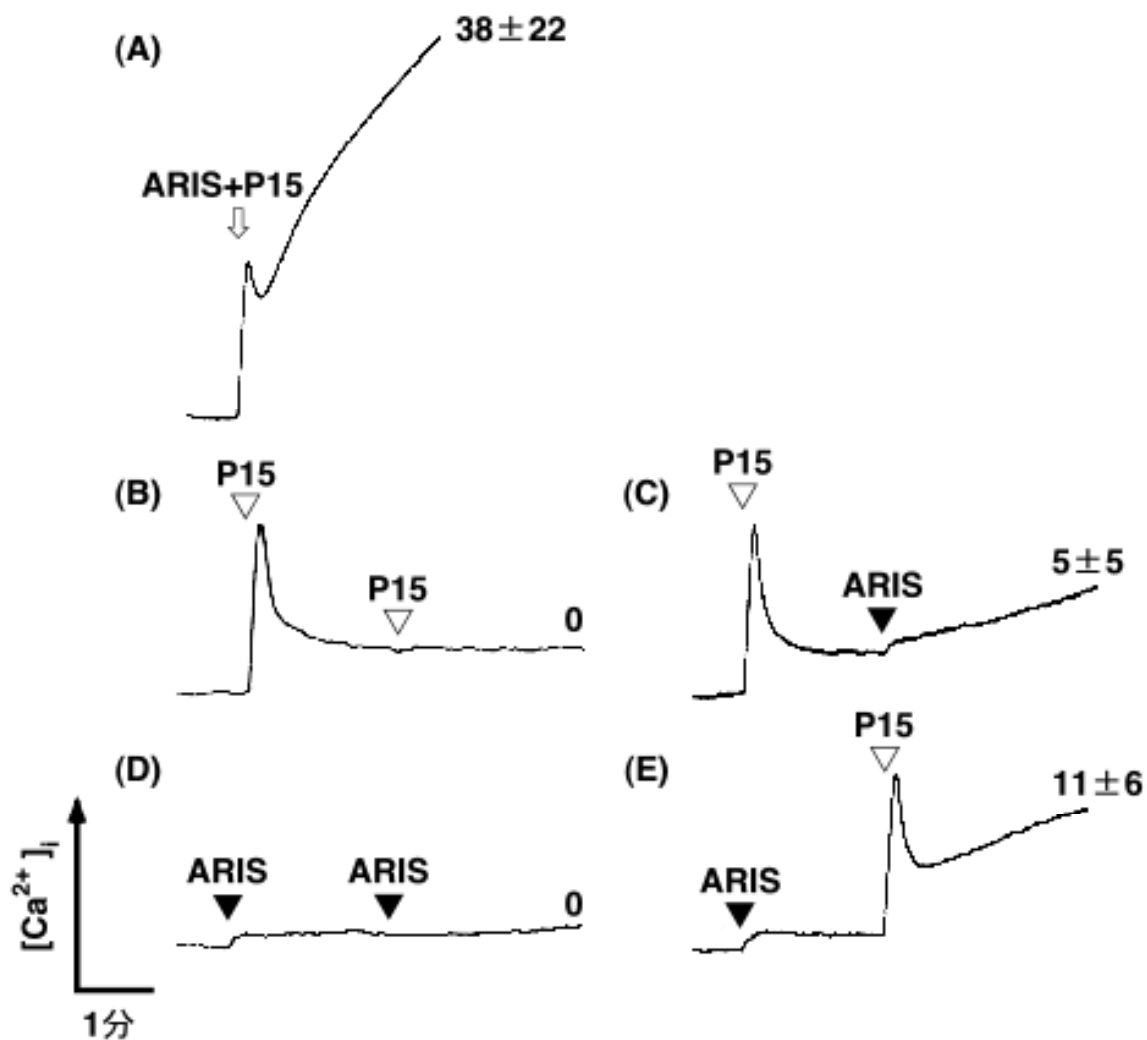


図 3-2 ARISとP15 で時間差をおいて処理した時の精子の $[Ca^{2+}]_i$ 変化

精子をARISとP15の混合物(◻)、ARIS(▼)またはP15(▽)で処理した時の $[Ca^{2+}]_i$ 変化を示した。(B)から(E)では、すべて2分間隔で2回の処理を行なった。各曲線の右端に示された数字は測定終了時の先体反応率(%)を表している。なお、ARISは $10 \mu\text{g sugar/ml}$ 、P15は $1 \mu\text{M}$ で使用した。3回の独立した実験を行ない、典型的なトレースおよび先体反応率の平均値±標準偏差を示した。

3-4 先体反応における細胞外Ca²⁺の重要性

ARIS、P15 混合物によって引き起こされる[Ca²⁺]_i変化において、細胞外Ca²⁺が必要であるか検討するため、Ca²⁺のキレート剤EGTAを様々なタイミングで精子懸濁液に加え、[Ca²⁺]_iおよび先体反応への影響を調べた。

ARIS、P15 混合物添加後、十分に[Ca²⁺]_iが上昇した時にEGTAを加えると、急激に[Ca²⁺]_iが下降し、その後、上昇は起こらなかった(図 3-3 上段)。しかし、EGTA添加以前に先体反応は起こっているため、十分な先体反応率が得られた。EGTA添加後、急激に[Ca²⁺]_iが低下したのは、海水中のCa²⁺が急速にキレートされて、細胞内外のCa²⁺のバランスが崩れたためだと考えられる。一方、[Ca²⁺]_iのスパイクが起きた直後にEGTAを添加したところ、持続的な[Ca²⁺]_iの上昇も先体反応も著しく抑えられた(図 3-3 中段)。さらに、ARIS、P15 混合物の前にEGTAを添加すると、[Ca²⁺]_iのスパイクも持続的上昇も抑えられ、先体反応も全く起こらなかった(図 3-3 下段)。

いずれの[Ca²⁺]_i変化においても、細胞外Ca²⁺は重要であることが示唆された。また、最初に起きる[Ca²⁺]_iのスパイクだけでは先体反応は起こらず、持続的な[Ca²⁺]_iの上昇に伴って先体反応が起きることが示された。

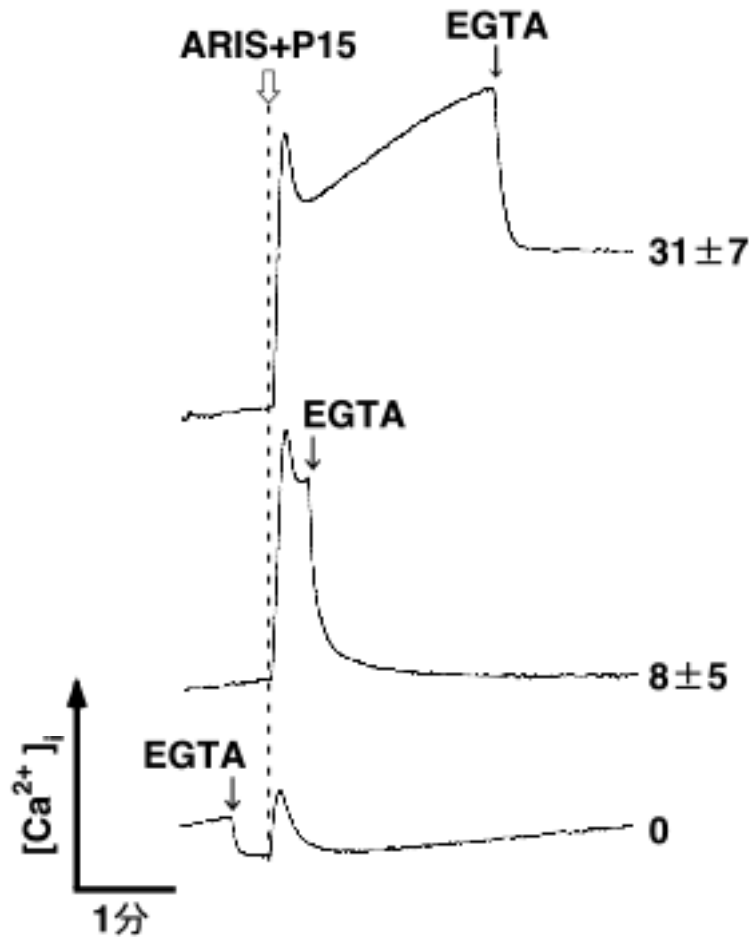


図 3-3 持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇および先体反応に対するEGTAの影響

精子をARIS、P15の混合物で処理する際(◇)、11 mM EGTAを様々な時間に添加して細胞外 Ca^{2+} 濃度を減少させた(↓)。上段ではARISとP15を添加した3分後、中段ではARISとP15を添加した30秒後、下段ではARISとP15を添加する30秒前にEGTAを加え、 $[Ca^{2+}]_i$ と先体反応に対する影響を調べた。各曲線の右端に示された数字は測定終了時の先体反応率(%)を表している。なお、ARISは10 μ g sugar/ml、P15は1 μ Mで使用した。3回の独立した実験を行ない、典型的なトレースおよび先体反応率の平均値±標準偏差を示した。

3-5 先体反応における SOC 様チャネルの重要性

ウニや哺乳類では、SOCの活性化が先体反応の引き金となっていると言われている。そこで、ヒトデにおいてもSOC様のチャネルが働いているのか検討した。ここで用いたSKF96365 およびNi²⁺は比較的SOCに選択的な阻害剤であることが知られている (Leung and Kwan, 1999; González-Martínez *et al.*, 2001)。

SKF96365 をそれぞれ 0、5、15 μM 含んだ人工海水に精子を懸濁し、ARISを添加して[Ca²⁺]_iの上昇が起こるのか検討したところ、ARISによる[Ca²⁺]_iの上昇はSKF96365 5 ~ 15 μMで抑えられた(図 3-4A)。この時、IC₅₀値が約 8.2 μMであった。しかし、SKF96365 をそれぞれ 0、5、15 μM 含んだ人工海水に精子を懸濁し、ARIS、P15 混合物を添加した場合、5 μMより低濃度で[Ca²⁺]_iの持続的上昇は抑えられた(図 3-4B)。この時のIC₅₀値は約 2.2 μMであった。また、50 ~ 500 μM Ni²⁺を含んだ人工海水中では、ARISによる[Ca²⁺]_iの上昇が抑えられたが、50 μMよりも低濃度のNi²⁺で、ARISとP15 による[Ca²⁺]_iの持続的上昇は著しく抑えられた(図 3-5)。この時、前者のIC₅₀値が約 400 μMであったのに対して、後者は約 36 μMであった。なお、持続的な[Ca²⁺]_iの上昇が阻害されると、先体反応も同じように阻害された。一方、P15 によって起こる[Ca²⁺]_iのスパイクはこれらの阻害剤によってほとんど影響を受けなかった(図 3-6)。

このように、ARIS、P15 混合物による持続的な[Ca²⁺]_iの上昇は、SKF96365 およびNi²⁺に対して高感受性であった。このことから、ARIS単独またはP15 単独の処理によって起きる[Ca²⁺]_iの上昇機構とARISおよびP15 の協調作用によって活性化される[Ca²⁺]_i上昇機構が別々に存在していると考えられる。しかも、後者の場合、SOC 様のチャネルが働いていることが示唆された。

以上のことを整理すると図 3-7 のようなモデルになる。ARISは小さな[Ca²⁺]_iの上昇を起こし(図 3-7 橙色)、asterosapは一過的に[cGMP]_iおよび[Ca²⁺]_iを上昇させる(図 3-7 青色)。しかし、ARISとasterosapの作用が同時にもたらされると、SKF96365 やNi²⁺に感受性の高いSOC様チャネルを介した[Ca²⁺]_i上昇機構が活性化され(図 3-7 黄色)、持続的な上昇および先体反応が引き起こされる。

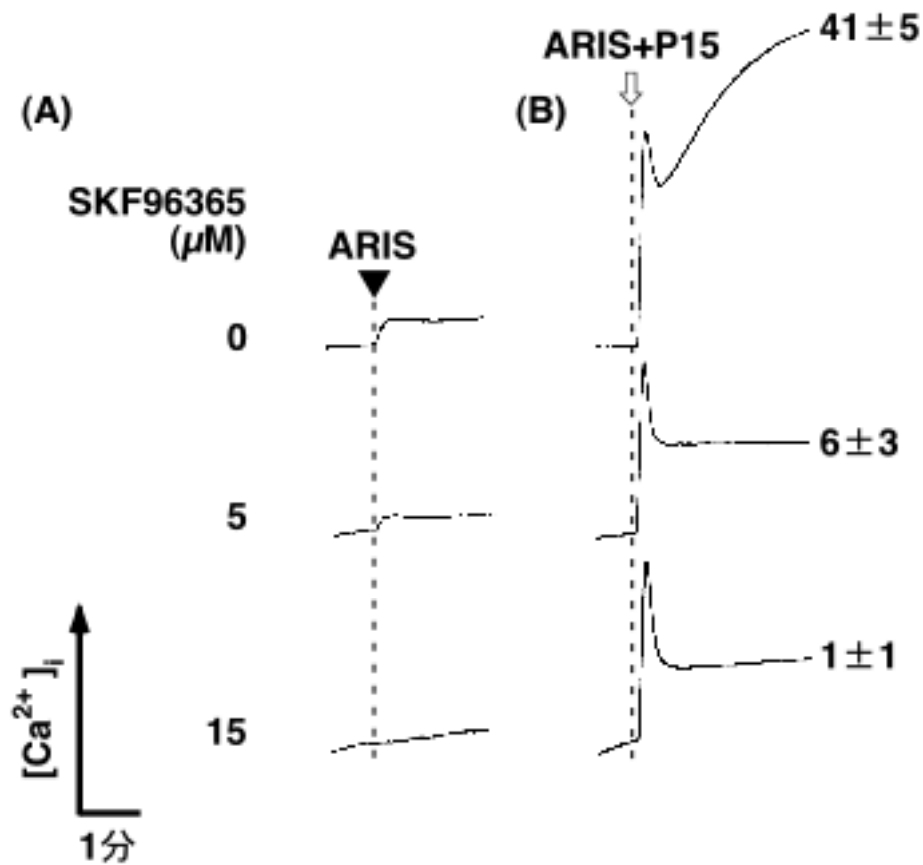


図 3-4 $[Ca^{2+}]_i$ 変化および先体反応に対するSKF96365 の影響

SKF96365 0 ~ 15 μ Mを含む人工海水中に精子を懸濁し、ARIS (▼) またはARIS、P15 混合物 (▽) で処理した時の $[Ca^{2+}]_i$ 変化と先体反応率を示した。各曲線の右端に示された数字は測定終了時の先体反応率 (%) を表している。なお、ARISは 10 μ g sugar/ml、P15 は 1 μ Mで使用した。3回の独立した実験を行ない、典型的なトレースおよび先体反応率の平均値 \pm 標準偏差を示した。

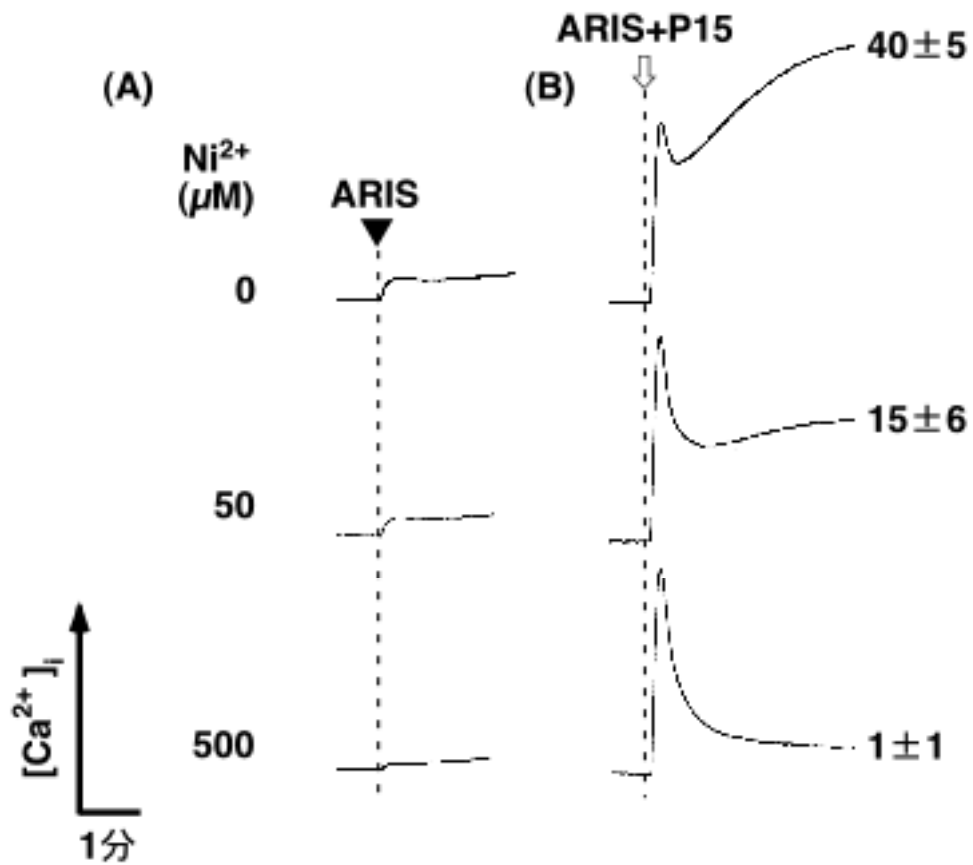


図 3-5 $[Ca^{2+}]_i$ 変化および先体反応に対する Ni^{2+} の影響

Ni^{2+} 0 ~ 500 μM を含む人工海水中に精子を懸濁し、ARIS (▼) またはARIS、P15 混合物 (▽) で処理した時の $[Ca^{2+}]_i$ 変化と先体反応率を示した。各曲線の右端に示された数字は測定終了時の先体反応率 (%) を表している。なお、ARISは 10 μg sugar/ml、P15 は 1 μM で使用した。3回の独立した実験を行ない、典型的なトレースおよび先体反応率の平均値 \pm 標準偏差を示した。

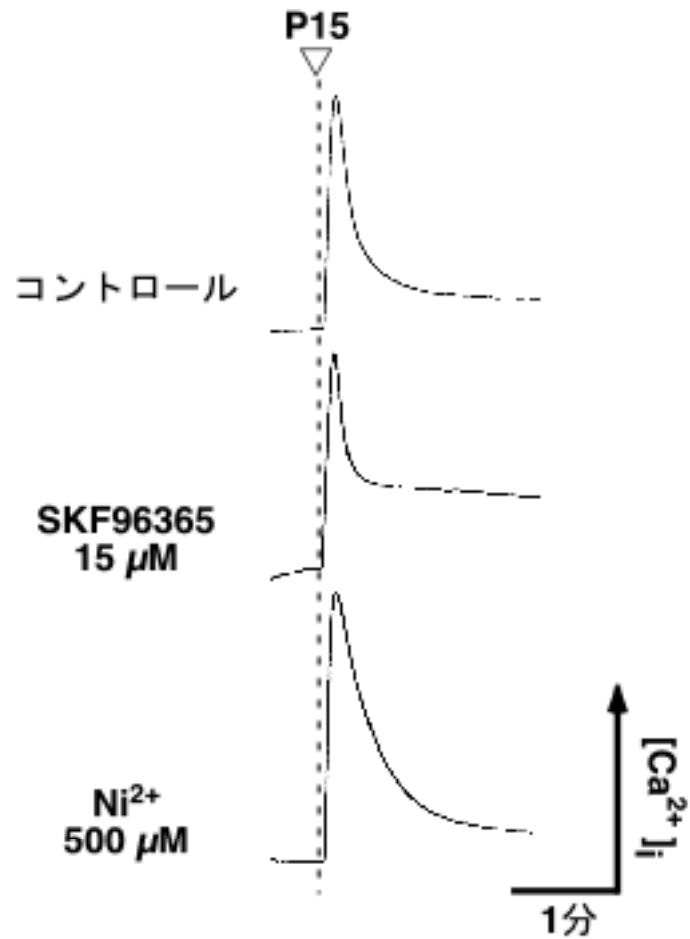


図 3-6 P15 による $[Ca^{2+}]_i$ 変化に対するSOC阻害剤の影響

15 μM SKF96365 または 500 μM Ni^{2+} を含む人工海水中に精子を懸濁し、P15 で処理した時 (∇) の $[Ca^{2+}]_i$ 変化を示した。コントロール実験は何も含まない人工海水で行なった。P15 は 1 μM で使用し、3 回の独立した実験の典型的なトレースを示した。

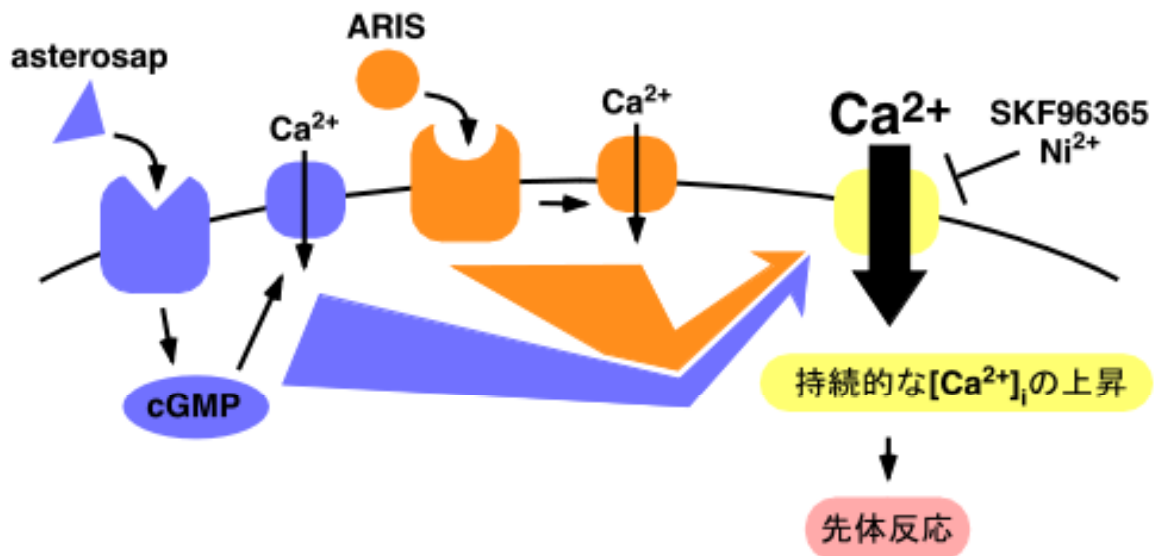


図 3-7 ARIS と asterosap による協調的な先体反応誘起モデル 1

ARISおよびasterosapはそれぞれ単独で $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させる（橙色および青色）。しかし、それらが同時に精子に作用すると、SKF96365 や Ni^{2+} に感受性の高いSOC様のチャンネルを介して Ca^{2+} を流入させる（黄色）。その結果、持続的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が起こり、先体反応が誘起される。

3-6 ストアCa²⁺の減少による先体反応誘起

以上の結果から、キヒトデ精子の先体反応においてもSOC様チャネルの重要性が示唆された。本当にSOCが関与しているとする、細胞内Ca²⁺ストアのCa²⁺（ストアCa²⁺）を人為的に減少させれば、先体反応が起こるはずである。もしそうであるならば、細胞内ストアにCa²⁺を蓄積させるためのポンプとして働くCa²⁺-ATPaseをCPA（cyclopiazonic acid）によって阻害すれば、ストアCa²⁺を減少させるので、先体反応が誘起されると考えられる。

精子を人工海水に懸濁し、CPAを含んだ人工海水に移して先体反応が起こるか調べた。しかし、CPA濃度を200 μMまで上げても、先体反応はほとんど起こらなかった（図 3-8）。しかし、ARISとCPAとを併用すると、先体反応が効率良く引き起こされた。したがって、ストアCa²⁺の減少は先体反応誘起に必要であるが、そのみでは先体反応に至らないと予想される。

なぜCPAが単独で先体反応を誘起できないのか、CPAが単独で精子にどのような変化をもたらすのか、などは今後明らかにする必要があるが、ARISとの併用で先体反応を誘起したことから、少なくともストアCa²⁺の減少が先体反応誘起に関わっていることが示唆された。したがって、先体反応が誘起される際にSOCの活性化が起こっているという前述の考えが支持された。

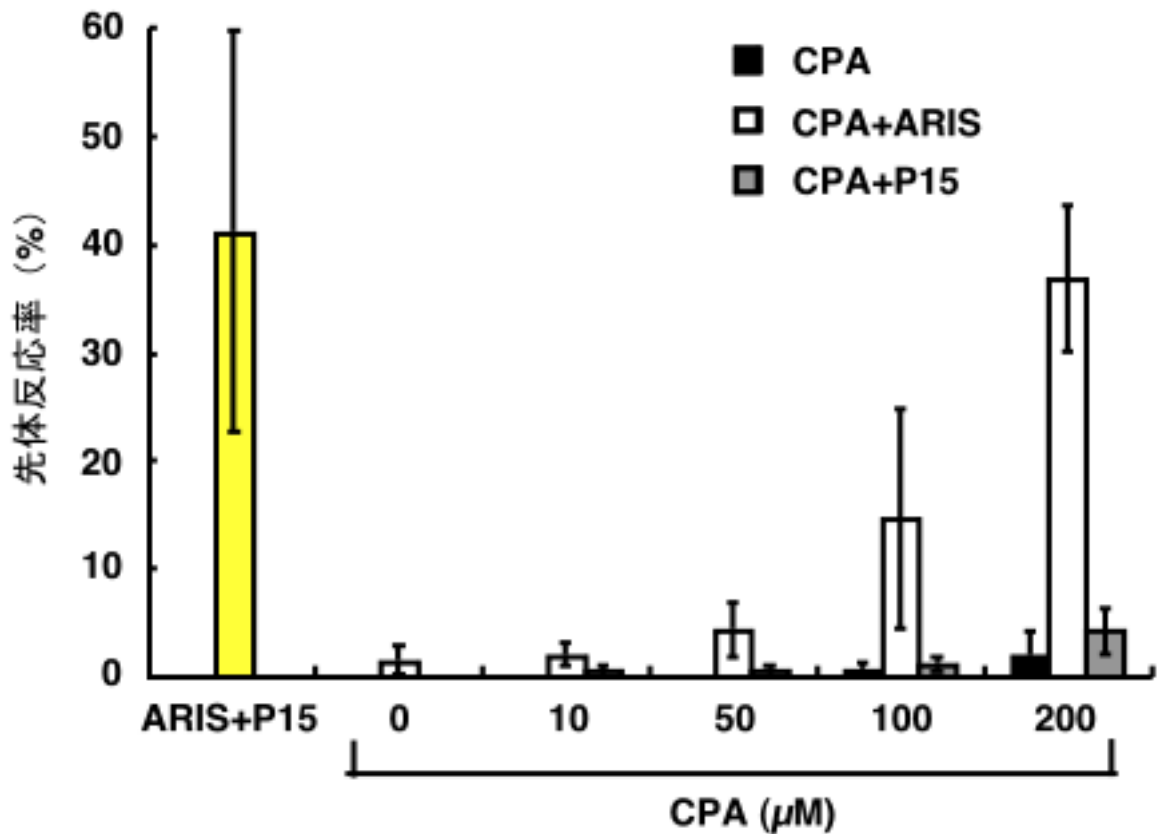


図 3-8 先体反応に対する CPA の影響

人工海水に懸濁した精子を、CPA を含む人工海水 (■)、CPA と ARIS を含む人工海水 (□) または CPA と P15 を含む人工海水 (■) に移した時の先体反応率 (%) を示した。また、人工海水に懸濁した精子を ARIS、P15 混合物を含む人工海水に移した場合を「ARIS + P15」と示した (■)。なお、CPA は 10 ~ 200 μM、ARIS は 10 μg sugar/ml、P15 は 1 μM で使用し、3 回の独立した実験の平均値 ± 標準偏差を示した。

3-7 高pH海水、高Ca²⁺海水中でのARISによる先体反応誘起機構

高pH海水または高Ca²⁺海水中では、ARIS単独で精子の先体反応が起きる (Matsui *et al.*, 1986a)。高pH海水 (pH 9.5)、高Ca²⁺海水のどちらの条件でも、ARISだけで大きな[Ca²⁺]_iの上昇が起こり、先体反応が誘起されることが確認された (図 3-9)。しかし、[Ca²⁺]_iの上昇速度が高pH海水中では遅く、高Ca²⁺海水中では速いことから、それぞれに関わっている機構が異なる可能性もある。

これらの海水条件はARISと協調的に大きな[Ca²⁺]_iの上昇および先体反応を誘起するという点から、asterosapの効果を模倣している可能性がある。しかし、これらの海水条件がasterosapの効果を模倣しているならば、大きな[Ca²⁺]_i上昇には、3-5で示したようなSOC様のチャンネルが関与しているはずである。このことを示すため、これらの海水中でARISによって起きる大きな[Ca²⁺]_iの上昇がSKF96365に高感受性であるか調べた。

高pH海水中でARISによって起こる[Ca²⁺]_iの上昇は5 μM SKF96365で著しく阻害された (図 3-10A)。この時、IC₅₀値は約3.1 μMとなり、SKF96365に対して高感受性であった。すなわち、通常的人工海水中で、ARISとP15によって引き起こされる持続的な[Ca²⁺]_iの上昇と同等なSKF96365感受性を示した。しかし、高Ca²⁺海水中では、さらに高濃度にSKF96365を存在させなければ、ほとんど阻害が起こらなかった (図 3-10B)。この時のIC₅₀値は約7.3 μMであった。3-5で示したように、通常的人工海水中では、ARISによる小さな[Ca²⁺]_iの上昇はIC₅₀値約8.2 μMで阻害されたことから、細胞外のCa²⁺濃度に関わらず、ARISによる[Ca²⁺]_i上昇はSKF96365に対して同等の感受性を示すことがわかった。

以上の結果から、高pH条件はARISとともにSOC様チャンネルを活性化することが示唆された。すなわち、高pH条件はasterosapの効果を模倣するといえる。しかし、高Ca²⁺海水中では、細胞外にCa²⁺が多量に存在するため、通常的人工海水中でも見られるARISによる[Ca²⁺]_iの上昇が増幅されただけで、SOC様チャンネルの活性化は起こっていないことが示唆された。この場合、結果的に上昇した[Ca²⁺]_iが先体反応を引き起こしたに過ぎない。このことは、高Ca²⁺海水中でARISによって先体反応が誘起される際、pH_iの上昇は必要ないという以前の結果と一致している (Matsui *et al.*, 1986c)。

これらの海水条件においてARISによって誘起される先体反応のモデルを図 3-11に整理した。高pH海水中では、ARISによる効果 (図 3-10 橙色) と明らかではない

asterosap様の効果（図 3-10 青色）が協調的にSOC様のチャンネルを活性化し（図 3-10 黄色）、大きな $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を引き起こす。しかし、高 $[Ca^{2+}]_i$ 海水中では、細胞外に Ca^{2+} が多量に存在するため、ARISによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が増幅されたと考えられる。

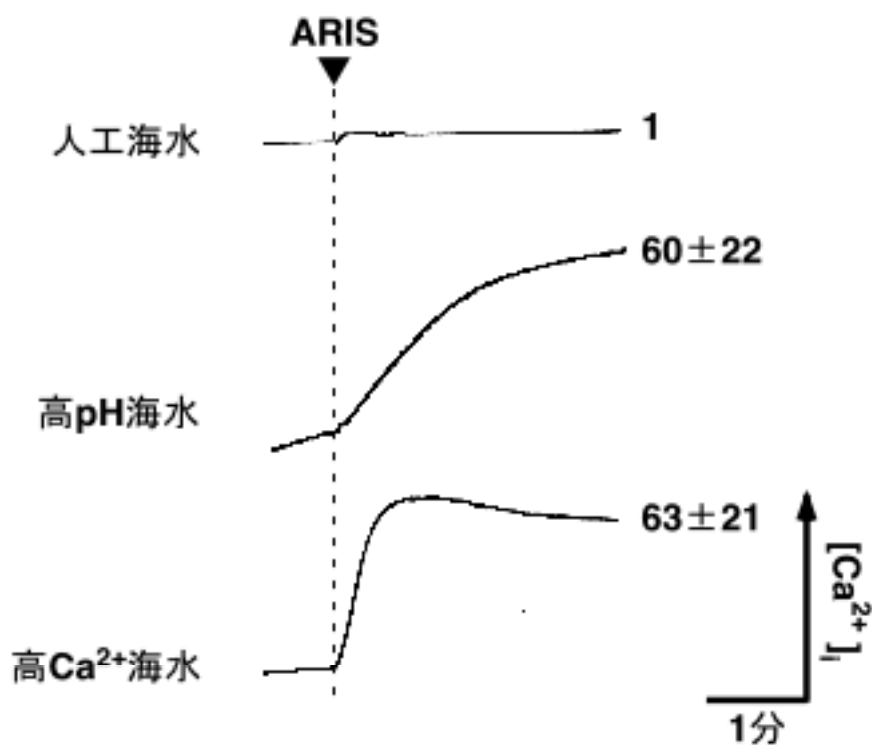


図 3-9 高pHまたは高 Ca^{2+} 海水中でのARISによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇

高pH海水（pH 9.5）または高 Ca^{2+} 海水に精子を懸濁し、ARISを加えた時（▼）の $[Ca^{2+}]_i$ の変化と先体反応率を示した。各曲線の右端に示された数字は測定終了時の先体反応率（%）を表している。なお、ARISは10 $\mu\text{g sugar/ml}$ で使用した。3回の独立した実験を行ない、典型的なトレースおよび先体反応率の平均値±標準偏差を示した。

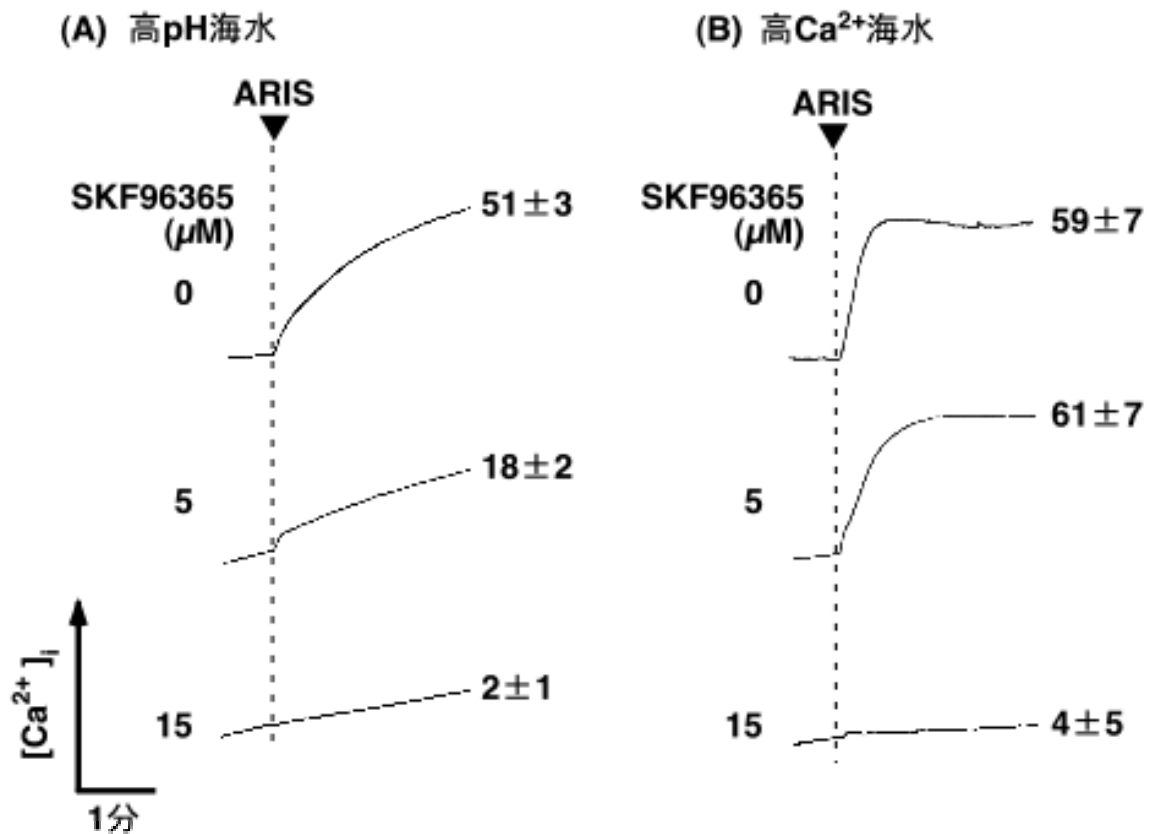


図 3-10 高pHまたは高Ca²⁺海水中でのARISによる[Ca²⁺]_i上昇に対するSKF96365の影響

0 ~ 15 μM SKF96365 を含む高pH海水 (pH 9.5, A) または 0 ~ 15 μM SKF96365 を含む高Ca²⁺海水 (B) に精子を懸濁し、ARISを加えた時 (▼) の[Ca²⁺]_iの変化と先体反応率を示した。各曲線の右端に示された数字は測定終了時の先体反応率 (%) を表している。なお、ARISは 10 μg sugar/mlで使用した。3回の独立した実験を行ない、典型的なトレースおよび先体反応率の平均値±標準偏差を示した。

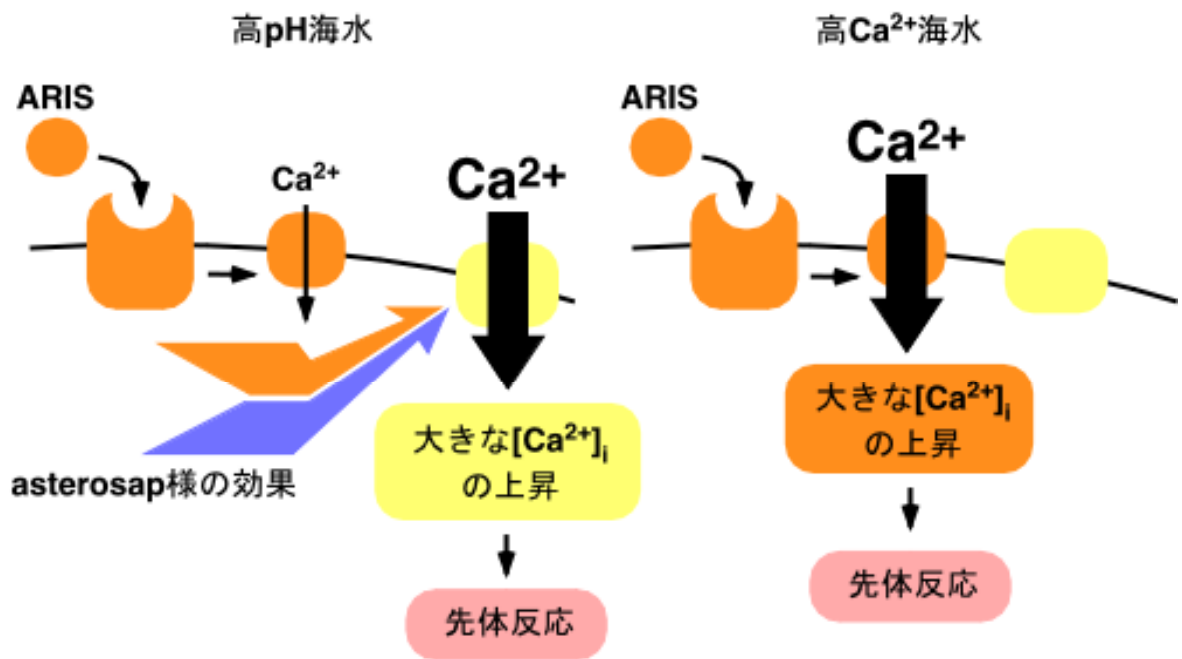


図 3-11 高pHまたは高Ca²⁺海水中でのARISによる先体反応誘起モデル

高pH海水中でARISは、SKF96365 高感受性のCa²⁺流入（黄色）を起こす。すなわち、高pH海水はasterosap様の効果を発揮して（青色）、ARISと協調的に先体反応を誘起する。一方、ARISは人工海水中でも[Ca²⁺]_i上昇を起こすが（橙色）、高Ca²⁺条件下では単にその上昇が増幅され、結果的に先体反応が起きる。

3-8 asterosap による細胞内 pH の上昇と ARIS による先体反応

3-7において、高pH条件はARISとともにSOC様チャネルを活性化することが示唆された。細胞外pH (pH_e) を上げると精子の pH_i も上昇することから、 pH_i の上昇とARISの効果によってSOC様チャネルが活性化されることが予想される。9-アミノアクリジンを用いて pH_i を測定したところ、ARISは変化を起こさず、P15が pH_i を上昇させた(図3-12)。この時、その値は 7.6 ± 0.1 から 7.7 ± 0.1 に上昇した($n = 4$)。標準偏差が0.1というように、個体間での pH_i 値のばらつきは大きかったが、その上がり幅は0.1程度であり、個体によらず安定していた。P15による pH_i の上昇は以前にもpHインジケータ-SNARFを用いて示されている(unpublished)。しかし、P15によって起こった pH_i の変化が、ARISと協調的に働くために十分であるかわからない。そこで、 pH_e を変えることで pH_i を変化させ、どのくらいの pH_i に達するとARIS単独で先体反応が起こるのか検討した。

まず、精子をpH 7.6から9.5の人工海水に懸濁し、その時の pH_i を測定した(図3-13)。すると、 pH_e 依存的に精子の pH_i は上昇した。さらに、それぞれの条件下で、精子をARISで処理し、どのくらい先体反応が起こるのか調べたところ、 pH_i が約7.7以上になると急激にARISによる先体反応が起こりやすくなり、 pH_i が約8.2に達すると最高値に達することがわかった(図3-14)。

以上の結果から、asterosapはARISによる先体反応が起こりやすくなるレベル(約pH 7.7)以上に pH_i を上昇させることが示された。すなわち、asterosapによる pH_i の上昇は、ARISによる先体反応を促進し得ることが示された。

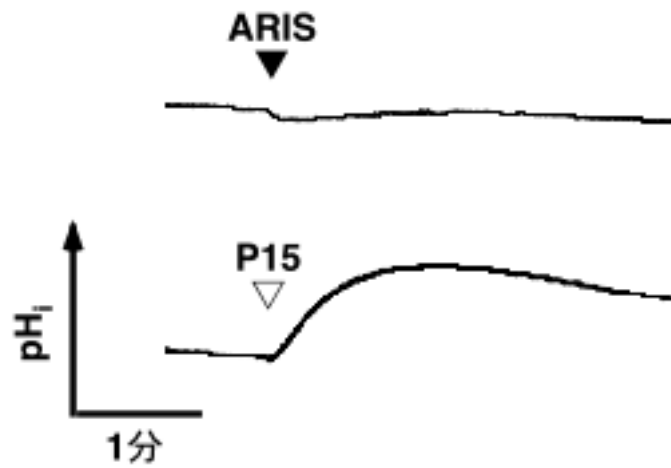


図 3-12 P15 による pH_i の上昇

精子を 10 μg sugar/ml ARIS (▼) または 1 μM P15 (▽) で処理した時の pH_i の変化を測定した。3 回の独立した実験を行ない、典型的なトレースを示した。

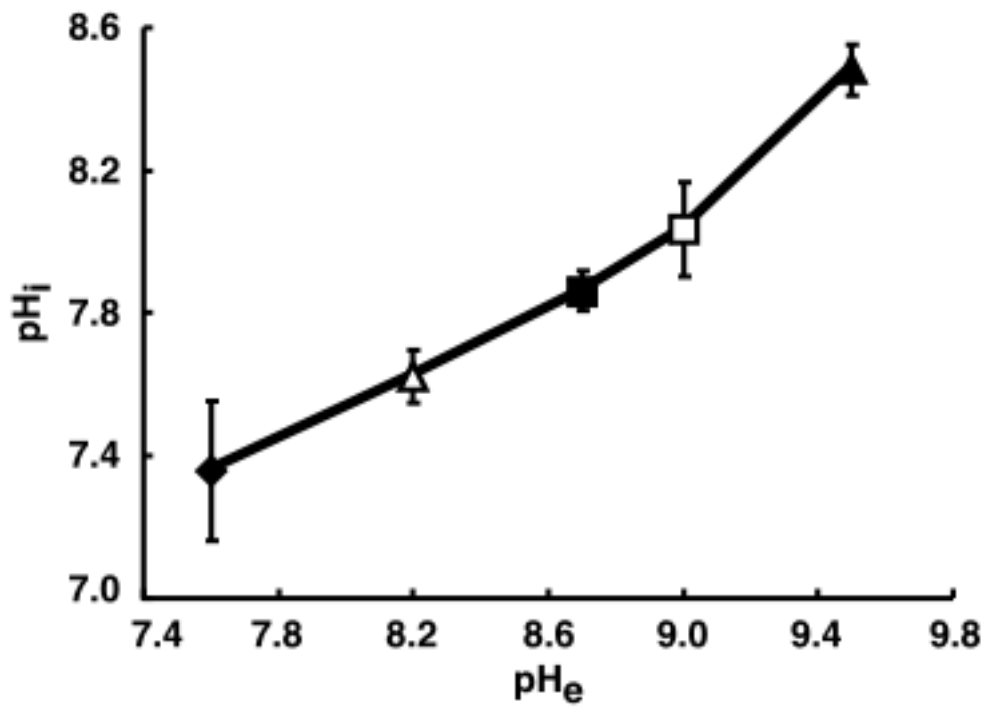


図 3-13 pH_e の変化に対するの pH_i の変化

精子を pH 7.6 (◆)、8.2 (△)、8.7 (■)、9.0 (□) または 9.5 (▲) の人工海水に懸濁し、その時の pH_i を測定した。5 回以上の独立した実験を行ない、平均値±標準偏差を示した。

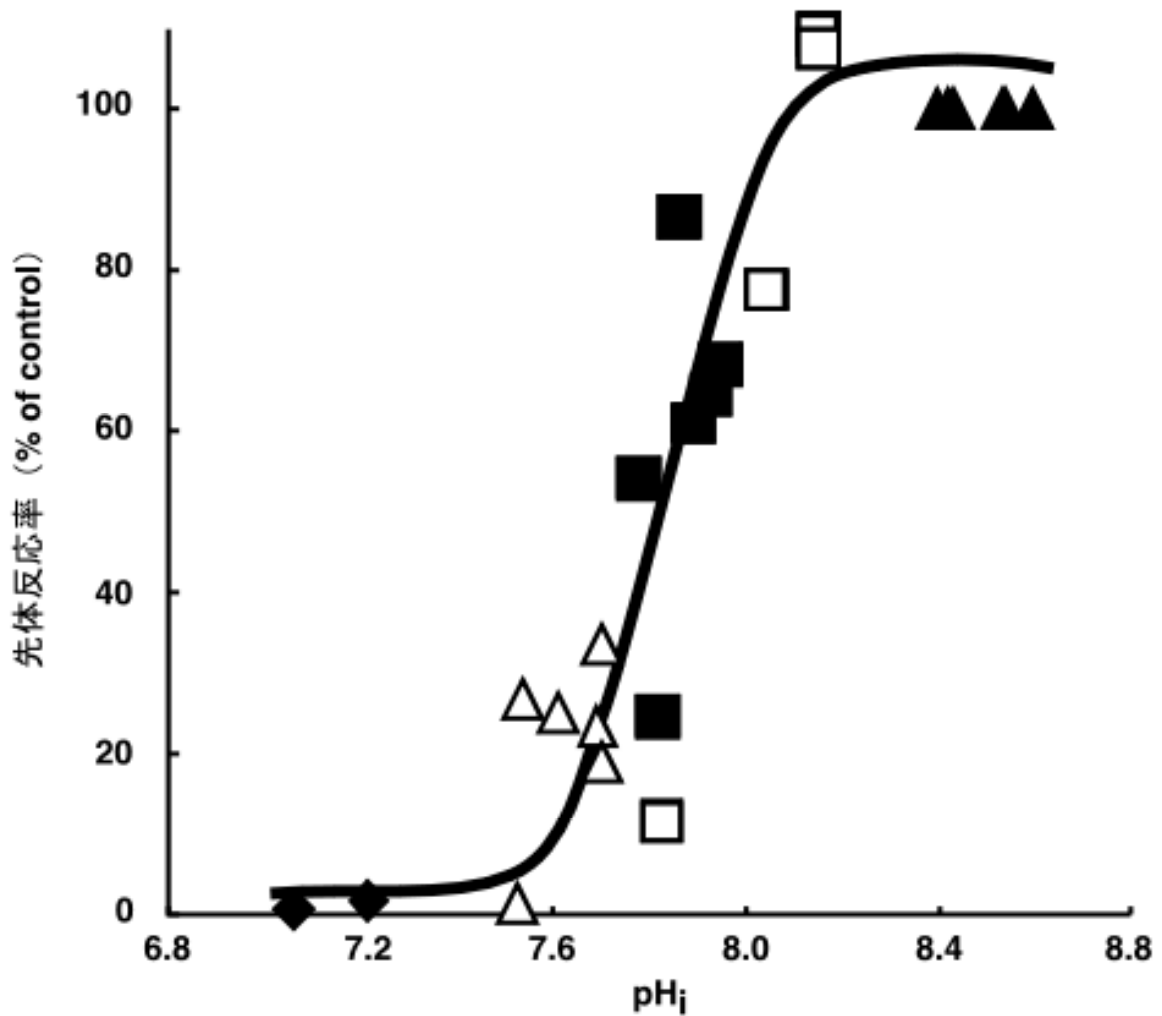


図 3-14 pH_iの変化とARISによる先体反応の関係

pH 7.6 (◆)、8.2 (△)、8.7 (■)、9.0 (□) または 9.5 (▲) の人工海水に精子を懸濁した時に得られたpH_iの値と、その条件でARIS処理を行なった時の先体反応率を示した。個体ごとに、pH 9.5 の条件下でARISによって誘起された先体反応率を 100%コントロールとした。なお、ARISは 10 μg sugar/ml で使用した。

3-9 細胞内 pH の低下による先体反応の抑制

0.1 という pH_i のわずかな上昇が先体反応を促進することが示されたが、逆にわずかな pH_i の低下は強く先体反応を抑制するはずである。そこで、 pH_i を低下させる条件下で、ARIS、P15 混合物によって持続的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇や先体反応が起こるのか検討した。

pH 7.6 や 7.1 の人工海水中では、持続的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇および先体反応が強く抑えられた (図 3-15)。図 3-13 で示したように、 pH_e 7.6 の条件下で、 pH_i は 7.4 ± 0.2 ($n = 7$) であり、さらに、その条件下で P15 によってどのくらい pH_i が上昇するかを測定したところ、0.1 ($n = 4$) であった。pH 7.6 の人工海水に精子を懸濁することで、 pH_i が約 0.2 低下したが、この条件下での P15 による pH_i の上昇は、それを補うには不十分であろう。

以上の結果から、P15 による 0.1 というわずかな pH_i の上昇が、ARIS とともに持続的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を引き起こし、先体反応を誘起していると考えられる。

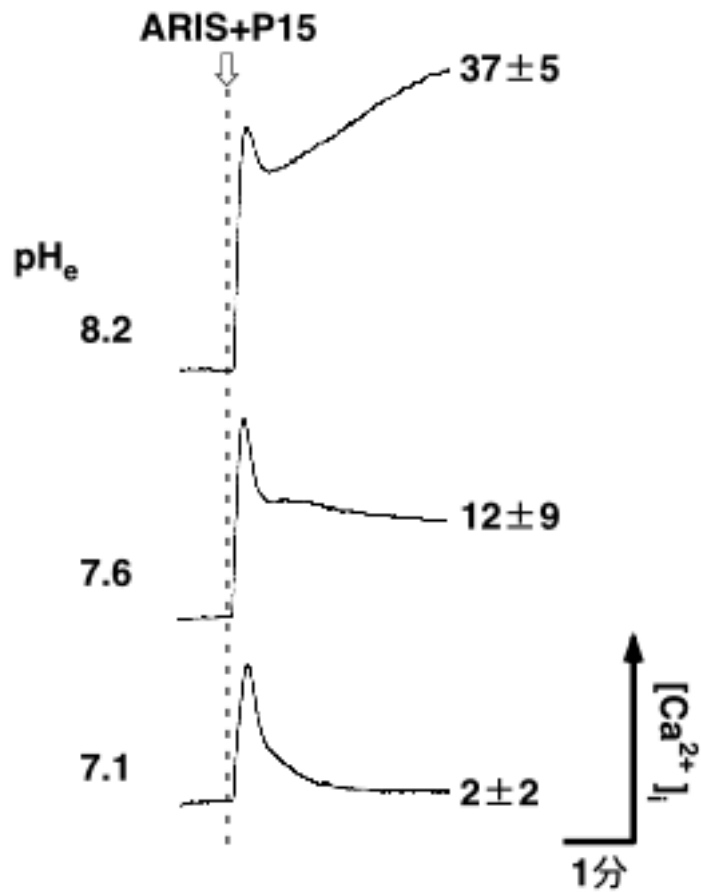


図 3-15 先体反応に対する低 pH 条件の影響

pH 8.2、7.6 または 7.1 の海水に精子を懸濁し、ARIS、P15 混合物 (▽) で処理した時の $[Ca^{2+}]_i$ 変化と先体反応率を示した。各曲線の右端に示された数字は測定終了時の先体反応率 (%) を表している。なお、ARIS は $10 \mu\text{g sugar/ml}$ 、P15 は $1 \mu\text{M}$ で使用した。3 回の独立した実験を行ない、典型的なトレースおよび先体反応率の平均値 ± 標準偏差を示した。

3-10 考察

本研究のすべての結果を図 3-16 に整理した。ARISは小さな $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を起こし（図 3-16 橙色）、asterosapは一過的に $[cGMP]_i$ 、 pH_i および $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させる（図 3-16 青色）。ARISとasterosapの作用が同時にもたらされると、SOC様チャネルを介した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇機構が活性化され（図 3-16 黄色）、持続的な上昇および先体反応が引き起こされる。第 2 章で行なったP15 前処理効果の解析結果と合わせると、asterosapによる細胞内シグナル伝達の中でも、 $[cGMP]_i$ と pH_i の上昇が重要であることが示唆された。また、図 3-8 で示したようにCPAとARISの併用により、先体反応が起きたことから、先体反応におけるストア Ca^{2+} の関与が示唆された。CPA単独では精子の $[Ca^{2+}]_i$ がどう変化するか、CPA単独でSOCが活性化されるのか、CPAとARISの併用でどのような $[Ca^{2+}]_i$ 変化が見られるのか、などの解析を行ない、今後、ストア Ca^{2+} の減少がどのように位置付けられるかを解析していきたい。ウニ精子において、CPAと人為的な pH_i の上昇によって先体反応を誘起した例はあるが、ARISは pH_i を上昇させないため、異なる現象を見ていると考えられ、SOCの活性調節について新しい知見が得られる可能性がある。（González-Martínez *et al.*, 2001; Hirohashi and Vacquier, 2003）。

持続的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、哺乳類やウニ精子の先体反応に必要である（Arnoult *et al.*, 1996a; O'Toole *et al.*, 2000）。これらの先体反応誘起には、性質の異なる 2 つの Ca^{2+} チャネルが必要であり、第 2 のチャネルの活性化によって持続的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が起こる（Guerrero and Darszon, 1989; Arnoult *et al.*, 1996b; Hirohashi and Vacquier, 2002a）。また、第 2 のチャネルはSOCであると考えられていて、その活性化は、第 1 のチャネルの開口に依存している（Guerrero and Darszon, 1989; Arnoult *et al.*, 1996b; O'Toole *et al.*, 2000）。本研究では、ヒトデ精子においても、ARISとP15によって持続的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が起こり、その結果、先体反応が誘起されることを示した。この持続的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇はSKF96365 に対して高感受性を示した（ IC_{50} 値約 2.2 μM ）。ヒト急性骨髄性白血病細胞HL-60 やラットの胸腺リンパ球、さらにウニの精子において、SKF96365 は IC_{50} 値 1 ~ 4 μM という濃度域でSOCの働きを阻害することが知られている。そのため、本研究で得られた約 2.2 μM という値から、ヒトデ精子における持続的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇にSOCが関与していると考えられる（Leung and Kwan, 1999; Hirohashi and Vacquier, 2003）。さらに、哺乳類やウニの精子においてSOCの働きを阻害する Ni^{2+} によっても、ヒトデ精子の持続的な $[Ca^{2+}]_i$ の

上昇は阻害されたため、ヒトデ精子の先体反応におけるSOCの関与が支持される (O'Toole *et al.*, 2000; González-Martínez *et al.*, 2001)。一方、ARISとP15 がそれぞれ単独で引き起こす $[Ca^{2+}]_i$ の変化が先体反応に必要なかは明らかにはならなかった。この問題を解決するには、これらの変化をそれぞれ選択的に阻害する方法を見つけなければならない。さらに多くの Ca^{2+} チャネル阻害剤を試す必要があるし、それぞれの場合で活性化されている Ca^{2+} チャネルを決定し、抗体などで機能阻害することも有効な手段となるだろう。asterosapの細胞内シグナル伝達のように、cGMPを介した Ca^{2+} の細胞内への流入は、ウシ、ヒトデ、ウニの精子でそれぞれ示されているが、いずれの場合も、この $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が精子の機能にどのような影響を与えているのか明瞭ではない (Weyand *et al.*, 1994; Kaupp *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2003)。精子は著しい形態的な極性を持ち、非常に特殊化された細胞であるため、単一の生きた精子を用いて、 $[cGMP]_i$ や $[Ca^{2+}]_i$ の局所的な変化と精子の振舞いを結び付けるような研究が重要になるだろう。

ウニ精子において、FSPによる pH_i の上昇は持続的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇およびそれに続く先体反応に必要な (García-Soto and Darszon, 1985; Guerrero *et al.*, 1998)。細胞内ストアから Ca^{2+} を流出させると考えられる IP_3 が高pH条件では IP_3 受容体様タンパク質に強く結合することが示されている (Zapata *et al.*, 1997)。マウス精子においては、透明帯可溶化物による先体反応の際、 pH_i の上昇が見られ、人為的に起こした pH_i の上昇は細胞内への Ca^{2+} 流入を促進する (Arnoult *et al.*, 1996a)。ヒトデにおいても、 pH_i の上昇はARISによる先体反応を促進するということが示唆されている (Matsui *et al.*, 1986a)。本研究では、asterosapによって起こる pH_i の上昇が、ARISによる持続的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇とそれに続く先体反応を促進することを示した。一方、高 Ca^{2+} 条件下でARISは先体反応を誘起できるが、これは pH_i の上昇とSOCの活性化を伴わず、通常的人工海水中でARISによって引き起こされる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が増幅された結果だと考えられる。したがって、ヒトデのような複数の先体反応誘起物質を持つ動物種においても、先体反応に至る細胞内シグナル伝達機構、すなわち pH_i や $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が保存されていることが明らかとなった。

ウニではFSP、マウスではZP3 という 1 つの分子が主に取り上げられ、先体反応誘起機構の解析に用いられてきた (Darszon *et al.*, 2001)。しかし、FSPまたはZP3 は同時に様々な精子内の変化を引き起こすため、解析が困難である。例えば、ストア Ca^{2+} の減少がどのようにSOCに伝わるのか、 pH_i の上昇がなぜSOCを活性化するのか、など大きな問題が残されている。ヒトデを用いた場合、ARISとasterosapの役

割が分かれているため、先体反応誘起機構を詳細に整理できるかもしれない。今後、ヒトでは重要な実験材料となるであろう。

自然条件では、受精の際、いくつもの物質が精子に作用していると考えられる。ウニでは、speractがFSPによる先体反応を促進する (Yamaguchi *et al.*, 1987; Hirohashi and Vacquier, 2002c)。明瞭には示されていないが、これらの働きには $[cGMP]_i$ 、 pH_i の上昇が重要であると予想されている。体内受精を行なう哺乳類では、さらに状況は混沌としている。ヒトの卵管にはNO（一酸化窒素）を生産するシステムが存在している (Rosselli *et al.*, 1998)。また、NOが精子内の可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化し、先体反応を誘起するという報告がある (Revelli *et al.*, 2001)。卵胞液および卵丘分泌物中に存在するプロゲステロンにも先体反応誘起活性があり、NOS (NO synthase) / cGMPシグナル伝達経路を介して作用することが示唆されている (Osman *et al.*, 1989; Roldan *et al.*, 1994; Herrero *et al.*, 1997)。同じく卵胞液および卵丘分泌物中に存在するANPは、おそらくグアニル酸シクラーゼを介して、ヒトおよびウシ精子の先体反応を誘起する (Rotem *et al.*, 1998; Zamir *et al.*, 1995)。以上の例を見渡すと、動物種によって状況は異なるものの、cGMPの先体反応への関与が一般的にいえるものと想像される。ヒトではcGMPの重要性が示されたが、哺乳類をはじめ、他の動物においても解明が進むことがのぞまれる。

ARIS と asterosap は先体反応に重要であるが、卵ゼリーに比較して ARIS、P15 混合物の活性は低い。このことは、自然条件では卵ゼリーに含まれる Co-ARIS や未知なる因子が働いていることを示唆する。ウニにおいても、卵ゼリー成分の sialoprotein が先体反応を促進するという報告がある (Hirohashi and Vacquier, 2002b)。自然条件での先体反応誘起機構を明らかにするには、さらに多くの因子を考慮に入れた解析が必要であろう。

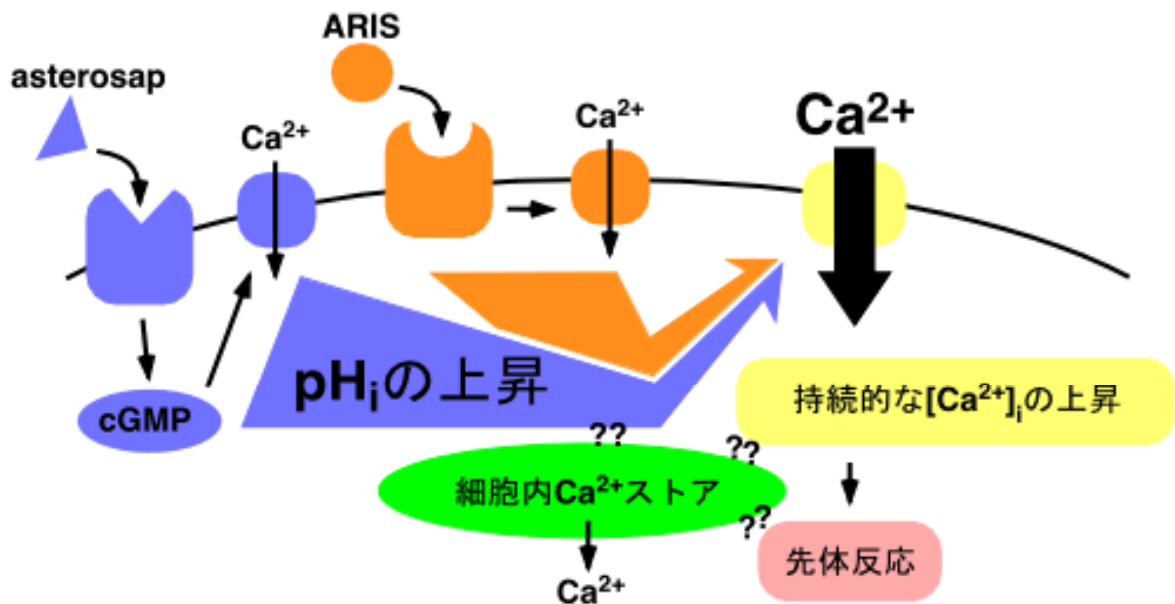


図 3-16 ARIS と asterosap による先体反応誘起モデル 2

ARISおよびasterosapはそれぞれ単独で $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させる（橙色および青色）。しかし、それらが同時に精子に作用すると、SOC様のチャンネルを介して（黄色）、持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が起こり、先体反応が誘起される。この時、asterosapによって誘起される $[cGMP]_i$ および pH_i の上昇が重要である。また、ストア Ca^{2+} の関与が示唆されたが（緑色）、上のモデルにおける正確な位置付けを行なうことは今後の課題である。

第4章 総括および今後の展望

キヒトデの精子先体反応はARIS、Co-ARIS、asterosapという3つの分子によって協調的に誘起される。しかし、ARISまたはasterosapだけで精子を処理すると、卵ゼリーによる精子の先体反応は抑制される（前処理効果）。第2章では、この一見矛盾した現象が何を意味しているのか検討した。精子をasterosapで処理すると急激に $[cGMP]_i$ の上昇が起きるが、すぐに減少して元のレベルまで戻ってしまう。しかも、もう一度asterosapで精子を処理しても $[cGMP]_i$ の上昇は起こらない。このことから、asterosap前処理により、その後、 $[cGMP]_i$ が2度と上昇しなくなるため、asterosap前処理効果が起こると予想された。そこで、 $[cGMP]_i$ の分解をPDE阻害剤で抑えたところ、asterosap前処理の際に上昇した $[cGMP]_i$ が長く維持され、asterosap前処理を行なったにも関わらず卵ゼリーやARISによって先体反応が引き起こされた。すなわち、卵ゼリーによる先体反応誘起には、高いレベルの $[cGMP]_i$ が必要であることが示唆された。先体反応におけるcGMPの重要性が、動物界で普遍的な事柄であるのか、今後の研究に期待がかかる。

第3章では、キヒトデ精子の先体反応において、特に重要な成分であるARISとasterosapの協調的な作用について解析を行なった。ARISとasterosapの作用が同時に精子にもたらされると、SKF96365や Ni^{2+} に感受性の高いSOC様チャンネルが活性化され、持続的に Ca^{2+} が細胞内へ流入し、先体反応が引き起こされるということが示唆された。さらに、asterosapによる精子の pH_i 上昇は、ARISとasterosapの協調作用に十分な大きさであることが示唆された。この結果は、ヒトデのように複数の先体反応誘起物質を持つ動物においても、哺乳類やウニのように単一の物質が先体反応を誘起すると考えられている動物においても、先体反応に必要な細胞内シグナル伝達が保存されていることを意味している。

ARISの作用機構についてはほとんど明らかではない。ARISによってわずかに $[Ca^{2+}]_i$ が上昇することは示されたが、それが精子の機能にどのような影響を持つのかは明らかではない。ARIS受容体の探究は現在進行中であり、ARIS受容体の同定により、その作用機構が明らかとなり、ARISとasterosapによる先体反応誘起機構のさらなる解明につながるであろう。

様々な細胞応答の調節において、 Ca^{2+} は非常に重要な因子である。現在の細胞生物学の大きな課題の1つとして、SOCの活性調節機構の解明が残されている。ストア Ca^{2+} の減少という情報がどのように細胞膜上のSOCに伝達されるのか、様々なモ

デルが提唱されているが、明確に証明した例はない (Putney *et al.*, 2001)。キヒトデ精子においてもSOC様チャネルの働きが示唆されたが、ストアCa²⁺を減少させるCPAとARISの併用により先体反応が誘起された。ウニ精子において、同様の薬剤と人為的なpH_iの上昇によって先体反応を誘起したという報告はあるが、ARISはpH_iを上昇させないため、ウニで見られているものとは異なる現象だと考えられる (González-Martínez *et al.*, 2001; Hirohashi and Vacquier, 2003)。現在、これ以上の結果が得られていないため、多くの問題が残されている。しかし、さらなる解析を進めることは、ARISの作用機構を明らかにするばかりでなく、SOCの活性調節について新しい知見をあたえる可能性があり、重要な研究課題になるだろう。

材料と方法

実験材料

キヒトデ *Asterias amurensis* は広島県大野町、岡山県牛窓町、オーストラリア・タスマニア島にて採集し、8~10°Cの人工海水ロートマリン（ロート製薬、大阪、日本）中で飼育した。タスマニアのものは比較的近年、東京湾から運ばれた個体の子孫であると考えられており、成体の形態やDNAの特徴は典型的な東京湾型であり、日本産のものと完全に交雑する（Byrne *et al.*, 1997）。

オスのヒトデを手術用のハサミで切り開き、精巢を取り出し、体腔液や海水をペーパータオルで吸い取った後、にじみ出た濃い精液を「ドライスパーム」として使用した。ドライスパームは使用直前に調製し、氷上で扱った。

海水の調製

本研究では、通常の海水として人工海水（10 mM EPPS（*N*-2-hydroxyethyl-piperazine-*N'*-3-propane sulphonic acid, pH 8.2）、430 mM NaCl、9 mM KCl、9 mM CaCl₂、25 mM MgSO₄、23 mM MgCl₂）を用いた。高Ca²⁺海水は70 mM CaCl₂に調製し、Ca²⁺欠如海水は上記の人工海水からCaCl₂を除いた。pH 7.6の海水は10 mM EPPSバッファーを用いてpH 7.6に調製し、pH 6.8およびpH 7.1の海水には10 mM PIPES（piperazine-*N, N'*-bis (2-ethane sulphonic acid)）、pH 8.7、9.0および9.5の海水には25 mMグリシンを用いた。なお、本研究ではpH 9.5の海水を高pH海水と呼んだ。

試薬の調製

asterosap の1アイソフォーム、P15は、サントリー生物有機科学研究所で合成、精製されたものを100 μM水溶液として-30°Cで保存した。

以下の試薬は全てSigma Chemical（St Louis MO, U.S.A.）から購入し、以下の濃

度で DMSO に溶かし、-30°C で保存した。

124.2 μ M オカダ酸、200 mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine)、36.8 mM ザプリナスト、38.2 mM EHNA (erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine)、47.3 mM ミリノン、14.2 mM ビンポセチン、20 mM cyclopiazonic acid、340 μ M 9-アミノアクリジン

以下の試薬はSigma Chemicalから購入し、以下の濃度でH₂Oに溶かし、-30°Cで保存した。

1 mM 1-メチルアデニン、10 mM SKF96365

fluo-4 AM はナカライテスク (京都、日本) から購入し、DMSO に溶かして 1 mM とし、-30°C で保存した。

EGTA (ethyleneglycol bis (β -aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid) はナカライテスクから購入し、2 M NaOH に溶かして 2 M とし、室温で保存した。EGTA を人工海水に直接溶かすと、人工海水の pH を著しく低下させるため、2 M NaOH を溶媒として用いた。

DMSO に溶かした試薬を用いる際、コントロールには等量の DMSO を用いた。1%の濃度までならば、DMSO は先体反応に影響を与えなかった。

卵ゼリーおよび ARIS の調製

メスのヒトデから卵巣を取り出し、人工海水で表面を洗い、10 μ M 1-メチルアデニンを含む人工海水に浸して放卵させた。回収した卵を人工海水で洗った後、同体積の人工海水に懸濁し、HCl により pH を 5.5 に下げ、再び NaOH で pH 8.2 に戻した時、可溶化する成分を卵ゼリーとし、-30°C で保存した。

卵ゼリーをセファロース CL-4B (サイズ; 4.1 \times 100 cm、移動相 0.1 M NaCl、15 mM トリス (pH 8.2)) によりゲルろ過し、素通りの画分を回収した。これをエバポレーターにより濃縮し、DEAE トヨパール 650M (サイズ; 2.1 \times 64 cm、0.1 M NaCl、50 mM トリス (pH 8.2)) により平衡化) に添加し、同緩衝液で洗浄した後、0.1 ~ 1.0 M NaCl 濃度勾配で溶出して得られたピークを ARIS とした。透析後、凍結乾燥して、-30°C で保存した。

卵ゼリーおよび ARIS の糖濃度は、L-Fuc を標準物質として、レゾルシノール硫酸法により決定した (Monsigny *et al.*, 1988)。本論文では、本来 mg Fuc equivalent/ml

であるところを mg sugar/ml として表した。

先体反応率の測定

人工海水 500 μ l に 5 μ l のドライスパームを懸濁し、氷上で各々の薬剤処理を行った。これを 20 μ l 取り、あらかじめ室温に用意しておいた 80 μ l の反応溶液に添加し、5 分間放置した。これにグルタルアルデヒドを 1% になるように加え、精子を固定した。さらに、5 分後、0.5% のエリスロシンを含む 70% エタノールを 3 μ l 加え、精子を染色した。顕微鏡 ($\times 1000$) 下で、1 サンプルにつき 200 個以上の精子を観察し、先体突起を形成した精子の割合をもとめた。 $[Ca^{2+}]_i$ の測定と対応した実験では、 $[Ca^{2+}]_i$ の測定後、速やかに 100 μ l のサンプルを取り、上記の固定法および染色法によって先体反応率をもとめた。なお、有意差の判定には、t 検定を用いた。

細胞内サイクリックヌクレオチド濃度の測定

精子を約 2×10^8 cells/ml になるように人工海水に懸濁し、各薬剤処理を行なった。この懸濁液を 300 μ l 取り、あらかじめ用意した 60 μ l の 60% トリクロロ酢酸と混合することで精子の反応を停止させた。これを $15000 \times g$ 、5 分間の遠心にかかけ、その上清を水飽和ジエチルエーテル 1 ml で 4 回洗い、遠心エバポレーターで乾燥させた。このサンプルに含まれるサイクリックヌクレオチド濃度を cGMP または cAMP Enzymeimmunoassay (EIA) System (Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, England) を用いて測定した。なお、有意差の判定には、t 検定を用いた。

細胞内 Ca^{2+} 濃度および細胞内 pH の測定

ドライスパームを fluo-4 導入用海水 (pH 6.8 に調製した Ca^{2+} 欠如海水、10 μ M fluo-4 AM、0.1 mM EDTA (ethylenediamine-*N, N, N', N'*-tetraacetic acid)、0.5% プルロニック F-127 (Sigma Chemical) を含む) に 1/10 希釈し、1 ~ 2 時間 16°C で静置した。

この懸濁液 50 μ l を 2 ml の人工海水と混合して、494 nm の励起光によって生じる 516 nm の蛍光変化を定量し、これを $[Ca^{2+}]_i$ の変化として示した。

また、0.17 μ M 9-アミノアクリジンを含んだ人工海水において、382 nm の励起光によって生じる 454 nm の蛍光強度を測定した。これに 5 μ l のドライスパームを加え、蛍光値が安定するまで待ち、その後、実験を行なった。この時の蛍光変化を pH_i の変化として示し、 pH_i の絶対値は以下の式でもとめた (Schuldiner *et al.*, 1972; Schackmann *et al.*, 1986)。

$$pH_i = pH_e - \log [(1 - F) / F \cdot F' / (1 - F')]]$$

F はドライスパーム添加前の蛍光強度に対する各時間の相対蛍光強度、F' は実験終了時に 0.05% TritonX-100 を加えて、精子細胞膜を崩壊させた後の相対蛍光強度を示している。なお、蛍光の測定には Shimadzu Spectrofluorophotometer RF-540 (島津科学、東京、日本) を使用し、実験中、精子懸濁液は 16°C に保たれ、常に攪拌子によって攪拌されるようにした。

ウェスタンブロッティング

人工海水 500 μ l に 5 μ l のドライスパームを懸濁し、短時間の場合は氷上で、長時間の場合は低温室 (4~6°C) で薬剤処理を行った。その後、1000 \times g、5 分間の遠心により精子を沈澱させ、上清 450 μ l だけを捨てて、50 μ l の 2 倍濃度サンプルバッファー (125 mM トリス (pH 6.8)、4% SDS、200 μ l/ml グリセロール、100 μ g/ml BPB、100 μ l/ml β -メルカプトエタノール) と混合した。これを 5 分間煮沸し、SDS-PAGE またはウェスタンブロッティングのサンプルとした。

10% アクリルアミドゲルにて SDS-PAGE を行ない、Trans-Blot SD cell (Bio-Rad, Hercules CA, U.S.A.) を用いて、タンパク質を Immobilon-P PVDF membrane (Millipore, Bedford MA, U.S.A.) に転写した。一次抗体には当研究室で作製された抗グアニル酸シクラーゼウサギ血清、二次抗体には HRP (horseradish peroxidase) で標識されたロバ由来抗ウサギ抗体 (Santa Cruz biotech, Santa Cruz CA, U.S.A.) を、ともに 3/2000 希釈して使用した。HRP の検出には ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences) を用いた。

リン酸の定量

SDS-PAGEを行なった後、Immobilon-P PVDF membraneにタンパク質を転写し、ポンソーSで染色した。120 kDに見られるグアニル酸シクラーゼのバンドを切り取り、50 mMグリシン緩衝液でポンソーSを洗い流した。この時、洗い流されたポンソーSの量を520 nmの吸光度で評価し、PVDF膜上のタンパク量を推定した。一方、PVDF膜上のタンパク質を2 M NaOHに浸し、24時間90°Cで処理し、リン酸基の加水分解を行なった。この上清を等量の4.7 M HClと混合し、さらに、この混合液に1.5倍量のリンモリブデン酸反応液（1.43% L-ascorbic acidおよび0.36% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を含んだ0.21 M H_2SO_4 ）を加えて45°Cで20分静置した。820 nmの吸光度からリン酸の量を推定した。なお、吸光度の測定にはSpectrophotometer DU640（Beckman coulter, Fullerton CA, U.S.A.）を使用した。

cGMP 結合タンパク質の精製と N 末端配列の決定

epoxy-activated セファロース 6B（Amersham Biosciences）を過剰量の H_2O で膨潤、洗浄し、このビーズを同体積のcGMP固定化溶液（100 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (pH 10)、200 mM NaCl、50 mM cGMP）に懸濁して、40時間室温で穏やかに攪拌した。これを反応停止溶液（100 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (pH 8)、200 mM NaCl、1 M ethanolamine）に移し、6時間室温で穏やかに攪拌し、ビーズの残存活性基を失活させた。その後、ビーズを洗浄溶液1（100 mM酢酸 (pH 4)、500 mM NaCl）と洗浄溶液2（100 mMトリス (pH 8.3)、500 mM NaCl）で交互に洗い、この洗浄作業を3回繰り返す、最後に H_2O に懸濁した。本実験では、これをcGMPビーズと呼んだ。

-80°Cで保存しておいたドライスパームを可溶化溶液中（0.01% TritonX-100、1 mM DTT を含む2倍希釈人工海水）で解凍し、Branson Sonifier 250（Branson Ultrasonics, Danbury CT, U.S.A.）で超音波破砕した後の遠心上清（10000×g、20分）をサンプルとした。サンプルにcGMPビーズを添加して、3時間穏やかに攪拌し、ビーズを過剰量の可溶化液で洗った。このビーズを直接2倍濃度サンプルバッファーに懸濁し、煮沸して、液体部分を用いてSDS-PAGEを行なった。

SDS-PAGEおよびCBB染色で得られたタンパク質のバンドを切り取り、 H_2O で洗

った後、ヒドロキシラミン溶液 (1.8 Mヒドロキシラミン (ナカライテスク)、2.5 M NaOH、0.24 M Na₂CO₃) に浸し、45°Cで8時間インキュベートすることで、タンパク質の断片化を行なった。さらに、ゲルをホモゲナイズし、20倍希釈サンプルバッファーで断片化されたタンパク質を溶出した。再度SDS-PAGEを行なうために、溶出液を遠心エバポレーターによって40倍に濃縮した。SDS-PAGE後、断片化されたタンパク質をPVDF膜に転写し、CBB染色によって検出されたバンドを切り取り、北海道大学機器分析センターにN末端アミノ酸配列の解読を依頼した。

CBB染色にはRapid stain CBB kit (ナカライテスク)、銀染色にはSilver stain II kit wako (和光純薬工業、大阪、日本) を用いた。

参考文献

Ain, R., Devi, K.U., Shivaji, S. and Seshagiri, P.B. (1999). Pentoxifylline-stimulated capacitation and acrosome reaction in hamster spermatozoa: involvement of intracellular signaling molecules. *Mol. Hum. Reprod.* **5**, 618-626.

Alves, A.P., Mulloy, B., Moy, G.W., Vacquier V.D. and Mourão, A. S. (1998). Females of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* differ in the structures of their egg jelly sulfated fucans. *Glycobiology* **8**, 939-946.

Anderson, R.A.Jr., Feathergill, K.A., Rawlins, R.G., Mack, S.R. and Zaneveld, L.J.D. (1995). Atrial natriuretic peptide: a chemoattractant of human spermatozoa by a guanylate cyclase-dependent pathway. *Mol. Reprod. Dev.* **40**, 371-378.

Arnoult, C., Zeng, Y. and Florman, H.M. (1996a). ZP-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J. Cell Biol.* **134**, 637-645.

Arnoult C., Cardullo, R.A., Lemos, J.R. and Florman, H.M. (1996b). Activation of mouse sperm T-type Ca²⁺ channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13004-13009.

Anderson, R.A.Jr., Feathergill, K.A., Rawlins, R.G., Mack, S.R. and Zaneveld, L.J.D. (1995). Atrial natriuretic peptide: a chemoattractant of human spermatozoa by a guanylate cyclase-dependent pathway. *Mol. Reprod. Dev.* **40**, 371-378.

Bleil, J.D. and Wassarman, P.M. (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by zona pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.* **95**, 317-324.

Byrne, M., Morrice, M.G. and Wolf, B. (1997). Introduction of the northern pacific asteroid *Asterias amurensis* to Tasmania – reproduction and current distribution. *Marine Biol.* **127**, 673-685.

- Chinkers, M. (1994). Targeting of a distinctive protein-serine phosphatase to the protein kinase-like domain of the atrial natriuretic peptide receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 11075-11079.
- Corbin, J.D. and Francis, S.H. (1999). Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of Sildenafil. *J. Biol. Chem.* **274**, 13729-13732.
- Dale, B., Dan-Sohkawa, M., De Santis, A. and Hoshi, M. (1981). Fertilization of the starfish *Astropecten aurantiacus*. *Exp. Cell Res.* **132**, 505-510.
- Dan, J.C. (1952). Studies of 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.
- Dangott, L.J. and Garbers, D.L. (1984). Identification and partial characterization of the receptor for speract. *J. Biol. Chem.* **259**, 13712-13716.
- Darszon, A., Beltrán, C., Felix, R., Nishigaki, T. and Treviño, C.L. (2001). Ion transport in sperm signaling. *Dev. Biol.* **240**, 1-14.
- Fisch, J.D., Behr, B. and Conti, M. (1998). Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: differential activation by type-specific phosphodiesterase inhibitors. *Hum. Reprod.* **13**, 1248-1254.
- Fukami, K., Nakao, K., Inoue, T., Kataoka, Y., Kurokawa, M., Fissore, R.A., Nakamura, K., Katsuki, M., Mikoshiba, K., Yoshida, N. and Takenawa, T. (2001). Requirement of phospholipase C δ 4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Science* **292**, 920-923.
- Garbers, D.L. and Kopf, G.S. (1980). The regulation of spermatozoa by calcium and cyclic

nucleotides. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **13**, 251-306.

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

García-Soto, J. and Darszon, A. (1985). High pH-induced acrosome reaction and Ca^{2+} uptake in sea urchin sperm suspended in Na^+ -free seawater. *Dev. Biol.* **110**, 338-345.

Goad, L.J. (1978). The sterols of marine invertebrates: composition, biosynthesis, and Metabolites. In *Marine Natural Product, Chemical and Biological Perspectives* Vol. 2 (ed. Scheuer, P.J.) pp. 75-172. Academic Press.

González-Martínez, M.T., Galindo, B.E., de De LaTorre, L., Zapata, O., Rodríguez, E., Florman H.M. and Darszon, A. (2001). A sustained increase in intracellular Ca^{2+} is required for the acrosome reaction in sea urchin sperm. *Dev. Biol.* **236**, 220-229.

Guerrero, A. and Darszon, A. (1989). Evidence for the activation of two different Ca^{2+} channels during the egg jelly-induced acrosome reaction of sea urchin sperm. *J. Biol. Chem.* **264**, 19593-19599.

Guerrero, A., García, L., Zapata, O., Rodríguez, E. and Darszon, A. (1998). Acrosome reaction inactivation in sea urchin sperm. *Biochim. Biophys. Acta* **1401**, 329-338.

Gunaratne, H.M., Yamagaki, T., Matsumoto, M. and Hoshi, M. (2003). Biochemical characterization of inner sugar chains of acrosome reaction-inducing substance in jelly coat of starfish eggs. *Glycobiology* **13**, 567-580.

Herrero, M.B., Viggiano, J.M., Martínez, S.P. and Gimeno, M.F. (1997). Evidence that nitric oxide synthase is involved in progesterone-induced acrosome exocytosis in mouse spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* **9**, 433-439.

Hirohashi, N. and Vacquier, V.D. (2002a). High molecular mass egg fucose sulfate polymer

is required for opening both Ca^{2+} channels involved in triggering the sea urchin sperm acrossome reaction. *J. Biol. Chem.* **277**, 1182-1189.

Hirohashi, N. and Vacquier, V.D. (2002b). Egg sialoglycans increase intracellular pH and potentiate the acrossome reaction of sea urchin sperm. *J. Biol. Chem.* **277**, 8041-8047.

Hirohashi, N. and Vacquier, V.D. (2002c). Egg fucose sulfate polymer, sialoglycan, and speract all trigger the sea urchin sperm acrossome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**, 833-839.

Hirohashi, N. and Vacquier, V.D. (2003). Store-operated calcium channels trigger exocytosis of the sea urchin sperm acrossomal vesicle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 285-292.

Horowitz, J.A., Toeg, H. and Orr, G.A. (1984). Characterization and localization of cAMP-dependent protein kinases in rat caudal epididymal sperm. *J. Biol. Chem.* **259**, 832-838.

Hoshi, M., Nishigaki, T., Ushiyama, A., Okinaga, T., Chiba, K. and Matsumoto, M. (1994). Egg-jelly signal molecules for triggering the acrossome reaction in starfish spermatozoa. *Int. J. Dev. Biol.* **38**, 167-174.

Hoshino, K., Nomura, K. and Suzuki, N. (1997). Cyclic-AMP-dependent activation of an inter-phylum hybrid histone-kinase complex reconstituted from sea urchin sperm-regulatory subunits and bovine heart catalytic subunits. *Eur. J. Biochem.* **243**, 612-623.

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

Ikadai, H. and Hoshi, M. (1981b). Biochemical studies on the acrossome reaction of the

- starfish, *Asterias amurensis* II . Purification and characterization of acrosome reaction-inducing substance. *Dev. Growth Differ.* **23**, 81-88.
- Jiang, H., Shabb, J.B. and Corbin, J.D. (1992). Cross-activation: overriding cAMP/cGMP selectivities of protein kinases in tissues. *Biochem. Cell Biol.* **70**, 1283-1289.
- Kaupp, U.B., Solzin, J., Hildebrand, E., Brown, J.E., Helbig, A., Hagen, V., Beyermann, M., Pampaloni, F. and Weyand, I. (2003). The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm. *Nat. Cell. Biol.* **5**, 109-117.
- Kawamura, M., Matsumoto, M. and Hoshi, M. (2002). Characterization of the sperm receptor for acrosome reaction-inducing substance of the starfish, *Asterias amurensis*. *Zoolog. Sci.* **19**, 435-442.
- Koyota, S., Wimalasiri, K. M. S. and Hoshi, M. (1997). Structure of the main saccharide chain in acrosome reaction-inducing substance of starfish, *Asterias amurensis*. *J. Biol. Chem.* **272**, 10372-10376.
- Kumar, R., Grammatikakis, N. and Chinkers, M. (2001). Regulation of the atrial natriuretic peptide receptor by heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem.* **276**, 11371-11375.
- Kuno, T., Andresen, J.W., Kamisaki, Y., Waldman, S.A., Chang, L.Y., Saheki, S., Leitman, D.C., Nakane, M. and Murad, F. (1986). Co-purification of an atrial natriuretic factor receptor and particulate guanylate cyclase from rat lung. *J. Biol. Chem.* **261**, 5817-5823.
- Labrecque, J., Mc Nicoll, N., Marquis, M. and De Lean, A. (1999). A disulfide-bridged mutant of natriuretic peptide receptor-A displays constitutive activity. Role of receptor dimerization in signal transduction. *J Biol Chem.* **274**, 9752-9759.
- Labrecque, J., Deschenes, J., Mc Nicoll, N. and De Lean, A. (2001). Agonistic induction of a covalent dimer in a mutant of natriuretic peptide receptor-A documents a juxtamembrane interaction that accompanies receptor activation. *J Biol Chem.* **276**, 8064-8072.

Lefièvre, L., Lamirande, E.D. and Gaugnon, C. (2000). The cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor, sildenafil, stimulates human sperm motility and capacitation but not acrosome reaction. *J. Androl.* **21**, 929-937.

Lefièvre, L., Lamirande, E.D. and Gaugnon, C. (2002). Presence of cyclic nucleotide phosphodiesterases PDE1A, existing as a stable complex with calmodulin, and PDE3A in human spermatozoa. *Biol. Reprod.* **67**, 423-430.

Leung, Y. M. and Kwan, C.Y. (1999). Current perspectives in the pharmacological studies of store-operated Ca²⁺ entry blockers. *Jpn. J. Pharmacol.* **81**, 253-258.

Matsui, T., Nishiyama, I., Hino, A. and Hoshi, M. (1986a). Induction of the acrosome reaction in starfish. *Dev. Growth Differ.* **28**, 339-348.

Matsui, T., Nishiyama, I., Hino, A. and Hoshi, M. (1986b). Acrosome reaction-inducing substance purified from the egg jelly inhibits the jelly-induced acrosome reaction in starfish: an apparent contradiction. *Dev. Growth Differ.* **28**, 349-357.

Matsui, T., Nishiyama, I., Hino, A. and Hoshi, M. (1986c). Intracellular pH changes of starfish sperm upon the acrosome reaction. *Dev. Growth Differ.* **28**, 359-368.

Matsumoto, M., Briones, A.V., Nishigaki, T. and Hoshi, M. (1999). Sequence analysis of cDNAs encoding precursors of starfish asterosaps. *Dev. Genet.* **25**, 130-136.

Matsumoto, M., Solzin, J., Helbig, A., Hagen, V., Ueno, S., Kawase, O., Maruyama, Y., Ogiso, M., Minakata, H., Godde, M., Kaupp, U.B., Hoshi, M. and Weyand, I. (2003). A sperm-activating peptide controls a cGMP-signaling pathway in starfish sperm. *Dev. Biol.* **260**, 314-324.

Monsigny, M., Petit, C. and Roche, A.C. (1988). Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micro method. *Anal. Biochem.* **175**, 525-530.

Morisawa, S. (1999). Acrosome reaction in spermatozoa of the hagfish *Eptatretus burugeri*

(Agnatha). *Dev. Growth Differ.* **41**, 109-112.

森沢幸子、水田貴信、田中裕之、窪川かおる、森沢正昭 (2004) 「ナメクジウオの先体反応」 日本動物学会第 75 回大会

Moy, G.W., Mendoza, L.M., Schulz, J.R., Swanson, W.J., Glabe, C.G. and Vacquier, V.D. (1996). The sea urchin sperm receptor for egg jelly is a modular protein with extensive homology to the human polycystic kidney disease protein, PKD1. *J. Cell Biol.* **133**, 809-817.

Nishigaki, T., Chiba, K., Miki, W. and Hoshi, M. (1996). Structure and function of asterosaps, sperm-activating peptides from the jelly coat of starfish eggs. *Zygote* **4**, 237-245.

Nishigaki, T., Chiba, K. and Hoshi, M. (2000). A 130-kDa membrane protein of sperm flagella is the receptor for asterosaps, sperm-activating peptides of starfish *Asterias amurensis*. *Dev. Biol.* **219**, 154-162.

Nishiyama, I., Matsui, T., Fujimoto, Y., Ikekawa, N. and Hoshi, M. (1987). Correlation between the molecular structure and biological activity of Co-ARIS, a cofactor for acrosome reaction-inducing substance. *Dev. Growth Differ.* **29**, 171-176.

Osman, R.A., Andria, M.L., Jones, A.D. and Meizel, S. (1989). Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160**, 828-833.

O'Toole, C.M.B., Arnoult, C., Darszon, A., Steinhardt, R.A. and Florman, H.M. (2000). Ca^{2+} entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1571-1584.

Potter, L.R. and Garbers, D.L. (1992). Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization. *J. Biol. Chem.* **267**, 14531-14534.

Potter, L.R. and Hunter, T. (1999a). A constitutively "phosphorylated" guanylyl

cyclase-linked atrial natriuretic peptide receptor mutant is resistant to desensitization. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1811-1820.

Potter, L.R. and Hunter, T. (1999b). Identification and characterization of the phosphorylation sites of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors A and B. *Methods*. **19**, 506-520.

Putney, J.W.Jr. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **7**, 1-12.

Putney, J.W.Jr., Boroad, L.M., Braun, F., Lievremont, J. and Bird, G.S.J. (2001). Mechanisms of capacitative calcium entry. *J. Cell Sci.* **114**, 2223-2229.

Revelli, A., Costamagna, C., Moffa, F., Aldieri, E., Ochetti, S., Bosia, A., Massobrio, M., Lindblom, B. and Dario, G. (2001). Signaling pathway of nitric oxide-induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol. Reprod.* **64**, 1708-1712.

Roldan, E.R.S., Murasse, T. and Shi, Q. (1994). Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* **266**, 1578-1581.

Rosselli, M., Keller, P.J. and Dubey, R.K. (1998). Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum. Reprod. Update* **4**, 3-24.

Rotem, R., Zamir, N., Keynan, N., Barkan, D., Breitbart, H. and Naor, Z. (1998). Atrial natriuretic peptide induces acrosome exocytosis of human spermatozoa. *Am. J. Physiol.* **274**, E218-E223.

Schackmann, R. (1986). Ion measurements in sea urchin sperm. In *Methods in Cell Biology, echinoderm gametes and embryos* vol. 27 (ed. Schroeder, T.E.), pp. 57-71. Academic Press.

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

Shimizu, T., Yoshino, K. and Suzuki, N. (1994). Identification and characterization of putative receptors for sperm-activating peptide I (SAP- I) in spermatozoa of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Dev. Growth Differ.* **36**, 209-221.

Singh, S., Lowe, D.G., Thorpe, D.S., Rodriguez, H., Kuang, W.J., Dangott, L.J., Chinkers, M., Goeddel, D.V. and Garbers, D.L. (1988). Membrane guanylate cyclase is a cell-surface receptor with homology to protein kinases. *Nature* **334**, 708-712.

Suzuki, N., Nomura, K., Ohtake, H. and Isaka, S. (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., Shimomura, H., Radany, E.W., Ramarao, C.S., Ward, G.E., Bentley, J.K. and Garbers, D.L. (1984). A peptide associated with eggs causes a mobility shift in a major plasma membrane protein of sea urchin spermatozoa. *J. Biol. Chem.* **259**, 14874-14879.

Suzuki, N. (1999). Diversity of sperm-activating peptide receptors. In *The Male Gamete, From Basic Science to Clinical Applications* (ed. Gagnon, C.), pp. 257-265. Cache River Press.

Tash, J.S. (1989). Protein phosphorylation: the second messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell Motil. Cytoskel.* **14**, 332-339.

Taylor, S.S., Buechler, J.A. and Yonemoto, W. (1990). CAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 971-1005.

Tilney, L.G. (1985). The acrosome reaction. In *Biology of Fertilization* vol. 2 (ed. Metz, C. B. and Monroy, A.), pp. 157-213. Academic Press.

Torphy, T.J. (1998). Phosphodiesterase isozymes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**, 351-370.

Ushiyama, A., Araki, T., Chiba, K. and Hoshi, M. (1993). Specific binding of acrosome

reaction-inducing substance to the head of starfish spermatozoa. *Zygote* **1**, 121-127.

Vacquier, V.D. and Moy, G.W. (1986). Stoichiometry of phosphate loss from sea urchin sperm guanylate cyclase during fertilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**, 1148-1152.

van den Akker, F., Zhang, X., Miyagi, M., Huo, X., Misono, K.S. and Yee, V.C. (2000). Structure of the dimerized hormone-binding domain of a guanylyl-cyclase-coupled receptor. *Nature*. **406**, 101-104.

Van, Q., Böhmer, M., Hildebrand, E., Weyand, I., Hagen, V., Matsumoto, M., Hoshi, M. and Kaupp, U.B. Chemotaxis in starfish sperm is controlled by cGMP-induced Ca^{2+} fluctuations. submitted.

Van Soom, A., Tanghe, S., De Pauw, I., Maes, D. and de Kruif, A. (2002). Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reprod. Dom. Anim.* **37**, 144-151.

Wang, P., Wu, P., Myers, J.G., Stamford, A., Egan, R.W. and Billah, M.M. (2001). Characterization of human, dog, and rabbit corpus cavernosum type 5 phosphodiesterases. *Life Sci.* **68**, 1977-1987.

Ward, G.E., Brokaw, C.J., Garbers, D.L. and Vacquier, V.D. (1985). Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer. *J. Cell Biol.* **101**, 2324-2329.

Ward, G.E., Moy, G.W. and Vacquier, V.D. (1986a). Dephosphorylation of sea urchin sperm guanylate cyclase during fertilization. *Adv. Exp. Med. Biol.* **207**, 359-382.

Ward, G.E., Moy, G.W. and Vacquier, V.D. (1986b). Phosphorylation of membrane-bound guanylate cyclase of sea urchin spermatozoa. *J. Cell Biol.* **103**, 95-101.

Weyand, I., Godde, M., Frings, S., Weiner, J., Müller, F., Altenhofen, W., Hatt, H. and

Kaupp, U.B. (1994). Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* **368**, 859-863.

Yamaguchi, M., Niwa, T., Kurita, M. and Suzuki, N. (1987). The participation of speract in the acrosome reaction of *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Dev. Growth Differ.* **30**, 159-167.

Zamir, N., Barkan, D., Keynan, N., Naor, Z. and Breitbart, H. (1995). Atrial natriuretic peptide induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. *Am. J. Physiol.* **269**, E216-E221.

Zapata, O., Ralston, J., Beltrán, C., Parys, J. B., Chen, J. L., Longo, F. J. and Darszon, A. (1997). Inositol triphosphate receptors in sea urchin sperm. *Zygote* **5**, 355-364.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始御指導、御高配を賜りました慶應義塾大学理工学部教授、星元紀博士および慶應義塾大学理工学部助教授、松本緑博士に謹んで感謝の意を表します。

また、実験動物の入手に関し、御尽力頂きました長浜バイオ大学環境生命科学コース教授、池上晋博士、広島県大野町松本水産、松本浩一氏、岡山大学理学部付属牛窓臨海実験所、東京大学海洋研究所附属大槌臨海研究センター、Marine and Coastal Research Tasmania の方々に厚く感謝致します。

また、P15 の合成および精製をして頂きましたサントリー生物有機科学研究所、幹渉博士および南方宏之博士に心より感謝致します。

また、タンパク質の N 末端アミノ酸配列の決定をして頂きました北海道大学薬学部教授、横沢英良博士および北海道大学機器分析センターの方々に深く感謝致します。

また、細胞内 pH の測定に関して御助言を頂きました慶應義塾大学理工学部助手、北村美一郎博士に厚く感謝致します。

また、親身になって御指導、御討論頂きました慶應義塾大学理工学部助手、小林一也博士、慶應義塾大学文学部助手、村部直之博士、科学技術振興機構研究員、川村麻由博士およびハウス食品株式会社、上野正一氏に心より感謝致します。

また、研究生活を共に過ごし、多くの面で支えて頂きました慶應義塾大学理工学部発生・生殖生物学研究室の同士および秘書の方々に感謝致します。

最後に、このような機会を与えてくださり、陰ながら支え応援して頂きました家族の皆に感謝致します。