

Structure and function of sperm-activating peptide binding protein

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Shimizu, Takeshi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16041

氏 名	清 水 健
生 年 月 日	
本 籍	神奈川県
学 位 の 種 類	博士 (理学)
学 位 記 番 号	博乙第103号
学位授与の日付	平成7年9月26日
学位授与の要件	論文博士 (学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	Structure and function of sperm-activating peptide binding protein (精子活性化ペプチド結合タンパク質の構造と機能に関する研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 桜 井 勝 (副査) 和 田 敬四郎, 大 場 義 樹 鈴 木 範 男, 二階堂 修

学位論文要旨

I examined the effects of two egg jelly components, a fucose sulfate glycoconjugate (FSG) and sperm-activating peptide I (SAP-I : Gly-Phe-Asp-Leu-Asn-Gly-Gly-Gly-Val-Gly) , on the intracellular pH (pH_i) and Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) of spermatozoa of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. FSG and/or SAP-I induced elevations of $[Ca^{2+}]_i$ and pH_i in the spermatozoa. A second addition of FSG did not induce further elevation of the $[Ca^{2+}]_i$ or pH_i of spermatozoa treated with FSG, but addition of FSG after SAP-I or of SAP-I after FSG induced further increases of $[Ca^{2+}]_i$ and pH_i . Tetraethyl-ammonium, a voltage-sensitive K^+ -channel blocker, inhibited induction of the acrosome reaction and elevations of $[Ca^{2+}]_i$ and pH_i by FSG, but did not affect those by SAP-I. These results suggest that FSG and SAP-I activate different Ca^{2+} and H^+ transport systems.

I characterized putative receptors specific for SAP-I in spermatozoa of the sea urchin *H. pulcherrimus*, using both binding and crosslinking techniques. Analysis of the data obtained from the equilibrium binding of a radioiodinated SAP-I analogue [$GGGY(^{125}I)$ -SAP-I] to *H. pulcherrimus* spermatozoa showed the presence of two classes of receptors specific for SAP-I in spermatozoa. The incubation of intact spermatozoa as well as sperm tails or sperm membranes prepared from *H. pulcherrimus* spermatozoa with $GGGY(^{125}I)$ -SAP-I and a chemical crosslinking reagent resulted in the radiolabelling of a 71kDa protein. A cDNA encoding the 71kDa protein was isolated from a *H. pulcherrimus* testis cDNA library. The amino acid sequence of the matured 71kDa protein is similar to cystine rich domain of a human macrophage scavenger receptor.

A cDNA clone for the membrane form of guanylate cyclase was isolated from a *H. pulcherrimus* testis cDNA library. An open reading frame predicts a protein of 1125 amino acids including an apparent signal peptide of 21 residues.

ヒトを含む全ての動物の受精には卵外被層が重要な役割を担っている。私は配偶子が大量に扱え、そして、受精が容易に行えるウニ類を用いて、卵外被層と精子との相互作用をそれに関する物質を中心に解析した。ウニ卵外被層はフコース硫酸タンパク質複合体 (FSG) とシアロ糖タンパク質の2種類の高分子成分と低分子の精子活性化ペプチド (SAP) より構成されている。FSG は精子先体反応誘起の主因子として働き、精子細胞内 pH, カルシウムイオン濃度, cAMP 濃度, IP_3 濃度の上昇を引き起こし、SAP は弱酸性海水中での呼吸量の増大、運動性の向上および精子先体反応の補助因子としての働きを示し、精子細胞内 pH, カルシウムイオン濃度, cGMP 濃度, cAMP 濃度の上昇を引き起こすことが知られている。バフンウニの FSG と SAP-I (Gly-Phe-Asp-Leu-Asn-Gly-Gly-Gly-Val-Gly) を用いてバフンウニ精子に対する細胞内 pH とカルシウムイオン濃度の作用について検討した。pH 6.6 と pH 8.0 の人工海水中における SAP-I の濃度依存性は細胞内 pH に関しては pH 6.6 の方が pH 8.0 よりも低濃度の SAP-I によって上昇し、細胞内カルシウムイオン濃度に関しては、pH 8.0 では上昇したが、pH 6.6 ではほとんど細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は検出できなかった。次に、SAP-I を最終濃度 0.59 nM になるように精子懸濁液に加えると2度目に SAP-I を等濃度添加してもバフンウニ精子の細胞内 pH は上昇しなかった。このことは、バフンウニ精子細胞膜上に存在する SAP-I に対する特異的な受容体は限られた数しか存在していないことを示唆していた。SAP-I を最終濃度 0.59 μ M になるように加え、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させ、2度目の添加では、SAP-I は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を引き起こせないことを確認した後に、FSG を加えると細胞内カルシウムイオン濃度は上昇した。その逆に、FSG を最初に加えておいて、精子細胞が FSG による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇に関して感受性を失ったことを確認した後に、SAP-I を添加したときにも、細胞内カルシウムイオン濃度は上昇した。同様な結果は細胞内 pH の上昇に関しても得られた。また、SAP-I と FSG を高濃度で加えることによって SAP-I, FSG に対して共に感受性を失った精子細胞懸濁液中に卵ゼリー溶液を加えても細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は見られなかった。これらのことは、バフンウニ精子細胞には SAP-I に特異的な受容体と FSG に特異的な受容体が別々に存在しており、異なるシステムによって細胞内カルシウムイオン濃度と pH を制御していることを示していた。また、卵ゼリー層中には他に精子細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる因子は存在していないことも示唆していた。電位依存性カリウムチャンネルの阻害剤であるテトラエチルアンモニウム (TEA) は FSG による先体反応誘起を阻害するが先体反応誘起の補助因子としての SAP-I の作用は阻害しなかった。その時の精子細胞内のカルシウムイオン濃度の変化を測定したところ、TEA は SAP-I によるカルシウムイオン濃度の上昇は阻害しなかったが、FSG による上昇は約 50% 阻害した。このことは、精子先体反応誘起にともなうカルシウムイオン濃度の上昇には電位依存性カリウムチャンネルが関与していることを示唆していた。

SAP-I に特異的な受容体の存在が示唆されたことから、結合実験および架橋実験により SAP-I 受容体分子の特定を行った。精子活性化ペプチドの誘導体 (GGGY-SAP-I) を合成し、 $Na^{125}I$ を用いてクロアミン T 法によって標識した。非放射性誘導体 (GGGY(I)-SAP-I) は精子活性化ペプチドによって起こる精子での作用 (弱酸性海水中での呼吸量の上昇、精子細胞内での cGMP 濃度の上昇) において、 EC_{50} はそれぞれ 0.056 nM と 32 nM であり、これらの値は SAP-I と同じであった。この SAP-I の放射性誘導体を用いて精子細胞との結合実験を行い、Klots plot, Scatchard plot, Hill plot によって解析を行った。その結果、高親和性結合部位と低親和性結合部位が精子細胞膜上に存在することが明らかになった。それぞれの K_d は 0.58-0.65, 23-25 nM であり、 B_{max} は 6.4, 11.0 pmol / mg 精子重量であった。また、高親和性結合部位において正の協同性がみられた。SAP-I と精子細胞との K_d と呼吸促進活性、細胞内 pH 上昇活性、細胞内カルシウム濃度上昇活性および細胞内 cGMP 濃度上昇活性の EC_{50} を比較したところ、それぞれ 0.056, 0.045, 7.0, 32 nM であり、細胞内 cGMP 濃度上昇活性が低親和性結合部位の K_d にほぼ一致したが、他の値は一致しなかった。次に、この SAP-I の放射性誘導体を用いて、架橋実験を行った。その結果、SAP-I の誘導体と架橋されるタンパク質は、SDS-PAGE

上で71kDaの大きさを示し、頭部よりも尾部に多く分布しており、精子細胞膜上に存在していることが明らかになった。また、SAP-Iを過剰に加えることによって、SAP-Iの誘導体と71kDaタンパク質との架橋が阻害され、他の種より得られた特異性の異なる精子活性化ペプチド-Ⅲ（SAP-Ⅲ）を過剰に加えた時には、SAP-Iの誘導体と71kDaタンパク質との架橋は阻害されなかった。このことから71kDaタンパク質は特異的にSPA-Iの誘導体と結合することが明らかになった。また、非常に少ないが75kDaタンパク質もSAP-Iの誘導体と架橋された。71kDaタンパク質をコードするcDNAをバフンウニ精巣cDNAライブラリーより単離した。502残基のタンパク質をコードしており、バフンウニ精子より精製した71kDaタンパク質のN-末端との比較から、シグナルペプチドは30残基であり成熟タンパク質は472残基であることが明らかになった。推定されたアミノ酸配列に膜貫通領域が一カ所存在し、膜タンパク質をコードしていることが示唆され、N-結合型糖鎖付加の可能性のあるコンセンサス配列が三カ所細胞外ドメインに存在した。また、ノーザン解析により、約2.6 kbのmRNAが精巣でのみ発現しており、卵巣や未受精卵には発現していなかった。推定されたアミノ酸配列の比較により、スカベンジャー受容体に存在する約100残基中に6個のシステイン残基が厳密に保存されているシステインリッチドメインを持ったファミリーの一員であることが明らかになった。SAP-I受容体はシステインリッチドメインを細胞外にタンデムに四つ保持していた。システインリッチドメインを持った他のタンパク質として免疫細胞の表面抗原CD6、Mac-2結合タンパク質、また免疫系に関与しているCyclophilinと相互作用を持つCyclophilin C-associatedタンパク質などが知られているが、機能については明らかになっていない。SAP-I-SAP-I結合タンパク質の系はリガンドが低分子でありSAP-I結合タンパク質の精製法が確立しているため、システインリッチドメインの機能を解明するための良い実験系であると思われる。

精子活性化ペプチドが精子細胞膜上に存在するSAP-I受容体と特異的に結合すると、細胞内pHとカルシウムイオン濃度の上昇を引き起こすと共に、グアニル酸シクラーゼの活性化とそれともなう精子細胞内cGMP濃度の一過的な上昇を引き起こすことが知られている。グアニル酸シクラーゼはリン酸化タンパク質であることが明らかになっており、SAP-Iの結合後、5秒以内にグアニル酸シクラーゼは活性化型であるリン酸化型から不活性化型である脱リン酸化型に速やかに変化することが明らかになっている。SAP-I結合タンパク質の機能を明らかにする第一歩としてSAP-Iによって一過的に活性化されるグアニル酸シクラーゼのクローニングを行った。バフンウニ精巣cDNAライブラリーよりグアニル酸シクラーゼをコードしているcDNAを単離し、全塩基配列を決定し、アミノ酸配列を推定した。推定したアミノ酸配列はバフンウニ精子から精製したグアニル酸シクラーゼより決定した7つの部分アミノ酸配列をすべて含んでいた。バフンウニ精子グアニル酸シクラーゼは1104残基よりなり、膜貫通領域が一カ所存在し、膜タンパク質であることが示唆された。細胞外ドメインに三カ所のN-結合型糖鎖付加の可能性のあるコンセンサス配列が存在した。また細胞内ドメインには、膜結合型グアニル酸シクラーゼに保存されているキナーゼ様ドメインと触媒ドメインがそれぞれ存在した。この精子グアニル酸シクラーゼをコードする約4.4 kbのmRNAは精巣でのみ発現しており、卵巣、未受精卵では発現していなかった。この分布は71kDaタンパク質のそれと一致した。

以上の研究成果からSAP-Iによる精子活性化の機構はFSGの経路とは異なることが示され、SAP-I結合タンパク質の特定および全一次構造を推定できた。また、SAP-I結合タンパク質によって活性が制御されていると思われるグアニル酸シクラーゼの全一次構造も推定できた。

学位論文の審査結果の要旨

ヒトを含む高等動物では受精は卵と精子の相互作用の結果生じ、個体発生を開始する。受精、発生の研究に頻用される海産無脊椎動物ウニ卵は、その周りが透明なゼリー層で覆われており、受精に際して精子はその保護層を通過しなければならない。ウニ卵ゼリー層には精子の先体反応を誘起するフ

コース硫酸糖タンパク質複合体 (FGS) と精子の運動性を活発にする作用のある精子活性化ペプチド (SAP) が含まれていて、両者はともに精子細胞内カルシウムイオン濃度及び水素イオン濃度を増加させる。しかし、SAP は単独では先体反応誘起活性は示さず、FSG による先体反応誘起の特異的補助因子として作用することが知られている。清水健君は、種々の条件下で SAP および FSG による精子細胞内カルシウムイオンおよび水素イオン濃度の増加を検討し、SAP と FSG は精子細胞膜上の異なる部位に結合すること、FSG は精子内の cGMP と cAMP の2種類の環状ヌクレオチドを増加させることをまず示した。次に、放射性ヨードで標識した SAP を用いて精子に対する結合を詳細に検討し、SAP の結合部位には高親和性及び低親和性の2種類の結合部位があり、SAP が高親和性の結合部位に結合すると精子細胞内水素イオンが増加し、呼吸、運動性が高まり、低親和性の結合部位に結合すると細胞内 cGMP 濃度が増加することを示した。更に、放射性ヨードで標識した SAP の精子に対する架橋実験を行い、このペプチドが精子細胞膜上の特異的タンパク質 (71kD) に結合することも明らかにした。このタンパク質を精製するとともに、このタンパク質に対する cDNA をクローニングし、構造解析を行い、このタンパク質は細胞内領域には極端に少なく、分子の殆どが細胞外に露出していること及びこのタンパク質は精子細胞膜上に存在し、精子先体反応誘起に関係していると考えられている小麦胚芽レクチン結合タンパク質と強く会合していることを示す結果も得ている。これらの成果は、受精の機構の理解に資することが大きいと判断できる。清水健君は、生理・生化学的及び分子生物学的研究手法をよく修得し、それらを研究の展開に有効に応用しており、成果も十分なものを得ている。就職の関係で本年5月に大学院を単位取得退学しているが、それまでに得ている成果は博士(理学)の学位を与えるに充分なものであると判断した。