

シンポジウム1 受精機構とその異常

受精における精子および卵子の生物学的機能解析

—とくに配偶子接着・精子核膨化・卵子活性化を中心に—

慶應義塾大学助手 久 慈 直 昭

目 的

受精は精子・卵子接着に始まり、卵子内カルシウム濃度上昇・表層反応を経て最終的に前核形成・第2極体放出に至るが、この一連の過程に関与する分子機構は明確にされていない。受精過程に関わる分子、特に蛋白機能の面から検討することにより、現在原因不明とされている受精障害の新しい概念を構築すると共に、不妊・避妊というヒト生殖現象の治療的修飾につながる研究を試みた。

まず卵・精子接着に関して、精子先体蛋白 SP-10 に対するモノクローナル抗体を作成、配偶子接着過程とその卵子側受容体について検討した。次に精子核の卵子内膨化と精子核蛋白との関係を明らかにする目的で、精子核の in-vitro 脱凝縮系および精子核内ヒストン蛋白検出系を考案し、その男性不妊、特に奇形精子症における精子核脱凝縮機構の異常について検討を加えた。最後に卵子活性化過程を、カルシウム結合蛋白である protein kinase C (PKC)、表層顆粒開口放出に関与する蛋白 syntaxin を中心として分子生物学的に解析した。

方 法

ヒト精子および卵子は、健常ボランティアおよび不妊症患者より書面にて informed consent を得て提供を受け、研究に使用した。

1. 卵・精子接着における先体蛋白 SP-10 の役割に関する検討

ヒト精子先体内膜に特異的に発現する蛋白 SP-10 の受精における役割を検索する目的で、SP-10 親水性15アミノ酸残基に対するモノクローナル抗体を作製、ヒト精子における SP-10 の局在を同定した。また本抗体を用いて透明帯除去ハムスター

卵への侵入、hemizona assay による透明帯との接着能を解析することにより、その機能を検討した。さらに卵子における SP-10 の受容体蛋白を検索するため、インテグリンを発現する F9 細胞および、F9 細胞より $\beta 1$ インテグリンを欠失させた TKO 細胞とヒト先体反応誘起後精子との接着を、抗 SP-10 モノクローナル抗体が抑制するか否かを検討した。

2. 受精障害への精子核蛋白の関与

精子核膨化障害に関与する精子核蛋白組成とその臨床的意義を明らかにする目的で、ヒト精子核膨化能の客観的評価法として 0.05% lyssolecithin-1.5M NaCl-5mM dithiothreitol 液よりなる in-vitro 精子核脱凝縮系を開発した。次に合成ペプチドから作成した抗 protamine 1 抗体および抗 histone H2B 抗体を用いて精子核蛋白中プロタミン・ヒストン比を Western blot 法にて分別定量、精子核蛋白組成および精子形態異常との相関を検討することによりヒト受精障害への関与を検討した。

3. 卵子活性化における情報伝達機構の検討

卵子内カルシウム濃度上昇とそれに伴う phospholipase 活性化に始まる卵子活性化過程の細胞内情報伝達系における中心的分子として、すでにマウス卵子内でその存在が確認されている PKC の前核形成・極体放出に対する役割をその選択的阻害剤を用いて検討した。

4. 表層反応における開口放出関連蛋白 syntaxin の作用

開口分泌現象である卵子表層反応に関与する蛋白として、neuron において開口分泌とくに分泌顆粒—形質膜融合過程における基本的構成蛋白である syntaxin に着目し、マウス卵における本蛋白の同定と受精前後における動態を、Western blot

法, RT-PCR 法および共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。

成 績

1. 卵・精子接着における先体蛋白 SP-10の役割に関する検討

免疫組織染色にて, SP-10が卵子との接着部位である精子先体内膜赤道部に局在することが明らかになった。また抗 SP-10モノクローナル抗体は透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子侵入を抑制し, 一方ヒト卵子透明帯を用いた hemizona assay においてはヒト先体反応誘起精子と卵透明帯との結合を抑制しなかった。ヒト先体反応誘起精子とインテグリン発現 F9細胞との接着を本抗体は抑制したが, インテグリン非発現 TKO 細胞においても同程度に抑制効果があった。

2. 受精障害への精子核蛋白の関与

in-vitro 精子核脱凝縮系における正常精液所見群の脱凝縮は迅速で, 90%以上の精子核が完全脱凝縮に至った。異常精液所見群のうち, 精子無力症症例, および奇形精子症のうち精子頭部縦横比の高い tapering 精子優位症例の2つの群では本法における脱凝縮が遅延すると共に, ハムスター卵への顕微注入後の精子核膨化も遅延した。一方正常精液所見群の精子核蛋白分析において protamine 1を12KD に, histone H2B を60KD に認め, ヒストン分画は核蛋白の22%を占めていた。

3. 卵子活性化における情報伝達機構の検討

Ca ionophore による人工的活性化マウス卵において, PKC 活性化剤 TPA は PKC の基質蛋白である33KD および45KD をリン酸化し, 同時に前核形成を促進したが第2極体放出は抑制した。一方, PKC 阻害剤 staurosporine は前核形成および第2極体放出を抑制したことから, diacylglycerol 依存性 PKC が卵子活性化過程の中で, とくに前核形成に関与していることが明らかになった。

4. 表層反応における開口放出関連蛋白 syn-

taxin の作用

マウス卵子において, 抗 syntaxin ポリクローナル抗体を用いた Western blot 法でシングルバンドが確認された。本抗体を用いた免疫染色において, syntaxin は受精前には卵細胞質表層および形質膜, 受精後には形質膜近傍のみに存在し, 受精過程にともなう局在変化が観察された。さらに受精前の細胞質の局在は lens-culinaris-agglutinin (LCA)を用いて染色した表層顆粒と co-localize しており, 形質膜および表層顆粒にこの蛋白が存在することが明らかになった。開口放出に関わる syntaxin isoform である syntaxin 1A, 1B, 4に対するプライマーを用いて RT-PCR 法を行った結果, 中枢神経系に存在する syntaxin 1A, 1B と異なり type 4に相当するバンドが確認され, cDNA sequence の結果もマウス syntaxin 4と一致した。

結 論

1. 卵との接着・融合開始部位である精子先体内膜赤道部に局在する SP-10は, 透明体との接着ではなく, 卵子形質膜との接着・融合に関与することが明らかとなった。

2. in-vitro 精子核脱凝縮系は精子運動性・精子形態と相関があったことから, 精子機能の新しい指標となりうることが示唆された。またヒト精子核には相当量のヒストンが存在することが明らかになり, ヒストンからプロタミンへの核蛋白置換異常が脱凝縮障害のメカニズムの一つである可能性が示唆された。

3. 受精過程における前核形成不全において, PKC を中心とする情報伝達系とその異常が関与している可能性が考えられた。

4. 卵子活性化の一過程である表層反応には, 神経細胞で確認されている開口放出関連蛋白, とくに syntaxin 4が関与していることが明らかとなった。