

Title	マウス精子-卵子認識機構に関する研究
Author(s)	河合, 裕一
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37860">https://hdl.handle.net/11094/37860</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 【 3 】

氏名	かわい ゆういち 河合裕一
博士の専攻分野 の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 9890 号
学位授与年月日	平成 3 年 9 月 12 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	マウス精子-卵子認識機構に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 真弓 忠範 (副査) 教授 近藤 雅臣 教授 三村 務 教授 三浦 喜温

## 論 文 内 容 の 要 旨

精子と卵子の認識反応は非常に高い種特異性を有しており、通常の状態では異種間の受精は起こり得ない。この厳密な特異性を規定しているのが卵子を包む透明帯である。そこで、透明帯上には精子受容体 (receptor)、精子頭部膜上には卵子認識分子 (ligand) の存在が想定されているが、材料収集の困難さから、その分子の実体は未だ解明されていない。そこで、マウス卵子透明帯上の精子 receptor 分子と精子先体部分に存在する ligand 分子両面から、精子-卵子認識機構の解明を目的として研究を行なった。

まず、精子-卵子がお互いに specific な認識をして結合することを測定できる系の確立を試みた。卵子と精子とを混合培養すると、精子はまず卵子の透明帯表面に軽く接着し、次いで強固な結合 (binding) を形成する。そこで卵子から接着している精子を除き、結合している精子のみを測定するために Stop-fix technique を用いた。その結果、精子は透明帯上に receptor 分子が存在する未受精卵とは結合するが、receptor 分子が消失している受精卵とは結合しない binding assay 系が確立出来た。

次にこの系を利用して、透明帯中の receptor 本体の解析を試みた。マウスの透明帯を各種条件下に可溶化し、可溶化後の透明帯溶液中に receptor 活性が存在するかどうかをまず検討した。その結果、可溶化透明帯中には、精子に対する receptor 活性が存在し、しかもその活性は、酸、アルカリ、熱、S-S還元剤などに対して安定であり、かつ pronase の消化を受けないという結果が得られた。この結果は、receptor 活性は透明帯のタンパク部分というよりも、むしろ糖鎖部分に依存している可能性を強く示唆している。

そこでレクチンを用い receptor 分子中の糖鎖の推定を行なった。その結果、GalNAc を認識する DBA、GlcNAc を認識する PHA および NeuNAc を認識する LPA レクチンで卵子を処理すると精子

の binding は阻害された。また、卵子の代わりに単離透明帯を用いた binding assay においてもよく一致した結果が得られた。さらに binding を阻害したレクチンで可溶化透明帯を吸収した場合には、可溶化透明帯中の receptor 活性はほとんど消失した。次に基質特異性の高い種々の EXO 型糖加水分解酵素 (Glycosidase) で卵子透明帯を処理することにより精子に対する receptor 活性が低下するか否かを検討した。その結果、それぞれの酵素単独処理あるいは Neuraminidase,  $\beta$  - Galactosidase の順に逐次加水分解した場合には、ほとんど receptor 活性に影響を与えなかった。ところが、Neuraminidase,  $\beta$  - Galactosidase, N-acetylhexosaminidase の順に逐次加水分解した場合には明らかに receptor 活性の低下が認められた。また、逐次加水分解する酵素の順序を変えると receptor 活性の変動は認められなかった。以上の結果を合わせ考えると、receptor 分子内には NeuNAc - Gal - GalNAc あるいは NeuNAc - Gal - GlcNAc - といった構造が存在すると推定することができる。そこで、単糖の存在下 competitive binding assay を行なった。その結果、NeuNAc が最も強力に精子の binding を阻害し、次いで GalNH<sub>2</sub>, GalNAc GlcNAc の順に阻害し、Mannose, Galactose などは全く阻害しなかった。

以上の結果を総合すると、GalNAc あるいは GlcNAc を含む複合糖鎖が、精子に対する receptor 活性を示す上で非常に重要であると言える。これらの結果より receptor 分子そのものの糖鎖構造が完全に解明されたわけではないが、これ以上の実験は、卵子透明帯の量的な面からも難しいと判断し、以後は観点を改めて精子側よりアプローチした。

マウスにおいて、透明帯に結合している精子は全て先体を保持しており、先体を失った精子は透明帯上の receptor に結合できないという事実から、ligand 分子は先体反応に伴って精子より遊離する先体部分に存在していると考えられている。そこで精子を、先体反応誘導剤であるカルシウムイオノフォア A23187 で処理することにより精子先体膜分画を調製し、それらの中に ligand 分子が存在しているかどうかを検討した。また同時に、A23187 処理精子が卵子に対する binding 能を失ったかどうかを調べた。その結果、A23187 処理精子は卵子への結合能をほとんど失った。また A23187 処理精子由来の膜分画によって精子の binding は濃度依存的に阻害された。従って精子の膜分画中には ligand 分子が含まれていると考えられるので、副睾丸尾部精子を出発原料とし binding 阻害活性を指標に精製した。その結果、100 匹の成熟マウス由来の精子より、電気泳動上単一で分子量約 67,000 の ligand 分子 0.2 mg を精製することに成功した。次に、この精製した ligand 分子が直接卵子透明帯と結合するかどうかを確認するために、ligand 分子を常法に従い lactoperoxidase 法で放射標識し、卵子および単離透明帯との結合実験を行なった。その結果、標識 ligand 分子は未受精卵とは結合したが、受精卵とはほとんど結合しなかった。またその未受精卵への結合は、約 30 分間で一定となり、その後 6 時間までほとんど変化が認められなかった。さらに、単離透明帯に対しても未受精卵に結合したものとほぼ同じ量の ligand 分子が結合した。その結果をもとにスキッチャードプロット解析し卵子一個当たりの receptor 数を約 660,000 分子と算出した。

以上、1) マウスにおいて精子と卵子の特異的結合を測定する系を確立した。2) マウス精子に対する卵子透明帯上 receptor 分子の構造の中には NeuNAc - Gal - GalNAc - あるいは NeuNAc - Gal -

GlcNAc - の構造が含まれていると推定した。またその中でも特にGalNAc - , GlcNAc - 残基が重要であることを明らかにした。3) 副睾丸尾部精子を精製原料としてligand分子を、電気泳動上単一にまで精製した。4) 放射標識したligand分子を用い、スキャッチャードプロット解析により卵子一個当たりのligand分子の最大結合数を約660,000分子であると算出した。

### 論文審査の結果の要旨

精子と卵子の認識反応は非常に高い種特異性を有しており、通常の状態では異種間の受精は起こり得ない。この特異性を規定しているのが卵子を囲む透明帯である。現在のところ、透明帯上には精子受容体、精子頭部膜上には卵子認識分子の存在が想定されているものの、その分子の実体は未だ解決されていない。

本論分は、精子-卵子の特異的認識・結合の測定系の開発を行った後、本系を利用して、マウス卵子透明帯上の精子受容体分子と精子先体部分に存在する卵子認識分子の両面から種々検討をくわえ、精子-卵子認識機構の解明に迫ろうとしたものである。

その結果、マウスにおける精子-卵子の特異的結合を測定するBinding Assay系を確立した。さらに、精子-卵子結合には、卵子透明帯上の精子受容体分子構造のうち NeuNAc - Gal - GalNAc - and /or NeuNAc - Gal - GlcNAc - の糖鎖構造が重要であること、また精子先体膜を精製原料として、分子量67000の卵子認識分子をSDS - PAGE上単一に精製したのち、放射標識した本分子の卵子透明帯に対する特異結合性を種々検討し、卵子に対する最大結合数などを明らかにした。

以上の成果は、複雑な精子-卵子認識機構の一端を分子のレベルで明らかにしたものであり、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものである。