

## 論文内容の要旨

### Regulation of sperm motility by Hofmeister effect in the viviparous fish guppy *Poecilia reticulata*

(Hofmeister 効果による精子運動制御機構に関する胎生魚グッピーを用いた研究)

氏名 田中 裕之

胎生魚グッピー (*Poecilia reticulata*)において、精液は交尾により卵巣に直接送り込まれ、精子は数ヶ月にもわたって卵巣内に蓄えられ、受精も卵の周期的成熟に合わせて卵巣内で起こることが知られている。この際立った特徴から、グッピーは胎生魚の精子運動性制御の研究材料として非常に興味深い種である。そこで、グッピーを用いて精子運動制御機構に関する研究を行った。グッピーはその生殖様式から、一般の海産魚や淡水魚のように受精のプロセスにおいて精子は浸透圧の変化に晒されることは無いと考えられる。研究開始当初までに、精子は浸透圧の変化に対して積極的な応答を示さないこと、および等張溶液中でいくつかのイオンによって活性化されることがわかっていた。(Morisawa, 1985, Zool. Sci.) しかしどのような溶質で、どのような原理に基づき精子は活性化されているのかについて全く明らかにされていなかった。そこで本博士論文の第一部では、等張溶液中で様々な溶質による精子活性化を評価することにより精子活性化の原理を探った。その結果、溶質はそれぞれ異なる強さの精子活性化能を持ち、それらの溶質を精子活性化能の強さで序列化すると Hofmeister 系列と一致し、chaotrope が精子を活性化し、kosmotrope が精子活性化を阻害することを見出した。また、その法則性とは独立に、多価イオンが精子を活性化することも明らかとなった。以上2つの経験則により全ての溶質による精子活性化を法則化することができた。今回見られた Hofmeister 溶質による精子運動制御現象は Hofmeister 効果の持つ性質をよく満たし、精子の運動開始現象が溶質の Hofmeister 効果により制御されることが強く示唆された。第二章では、グッピーの精子を活性化する溶質である chaotrope および多価イオンによる精子活性化に関与する細胞内シグナルを探った。Triton X-100 による除膜モデル、細胞内 cAMP および細胞内  $Ca^{2+}$  レベルの測定などの方法

を用いた解析を行った結果、精液内では未成熟で運動を停止している精子が **chaotrope** や多価イオンに晒されることにより、何らかのシグナルを経て細胞内 **cAMP** レベルが上昇し、**cAMP** 依存的な精子成熟および運動の開始が誘導されることが明らかになった。最後に第三章において、グッピー精子の運動開始が **Hofmeister** 効果によって制御される現象について、その生理的意義の解明を行った。精液成分はあらゆる **chaotrope** および多価イオンによる精子活性化を阻害することを見出し、このことは精液にはオスの輸精管内で精子活性化を阻害して精子を不活性に保つ活性が存在することを意味した。そこで、精液が **chaotrope** による活性化を阻害する作用は精液の **kosmotropic** な性質によるものである、との仮説を立てた。溶解度を測定することにより精液の物理化学的性質を検討し、**Hofmeister** 効果による精子運動制御機構が生理的現象において実際に機能していることを示した。

## 第一部 グッピー精子の運動開始を制御する溶質

グッピー精子は **spermatophore** として形成され、射精時まで輸精管に蓄えられている。(図1) オスの腹を軽く圧迫し、ガラス毛細管に精液を採取し観察すると、精子は運動を停止しており、輸精管内でも運動を抑制された状態にあると考えられた。さて森沢 (Morisawa, 1985, Zool. Sci.)により、グッピー精子は等張溶液中で最も良い活性化が見られること、および **NaCl**, **KCl** などの電解質中ではゆっくりとした活性化が見られるが、**mannitol**, **glucose** などの非電解質中では活性化が見られないことが報告されている。しかし、これらの溶質の効果がどのような原理に由来するのかについては明らかにされていなかった。そこで等張溶液中で様々な溶質を精子に作用させることにより、溶質による精子運動制御の原理を探った。その結果、精子を活性化または不活性化する溶質の種類には幅広い選択性が見られ、その選択性から「**Hofmeister** 系列 (表1) における **chaotrope** (高分子不安定化溶質) および多価イオンによって精子は活性化され、**kosmotrope** (高分子安定化溶質) により精子は不活性化される」という経験則が成立することを見出した。(図2・3) 次に **Hofmeister** 効果に知られる5つの物理化学的性質について精子運動性制御との対応を検討した。その特徴の一つに溶質効果の加減則がある。溶質効果の加減則とは、**chaotrope** と **kosmotrope** が共存すると、お互いの相反する効果が打ち消される現象を指す。精子運動性においても溶質効果の加減則が成立した (図5) ことなどからも、**Hofmeister** 溶質によるグッピー精子運動性制御の現象が **Hofmeister** 効果を介することが示された。

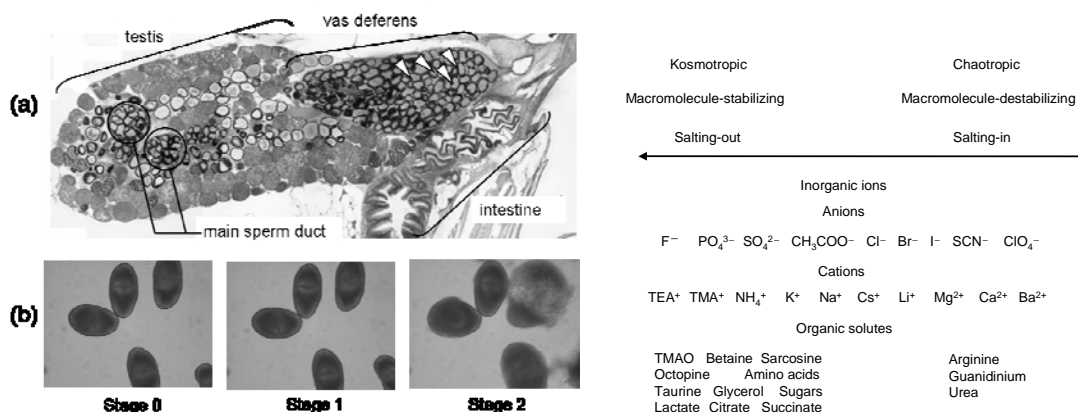
## 第二部 精子運動制御に関与する細胞内シグナル

細胞内 **Ca<sup>2+</sup>** および **cAMP** レベルが精子運動開始・活性化に関与することが様々な動物種において知られている。そこで **chaotrope** および多価イオンによるグッピー精子活性化現象について、除膜モデルによる解析および細胞内 **Ca<sup>2+</sup>**・**cAMP** レベルの測定を行った。**Triton X-100** による除膜モデルの解析においては、精子を不活性化する溶質である **kosmotrope** から成る除膜液によって除膜した場合には再活性化の際に **cAMP** の添加を必要とした。それに対し、一旦 **chaotrope** により運動開始させてから除膜した場合は再活性化に **cAMP** の添加を必要としなかった。このことから **chaotrope** による精子活性化の際に **cAMP** 依存的な精子成熟が起きていることが示された。**ELISA** を用いた細胞内 **cAMP** レベルの測定によっても精子活性化の際に **cAMP** レベルの上昇が検出された。(図4) また、膜透過型の **cAMP**

の添加によっても精子は運動を開始したことから、細胞内 cAMP レベルの上昇は chaotrope による精子活性化の際の内因的な引き金であると考えられた。蛍光色素 Fluo4 による細胞内 Ca<sup>2+</sup>レベルの測定においては、活性化の際に変動は検出されず、細胞内 Ca<sup>2+</sup>レベルの精子運動活性化への積極的関与は無いと考えられた。

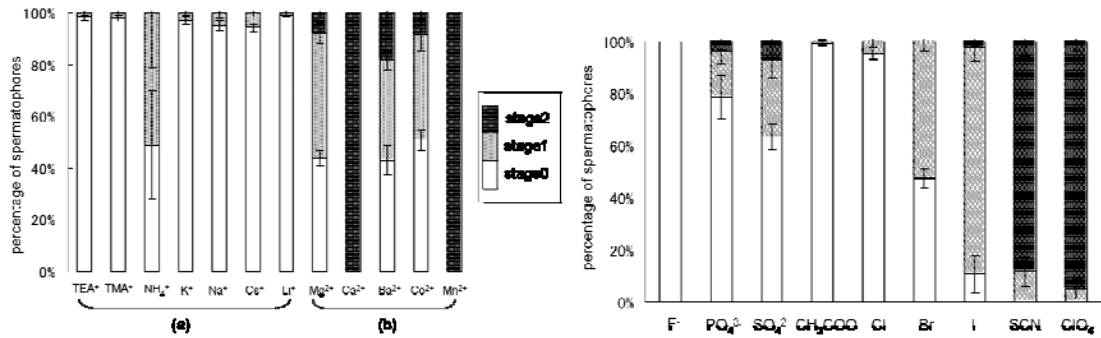
### 第三部 Hofmeister 効果による精子運動性制御の生理的意義

グッピー精子の運動開始は溶質の Hofmeister 効果により制御されることを第一部で示したが、第三部ではその現象の生理的意義について検討を行った。前述のように、精子はオスの輸精管において精液に浸かった状態で運動を停止している。そして精液が希釈され chaotrope や多価イオンに晒されると運動を開始するが、そのとき精液成分が良く希釈されない場合には活性化が効果的に抑えられることを見出した。このことから輸精管における精子運動の停止が、精液に由来する精子運動阻害活性に存することが推測された。そこで、第一部で示された kosmotrope による Hofmeister 効果を介したグッピー精子運動阻害活性こそが、精液に存する精子運動阻害活性である可能性について検討を行うこととした。溶解度測定モデル物質である BTEE (N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester) および phenylalanine を用い、精液成分の物理化学的性質の評価を行った。精液成分が kosmotropic であればモデル物質の溶解度は精液成分の添加により減少すると想定される。結果、精液の添加により両モデル物質の溶解度は減少し、精液は kosmotropic な性質を示すことが明らかになった。続いて分子量による精液成分の分画を行い、それぞれの画分の精子運動制御およびモデル物質の溶解度に対する効果を評価した。その結果、精液に存することが明らかになった精子運動阻害活性およびモデル物質の溶解度を減少させる活性は、共に分子量3万以上の高分子画分に存することが明らかになった。以上の結果から、精液に含まれる高分子成分の持つ Hofmeister 効果により精子を精液中で不活性状態に保つという、溶液の物理化学的性質に依存した新規の精子運動制御機構の存在が示唆された。



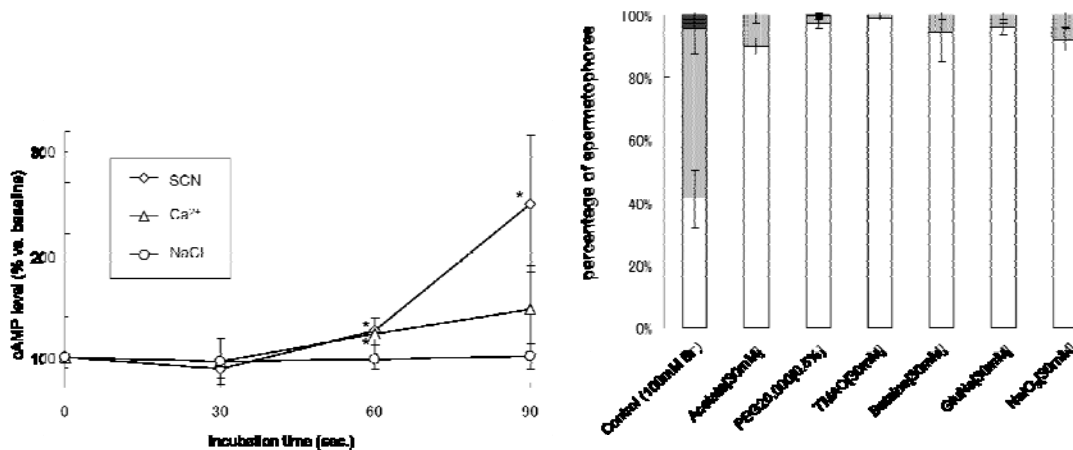
(左) 図1 グッピー雄性生殖器官の構造と chaotrope による spermatophore の活性化(a)へマトキシリン・エオシン染色を行った。形成された spermatophore (矢頭)は輸精管(vas deferens)に蓄えられる。(b) 等張の NaI (chaotrope)溶液に希釈された精子は、stage 0 (精子は運動を停止)、stage 1 (spermatophore の中で精子が運動を開始)、stage 2 (spermatophore の構造が崩壊し自由になった精子が泳ぎ出る)の経過で活性化する。

(右) 表1 Hofmeister 系列



(左) 図2 各種陽イオンが精子運動性に及ぼす効果 (a)等張の一価イオンの塩化物塩溶液(pH7.4)に精液を100倍に希釈し3分後の各活性化段階の spermatozoa の割合を示した。平均値±標準偏差(n=4)を示す。(b) 1mM の二価イオンの塩化物塩を含む等張の NaCl 溶液(pH7.4)による精子活性化

(右) 図3 各種陰イオンが精子運動性に及ぼす効果 等張の陰イオンのナトリウム塩溶液(pH7.4)に精液を100倍に希釈し3分後の各活性化段階の spermatozoa の割合を示した。平均値±標準偏差(n=4)を示す。データはイオンの Hofmeister 系列に従って並べた。



(左) 図4 chaotropic(SCN-)および二価陽イオン(Ca<sup>2+</sup>)による精子活性化における細胞内 cAMP レベルの変動 各イオンにより 0~90 秒間精子を活性化し、細胞内 cAMP レベルを Enzyme immunoassay により測定した。非活性化状態(t=0)に対する比で表した。平均値±標準偏差(n=4)を示す。\*は対照実験(NaCl の処理)に対して p<0.05 で有意差があることを示す。

(右) 図5 各種 kosmotrope が chaotrope(Br<sup>-</sup>)による精子活性化に及ぼす効果 100mM の NaBr、および [ ]に示す濃度の各種 kosmotrope (対照実験は 35mM NaCl) を含む溶液中に精液を希釈し5分後の各活性化段階の spermatozoa の割合を示した。平均値±標準偏差(n=4)を示す。