ヒト精子中に見いだされたアルギニンエステラーゼについて

松田兆史,^{*,a} 押尾 茂,^{b,1)} 兼子 智,^c 飯塚理八,^c
毛利秀雄,^b 秋浜澄行^a

明治薬科大学,^a 東京大学教養学部,^b 慶応大学医学部^c

An Arginine Esterase in the Human Sperm

Yoshifumi MATSUDA,^{*,a} Shigeru OSHIO,^{b,1)} Satoru KANEKO,^c
Rihachi IIZUKA,^c Hideo MOHRI^b and Sumiyuki AKIHAMA^a

*First Department of Biochemistry, Meiji College of Pharmacy,^a 1-35-23, Nozawa,
Setagaya-ku, Tokyo 154, Japan, Department of Biology, College of Arts and
Sciences, University of Tokyo,^b 3-8-1, Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153,
Japan, and Department of Obstetrics and Gynecology, School of
Medicine, Keio University^c, 35 Shinanomachi,
Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan*

(Received November 30, 1988)

Human sperm was highly purified by the use of a discontinuous Percoll density gradient placed in an innercolumn of a centrifugation tube. Seminal plasma contamination was only 0.0008 percent in the purified sperm.

A new basic arginine ester hydrolyzing enzyme with a weak affinity for lima bean trypsin inhibitor (LBTI) Cellulofine column was found in the purified human sperm, and the characteristics of this enzyme were found to be different from those of human acrosin.

Keywords—human sperm; seminal plasma; Percoll; innercolumn method; purification; basic arginine esterase; lima bean trypsin inhibitor

緒 言

受精過程を生化学的に解明することは、生物学的に重要な意味を持つばかりでなく、医学的に見ても不妊症治療あるいは避妊研究などの上で大きな役割を果たすものである。今回我々は、受精現象の生理化学的研究の一環として、ヒト精子中のアルギニンエステラーゼに関する基礎的検討を試みた。

精液中には、精子以外にも上皮細胞、白血球あるいは細菌などが含まれている。また、精子は成熟精子のみでなく未成熟精子や形態異常精子が共存している。そこで精子の生化学研究を行うには、精漿から精子を完全に分離するばかりでなく、成熟した精子のみを分取し、そこから得た標品について議論する必要がある。

従来、生化学研究あるいは検査に使用する精子の調製には、希釈洗浄法²⁾ アルブミン重層法³⁾あるいはゲルろ過法⁴⁾などが用いられてきた。これらの方法では成熟精子以外の未成熟及び異常精子、あるいは上皮細胞などの完全な除去ができず、精子の損傷も起こりやすいという欠点がある。さらに精漿の混入も防ぐことができず、精漿に由来する種々の酵素、インヒビター、ホルモンあるいは蛋白質等の影響を無視することは出来ない。近年、研究用精子の調製法として密度勾配遠心用担体フィコールやパーコールを用いた洗浄法が開発されたが⁵⁾ この方法でも約 2—3% の精漿の混在は免れることはできなかった。⁶⁾ そこで著者らは精漿の混在をほぼ完全に除去し、しかも成熟精子のみを得る方法として、多層パーコール濃度勾配遠心法を応用改良した、インナーカラム法の開発検討を試みた。⁷⁾ 開発した方法は精製精子中の精漿の混在をほぼ完全に取り除くことが可能であった。さらに本法により得た精製ヒト精子を用い、精子中に存在するアルギニンエステルを水解するプロテナーゼの検索を行ったところ、精子中にはアクロシン (EC 3.4.21.10) とは異なる、従来の方法では精漿中に存在するプロテナーゼインヒビターにより阻害されていて見出せなかったと考えられる、新しいアルギニンアミダーゼ活性 (アルギニンエステラーゼ活性) が存在することを確認した。

本論文は、新規に開発した精子調製法（インナーカラム法）を用い、ヒト精製精子を調製し、新しく見出したアルギニンアミダーゼ活性について、その性質の一部を検討したものである。

材料及び実験方法

ヒト精液 試料として用いたヒト混合精液は、4 日以上禁欲後、用手法により採取したものをを用いた。

タンパク質量の推定 タンパク質量の指標には、タンパク質の 280 nm の吸収を光路長 1 cm のセルを用いて測定した値 (A_{280}/ml) をを用いた。

酵素活性の測定 基質として塩基性アミノ酸のメチルエステル誘導体を用いるアルギニンエステラーゼ活性の測定は、森脇らのクロモトロープ酸法⁸⁾に準拠し、pH 8.0, 30°C の条件で行った。p-ニトロアニリンを基質として用いるアルギニンアミダーゼ活性の測定は Amundsen らの方法⁹⁾を一部変更し、エステラーゼ活性測定の場合と同一条件で行った。両活性は 1 分間に加水分解された基質の量 (nmol/min) で表示した。

酸性ホスファターゼ活性は基質として p-ニトロフェノール磷酸を用い、pH 5.0, 37°C で測定した。活性の表示は 1 分間に加水分解された基質の量 (mmol/min) で示した。

精子分離用パーコールインナーカラムの調製 0.1 M HEPES を含む 1.5 M 食塩水 (pH 7.4) 1 容量と 9 容量のパーコールを混合し 90% 等張パーコール溶液を作成した。90% パーコール溶液と上記 0.01 M HEPES-1.5 M 食塩水 (pH 7.4) を用い、さらにパーコールの 40%, 60%, 70% 及び 80% (v/v) 溶液を作成した。次に遠心用試験管中に 80% パーコール溶液 6 ml を加え、さらにピペットマンの 5 ml チップをインナーカラムとして挿入し、インナーカラム中に各 1 ml ずつの 70%, 60% 及び 40% パーコール溶液を層積し、精子分離精製用カラムを作成した。

試薬 実験に用いた試薬、タンパク質及びクロマト樹脂はすべて特級品あるいは研究用を用いた。

結 果

ヒト精子の精製

用手法により得たヒト混合射出精液を 100 mM HEPES-ハanks 緩衝液 (pH 7.4) で 3 倍に希釈した後 20 分間室温で放置し、精液中に混在する他細胞や結晶物を沈殿させた。次に 40 μm のナイロンメッシュを通し、さらにゼリー状物質の除去を行ったのち、あらかじめ用意した精子分離用パーコールインナーカラムの上端に上記の処理をした精液を層積し、600 $\times g$ で 30 分間遠心分離を行った。遠心終了時、精漿はインナーカラムの最上層部に、他細胞、未成熟精子あるいは異常精子は各パーコール界面に残り、運動性良好な成熟精子は管底部に移行する。次にインナーカラムの上端をゴムキャップでふさぎ、カラムを静かに除去し、管底に残る精製精子を回収した。Fig. 1 には原精子及び本法を用い精製した精子の顕微鏡写真をそれぞれ示した。

精製精子の性状

精製精子を pH 7.4 に調製した生理食塩水に懸濁し、遠心分離後に得た上清液を精製精子中の精漿狭雑率検討用検体として用いた。精製精子中に狭雑する精漿の除去率は、精漿中に多量に含まれる蛋白質質量並びに酸性ホスファターゼ活性を指標として検討し、結果は Table I に表示した。この結果、前報⁷⁾と同様前者は検出されず、酸性ホスファターゼ活性も精漿中に見出される活性の約 0.0008% まで低下し、ほぼ完全に精漿の除去が行われたことが明らかであった。

新しいアルギニンエステラーゼ活性の検出

上記方法により 1000 ml のヒト混合精液より調製したヒト精製精子懸濁液 18 ml (1 ml あたり 1×10^9 の精子を含む) を出発材料として用いた。この懸濁液に等量の 10% のグリセリンを含む pH 2 塩酸水を加え、ポリト

TABLE I. Exclusion of Seminal Plasma from Purified Sperm

	Seminal plasma	Purified sperm	Ratio
	(mean $\pm$ S.E.)		Sperm/seminal plasma
Protein (A_{280})	165 $\pm$ 57	ND ^{a)}	0
Acid phosphatase	677 $\pm$ 395	0.0053 $\pm$ 0.0030	7.6 $\times 10^{-6}$

a) ND, not detected. Acid phosphatase activity was expressed in terms of mmol/min/ml.

A

B

C

Fig. 1. Photographs of Semen

A, Ejaculated semen; B, purified sperm in the sediment; C, motile purified sperm in the sediment taken by bulb exposure photography.

ロンを用い、精子の粉碎を行い、さらに、2時間 4°C で抽出を行った。この抽出液を遠心分離し、得られた上清液を 0.05 M リン酸緩衝液 pH 7 に対し透析した後、同緩衝液で平衡化した CM-セルロースカラムに添加した。カラムに吸着したアルギニンエステル水解活性画分の溶出は 0.5 M 食塩を含む上記緩衝液を用い行った。得られた活性画分をリマ豆トリプシンインヒビター (LBTI)-セルロファインカラム (1×7 cm) に添加し、0.05 M Tris-HCl 緩衝液 pH 7.5 で洗浄後、pH 2 塩酸水で溶出を行いアクロシン画分が得られた (Fig. 2).

パーコールインナーカラム法で得た精製精子を用いた場合、LBTI-セルロファインカラム通過画分及び 0.05 M Tris-HCl 緩衝液洗浄画分中に、従来洗浄精子に狭雑する精漿中のプロテイナーゼインヒビターの混在によりマスクされ、見出すことの出来なかったアルギニンエステラーゼ活性の存在が認められた (Fig. 2). この酵素は LBTI-セルロファインカラムに対する親和性が弱いことから、精子先体中に存在するアクロシンとは異なる酵素であると考えられる。

アルギニンエステラーゼ活性の性質

本酵素活性とヒトアクロシン¹⁰⁾のアルギニンアミダーゼ活性に対する塩化カルシウムの及ぼす影響の検討を、

Fig. 2. LBTI-Cellulofine Affinity Adsorption and Elution of Human Acrosin

—●—, Tos-Arg-Me esterolytic activity; —○—, protein concentration (A_{280}/ml). A, Wash with 0.05 M Tris-HCl buffer at pH 7.5; B, elute with HCl solution at pH 2.0.

Fig. 3. Effect of Calcium Chloride

Basic arginine esterase and indicated calcium chloride were mixed and then Tos-Arg-Me esterolytic activity was assayed. The activity was expressed as ratio to the control without calcium chloride. —○—, Present enzyme; —●—, human acrosin.¹¹⁾

Fig. 4. Optimum pH

Optimum pH of Tos-Arg-Me esterolytic activity was determined in 0.08 M modified Britton-Robinson's wide range buffer. The activity was expressed as a percentage that at optimum pH.

Fig. 5. Estimation of Molecular Weight

Molecular weight was estimated by use of Cellulofine GCL-300 gel column.

●, D-Valyl-L-leucyl-L-arginine-p-nitroanilide (Val-Leu-Arg-pNA) amidolytic activity; ○, Protein concentration (A_{280}/ml). A, B, C, D and E, stand for blue dextran, egg white albumin, soybean trypsin inhibitor, cytochrome c and aprotinin.

Fig. 6. Behavior to Some Proteinase Inhibitors

A mixture of the indicated inhibitor and enzyme (0.012 A_{280}) was incubated at 30°C for 20 min, and remaining activity was measured by Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity. The activity was expressed as a percentage of that of the control without an inhibitor.

---○---, Aprotinin; —○—, soybean trypsin inhibitor; —●—, α -anti-trypsin; ---●---, pepstatin; —□—, β -mercaptoethanol; ---□---, p -chloromercuribenzoate.

Fig. 7. Isoelectric Focusing

Isoelectric focusing was carried out by Ampholine system at pH range 7 to 10, and electrophoresis was done for 40 h at 4°C.

基質として N - α -tosyl-L-arginine methyl ester (Tos-Arg-Me) を用いた。Fig. 3 に示したようにアクロシンは 30—100 mM の塩化カルシウムの添加により、約 3 倍の活性の上昇が認められたのに対し、本酵素では塩化カルシウムの添加による活性の上昇は認められなかった。

本酵素のアルギニンアミダーゼ活性の至適 pH は約 9.0 と測定されたが (Fig. 4), やや幅広い至適 pH 領域を示し、ヒトアクロシン¹⁰⁾と類似した傾向を認めた。

また本酵素の分子量をセルロフィン GCL-300 ゲルろ過を用いて推定したところ、 1.5×10^4 daltons (Da) と推定され、ヒトアクロシンの 4.0×10^4 Da¹⁰⁾ とは異なっていた (Fig. 5)。

各種プロテイナーゼインヒビターの本酵素に対する影響を Fig. 6 に示した。本酵素はアプロチニン、アンチバインあるいはロイペプチンにより強く阻害されたが、アクロシンに対しては低用量で阻害作用を持つ α -アンチトリプシンや β -メルカプトエタノールに対しての感受性が低いことが認められた。

本酵素の多様性の有無の検討のために、アンフォラインシステムを用いた等電点電気泳動を行った。Fig. 7 に示したように本酵素は pI 9.9, 10.3 及び 10.4 の 3 種の等電点を有し、多様性を示すことが明らかになった。

考 察

ヒト精製精子の調製法としては、著者らが開発したパーコール密度勾配遠心法がすでにあるが、この方法を用いても約 3% 位の精漿の狭雑は避けられなかった。⁶⁾ パーコールインナーカラム法を用いることにより、上記方法で問題となった管壁を伝わる微細な精漿成分による汚染を受けることなく、精製された精子を得ることが可能になった。このことは精漿中に多量に含まれる酸性ホスファターゼ活性が精製精子検液中にほとんど検出されなかったことから明らかである (Table I)。また著者らの精製精子の形態学的研究においても、パーコールインナーカラム法を用い精製した精子は、形態的に正常で、生存率も高く、かつ前進運動性が良好であることが明らかとなっている。⁷⁾ さらに精子中のシアル酸含量の検討の結果、精製精子では約 40% もその含量が洗浄精子に比して低値を示すとの報告もある。¹¹⁾ したがって今後精子の生化学的性状の研究は、著者らの開発したインナーカラムを用いた高純度精子精製法を使用して再検討されるべきであろうと考える。

本研究において、精子中には LBTI に対する親和性が弱い、新しい塩基性のアルギニンエステル水解活性を持った酵素が存在することが明らかとなった (Fig. 2)。本酵素の阻害剤に対する態度、カルシウムイオン感受性ある

いは推定分子量などはヒトアクロシン¹⁰⁾とは異なっており、この両者は異なる酵素であることは明らかである。またアクロシンには2種類の多様成分(α 及び β 型)が認められるとの報告もあるが、¹²⁾このアクロシン多様成分の分子量は本酵素に比してかなり大きく(α 型 5×10^4 , β 型 3.5×10^4 Da), この2種アクロシンの内1種が本酵素である可能性はほとんど無いと考えられる。また著者らは、すでにヒト精漿中にアクロシンとは異なる同様の塩基性アルギニンエステラーゼが存在することを明らかにし、¹³⁾この精漿中の酵素は雄尿中にもみ見出される塩基性アルギニンエステラーゼ^{13,14)}と同一酵素ではないかと推察したが、この精漿中の酵素はLBTIセルロフアインカラムに強い親和性を示すことより、本酵素とは異なる酵素であると考えられる。いずれにしてもこれらの精液中に存在する各種アルギニンエステラーゼの精製を行い、その性質を明らかにするとともに、免疫化学的相同性の検討を行い、性質の差異及びその由来を追求する必要がある。

本酵素の受精過程における役割についてはまだ検討を行っていないが、今後本酵素とアクロシンの関係並びに受精過程の役割を明らかにしたいと考える。

引用文献及び注

- 1) 現住所: 帝京大学医学部泌尿器科教室。
- 2) T. Mann, C. L. Mann, "Male Reproductive Function and Semen," Springer Verlag, N. Y., 1981, p. 57.
- 3) R. J. Ericsson, C. N. Langevin, M. Mishino, *Nature* (London), **246**, 421 (1973).
- 4) O. Steeno, A. Adimoeja, J. Steeno *Andrologia*, **7**, 95 (1975).
- 5) R. A. P. Harrison, *J. Reprod. Fertil.*, **48**, 347 (1976); R. Iizuka, S. Kaneko, K. Kobanawa, T. Kobayashi, *Arch. Androl.*, **20**, 117 (1988).
- 6) 真田利男, 小林俊文, 兼子 智, 小埜 清, 飯塚理八, 日本不妊学会誌, **28**, 267 (1983); 兼子 智, 小埜 清, 小林俊文, 飯塚理八, 日本受精着床学会誌, **1**, 51 (1984).
- 7) S. Kaneko, S. Oshio, K. Kobanawa, T. Kobayashi, H. Mohri, R. Iizuka, *Biol. Reprod.*, **35**, 1059 (1986).
- 8) C. Moriwaki, Y. Hojima, H. Moriya, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 975 (1974).
- 9) E. Amundsen, J. Putter, P. Friberger, M. Knos, M. Larsbraten, G. Glaseson, "Adv. Exp. Med. Biol., Kinin II," Plenum Press, N. Y., 1979, p. 83.
- 10) Y. Matuda, S. Oshio, S. Kaneko, R. Iizuka, H. Mohri, S. Akihama, *Jpn. J. Fertil. Steril.*, accepted.
- 11) S. Oshio, S. Kaneko, R. Iizuka, H. Mohri, *Arch. Androl.*, **18**, 225 (1987).
- 12) B. Zelezna, D. Cechova, *Z. Physiol. Chem.*, **363**, 757 (1982).
- 13) 松田兆史, 兼子 智, 押尾 茂, 飯塚理八, 秋浜純行, 臨床化学, **15**, 168 (1986).
- 14) R. P. McPartland, D. L. Sustasic, J. P. Rapp, *Endocrinol.*, **108**, 1539 (1981); M. Nakamura, M. Takaoaka, M. Nakajima, S. Morimoto, *Biochim. Biophys. Acta*, **884**, 311 (1986).