薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
110 (5) 325-331 (1990)

マウス精子先体反応過程における蛋白質リン酸化反応の変化

小松節子, 遠藤芳広, 鈴木秋悦*

慶應義塾大学医学部

Changes in Protein Phosphorylation during Acrosome Reaction of Mouse Sperm

Setsuko KOMATSU, Yoshihiro ENDO, and Shuetu SUZUKI*

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan

(Received January 5, 1990)

The changes of protein phosphorylation were analyzed during mouse sperm capacitation and acrosome reaction. Sperm adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) levels were gradually elevated during capacitation period. Although ^{32}P uptake by sperm and protein phosphorylation increased during capacitation, the phosphorylation of a 45-kDa protein remained to be relatively constant. It was also demonstrated that acrosome reaction was induced by the treatment of capacitated sperm with 0.1 mM dibutyryl cAMP, 10 mM dibutyrylguanosine 3',5'-cyclic monophosphate, 20 μM calcium ionophore A23187 or acid-solubilized zonae pellucidae. The phosphorylation of a 45-kDa protein was augmented during the acrosome reaction induced by such agents. These results suggest that changes in protein phosphorylation might be involved in the regulation of mouse sperm capacitation and acrosome reaction.

Keywords—mouse sperm; capacitation; acrosome reaction; cyclic nucleotide; protein phosphorylation

緒言

受精は細胞間連絡及び相互作用の1つの興味深いモデルであり, マウス精子においては, 受精能獲得過程を経て, 卵子透明層糖蛋白質である ZP3 がシグナルとなり, 精子が透明層に結合することにより先体反応が起こる.^{1,2)} 受精能獲得とは精子が先体反応を開始するまでの生化学的, あるいは生理学的変化であり, その後, 先体反応と呼ばれる連続的な膜変化を呈する. 先体反応とは, 精子細胞膜と外先体膜の融合, そして vesiculation という形態変化である. マウス精子においては, 透明層によって誘起される先体反応に先立って, adenosine-3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) 濃度が上昇し,³⁾ モルモットにおいても, Ca^{2+} の添加により cAMP 濃度が上昇しひき続き先体反応が誘起される.⁴⁾

マウス, ハムスター, ヒトなどにおいて, N^6 -O-2'-dibutyryladenosine 3':5'-cyclic monophosphate (dbcAMP) やフォスホジエステラーゼ阻害物質のカフェインの添加によって受精能獲得過程は促進する.⁵⁾ さらに, ハムスターでは受精能獲得中にアデニレートサイクラーゼ活性が亢進することが知られており, dbcAMP やカフェインの添加によって先体反応が促進する.⁶⁾ しかし, モルモットやハムスターでは, dbcAMP やカフェインを添加すると先体反応や受精が阻害され, フォスホジエステラーゼ活性化剤であるイミダゾールは促進するという報告,⁷⁾ 先体反応は guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) と cAMP の濃度比が関与しているという報告もあり,⁸⁾ その作用機序は不明である. 最近, シグナルトランスデューサーである Gs 蛋白 (stimulatory guanine nucleotide-binding regulatory protein) は, マウス精子中にはなく, Gi 蛋白 (inhibitory guanine nucleotide-binding protein) の存在が報告されている.⁹⁾ マウス精子を islet-activating protein (IAP) で処理し, Gi を不活化し透明層により誘起される先体反応への影響をみると, IAP により先体反応は濃度依存性に抑制されることより, Gi 蛋白が重要な役割を果たしていると報告されている.¹⁰⁾

他方、Lee ら¹¹⁾ はマウス精子において、マウス透明層により誘起される先体反応過程が腫瘍プロモーターの phorbol ester あるいは diacylglycerol により、修飾されることを報告している。受精時における細胞応答はカルシウム依存性のエキソサイトーシスであり、カルシウム・リン脂質依存性プロテインキナーゼ (C キナーゼ) の関与も考えられ、¹²⁾ 我々はすでに、マウス精子の受精過程において、C キナーゼの活性と、それに依存する蛋白質リン酸化反応が関与する可能性を報告している。¹³⁾ 本研究においては、マウス精子を用いて、受精能獲得過程と先体反応過程における蛋白質リン酸化反応の変化を解析し、さらに、サイクリックヌクレオチドの関与を検討したので報告する。

実験方法

1. 実験動物と精子採取法 10—12 週齢の slc-ddY 系マウス (静岡県実験動物農業協同組合) を用い、頸椎脱臼にて屠殺後、精巣上体尾部を切開して針にて精子塊を採取し、4 mg/ml ウン血清アルブミン (BSA, Sigma) と 10 mM Hepes (pH 7.4, Sigma) 含有 modified Krebs Ringer bicarbonate buffer (m-KRB)¹⁴⁾ 培養液中に精子懸濁液を作製し、実験に供した。培養は 5% CO₂ 含有 95% 空気、37°C で行い、精子数は血球測定板を用い光学顕微鏡下測定し、1—2×10⁸ cells/ml とした。

2. In Vivo 標識による蛋白質リン酸化パターンの解析法 精子を 100 μ l m-KRB 培養液中に採取後、3 mCi/ml [³²P]orthophosphate (ICN, Irvine) 存在下 37°C で培養した。 [³²P]orthophosphate 添加後 30, 60, 90, 120 分後、あるいは 90 分後にさらに以下の試薬を加え 20 分間培養し検体とした。試薬は各種濃度の dbcAMP (Sigma), 10 mM dbcGMP (dibutylguanosine cyclic monophosphate, Sigma), 20 μ M calcium ionophore A23187 (Sigma), 4 zonae pellucidae/1 μ l 卵子透明層酸溶解液を用いた。卵子透明層酸溶解液は雌性マウスを過排卵処理後、排卵卵子の酸処理により透明層を溶解し pH 7.4 として用いた。¹⁵⁾ 透明層数は、精子懸濁液 1 μ l あたり 4 個となるように調整した。標識後、精子懸濁液を m-KRB 培養液にて 12000 rpm (TOMY, TMA ローター) で 3 分間遠心することにより 3 回洗浄した。精子 pellet に extraction buffer (50 mM Tris-HCl; pH 7.5, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt; EDTA, 5 mM sodium vanadate, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, 1 mM dithiothreitol, 5 mM *p*-nitrophosphate, 5 mM benzamidine) を加え、氷中にて 30 分間可溶化した。¹³⁾ 15000 rpm で 15 分間遠心し、上清に同量の lysis buffer (9.5 M urea, 2% NP-40, 2% ampholines, 5% β -mercaptoethanol) を加え、O'Farrell の二次元電気泳動を行った。¹⁶⁾ なお、二次元電気泳動では、アプライする蛋白質量を一定とした。

他方、sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行う時は、SDS-PAGE sample buffer (62.5 mM Tris-HCl; pH 6.8, 2.3% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 10% glycerol) にて可溶化し、5 分間煮沸した。¹⁷⁾ 分子量マーカーとして、myosin (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), phosphorylase B (92 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), soybean trypsin inhibitor (21 kDa), lysozyme (14 kDa) を用いた。

3. Chlortetracycline (CTC) 蛍光法 以下の実験は 37°C ホットプレート上で行った。スライドガラス上に精子懸濁液 5 μ l をのせ、CTC 溶液 (500 μ M CTC, 5 mM cysteine, 20 mM Tris-HCl, 130 mM NaCl; pH 7.8) 5 μ l を加えた。次に glutaraldehyde 液 (12.5% glutaraldehyde, 1 M Tris-HCl; pH 7.8) 0.1 μ l にて固定し、カバーガラスをのせ、2 時間以内に蛍光顕微鏡下、B, S, AR パターンを観察した。¹⁸⁾ つまり、受精能を獲得し精子頭部前方に強い蛍光の認められる B パターン、明るい midpiece、頭部前方の punctate 蛍光、あるいは post-acrosomal lesion の不整な弱い蛍光を示す S パターン、先体反応を完了し頭部に蛍光の全く認められない AR パターンを識別し、計 100 細胞をカウントし、%AR パターンを算出した。

4. cAMP 測定法 精子採取後、経時的に phosphate buffered saline (PBS) にて洗浄し、extraction buffer¹³⁾ を加え、氷中 30 分間可溶化した。3000 rpm, 15 分間遠心分離し、上清をスクシニル化し測定用試料とした。精子抽出物中の cAMP 量は cyclic AMP assay kit (YAMASA SHOYU K.K.) を用いて測定した。^{12a)} スクシニル cAMP チロシンメチルエステルにスクシニル化した試料と抗 cAMP モノクロナール抗体を加え、氷中にて反応後、分離用活性炭を加え氷水中に 30 分間静置し 3000 rpm 4°C 5 分間遠心分離し、上清を測定した。

結 果

1. 受精能獲得過程における蛋白質リン酸化と cAMP の変化

受精能獲得過程における蛋白質リン酸化の関与を経時的に精子内への ^{32}P の取り込み、二次元電気泳動による蛋白質リン酸化、各蛋白質への ^{32}P の取り込みにより検討した。 ^{32}P の精子内取り込みの結果は Fig. 1 に示したように、精子採取後 90 分でプラトーに達した (30 分: 3300 cpm, 60 分: 8700 cpm, 90 分: 10200 cpm, 120 分: 10400 cpm)。二次元電気泳動による蛋白質リン酸化のパターンを、Fig. 2 に示した。分子量 60 kDa 蛋白質を internal marker とするために、ジェルとフィルムの露出時間を適度に調節し、分子量 60 kDa 蛋白質リン酸化のスポットの強度が同程度になるようにした。結果は、精子採取 30 分後に比較して 60 分以降で、45 kDa の蛋白質リン酸化の亢進は認められなかった。さらに、二次元電気泳動後の各スポットをジェルより切り出しチェレンコフ法にて ^{32}P の取り込みをカウントした結果、分子量 60 kDa 蛋白質は、経時的に 39, 278, 279 cpm と 60 分以降で顕著に上昇したのに対し、45 kDa 蛋白質は 30, 69, 79 cpm と顕著な上昇は認められなかった (Fig. 3)。さらに、精子抽出液中の cAMP 量の経時的变化は、Fig. 4 に示したように、明らかに経時的に上昇した (10^6 細胞あたり, 0 分: 5.5 pmol, 30 分: 8.9 pmol, 60 分: 21.2 pmol, 90 分: 27.1 pmol)。

2. 先体反応過程における cAMP の関与

cAMP の先体反応過程、及び蛋白質リン酸化への関与を検討した。まず、各種濃度の dbcAMP による先体反応誘起作用を CTC 蛍光法により確認した (Fig. 5)。0.1 mM dbcAMP において $30.2 \pm 4.6\%$ に先体反応誘起を認め、その他の濃度では先体反応誘起作用は認められなかった。Fig. 6 は各種濃度の dbcAMP における蛋白質リン酸化の結果を示した。CTC 蛍光法により先体反応誘起作用を認めた 0.1 mM dbcAMP において 45 kDa と 35 kDa 蛋白質リン酸化が亢進し、10 mM dbcAMP では 30 kDa 蛋白質リン酸化が亢進した。

Fig. 1. Time Course of ^{32}P Uptake by Mouse Sperm during Capacitation

Mouse sperm were incubated for 30, 60, 90, 120 min in m-KRB.

Fig. 2. Sequential Change in Protein Phosphorylation during Mouse Sperm Capacitation

Mouse sperm were incubated for 30 min (A), 60 min (B), 90 min (C) or 120 min (D) in m-KRB. The arrows show the position of 45-kDa protein.

Fig. 3. Time Course of ^{32}P Incorporation into pp60 and pp45

●—●, pp60; ○—○, pp45. The spots of 60-kDa and 45-kDa proteins from the gel were cut out and radioactivity was determined by Cherenkov counting.

Fig. 5. Effect of dbcAMP on the Acrosome Reaction of Mouse Sperm

Data represent the mean SD of three individual experiments.

3. 先体反応過程における蛋白質リン酸化の変化

次に、10 mM dbcGMP, 20 μM calcium ionophore A23187, 透明層酸溶解液による先体反応誘起率を、Fig. 7 に示した。なお、dbcGMP¹⁰⁾ と calcium ionophore A23187¹⁾ の濃度設定、透明層酸溶解液調整の条件設定¹²⁾は、予備実験により検討し（未発表データ）、本研究は、至適条件下にて、先体反応誘起率を検討した。先体反応誘起率は、対照群の $15.2 \pm 0.6\%$ に対し、dbcGMP で 46%, A23187 で 53%, 透明層酸溶解液で 60% と高率に認められた。

Fig. 4. Time Course of Intracellular cAMP Concentration during Mouse Sperm Capacitation

Intracellular cAMP concentrations were assayed at 0, 30, 60 and 90 min after collection of sperm.

Fig. 6. Effect of dbcAMP on Phosphorylation in Mouse Sperm Protein

Mouse sperm were incubated in m-KRB including 10^{-2} mM (1), 10^{-3} mM (2), 10^{-4} mM (3), 10^{-5} mM (4), 10^{-6} mM (5) dbcAMP or medium alone (6).

Fig. 7. Effects of 0.1 mM dbcAMP, 10 mM dbcGMP, 20 μM Calcium Ionophore A23187 and 4 Zonae Pellucidae/ μl Solubilized Zonae on the Acrosome Reaction

The sperm were preincubated in medium for 90 min at 37°C prior to the start of the experiment. The acrosome reaction was scored by CTC fluorescence assay essentially as described previously (17).

Fig. 8. Effects of dbcGMP, Solubilized Zona and Calcium Ionophore A23187 on Protein Phosphorylation in Mouse Sperm

A, C, E, control; B, 10 mM dbcGMP; D, 4 μ M zona pellucida; F, 20 μ M calcium ionophore A23187.

Fig. 9. Effect of dbcAMP on Protein Phosphorylation in Intact Mouse Sperm

The samples were subjected to two-dimensional gel electrophoresis as described in Materials and Methods. (A) untreated sperm, (B) 0.1 mM dbcAMP and (C) 10 mM dbcAMP.

さらに先体反応誘起下で処理した精子の蛋白質リン酸化の動態を検討した。dbcGMP 処理においては、対照群と比較してわずかに 45 kDa 蛋白質リン酸化の亢進が認められ (Fig. 8B), A23187 あるいは透明層酸溶解液で共に 45 kDa 蛋白質のリン酸化が顕著に亢進した (Fig. 8D, F)。dbcAMP においては、低濃度で同蛋白質リン酸化はわずかに亢進し、高濃度では減少した (Fig. 9)。

考 察

受精能獲得過程は、マウス精子において、CTC 蛍光法により 90 分ではほぼ完了していると報告されており、¹⁰⁾ 同条件下で経時的に ³²P 標識し、二次元電気泳動を行うことにより、分子量 45 kDa 蛋白質以外の蛋白質は、経時的にリン酸化が亢進しているのに対し、45 kDa 蛋白質のリン酸化は変動しないことが確認された。そして、受精能獲得過程を抑制する条件下、つまり HCO₃⁻ の無添加培養液中で ³²P 標識した場合、²⁰⁾ 蛋白質のリン酸化は亢進せず、蛋白質リン酸化のパターンは培養 30 分後と 120 分後で同じだった (未発表データ)。さらに、経時的にマウス精子内 cAMP 量が増加することにより、受精能獲得過程における cAMP の関与も考えられる。一方、cGMP に関しては、他の系で働いている cGMP 濃度を十分測定できる程度に測定感度をあげても、精子内 cGMP 濃度は 0.1 pmol/10⁹ cells 以下 (未発表データ) で、とらえることはできなかった。

Talansky ら¹⁹⁾ は dbcGMP とイミダゾール添加により、30 分で先体反応はほぼ 100% 誘起されることを報告しているが、本研究では dbcGMP のみでも先体反応誘起作用があることを確認し、dbcGMP, A23187, 透明層溶解液処理で先体反応誘起作用を確認後、同条件下で処理した精子を、二次元電気泳動によりリン酸化パターンを検討し、分子量 45 kDa 蛋白質のリン酸化が亢進した。さらに、先体反応誘起作用を認めた dbcAMP の低濃度においても 45 kDa 蛋白質のリン酸化が亢進した。なお、先体反応誘起時に精子内 cAMP 量が増加することは、すでに報告されている。^{3,4)} 一方、Rogers ら⁷⁾ はモルモットで 8 mM dbcAMP は先体反応を阻害することを報告しており、本研究においても、dbcAMP の高濃度添加時には先体反応は認められず、かつ 45 kDa 蛋白質リン酸化は減少した。45 kDa 蛋白質リン酸化に関しては、精子 extract を *in vitro* でリン酸化した結果、cAMP の添加によりリン酸化が亢進することも確認している (未発表データ)。以上の結果より、分子量 45 kDa 蛋白質は、受精能獲得過程において、安定したリン酸化状態にあり、先体反応過程に急激にそのリン酸化が亢進すると思われる。また、先体反応に特異的な 45 kDa 蛋白質のリン酸化の亢進に、サイクリックヌクレオチドが関与している可能性が示唆された。

また、分子量 56 kDa の type II の A キナーゼ RII の自己リン酸化は、短時間の標識で亢進されるので、²¹⁾ 本研究では 90 分間標識しているため検出できなかったと考えられる。すでに、我々は、カルシウム・リン脂質依存的にリン酸化される蛋白質として、215・80・35 kDa を報告しており、¹⁸⁾ 腫瘍プロモーターである TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate) により *in vivo* 及び、*in vitro* のリン酸化において、共に、45 kDa 蛋白質をとらえておらず、外来の C キナーゼを加えても、45 kDa 蛋白質は亢進しないので、45 kDa 蛋白質は、C キナーゼの特異的基質ではないと考えられる。

本研究により、マウス精子受精能獲得過程、先体反応誘起過程において、蛋白質リン酸化反応は特異的に変化し、サイクリックヌクレオチドを介する調節機構の関与が示唆された。

謝辞 cAMP 測定にあたり御指導いただいた三菱油化ビーシーエルの畠 啓視・松本 昇両氏に深く感謝いたします。

なお、本研究は、文部省科学研究重点領域研究「生殖系列」No. 63640510 (to S.S.)、及び、WHO Special Program of Research, Development and Research Training in Human Reproduction No. 87088 (to S.S.) によって助成された。

引 用 文 献

- 1) J. D. Bleil, P. M. Wassarman, *Dev. Biol.*, **95**, 317 (1983).
- 2) G. S. Kopf, M. J. Woolkalis, G. L. Gerton, *J. Biol. Chem.*, **261**, 7327 (1986).
- 3) T. D. Noland, D. L. Garbers, G. S. Kopf, *Biol. Reprod.*, **38** (suppl. 1), 94a (1988).
- 4) R. V. Hyne, D. L. Garbers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 5699 (1979).

- 5) L. R. Fraser, *J. Reprod. Fert.*, **57**, 377 (1979).
- 6) J. M. Randall, M. Stanley, *J. Exp. Zool.*, **211**, 153 (1980).
- 7) B. J. Rogers, L. Garcia, *Biol. Reprod.*, **21**, 365 (1979).
- 8) J. W. Gordon, B. E. Talansky, *J. Exp. Zool.*, **239**, 347 (1986).
- 9) D. L. Garbers, G. S. Kopf, *Adv. Cyclic Nucl. Res.*, **13**, 251 (1980).
- 10) Y. Endo, M. A. Lee, G. S. Kopf, *Dev. Biol.*, **119**, 210 (1987).
- 11) M. A. Lee, G. S. Kopf, B. T. Storey, *Biol. Reprod.*, **36**, 617 (1987).
- 12) Y. Endo, M. A. Lee, G. S. Kopf, *Dev. Biol.*, **129**, 12 (1988).
- 13) S. Komatsu, Y. Endo, S. Suzuki, R. Iizuka, M. Hirai, N. Shimizu, "The Proceeding of Annual Meeting of Society for Basic Reproductive Immunology," ed. C. Tachi, Y. Tsunoda, H. Mohri, Hayashi-kobo, Tokyo, 1988, p. 74.
- 14) Y. Toyoda, M. C. Chang, *J. Reprod. Fert.*, **36**, 9 (1974).
- 15) Y. Endo, P. Mattei, G. S. Kopf, R. M. Schultz, *Dev. Biol.*, **123**, 574 (1987).
- 16) P. H. O'Farrell, *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007 (1975).
- 17) U. K. Laemmli, *Nature* (London), **277**, 680 (1970).
- 18) M. A. Lee, B. T. Storey, *Biol. Reprod.*, **33**, 235 (1985).
- 19) B. E. Talansky, J. W. Gordon, *Biol. Reprod.*, **36** (suppl. 1) 11 (1986).
- 20) M. A. Lee, B. T. Storey, *Biol. Reprod.*, **34**, 349 (1986).
- 21) J. S. Tash, S. S. Kakar, A. R. Means, *Cell*, **38**, 551 (1989).