

## アワビ精子先体反応と細胞骨格系蛋白質

### Functional Aspects of Cytoskeletal Proteins in the Acrosome Reaction of Abalone Sperm

酒 井 淑、代 谷 陽 子

#### [SUMMARY]

Changes in cytoskeletal structures which occur during the acrosome reaction of abalone sperm was analyzed by fluorescence and electron microscopies. Fluorescence staining with NBD-phalloidin indicated that the axial rod consists of actin filament bundle, which elongates to form the acrosomal process. Decoration with S1 further revealed that the actin filaments are organized in such a way that the barbed end is distal to the nucleus. This polarity did not change after the formation of the acrosomal process. The truncated cone in the acrosome found by the authors in 1982 was composed of helically coiled filaments with a diameter of about 10 nm. The truncated cone extended three times the original height transforming into the cylindrical structure by further coiling up of the filaments and by stretching of the coil. The helical filaments consisted mainly of 60,000 molecular weight protein which cross-reacted with the antibody against an intermediate filament protein, vimentin. Localization of this protein in the truncated cone was demonstrated by immunofluorescence and immunoelectron microscopies. It was suggested that the 60 kD protein as well as actin filament play roles in fertilization of abalone.

先体反応は、受精の際に精子側で起る受精に必須の反応であり、精子頭部の著しい構造変化を伴う現象である。これまで無脊椎動物を始め哺乳類を含む多くの動物で見出され、多くの知見が蓄積されている。しかし、その反応機構については、まだ十分明らかにされていない。受精現象は、両配偶子の結合に関する種々な細胞生理学的・遺伝学的側面のほかに、精子と卵の融合という細胞間の相互認識や細胞融合に関与するので、細胞間相互作用の一局面を解き明かす上からも重要な研究課題として、精子先体の微細構造の変化が詳細に調べられてきた。しかし、先体の構造変化を、細胞運動や細胞骨格系の変化という視点から扱うように

なったのは極く最近のことである。

軟体動物の精子は大型で先体反応の研究には優れた材料であると言われながら、人工放精・放卵や人工受精、成熟度のチェック等が困難なことから、その微細構造の変化については、*Mytilus*に関する先駆的研究<sup>1)</sup>以外には殆ど行われないうままであった。アワビは、親個体を傷つけずに卵巣や精巣の成熟度を観察できる上に、紫外線照射海水や過酸化水素処理により採精・採卵が可能で人工受精も容易である<sup>2)3)</sup>。しかもその精子は巨大な先体を持つことが明らかになったので<sup>4)5)</sup>、我々は、この巨大な先体を持つアワビ(*Haliotis discus*)精子を用いて、先体反応に伴う微細構造の変化の過程と先体部膜系の変化を、主に超薄切片法<sup>6)7)</sup>とフリーズフラクチャー法<sup>8)9)</sup>により解析してきた。その中で、先体突起の形成過程が明らかになると共に、アワビ精子に特有な“円錐台構造”や先体外膜の裏打ち構造などが見つかった。先体突起は、卵細胞膜と直接融合する先体突起膜の形成に主要な役割を担っており、円錐台構造は、精子が卵に侵入する初期過程で著しく伸長し<sup>10)</sup>、卵表から伸びた卵微絨毛と強い接着性を示すことから、精子の卵内進入を容易にしていると考えられる。

本稿では、先体反応の主要過程の一つである先体突起の形成機構と、アワビ精子に特有な円錐台構造の伸長変化のメカニズムを、細胞骨格系の運動性蛋白質の変化に着目して行った結果について概説する。

### [先体反応の過程]

アワビ精子頭部は、細長い釣鐘型の先体胞 (ca.  $2.8\mu\text{m} \times 1.1\mu\text{m}$ ) とその後方にほぼ同じ大きさの円筒型の核を持ち、核の後端には5個のミトコンドリアからなる中片が続いている(図1)。中片の中央には2個の中心子があり、遠位中心子 (distal centriole) の後端から $40\mu\text{m}$ 以上の一本の長い鞭毛が伸びている。先体胞最先端部は、細胞膜と先体外膜とが互いに密着して引き金層を形成しており、これに続いて先体外膜のすぐ内側に先体物質を覆うように円錐台構造 (truncated cone) が見られる(図3a, 4a)。先体胞後部には、先体胞と核の両方に深く陥入して微小繊維の束から成る先体桿 (ca.  $0.15\mu\text{m} \times 2.4\mu\text{m}$ ) があり(図1a, 3a)、その前方部は先体内膜によって、後方部は核膜によって覆われている<sup>6)7)</sup>。

先体反応は、先ず先体胞先端部の引き金層域で膜の小胞化が起り、続いて先体外膜と細胞膜が引き金層域周辺部で融合する。これにより先体胞先端部が開口し、先体物質の放出が起る。先体胞の開口と並行して、先体外膜と先体物質の間に僅かな間隙が先体胞全表面に互って認められる。この変化とほぼ同時に先体桿から先体突起の形成が始まり、円錐台構造も伸長を開始する。やがて先体突起は空胞化した先体胞開口部の、円筒状に変化した円錐台構造

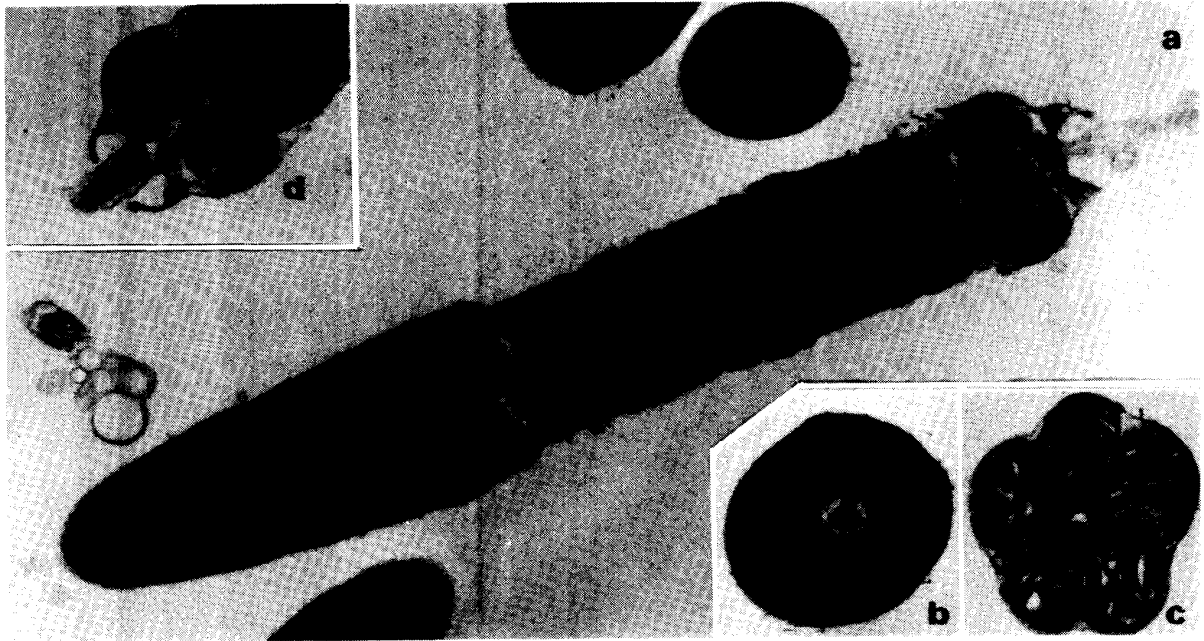


図1. アワビ未反応精子頭部の全体像（超薄切片電子顕微鏡像）<sup>6)</sup> (x18,600)

- a) 精子頭部の縦断切片像
- b) 先体胞後部の横断切片像
- c) 中片（ミトコンドリア域）の横断切片像
- d) 中片の縦断切片像

の中央を貫いて伸長する(図3c, 4b)。空胞化した先体胞の内側には、電子密度の高い粒子が先体外膜を裏打ちしているのが認められる<sup>6)</sup>。

### [先体突起の形成機構]

海産無脊椎動物の精子では、一般に先体反応の際に先体突起が形成され、これが精子の卵内侵入に重要な役割を果たしていると考えられている。アワビ未反応精子の先体胞後方に深く陥入して存在する先体桿は微小繊維の束から成り(図1a, 3a)、先体反応に伴って著しく伸長し先体突起を形成する(図3c)。二、三の海産無脊椎動物の精子先体胞後部にアクチン繊維が存在することが報告されているので<sup>11)12)13)</sup>、アワビ精子の先体桿を構成している微小繊維もアクチン繊維であることが推測された。そこで、F-アクチンに特異的に結合する phalloidin の蛍光色素結合体、NBD-phalloidin を用いて、アワビ精子におけるアクチン繊維の局在を調べた。パラフォルムアルデヒド固定した精子を緩衝液で洗浄したのち、NBD-phal-

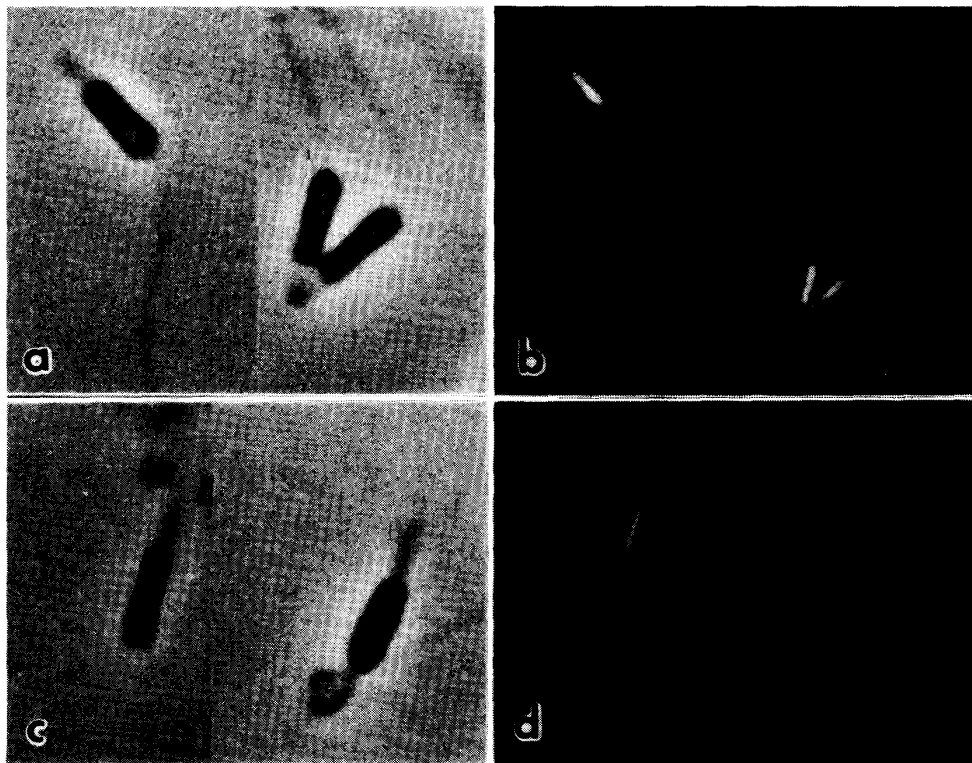


図2 . NBD-phalloidin染色によるアクチン繊維の局在<sup>14)</sup> (x1,860)

- a) Triton X-100で処理した未反応精子 (位相差顕微鏡像)
  - b) a)と同じ精子のNBD-phalloidin染色像 (落射蛍光顕微鏡像)
  - c) 先体反応を起した精子 (位相差顕微鏡像)
  - d) c)と同じ精子のNBD-phalloidin染色像 (落射蛍光顕微鏡像)
- 先体桿(b)及び先体突起(d)部分が特異的に染色され光ってみえる。

lacidin染色を施し、落射蛍光顕微鏡で観察した。未反応精子では、先体桿部分が良く染まり (図2a, b)、先体桿を構成している微小繊維がアクチン繊維からなることが分かった。又、Ca-Ionophore A23187により先体反応を誘起した精子でも、伸長した先体突起が特異的に染まり (図2c, d)、先体突起がアクチン繊維の束からなること<sup>14)</sup>、又、先体桿の約2.5倍に伸長していることが観察された。

更に、先体突起形成のメカニズムを明らかにするために、先体桿を構成しているアクチン繊維の極性を調べた。Triton X-100及びグリセリン処理したアワビ精子を、ウサギ骨格筋ミオシンから調製したサブフラグメント-1 (S1)及びヘビーメロミオシン (HMM)と反応させたところ、S1及びHMMは先体桿を構成している微小繊維と特異的に結合し、明らかな、“やじり”構造をつくることが超薄切片の電子顕微鏡像で観察された (図3b)。又、やじりの方向はすべて基部 (核の方) に向いていた<sup>14)</sup>。このことから、先体桿は同一の方向性を

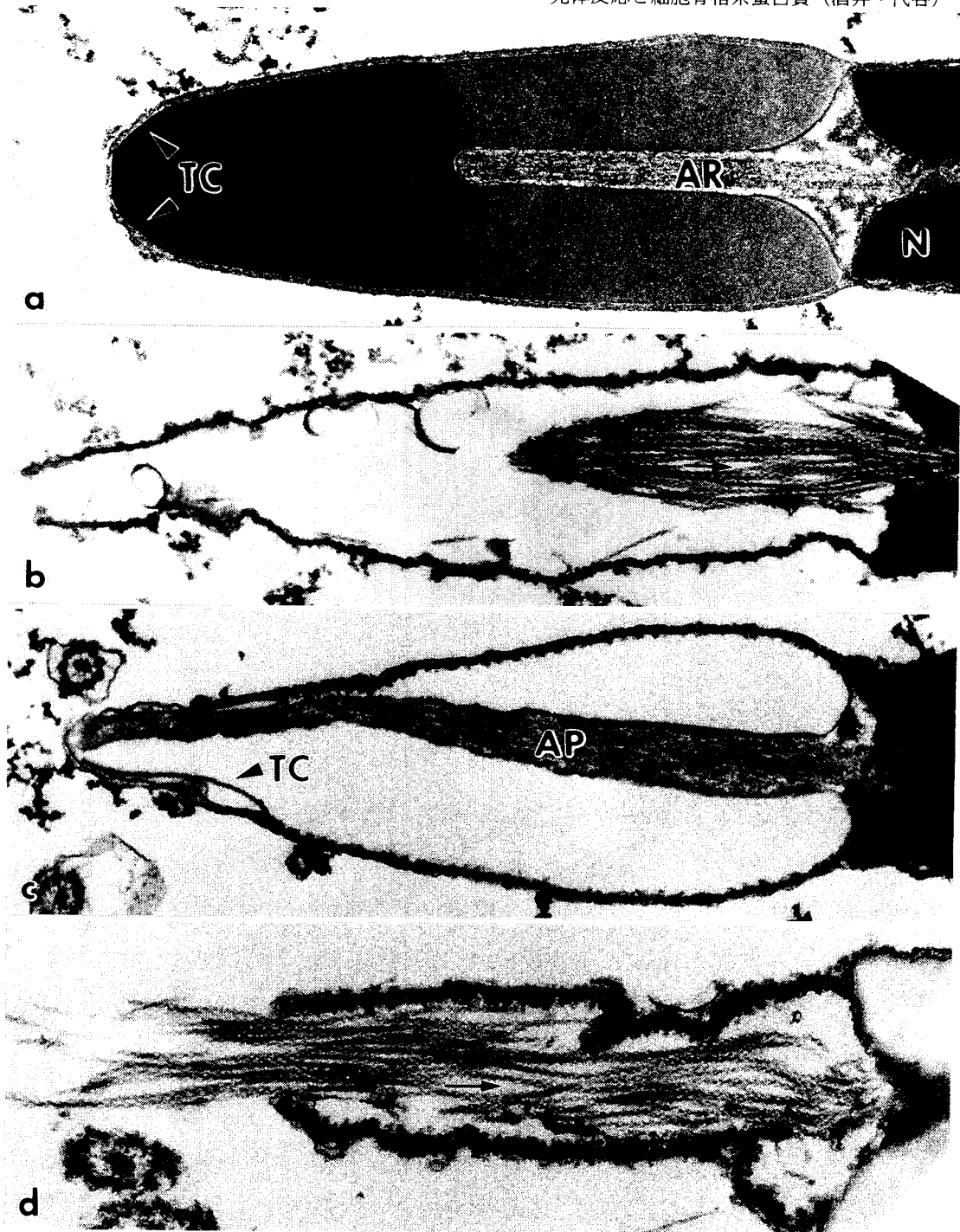


図3. 先体反応における先体突起の形成 (超薄切片電子顕微鏡像)<sup>14)</sup> (x34,000)

- a) 未反応精子の先体部
  - b) S 1 修飾を施した未反応精子の先体部  
先体桿を構成する微小繊維はすべて S 1 で修飾され、核に向けた“やじり”構造を示している。Triton X-100 処理により先体物質は消失している。
  - c) 先体反応を起した精子の先体部
  - d) S 1 で修飾した先体反応精子の先体部  
先体突起を構成する微小繊維はすべて S 1 で修飾され、b) と同様に核に向けた“やじり”構造を示している。
- AR: 先体桿、AP: 先体突起、N: 核、TC: 円錐台構造

持ったアクチン繊維の束からなり、先体桿先端部がアクチン繊維の好成長端(barbed end)であることがわかった。同様に、Ca-Ionophoreにより先体反応を誘起した精子の先体突起の微小繊維も、S 1 処理によってやじり構造が同定され、その方向もすべて核に向いていた(図3d)。又、未反応精子先体桿のアクチン繊維束に exogenous なウサギ骨格筋G-アクチンを加えたところ、やじりの barbed end から、加えたアクチンが重合し、アクチン繊維束が成長することが分かった<sup>14)</sup>。これは、*in vitro*で報告されているアクチンの性質<sup>15)16)</sup>をそのまま反映している。

これらの結果から、先体桿を構成している微小繊維の束はアクチン繊維束であること、先体突起の形成(アクチン繊維束の伸長)は、精子細胞質中の恐らくは先体胞と核の境界域に存在すると思われるG-アクチンが、先体桿を核としてその先端部(barbed end)で重合することによって起ることが示唆された。

#### [円錐台構造の伸長機構]

アワビ未反応精子の先体胞先端部をキャップ状に覆っている円錐台構造は、先体外膜のすぐ内側に位置し、精子最先端部の引き金層(trigger region)とその上端で接しており、下端は先体外膜と連結している(図4a)。この円錐台構造は、先体反応の過程で、伸長する先体突起の基部を取り囲みながら著しく伸長し、元の約3倍長の細長い円筒形に変化する(図4b)。超薄切片像やフリーズ・フラクチャー像、及び、ネガティブ染色像等の解析から、円錐台構造は、一種の運動性を持った螺旋状蛋白繊維からなる圧縮コイル様構造体であると推定される。およそ12本の繊維(直径 ca.10nm、長さ ca.3.6 $\mu$ m)が先体胞開口部辺縁域の先体外膜内側から一定の間隔で伸び出ており、各繊維は密に約2回転半螺旋状に巻いて円錐台状(上底面及び下底面直径 ca.0.3 $\mu$ m, 0.6 $\mu$ m、斜高 ca.0.3 $\mu$ m)の圧縮コイルを構成していると思われる。先体反応が開始すると、圧縮コイルが弛み円錐台構造は細長く伸び、最後には完全な円筒形(直径 ca.0.2 $\mu$ m、高さ ca.1 $\mu$ m)にまで伸長する<sup>10)</sup>。この時、各繊維は規則正しい周期でおおよそ5回転しているので、円錐台構造の伸長は、単なる圧縮コイルの弛みによる伸びだけでなく、螺旋状繊維が更に巻き込みながら細長い円筒形へと変化することを示唆している。

この円錐台構造を構成している螺旋状繊維の性状を明らかにするために、精子頭部から円錐台構造を単離し、その構成成分の解析を行った。精子懸濁液をブレンダー処理し精子頭部から鞭毛を分離した後、精子頭部をノニデット、グリセリン、EGTA、Mgイオン等を含む溶液で処理し、蔗糖密度勾配遠心法により、円錐台構造を含む先体先端部のみを単離した<sup>17)</sup>。得

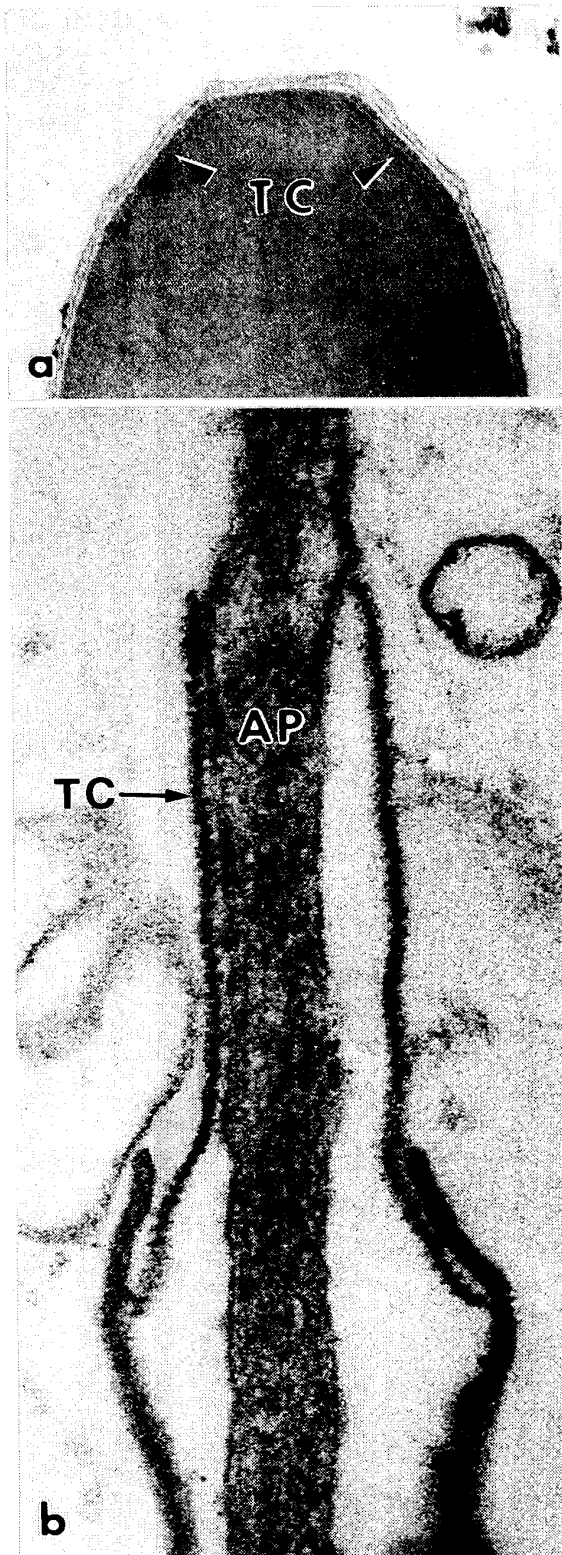


図4. 先体反応における円錐台構造の伸長  
(超薄切片電子顕微鏡像)

- a) 未反応精子の円錐台構造<sup>6)</sup>  
(x70,000)
- b) 先体反応により円筒状に伸長した  
円錐台構造<sup>10)</sup> (x93,000)

TC: 円錐台構造  
AP: 先体突起

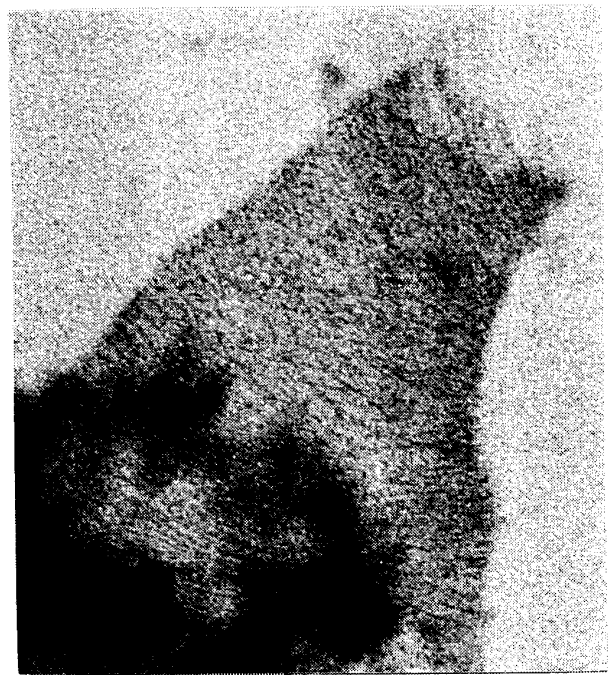


図5. 単離円錐台構造 (x93,000) 及び  
円錐台構造分画のSDSポリアク  
リルアミドゲル電気泳動 (SDS-  
PAGE)<sup>18)</sup>

- a) Triton X-100不溶性分画
- b) CaFASW可溶性分画
- c) CaFASW不溶性分画

右の数値は、分子量 $\times 10^{-3}$

られた先体先端部には、先体胞前方部の先体物質がそのまま保持されているので、イオン強度を上げて先体物質を溶解除去し、先体先端部の膜ゴーストと共に円錐台構造を高純度に単離することが出来た。これをネガティブ染色法により電子顕微鏡で観察したところ、単離された円錐台構造は、直径約 10nm の繊維が螺旋状に規則正しく巻かれた構造(図 5)であることが確認された。この円錐台構造画分を、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS PAGE) で分析したところ、分子量 60K、86K、及び 200K の 3 つの蛋白質が主成分として認められた (図 5c)。

そこで、円錐台構造を含む先体先端部画分を抗原として、ウサギ抗血清を作成し、免疫学的手法により、その構成成分の解析を試みた。先体先端部画分溶液に等量の Freund 完全アジュバンドを加えて良く混合したものをウサギに免疫注射し、血清の抗体価が十分に上がるまで 3 回追加免疫を行った。得られた抗血清は、更にニトロセルロース膜に結合させた円錐台構造画分の主要蛋白成分である 60K (分子量 6 万) 蛋白バンドを用いて、抗体をアフィニティー精製した。アフィニティー精製によりえられた抗体は、円錐台構造画分の 60K のバンドとのみ特異的に反応することが、イムノプロット法により確認された。

この抗 60K 蛋白抗体を用いて間接蛍光抗体法により、60K 蛋白質の局在を調べたところ、単離した先体先端部画分の円錐台構造領域に 60K 蛋白質が局在することが確認された (図 6a, b)。先体反応を誘起した精子でも、同様に円筒状に伸長した円錐台構造領域に 60K 蛋白質の局在が認められた (図 6c, d)。更に、微細構造的に 60K 蛋白質の局在を明らかにするために、Protein-A 金コロイド法を用いて電子顕微鏡レベルでの同定を試みた。抗 60K 蛋白抗体と反応させた単離円錐台構造画分で、円錐台構造を構成している螺旋状繊維構造に、金粒子が特異的に局在するのが観察された (図 7a)。同様にして、先体反応を起した精子についても、円筒状に伸長した円錐台構造の螺旋状繊維構造に特異的に金粒子が認められ (図 7b)、60K 蛋白質が円錐台構造の主要成分の一つであることが明らかになった。更に、イムノプロット法により、60K 蛋白質が中間径繊維蛋白の一つであるビメンチンの抗体と交叉反応することが確かめられた<sup>18)</sup>。

以上の結果は、円錐台構造を構成している螺旋状繊維が、60K 蛋白質を主要成分の一つとする中間径繊維様の運動性蛋白繊維であることを示唆しており、円錐台構造の細長い円筒形への伸長変化は、密に巻いたコイルが弛んで伸びると同時に、螺旋状繊維が更に巻き込むことによって起るものと考えられる。



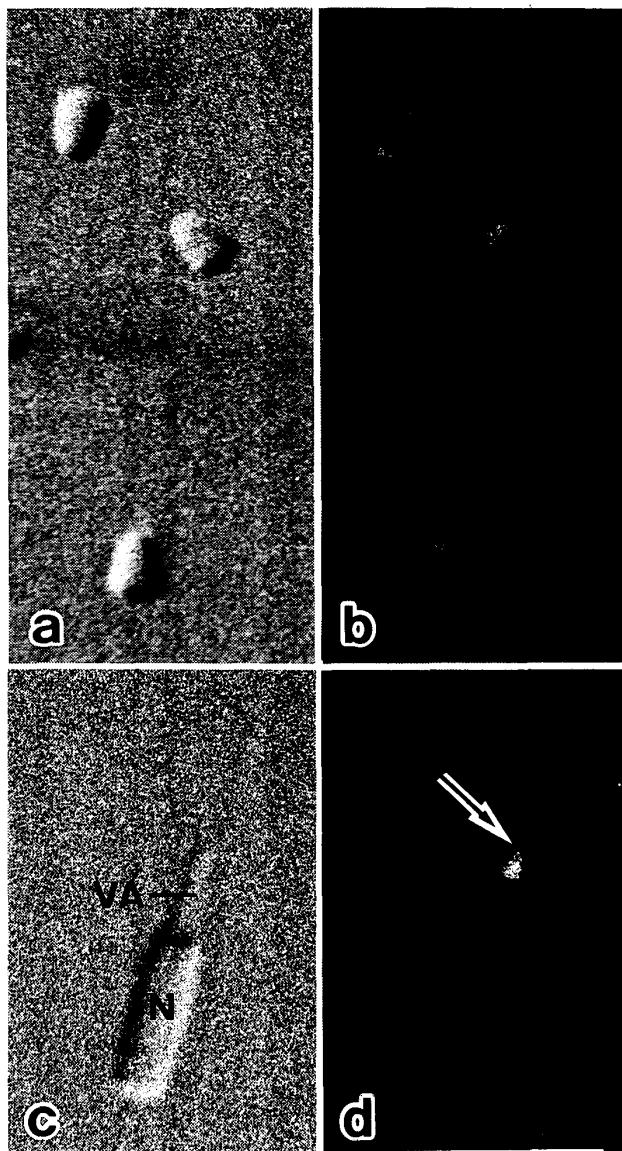


図6. 間接蛍光抗体法による60K蛋白質の局在 (×4,000)

- a) 単離先体先端部 (微分干渉位相差顕微鏡像)
- b) a)と同じ単離先体先端部を抗60K蛋白質抗体と反応させた後、蛍光標識二次抗体で処理した像。先端の円錐台構造部域が特異的に染色され光って見える。(蛍光顕微鏡像)
- c) 先体反応を起した精子 (微分干渉位相差顕微鏡像)
- d) c)と同じ精子を抗60K蛋白質抗体と反応させた後、蛍光標識二次抗体で処理した像。空砲化した先体胞 (VA) 開口部の円筒状に伸長した円錐台構造部域が特異的に染色され光って見える。(蛍光顕微鏡像)

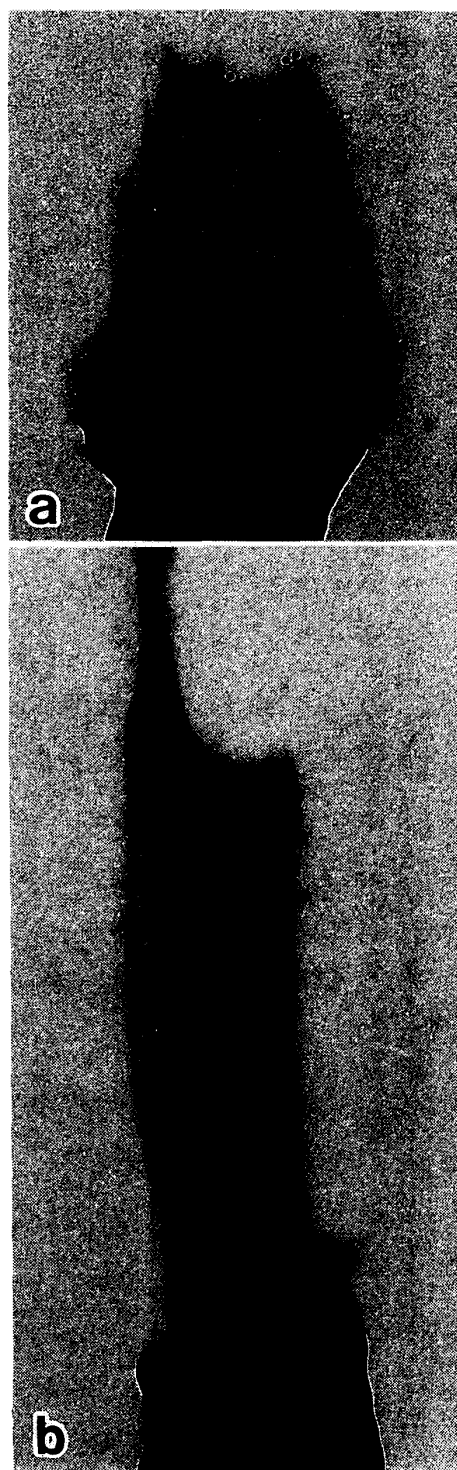


図7. Protein-A金コロイド法による60K蛋白質の局在 (ネガティブ染色・電子顕微鏡像) (×75,000)

- a) 単離円錐台構造画分の螺旋状繊維のところへ金粒子が特異的に認められる。
- b) 先体反応精子の円筒状に伸長した螺旋状繊維構造に金粒子が特異的に結合している。

## 〔総括〕

細胞骨格系を構成する蛋白繊維は、微細繊維 (microfilament)、微小管 (microtubule)、中間径繊維 (intermediate filament) の三つに大別されるが、前者二つの蛋白繊維は同時に細胞運動や細胞の情報伝達にも関わっている。例えば、微細繊維はアクチン—ミオシン系として筋肉の運動に、微小管はチューブリン—ダイニン系 (又は微小管—ダイニン系) として鞭毛や繊毛の運動に関与している。又、分泌活動を含む細胞内輸送の原動力は、微小管—キネシン系によることが最近明らかにされた<sup>19)</sup>。

アワビ精子には、他の多くの精子に見られるように、頭部後方には卵に接近するための鞭毛という微小管—ダイニン系の運動器官があり、頭部前方の先体胞後部にはアクチン系細胞骨格である先体桿があり、卵細胞膜と融合する先体突起膜の形成に重要な役割を果たしている。更に、我々のこれまでの結果から、アワビ精子に特有な“円錐台構造”を構成する螺旋状蛋白繊維が、受精に重要な機能を果たす中間径繊維様の蛋白繊維として新たに登場した。このことは、円錐台構造の機能が単に大型精子の一つの特性を示すにとどまらず、先体反応へのアクチン以外の運動性蛋白質の関与を示唆するものとして、受精現象を理解する上で重要である。特に、螺旋状繊維構造の伸長という運動形態は、これまで受精現象の中では全く知られていなかったものである。円錐台構造を構成する繊維の直径、分子量、安定性、免疫交叉性等から、この繊維は中間径繊維である可能性が極めて高く、受精反応への中間径繊維の関与という新たな視点を提示している。又、この繊維が中間径繊維であることが明らかにされると、中間径繊維が細胞運動に直接関与する初めての例として興味を持たれる。

本研究の一部は、第4回国際細胞生物学会議 (1988年8月14日—19日、モントリオール、カナダ) で報告された。本研究を行うに当たり、実験材料の蒐集や研究施設の使用など、多大なご協力をいただいた千葉県水産試験場・種苗生産研究室の方々に深く感謝の意を表す。

本研究は、文部省科学研究費補助金 (昭和58—60年度No. 58540475、昭和61年度No. 61740433) 及び、日本私学振興財団・学術研究振興資金 (昭和63年度) により行われたものである。

## [文 献]

- 1) Nijima, L., & J. C. Dan J. Cell Biol., **25**, 249—259. (1965)
- 2) Kikuchi, S., & N. Uki Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab., **33**, 69—78. (1974)
- 3) Kikuchi, S., & N. Uki *ibid.*, **33**, 79—86. (1974)
- 4) Lewis, C. A., D. L. Leighton, & V. D. Vacquier J. Ultrastruct. Res., **72**, 39—46. (1980)
- 5) Sakai, Y. T., Y. Shiroya, & K. Haino-Fukushima Zool. Mag., **90**, 414. (1981)
- 6) Sakai, Y. T., Y. Shiroya, & K. Haino-Fukushima Develop. Growth & Differ., **24**, 531—542. (1982)
- 7) Shiroya, Y., & Y. T. Sakai J. Wayo Women's Univ., **24**, 253—267. (1983)
- 8) Sakai, Y. T., F. Suzuki, & Y. Shiroya Develop. Growth & Differ., **27**, 787—802. (1985)
- 9) Shiroya, Y., & Y. T. Sakai Cell Struct. Funct., **13**, 73—87. (1988)
- 10) Shiroya, Y., & Y. T. Sakai Develop. Growth & Differ., **26**, 25—32. (1984)
- 11) Jessen, H., O. Behnke, K. G. Wingstrand, & J. Rostgaard Exp. Cell Res., **80**, 47—54. (1973)
- 12) Schroeder, T. E., & R. Christen Exp. Cell Res., **140**, 363—371. (1982)
- 13) Tilney, L. G. J. Cell. Biol., **77**, 551—564. (1978)
- 14) Shiroya, Y., H. Hosoya, I. Mabuchi, & Y. T. Sakai J. Exp. Zool., **239**, 105—115. (1986)
- 15) Woodrum, D. T., S. A. Rich, & T. D. Pollard J. Cell Biol., **67**, 231—237. (1975)
- 16) Kondo, H., & S. Ishiwata J. Biochem. **79**, 159—171. (1976)
- 17) Shiroya, Y., S. Maekawa, & Y. T. Sakai Zool. Sci., **4**, 1070. (1987)
- 18) Shiroya, Y., S. Maekawa, & Y. T. Sakai Cell Struct. Funct., **14**, in press (1989)
- 19) Vale, R. D., T. S. Reese, & M. P. Sheetz. Cell, **42**, 39—50. (1985)

酒井 淑 (本学教授)

代谷 陽子 (本学助手)