

依頼稿 (報告)

平成 22 年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題

1) 精子における活性酸素消去機構の解析

研究代表者 春見 達郎

細胞は進化の過程でミトコンドリアを獲得し、ミトコンドリアを細胞内小器官として保持することによって呼吸をおこない、効率的に ATP を合成している。しかし、一方で、ミトコンドリアでは、酸素を取り込むことで活性酸素種 (ROS) が生じる。ROS は、近年、低濃度では細胞間情報伝達分子として働くことも知られているが、その負の作用として脂質の酸化や DNA の障害を引き起こす毒性を持ち、老化や疾患などの原因の一つとして考えられている。一般の細胞内では細胞質に存在する種々の活性酸素消去酵素系が働き、ROS がミトコンドリアの周辺で分解され、核などに到達しない機構が存在する。一方、受精を行う精子は、卵や他の細胞と異なり、細胞質をほとんど持たないが、ミトコンドリアを核の隣の中片に持ち、活発に呼吸して鞭毛運動を行う。本研究では、精子は発生した ROS をどのように代謝しているのかを調べた。

HTF 培養液にけん濁したラット精子を ROS 検出蛍光プローブで観察すると、けん濁直後の活発に遊泳している精子では精子中片に ROS が検出されるのに対して、けん濁 24 時間後にその動きを止めた精子においては、精子全体に ROS が検出された (図 1)。この結果から、精子の遊泳時には ROS はミトコンドリアの存在する精子中片で発生していることが明らかになった。

精子において、発生した ROS をどのようにして消去しているのかを調べるため、ROS の一つである過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) を精子けん濁液に加え、その代謝量を測定した。 $10^7$  精子/ml の濃度の精子けん濁液に 1mM という高濃度の  $H_2O_2$  を加えたところ、15 分以内に  $H_2O_2$  は完全に消去された。1mM  $H_2O_2$  は一般



図 1 ラット精子の遊泳時 (けん濁 2 時間後)、および遊泳停止後 (24 時間後) の ROS 検出プローブ (DCHF) による染色

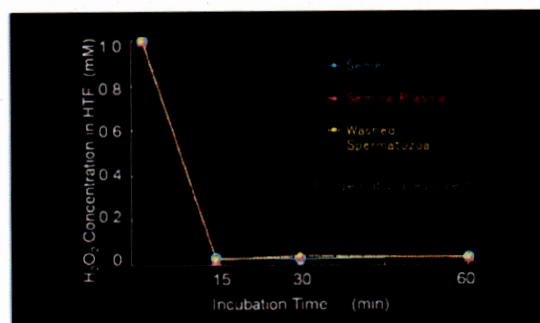


図 2 ラット精液、精漿および精子における  $H_2O_2$  消去活性

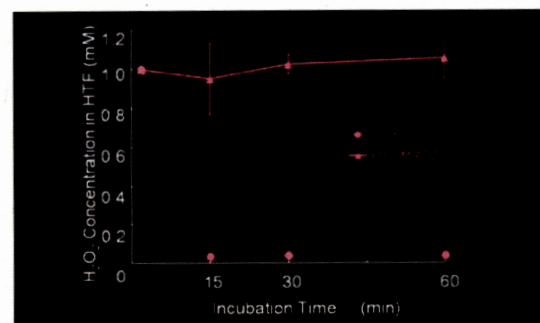


図 3 ラット精漿の  $H_2O_2$  消去活性におよぼすカタラーゼ阻害剤 (3-amino-1,2,4-triazole:ATZ) の効果

の培養細胞では細胞死を引き起こす毒性の高い濃度である。この濃度の過酸化水素を添加してもラット精子の運動や遊泳時間に影響は認められなかった。この結果から、ラット精子（精液）には非常に強い ROS 消去活性が存在することが明らかになった。精液を精子と精漿とに分離して測定した結果、この非常に強い H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去活性は精子にも精漿にも存在した（図2）。

この H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去活性の本質を明らかにするため、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解酵素であるカタラーゼの阻害剤アミノトリアゾール（ATZ）を加えて H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去活性を測定した結果、精漿の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去活性は完全に阻害された（図3）。一方、洗浄し精漿を除去した精子に ATZ を添加しても、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去活性は部分的にしか阻害されなかった（図4）。さらに、ATZ 添加に加え精子を 100℃ で 3 分間加熱した後も H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去活性は残っていた（図4）。また、カタラーゼ以外の ROS 消去因子として知られる耐熱性のトリペプチド、グルタチオンはラット精子に検出されなかった。

以上の結果を図5にまとめた。精液の中で、精漿中ではカタラーゼが ROS 消去因子として働くのに対して、精子にはカタラーゼに加えて、非酵素性の耐熱性 ROS 消去因子が存在する。

現在、この耐熱性 ROS 消去因子の性質を示唆するデータが得られている。一般に SH 基に活性中心を持つ酵素の阻害剤として知られ、水銀を含有する *p*-chloromercuribenzoate (PCMB) は ATZ と協同してラット精子における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去活性を完全に阻害した（図6）。先の実験結果（図4）で、精子の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去はカタラーゼと酵素に依存しない耐熱性の因子によることから、図6で示された PCMB による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去の阻害効果は、PCMB が含む水銀の反応性に基づくことが予想される。

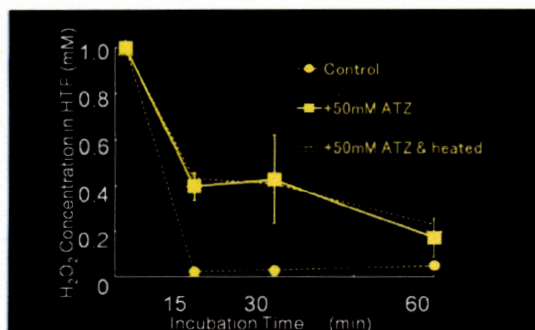


図4 ラット精子の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去活性におよぼす ATZ、および加熱の効果

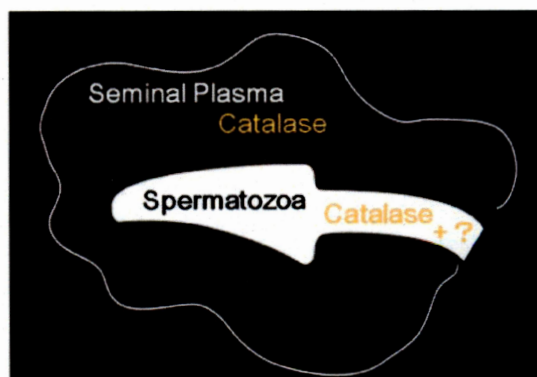


図5 ラット精液における ROS 消去機構

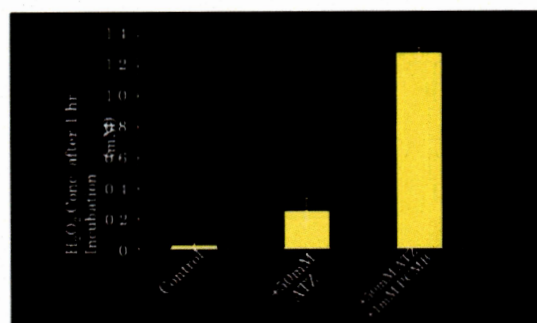


図6 ラット精子の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去活性におよぼす ATZ と *p*-chloromercuribenzoate (PCMB) の効果 (1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理 1 時間後)

今後、ラット精子で見出されたこの非酵素性の耐熱性 ROS 消去因子の同定を進める必要がある。

本助成によるこの研究成果は第 50 回米国細胞生物学会（フィラデルフィア）において以下の演題で発表された。T. Harumi *et al.*, "Species-Specific Mechanisms for Scavenging Reactive Oxygen Species in Mammalian and Fish Spermatozoa"