

て、精漿にも精子にも、強力な ROS 消去活性が存在することを明らかにした (Fig. 1)。本年度はこの ROS 消去機構の分子的基盤を明らかにすることを試みた。

昨年度に引き続き、ROS の消去活性は、ROS の一つである過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) を添加しその減少量を Amplex Red から Resorufin への変換量を基に測定を行った。既に、精漿における ROS 消去活性はカタラーゼに由来することを見出している。一方、洗浄精子における ROS 消去活性の測定の結果では、カタラーゼ阻害剤 (ATZ) ではその活性は部分的にしか阻害せず、水銀を含む *p*-chloromercuribenzoate (PCMB) との併用で完全に阻害することが出来た (Fig. 2)。この結果から、精子に存在する金属イオンによる ROS 消去活性の可能性を調べた。セレンは生体内においてセレノシステインやセレノメチオニンのようなセレノアミノ酸としてタンパク質中に存在することが知られている。精子にはセレノアミノ酸が存在することが報告

### 3) 精子における活性酸素種消去機構の解析

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種消去酵素系が働き、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。

受精を行う雄性配偶子である精子は、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。昨年度の「独創性のある生命科学研究助成」により、ラットを用いた実験から、ラット精液におい

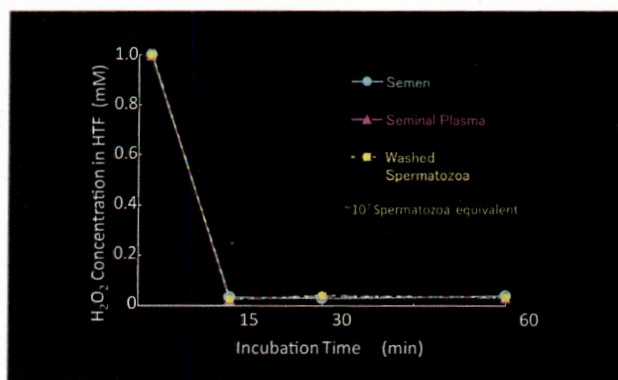


Fig 1 Elimination of  $H_2O_2$  by Rat Semen, Seminal Plasma and Washed Spermatozoa

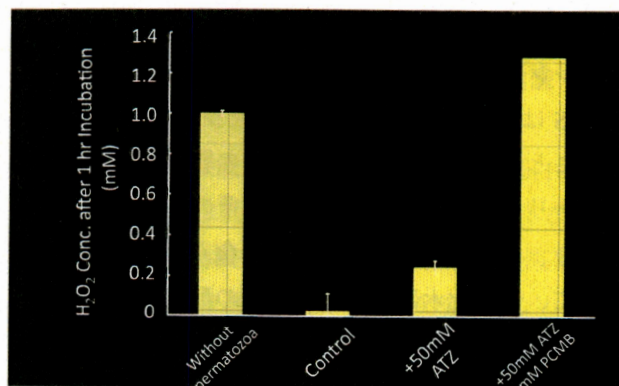


Fig 2 Synergistic Effect of Aminotriazol(ATZ) and pchloromercuribenzoate(PCMB) on  $H_2O_2$  Elimination by Washed Rat Spermatozoa

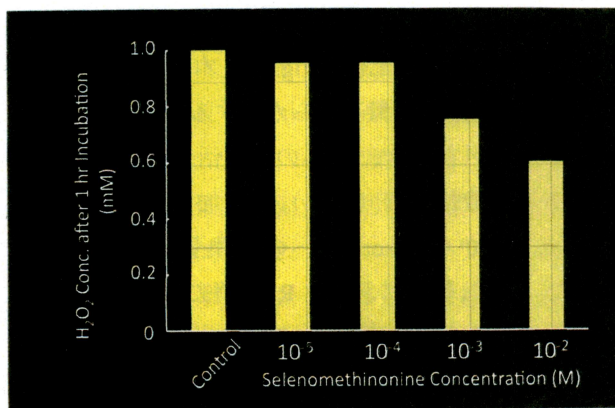


Fig 3 Effect of Selenomethionine on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Degradation

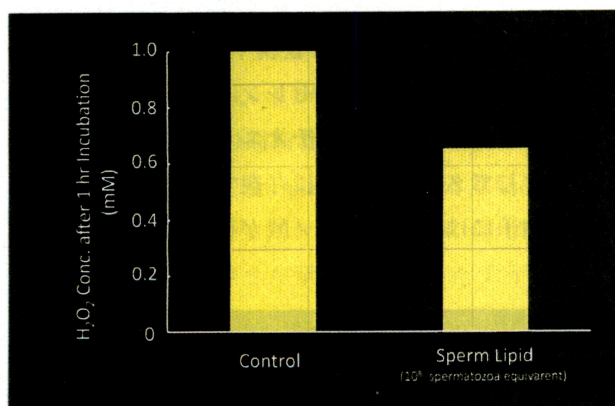


Fig 4 Effect of Extracted Sperm Liquid Fraction on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Degradation

されているため、セレノメチオニンによる過酸化水素の分解を測定した。その結果、1 mM を超える濃度のセレノメチオニンで過酸化水素の分解が認められた (Fig. 3)。本結果によりセレノアミノ酸に ROS 消去活性が認められたが、その必要濃度は高く、生体内におけるセレン濃度は 1  $\mu$  M 程度であると報告されていることから、精子に認められる強力な ROS 消去活性がセレンだけに基づくとは考えにくい。

ROS は細胞膜の膜脂質の酸化を生じ細胞に障害を示すことが知られている。細胞膜の脂質は中性脂肪の様なトリグリセリドとは異なり、その多くはリン脂質であり、多価不飽和脂肪酸を多く含んでいる。精子において、過酸化水素が精子細胞膜の酸化に関わるかどうかを明らかにするため、ラット精子からブライ・ダイアー法により膜脂質を抽出し、これに過酸化水素を加えた。その結果、過酸化水素の分解が認められた (Fig. 4)。これは過酸化水素による膜脂質の酸化が起こり、その結果過酸化水素の分解が生じた可能性も有

るが、この過酸化水素の分解は限定的であり、また反応性の低い過酸化水素がリン脂質の不飽和脂肪酸に直接作用するとは考えにくく、過酸化水素が一旦ラジカルに分解されて膜脂質に作用したのではないかと考えられる。

以上の結果をまとめると、精子に存在する強力な ROS 消去活性は、ある一つの要素によるものではなく、カタラーゼ、金属イオン、脂質酸化等の複合的要因が重なり生じている可能性を示唆している。細胞質をほとんど持たない精子において、精子自身が持っている ROS 消去活性、および精子細胞外の精漿中のカタラーゼがミトコンドリアで発生する ROS を消去し、その結果、精子の遊泳や受精に ROS の有害な影響が生じないと考えられる。

本助成によって得られた研究成果は第 52 回米国細胞生物学会 (サンフランシスコ) において以下の演題で発表された。T. Harumi *et. al.*, "Species Specificity of Energy Metabolisms and Mitochondrial Morphology in Mammalian and Fish Spermatozoa".