

論文内容要旨（和文）

平成 14 年度入学 大学院博士後期課程 地球共生圏科学専攻 共生圏発達科学 講座

氏 名 佐々木 隆広



論 文 題 目 細胞培養系を用いたメダカ精子完成におけるカスパーゼ活性の役割の解析

精子完成とは、精細胞の著しい形態変化によって受精に適した精子の形態を作り上げる過程であり、細胞内では核凝縮を始めとする多くの現象が秩序正しく進行する。精子完成の一部は、精細胞の自律的制御によって進行することが示唆されているが、その制御機構については不明な点が多い。

カスパーゼは、アポトーシスの過程で細胞内信号のカスケードを形成し、核 DNA の断片化やアポトーシス小体の形成等を引き起こすプロテアーゼである。近年、ラットやショウジョウバエの精子完成過程にカスパーゼが関与することが報告されている。その作用機序については不明な点が多いが、アポトーシスにおいて明らかにされている作用機序から、カスパーゼが精子完成で起こる諸現象を、包括的に制御する信号伝達系を形成することが考えられる。この仮説を検証するためにメダカ (*Oryzias latipes*) 第一精母細胞の細胞培養系を用いて研究を行った。

メダカの第一精母細胞は、細胞培養下で自律的に受精可能な精子に分化しうる唯一の例であり、この培養系は精子完成の自律的な制御機構を調べる上で有効な手段と考えられる。そこで、本研究では、まず、細胞培養系における精子完成の進行状況について検討した。

細胞培養下で第一精母細胞の DNA 合成時に BrdU を取り込ませ、その後分化してくる精子を成熟卵に媒精し、受精して発生を開始した胚の割球を BrdU 抗体を用いて抗体染色したところ、核に特異的な染色が観察された。このことは、細胞培養下で第一精母細胞から受精能を持つ精子が分化したことを示している。そこで、この分化過程における精子完成の諸現象、すなわち、核凝縮の開始、ミトコンドリアの局在化、鞭毛の形成及び細胞質小葉の形成の起こる時期について調べた。

メダカの精子形成において、プロタミンは核凝縮に関与することが明らかにされている。そこで、細胞培養した精子形成細胞におけるプロタミン mRNA の発現の有無について RT-PCR 法で調べたところ、培養 3 日目に顕著な発現の上昇が認められた。また、核凝縮に伴う変化、すなわち、生殖細胞核 DNA の DNase I 活性に対する抵抗性について調べたところ、培養 3 日目の生殖細胞で、DNase I 処理による DNA の分解量が顕著に減少した。本研究で用いた培養系では、第一精母細胞は培養 3 日目までに精細胞に分化するので、これらの結果は、核凝縮が初期の精細胞で始まることを示していると考えられる。

(10pt 2,000字程度 2頁以内)

次に、ミトコンドリアの局在化について、ミトコンドリアに特異的に結合する蛍光試薬を用いて細胞培養下での精子形成細胞を染色したところ、培養3日目の精細胞においてミトコンドリアが細胞質の一部に局在する像が観察された。また、顕微鏡を用いた経時的な観察から、分化した精細胞において培養3日目にすでに鞭毛が観察され、培養6日目までに成熟精子の鞭毛と同程度の長さの伸長することが示された。これらの結果は、ミトコンドリアの局在化及び鞭毛の伸長が初期の精細胞で起こることを示している。一方、細胞質小葉を形成した精細胞は、培養4日目に多く観察された。

以上、細胞培養下で進行する精子完成の諸現象の時期は、生体内で見られる精子完成の諸現象が起こる時期と基本的に一致している。更に、この実験系において精子完成の精細胞自律的な制御が働くことが示唆される。

次に、この培養系を用いて、精子完成の諸現象に対するカスパーゼ活性の作用について調べるために、カスパーゼ活性に対する包括的な阻害剤である Z-VAD-fmk を培養液に加え、各現象への影響を調べた。その結果、DNase I 処理によって核 DNA の分解が検出された。また、培養4日目に細胞質小葉を形成した精細胞の割合が、阻害剤を作用させていないコントロール実験に比べて減少した。これらの結果は、核凝縮の開始と細胞質小葉の形成に、カスパーゼ活性が関与することを示唆する。更に、カスパーゼ-3 の活性を特異的に阻害する Ac-DMQD-CHO を培養液に加えたところ、DNase I 処理によって核 DNA の分解が検出された。これは、カスパーゼ-3 が、核凝縮の開始に関与することを示唆する。

カスパーゼ-3a、及びカスパーゼ-3の活性化に関与すると考えられるカスパーゼ-8 と-10 の mRNA について、精子形成細胞における発現を RT-PCR 法によって調べたところ、精巣の精細胞及び培養下で分化した精細胞においてカスパーゼ-3a、及び-10 mRNA の発現が検出された。これらの結果は、メダカ精子完成の制御にカスパーゼを介した信号伝達系が関与することを示唆する。

本研究で得られた結果は、カスパーゼを介した信号伝達系が、精子完成で起こる少なくとも2つの現象、核凝縮と細胞質小葉の形成を統括的に制御していることを示した。このような特徴を持つ精子完成の制御機構についてはこれまでに報告がなく、受精に適した形態を作り出す上で重要な役割を持つと考えられる。

論文内容要旨 (英文)

平成14年度入学 大学院博士後期課程 地球共生圏科学専攻 共生圏発達科学 講座

氏名 佐々木 隆広



論文題目 Role of caspase activities in *in vitro* spermiogenesis of the medaka fish, *Oryzias latipes*.

Spermiogenesis is the process that spermatids undergo remarkable morphological changes into sperm, and suggested to be regulated autonomously in spermatids, at least in part. Caspases are involved in an intracellular signaling for inducing apoptosis. Recent reports revealed that the caspase activities involved in controlling spermiogenesis. The signaling mediated by caspases is expected to act in a new mechanism for controlling the autonomous progressing of spermiogenesis. In this study, I examined the involvement of the caspase activity in spermiogenesis of a teleost, *Oryzias latipes*, in cell culture.

Previous study suggested that primary spermatocytes of *O. latipes* differentiated into fertilizable sperm in cell culture. In the present study, we directly demonstrated the fertilizability of the sperm differentiated in cell culture using BrdU as a tracer. Then, I examined the timing of nuclear remodeling, mitochondrion localization, flagellum formation and cytoplasmic lobe formation, which took place in spermiogenesis, in the *in vitro* spermiogenesis and found that those events orderly occurred in spermatids as *in vivo*.

When Z-VAD-fmk, an inhibitor for any caspase activities, was added to the medium, the digestion of nuclear DNA by DNase, which was suppressed by the nuclear remodeling, was detected in spermatids and cytoplasmic lobe formation was also inhibited. These results suggest that caspase activity involves in inducing nuclear remodeling and cytoplasmic lobe formation. Moreover, using Ac-DMQD-CHO, an inhibitor specific for caspase-3, caspase-3 was suggested to involve in the nuclear remodeling in the *in vitro* spermiogenesis. The results of RT-PCR demonstrated that mRNA for caspase-3a and -10 expressed in spermatids in spermatids differentiated *in vitro* as well as *in vivo*.

The results of the present study suggest that caspase signaling is important for controlling some events in spermiogenesis of *O. latipes*. It is the first report to show the role of caspase activity in vertebrate spermiogenesis.

(12pt シングルスペース 300語程度)

学位論文の審査及び最終試験の結果の要旨

平成 17 年 2 月 17 日

理工学研究科長 殿

課程博士論文審査委員会

主 査	阿部 宏之
副 査	鬼武 一夫
副 査	澤井 毅
副 査	原 慶明
副 査	渡辺 明彦



学位論文の審査及び最終試験の結果を下記のとおり報告します。

記

1. 論文申請者

専攻名 地球共生圏科学専攻
氏 名 佐々木 隆広

2. 論文題目 (英文の場合は, その和訳を併記すること。)

細胞培養系を用いたメダカ精子完成におけるカスパーゼ活性の役割の解析

3. 学位論文公聴会

開催日 平成 17 年 2 月 15 日
場 所 理学部 S401 教室

4. 審査年月日

論文審査 平成 17 年 2 月 1 日 ~ 平成 17 年 2 月 15 日
最終試験 平成 17 年 2 月 16 日 ~ 平成 年 月 日

5. 学位論文の審査及び最終試験の結果 (「合格」・「不合格」で記入すること。)

(1) 学位論文審査 合格
(2) 最終試験 合格

6. 学位論文の審査結果の要旨 (1,200字程度)

別紙のとおり

7. 最終試験の結果の要旨

別紙のとおり

専攻名	地球共生圏科学専攻	氏名	佐々木 隆広
学位論文の審査結果の要旨			
<p>本論文は、メダカ精子形成細胞の細胞培養系を用い、精子完成過程の制御にカスパーゼ分子群を介した信号伝達系が細胞内情報伝達系として関与することを発見するとともに、そこで機能する一部のカスパーゼ分子について、その検出に成功したものである。最近、カスパーゼを介した細胞内信号伝達系が、細胞分化の制御に関与することが明らかにされ注目されているが、本論文は、この信号伝達系が脊椎動物における精子完成過程の制御に関与することを示唆した最初の報告である。</p> <p>本研究は、細胞培養系において、減数分裂と精子完成過程を経て受精能を持つ精子が連続的に形成されるメダカ精子形成細胞を用いて遂行され、その内容は、大きく3つの部分から構成されている。</p> <p>第1は、細胞培養系において、メダカ精子形成細胞の精子完成過程で起こる核凝縮の開始、ミトコンドリアの局在化、べん毛の形成及び細胞質小葉の形成それぞれの特徴を反映する指標を確立し、これに基に、各現象が起こる時期と順序を明らかにした。</p> <p>第2は、この指標を基に、タンパク質分解酵素活性を持つカスパーゼに対して全般的な阻害作用を持つ薬剤を用い、核凝縮の開始と細胞質小葉の形成にカスパーゼ活性が関与することを示した。同様に、カスパーゼ3の活性を特異的に阻害する薬剤を用い、核凝縮の開始にカスパーゼ3が重要であることを見いだした。</p> <p>第3は、カスパーゼ3とこれを活性化することが知られているカスパーゼ8及びカスパーゼ10各分子に対するmRNAが、メダカ精細胞で発現しているか否かを分子生物学的手法によって検討し、少なくともカスパーゼ10とカスパーゼ3に対するmRNAが発現していることを明らかにすることにより、それぞれの産物が精細胞で機能し得ることを示した。</p> <p>以上の結果は、メダカ精細胞における精子完成過程の進行には、カスパーゼを介した細胞内信号伝達系が重要な役割を果たすことを示している。</p> <p>本論文は、脊椎動物における精子完成過程の制御に関わる分子機構の一端を明らかにしただけでなく、その全容を解明するための端緒となる可能性を持つ。また、生物種によって多様な形態を示す精子の系統進化学的研究の発展にも寄与することが期待される。</p> <p>また、本論文の一部は、ケープタウンで開かれたThe 9th symposium on spermatology (2002年)において口頭発表され、その一部はDevelopment Growth & Differentiation誌(2005年)において印刷公表されている。</p> <p>以上を踏まえ、本審査委員会は、全員一致で本論文が博士(理学)の学位を授与するに相応しいと判定し合格とした。</p>			
最終試験の結果の要旨			
<p>申請者は、論文内容に対する口頭諮問に対して、生殖生物学の知識を基礎とした的確な応答を示した。その内容は、当該分野での学術研究に従事するうえで必要な要件を修学したものと認められる。また、英語の諮問に対しても的確な応答を示し、外国語においても学術研究に必要な能力を習得したものと認められる。</p> <p>以上により、最終試験の結果を合格と認める。</p>			