

氏名（本籍）	加藤 侑希		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第	7421	号
学位授与年月	平成 27 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	ブタ精子 capacitation の分子機構 ータンパク質チロシンリン酸化と ROS レベルの関与につ いてー		
主査	筑波大学教授	獣医学博士	八神 健一
副査	筑波大学教授	博士（医学）	西山 博之
副査	筑波大学助教	博士（医学）	新開 泰弘
副査	筑波大学准教授	博士（薬学）	長谷川 潤

論文の内容の要旨

(目的)

哺乳動物の精子は、精巣で形成された後、精巣上体における精子成熟及び輸卵管峡部における capacitation を経て活性化され、hyperactivation 及び先体反応を起こして卵と受精することが可能となる。Capacitation の詳しい分子メカニズムは未解明な点が多いが、capacitation には ROS レベルの上昇と機能タンパク質のチロシンリン酸化が特に重要であると考えられている。しかし、これまでに capacitation に伴ってチロシンリン酸化されるタンパク質の存在についてはいくつか報告があるものの、そのリン酸化タンパク質の機能は不明であり、また、ROS レベルの調節機構も明らかにされていない。本研究は、capacitation に伴いチロシンリン酸化されるタンパク質が精子の capacitation や精子内 ROS レベルの調節にどのように関わっているのかを明らかにすることを目的とした。

(対象と方法)

ブタの精巣、精巣上体及び精子を用いて、capacitation の誘導に伴いチロシンリン酸化されるタンパク質を二次元電気泳動、Western blot、MALDI-TOF-MS 解析等により同定した。同定された aldose reductase (AR) 及び isocitrate dehydrogenase I (IDPc) について、精巣や精巣上体組織の免疫染色、阻害剤による機能解析を行い、さらに NADPH 量や ROS レベルの検討を行った。

(結果)

本研究では、capacitation に伴いチロシンリン酸化されるタンパク質として AR 及び IDPc を新たに同定した。また、精子の AR は精子形成、特に精巣上体での成熟過程で体細胞から精子に付与される外来タンパク質であることが明らかとなった。さらに、AR の膜透過性の特異的阻害剤 alrestatin が capacitation を阻害することから、AR がチロシンリン酸化を受け活性化することで capacitation 及びそれと深く関係する hyperactivation 及び ROS レベルの上昇が起こることが強く示唆された。また、IDPc は capacitation に伴って活性が低下し、さらに精子細胞内 NADPH 量も低下し、一方で ROS レベルは上昇していることが明らかとなった。これらの結果より、AR と IDPc のチロシンリン酸化による活性変化が NADPH を介した抗酸化ストレス系の働きを低下させ、ROS レベルの上昇の誘導に深く関わっていることが推察された。

(考察)

AR は精子の主要なエネルギー源の一つである fructose を産生する polyol pathway の律速酵素であり、NADPH を補酵素として glucose を sorbitol に変換する酵素として知られている。一方、多くの細胞で NADPH の細胞内レベルの維持にペントースリン酸経路 (PPP) が中心的な役割を果たすが、本研究で用いたブタにおいては、glucose-6-phosphate dehydrogenase 活性が認められず、PPP は生理的な役割を果たしておらず、精子内 NADPH 生成には malic enzyme と IDPc が働いていると考えられている。また、capacitation に伴って IDPc の活性及び精子細胞内 NADPH 量は低下するのに対し、ROS レベルは上昇したことから、capacitation に伴うチロシンリン酸化による AR の活性上昇と IDPc の活性低下は、精子内 NADPH 量の減少を導くことが推察された。さらに、NADPH 量の減少は、ROS の消去に作用するグルタチオンサイクルの働きを障害し、結果として精子内 ROS レベルを上昇させる。ROS 濃度は、精子が capacitation を起こすために重要な調節因子になっていると考えられており、AR と IDPc は ROS レベルの調節の中枢を担っていると考えられた。

本研究において、AR 及び IDPc の解析から、精子が生理的な ROS 産生系を持ち、それが細胞内 NADPH レベルによって制御されていることが強く示唆された。これまで、精子で産生される ROS は主にミトコンドリアを起源とすると言われてきたが、本研究の結果は新しい ROS 産生系の存在を示したものである。精子における ROS を介した機能調節系の全体像を明らかにすることによって、不妊治療や避妊、家畜の育種や遺伝資源の保存などに際して、精子の受精能を有効に制御することが可能になると考えられる。

審査の結果の要旨

(批評)

Capacitation は精子の受精能獲得の過程で極めて重要な現象であり、生殖生理学、発生工学分野で多くの研究者がその分子機構の解明を試みているが、未解明な点が多い。本研究では、capacitation に伴いチロシンリン酸化されるタンパク質として AR 及び IDPc を新たに同定し、その機能解析の結果、capacitation に伴うチロシンリン酸化による AR の活性上昇と IDPc の活性低下が精子内 NADPH 量の減少を導くことが示唆された。AR と IDPc が ROS レベルの調節、精子の受精能獲得に深く関わることを示した本研究は、精子 capacitation の分子機構の全容解明に向けて重要な成果を示したものであり、今後のさらなる展開が期待できる優れた研究である。

平成 27 年 1 月 7 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。