

氏名	牛山 愛		
学位の種類	博 士 (学 術)		
学位記番号	博 甲 第 8 5 9 7 号		
学位授与年月日	平成 3 0 年 3 月 2 3 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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Biochemical and Functional Characteristics of Membrane Micro-domains in Avian Sperm (鳥類精子における細胞膜マイクロドメインの生化学的および機能的特性)		
主査	筑波大学教授	Ph.D.	田島 淳史
副査	筑波大学教授	Ph.D.	Taylor DeMar
副査	筑波大学教授	農学博士	宮崎 均
副査	筑波大学助教	博士(学術)	浅野 敦之

論 文 の 要 旨

遺伝子の転写・翻訳活性を欠く精子は、受精を達成するため予め自己に組み込まれた様々な細胞機構に依存しなければならない。“膜ラフト”はステロール、G_{M1}および機能性タンパク質を豊富に含む細胞膜マイクロドメインであり、様々な細胞機能の時空間制御に関わっている。近年、哺乳類精子において膜ラフトは卵子透明帯への結合および先体反応の制御に関与することが分かってきた。一方、鳥類の精子は哺乳類とは形態および機能性において異なることから、受精機構分子基盤の解明が遅れている。最近、膜ラフトは鳥類精子にも存在することが報告されたが、その機能的役割は未だ不明である。

そこで、審査対象論文において、著者は細胞膜が制御する鳥類精子受精機構の分子基盤の解明を進めるため、様々な手法を使ってニワトリ精子膜ラフトの生化学的および機能性解析を行った。

第1章で著者は家畜資源の遺伝的多様性維持の重要性について分析すると共に、その方策として配偶子凍結保存の有効性と現状を論ずることで、鳥類精子における生殖工学技術発展の必要性を指摘した。さらに膜ラフトの哺乳類精子における機能性と鳥類精子における細胞膜変化を照らし合わせることにより、鳥類精子における精子膜ラフトの機能的重要性を指摘した。

第2章では、ニワトリ精子を凍結保存する際に高頻度で認められる受精能力低下に対する人工ステロール充填による膜ラフト強化の影響について検討した。その結果ステロール充填は凍結保存された精子の生存性、運動性および受精機能の低下を阻止できることを明らかにした。さらにこの改善効果の作用機序は、凍結保存が誘起する膜ラフト崩壊が引き起こすアポトーシスや先体反応異常を抑制することに因ることを明らかにし、本手法が鳥類精子の凍結保存に有効であることを明らかにした。

第3章では、ニワトリ精子において膜ラフトの機能的役割を網羅的に解明する目的で、人工的に分離した膜ラフトの生化学分析と共に相対定量的プロテオーム解析を行った。その結果、膜ラフトは少なくとも82のタンパク分子種を豊富に含み、その内15種は膜ラフト特異的に存在するこ

とを同定した。さらに膜ラフトの凍結傷害誘起機構および卵 - 精子結合における役割を検討した結果、凍結保存に伴うステロール流出が膜ラフト崩壊の起点となること、さらに膜ラフトに豊富に存在する60KDaタンパク分子が卵膜への結合を仲介していることを明らかにした。

第4章では、前章のプロテオーム解析によって膜ラフトに豊富に存在することが分かったグルコーストランスポーター3(GLUT3)に着目し、その分子特性と共にグルコースの精子受精機能に及ぼす影響を検討した。その結果、ニワトリ精子GLUT3は、哺乳類のそれと同様の分子量を有す糖タンパクであること、また精子の先体及び主部原形質膜に局在し、膜ラフトと極めて高い親和性を示すことを明らかにした。これに加え、グルコースは運動性に影響を及ぼさないが、先体反応を濃度依存的に促進することを明らかにし、さらにその作用機構には膜ラフトによるグルコースの取り込みの維持が関与していることを明らかにした。

第5章では、前章で明らかにされたグルコース依存的な先体反応促進機構の作用機序を明らかにする目的で、AMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)の発現および機能特性を検討した。その結果、AMPKは膜ラフトを介したグルコース取り込みによる先体反応機構を制御していることを明らかにした。さらに、AMPKの活性制御機構を検討した結果、膜ラフトに存在するトランスポーターによるグルコース取り込みはAMPK α のThr172残基をリン酸化することから、AMPKシグナル経路の制御には膜ラフトが重要な役割を果たすことを明らかにした。

以上の一連の研究成果に基づき、第6章では鳥類の繁殖生理ならびに哺乳類との差異の面から鳥類精子の機能制御機構分子基盤において膜ラフトが様々な役割を果たしている可能性を考察し、それらが動物界を通じて受精成立にかけた精子の生殖戦略であることを指摘した。さらに、本検討で得られた基礎的知見を利用した動物繁殖技術の開発に向けた展望とその社会的役割について考察を加えた。

審 査 の 要 旨

本研究は、細胞膜マイクロドメイン“膜ラフト”の機能性に着目し、様々な手法を用いて鳥類精子における受精機構分子基盤の統括的な解明を試みた。その結果、膜ラフトの人工制御は安定的な配偶子保存技術の構築に有用であることを明らかにしている。さらに、定量的プロテオミクス解析を使って、膜ラフトは精子-卵結合を含む様々な機能の制御に関わっている可能性を示している。そこでプロテオームデータに基づき、グルコース代謝の先体反応における役割を検討した結果、膜ラフトはGLUT3などのトランスポーターを制御することでグルコース取り込みに関与すること、またグルコースはAMPKのリン酸化を誘起することで先体反応を促進することを明らかにしている。さらに著者は、一連の研究成果に今までの知見を加えながら、膜ラフトが動物界を通じて普遍的に受精機構の制御に関わっていると考察している。

以上の通り、本研究は鳥類精子の受精機能制御に新たな作用機構の関与を示すと共に、鳥類における効率的な配偶子凍結保存法の構築に大きく貢献するものであり、その成果の学術的な意義は大きいと判断される。

平成30年1月18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に論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(学術)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。