

氏名	U. A. CHATHURA PRIYADARSHANA		
学位の種類	博 士 (学術)		
学位記番号	博 甲 第 9 4 7 7 号		
学位授与年月日	令和2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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Membrane Regulation of Protein Kinase Signaling Pathways in Chicken Sperm Function (鶏精子における細胞膜によるタンパク質キナーゼ情報伝達経路の制御に関する研究)		
主査	筑波大学助教	博士 (学術)	浅野 敦之
副査	筑波大学教授	Ph.D.(Animal Physiology)	田島 淳史
副査	筑波大学教授	Ph.D.(Ecological Sciences)	Taylor DeMar
副査	筑波大学教授	農学博士	宮崎 均

論 文 の 要 旨

審査対象論文は、鳥類における家畜生産性と生息域外保存強化に向け精子の高度利用技術構築に必要な基盤のデータを獲得するため、細胞膜に存在する機能性膜領域“膜ラフト”に注目し、受精現象に必須である精子先体反応誘起に関わるシグナル伝達機構の解明を行ったものである。本論文で著者は、鶏精子の先体反応 (AR) は膜ラフトを起点とした種々の異なるシグナル伝達経路により制御されていること、またそれらの経路には哺乳類の知見と比べて多くの差異が認められることを明らかにし、鳥類精子の生殖補助技術構築には動物界で普遍性の高い膜ラフトの人為的コントロールが有用である可能性を示した。

第1章では、著者は昨今の社会環境変動に対する食料としての家禽利用性強化、および野生鳥類における絶滅危惧の加速化について分析し、それらの持続的発展には鳥類で効率的繁殖技術や生息域外保存技術の整備が必要であると指摘している。さらにその具体的方策として鳥類では精子凍結保存技術が極めて有効であるが、細胞生理学的な特殊性からその機能制御メカニズムの究明は遅延しており、他種と比べてもそのような技術の社会実装への道のりは特に険しいことを論述している。一方、受精メカニズム分子基盤究明が先行する哺乳類精子では、膜ラフトが受精機能制御の主要メカニズムとして受精能獲得から AR 誘起までのシグナル伝達経路活性を広く調節しているが、鳥類精子では膜ラフトの機能的役割を示す知見が不足している現状を指摘している。著者はこの現状を鑑み、膜ラフト特性解析を通じた鳥類精子の AR 機構の解明が、精子機能性の理解を促進するのみならず、その成果は人為的繁殖制御技術への基盤となりうると論じている。

第2章で著者は、様々な阻害剤を使って鶏精子において膜ラフトと Protein kinase A (PKA) シグ

ナル伝達経路および AR との関係性を調べた。その結果、膜ラフトは PKA 活性の制御を介して AR 誘起機構に関与することを明らかにした。さらに、PKA 活性制御機構の上流部分には溶性と膜貫通型アデニルシクラーゼの2種類の cAMP 産生酵素が関与していることを示した。以上の結果から、鶏精子において膜ラフトは哺乳類のそれと同様に、アデニルシクラーゼ/cAMP/PKA 経路を介して AR 誘起を調節していることを明らかにした。

第3章で著者は、PKA 経路と AR 誘起機構とのギャップを仲介するメカニズムを検討するため、Src family tyrosine kinases (SFK)の発現と機能性を調べた。免疫的検出により、リン酸化型 SFK および SFK のプロトタイプである c-src の発現と精子頭部への局在を確認した。さらに薬理学的手法により、SFK 活性化は膜電位調節を介して細胞内カルシウム動態 ($[Ca^{2+}]_i$)、PKA および AR 誘起をネガティブレギュレーションすることを明らかにし、SFK と PKA 活性化によるAR制御様式が鳥類と哺乳類精子間で異なることを示唆した。また界面活性剤を利用した生化学分析により、SFK は局在および機能面で膜ラフトに制御されていることを明らかにした。

第4章で著者は、AR 誘起プロセスの最終段階に不可欠である精子—内卵黄膜 (IPVL) 結合の生理的役割を調べた。その結果、IPVLへの結合により、精子は $[Ca^{2+}]_i$ の増加と同時に、一部の運動性(直線速度、平均速度および頭部振幅性)を向上することを示し、カルシウム動態および運動性活性化が鶏精子の卵膜通過に必要なであることを推定した。

本論文において、著者は薬理的および細胞生物学的手法を駆使し鶏精子の AR 誘起メカニズム分子基盤の解明を行い、AR には膜ラフトを起点とする様々なシグナル分子によるカスケードが関与することを明らかにした。これらの研究成果は、鳥類精子の受精機能機構に新たなメカニズムの存在を提示すると共に、哺乳類と鳥類精子間の生殖戦略に関する振る舞いに差異があることを明らかにしており、今後鳥類における生殖補助技術発展に基盤データとして役立つことが期待出来る。

審 査 の 要 旨

本論文は、鳥類精子の AR 誘起機構を支えるシグナル伝達機構とこれに伴う機能変化を細胞膜特性の観点から統括的に明らかにしたものである。その結果、鶏精子は膜ラフトを介して PKA シグナル伝達経路を制御することで AR を誘起することが明らかになった。また膜ラフトは SFK による膜電位調節を介して、 $[Ca^{2+}]_i$ 、PKA 活性および AR 誘起をネガティブレギュレーションしていることも明らかにした。さらに鶏精子の IPVL 結合は AR 誘起に加えて、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と運動性活性化も引き起こすことで、卵膜通過に重要な役割を果たす可能性を示した。以上の成果は、哺乳類と鳥類精子の受精機構分子基盤は類似性と特異性を併せ持つことを示し、種特異的生殖戦略を支える分子メカニズムの理解、さらに鳥類における生殖補助技術の開発に貢献するものとして、学術的な意義は大きいと判断される。

令和2年1月21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。