

論文審査の結果の要旨

氏名 田中 裕之

胎生魚のグッピー (*Poecilia reticulata*)において、精液は交尾により卵巢に直接送り込まれ、精子は数ヶ月にもわたり卵巢内に蓄えられ、受精も卵の周期的成熟に合わせて卵巢内で起こることが知られている。この際立った特徴に着目し、グッピーを用いて胎生魚の精子運動性制御に関して研究を行った。本論文は3章からなる。第1章は、本論文の対象であるグッピー精子の運動性に関する *in vitro*系における観察と、その現象に見られる法則性についての記述である。従来の研究より、グッピー精子は等張溶液中で最も強い活性化が見られること、およびNaCl, KClなどの電解質中ではゆっくりとした活性化が見られるが、mannitol, glucoseなどの非電解質中では活性化が見られないことが報告されていた。しかし、精子がどのような溶質で、どのような原理に基づき活性化されているのかについて全く明らかにされていなかった。そこで等張溶液中で様々な溶質による精子活性化を評価することにより精子活性化の原理を探った。その結果、精子を活性化または不活性化する溶質の種類には幅広い選択性が見られ、それらの溶質を精子活性化能の強さで序列化すると、従来物理化学の法則として見出された溶質のHofmeister系列と一致し、chaotrope (高分子不

安定化溶質)が精子を活性化し、kosmotrope(高分子安定化溶質)が精子活性化を阻害することを見出した。また、その法則性とは独立に、多価イオンが精子を活性化することも明らかにした。以上2つの法則により、実験に用いた全ての溶質による精子活性化を法則化することができた。Hofmeister効果の特徴の一つに溶質効果の加減則(chao tropeとkosmotropeが共存すると、お互いの相反する効果が打ち消される現象)があるが、精子運動性においても溶質効果の加減則が成立したことなどからも、各種溶質によるグッピー精子運動性の制御がHofmeister効果を介することが示された。第2章では、グッピーの精子を活性化する溶質であるchao tropeおよび多価イオンによる精子活性化において関与している細胞内シグナルについて述べられている。除膜モデルの解析においては、精子を不活性化する溶質であるkosmotropeから成る除膜液によって除膜した場合には再活性化の際にcAMPの添加を必要とした。それに対し、一旦chao tropeにより運動開始させてから除膜した場合は再活性化にcAMPの添加を必要としなかった。このことからchao tropeによる精子活性化の際にcAMP依存的な精子鞭毛軸系の成熟が起きていることが示された。ELIZAを用いた細胞内cAMPレベルの測定によっても精子活性化の際にcAMPレベルの上昇が検出された。また、膜透過型のcAMPの添加によっても精子は運動を開始したことから、細胞内cAMPレベルの上昇はchao tropeによる精子活性化の際の内因的な引き金である

と考えられた。蛍光色素Fluo4により細胞内Ca²⁺レベルを測定したところ、精子運動活性化の際に変動は検出されず、細胞内Ca²⁺レベルの積極的関与は支持されなかった。以上から、精液内では軸系が未成熟で運動を停止している精子がchaot ropeや多価イオンに晒されることにより、cAMP依存的な軸系成熟および運動の開始が誘導されることが明らかになった。第3章においては、グッピー精子の運動開始がHofmeister効果によって制御される現象について、そのin vivoにおける生理的意義について述べられている。精子はオスの輸精管において精液中で運動を停止している。そして精液が希釈されchaot ropeや多価イオンに晒されると運動を開始するが、そのとき精液成分が十分に希釈されない場合には活性化が効果的に抑えられることを見出した。このことから輸精管における精子運動の停止が、精液に由来する精子運動阻害活性に起因することが推測され、精液がchaot ropeによる活性化を阻害する作用は精液のkosmotropicな性質によるものである、との仮説を立てた。モデル物質の溶解度を測定することにより精液の物理化学的性質を検討したところ、精液はkosmotropicな性質を示すことが明らかになった。以上の結果から、精液に含まれる溶質のHofmeister効果により精子を精液中で不活性状態に保つという、溶液の物理化学的性質に依存した新規の精子運動制御機構の存在が示唆された。

これらの論文の各章で示された研究成果は精子運動性の制御機構を理解する

上で大変重要な知見であり、論文提出者の研究成果は博士（理学）の学位を受けるにふさわしいと判定した。

なお、本論文第1章～第3章は、岡良隆との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。

最終試験の結果の要旨

氏名 田中 裕之

成績 合格

本委員会は、論文提出者に対し平成17年2月4日、学位論文の内容及び関連事項について、口頭試験を行った。

その結果、論文提出者は動物学特に神経生物学について博士(理学)の学位を受けるにふさわしい十分な学識をもつものと認め、審査委員全員により合格と判定した。