

審査の結果の要旨

氏名 宇田川 理

生体内には、コレステロールに水酸基やケトン基など酸素が付加した酸化コレステロール（オキシステロール）が存在する。オキシステロールはコレステロール恒常性維持、免疫抑制、アポトーシスの促進など多様な生理活性が報告されている。一方、細胞内にはオキシステロールと結合する蛋白質群（ORP (OSBP-Related Protein) ファミリー）が存在している。ORP ファミリー分子はN末端側にPHドメイン、C末端側に脂質結合ドメインを有しており、哺乳動物には12のORP分子が存在する。宇田川理は、OSBPと高い相同性を有するORP4が脳と精巣に高発現することに着目し、ORP4欠損マウスを用いて、その機能解析を行った。

定法に従いORP4欠損マウスを樹立した。宇田川は、欠損マウスを用いて交配を行い、雄マウスは生殖能が全く認められず雄性プラグ不妊であることを見出した。さらに、精巣および精子を詳細に解析し、精子数が著しく減少していることを見出した。この結果から、ORP4欠損マウスでは精子形成に異常が生じていることを示唆した。

次に、宇田川は、マウス腹腔にBrdUを投与し、精原細胞の体細胞分裂を調べ、ORP4欠損マウスでも野生型と同様に精原細胞が増殖していることを見出した。また、精巣から生殖細胞を分離し、FACSを用いて生殖細胞の核相を調べ、減数分裂が終了した1Nの生殖細胞数は保たれていることを確認した。以上の結果から、宇田川は、ORP4欠損マウスでは精原細胞の体細胞分裂、並びに減数分裂の過程には異常がないことを明らかにした。また、各種マーカーを用いて精子を染色し精子の変態過程を調べ、ORP4欠損マウスの成熟精子では、細胞質およびミトコンドリアが精子頭部に残存していることを見出した。すなわち、精子頭部の変態、特に精子頭部から細胞質部分が脱離する過程に異常が生じていることが明らかにした。また、これらの精子ではアクロソームが形成されておらず、受精能も認められないことを確認した。一方、精巣の切片をTUNEL染色し、ORP4欠損マウスの精巣ではTUNEL陽性の生殖細胞を多数観察し、アポトーシスが亢進していることを見出した。宇田川は、TUNEL陽性細胞の多くは巨大頭部と鞭毛を有する精子細胞であったことから、細胞質脱離に異常が生じた精子がアポトーシスを引き起こしていると考えた。

以上の結果から、宇田川は、ORP4欠損マウスでは、1) 精子頭部の変態過程に異常が生じること、2) 頭部形態に異常をもつ精子がアポトーシスを引き起こし、精子数が減少することを明らかにした。

宇田川は、次に、精子形成におけるORP4の機能とオキシステロールの関連を探るため、マウス精巣におけるオキシステロールの定量を行った。精巣から抽出したステロール画分をGC-MSを用いて解析し、コレステロールの25位が水酸

化されたオキシステロールである 25-ヒドロキシコレステロール (25-HC) が最も多く存在することを見出した。次に、リポソーム膜に放射ラベルした 25-HC を埋め込み、ORP4 タンパクとの結合性を評価し、ORP4 が 25-HC と結合することも見出した。

さらに、マウス精原細胞株 GC-1 に 25-HC を添加したところ、ORP4 の細胞内局在が変化し細胞質からゴルジ体へと移行しすることを見出した。この効果は 25-HC に特異的であり、他のオキシステロールでは局在変化は観察されないことも明らかにした。

ORP4 は脳においても高い発現が観察される。宇田川は、*in situ* ハイブリダイゼーションならびに抗体染色により ORP4 の脳内分布を調べ、ORP4 は海馬 CA 錐体細胞、歯状回顆粒細胞、大脳皮質錐体細胞および小脳プルキンエ細胞に発現がしていることを見出した。そこで、海馬の発現に着目して形態を解析し、ORP4 欠損マウスでは細胞体の層構造には異常がみられないことを確認した。一方、CA1 錐体細胞の樹状突起の分岐に著しい異常があることを見出した。ゴルジ染色により樹状突起の形態を詳細に解析し、細胞体の近傍で樹状突起が分岐する神経細胞を多数観察した。さらに、宇田川は、空間学習試験を行ったところ、ORP4 欠損マウスでは、モリス水迷路試験において有意な学習能の低下が起きている事を見出した。

以上、宇田川は、ORP4 欠損マウスのフェノタイプを詳細に解析することにより、雄性不妊、精子数の激減・精子運動性の喪失・精子頭部奇形を伴う oligo-astheno-teratozoospermia の症状を示すことを見出した。さらに、神経細胞にも樹状突起の分岐に異常を示すことを見出した。これまで全く解明されなかった ORP4 の生理機能を解明した成果は、博士 (薬学) に充分値するものと判断した。