

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 ア.カ.マ. アサン カビール

性成熟後の哺乳類の精巣では、精細管内で精原細胞が増殖後第一および第二減数分裂を行って精細胞となり、これが先体形成、核濃縮、細胞質脱落、頸部形成、尾部形成などを起こして精子となる。この精子形成の過程で多くが死滅する。卵巣では、性周期毎に一定数の一次卵胞が発育しはじめ、二次卵胞を経て三次卵胞となり、排卵に至る。この卵胞発育の過程で多くが閉鎖する。このように雌雄とも配偶子形成過程で多くが死滅し、生き残った一部が生殖に供される。より安定的に家畜を増産するためには、配偶子の死滅を調節している機構を明らかにしなくてはならない。本研究では、重要な反芻家畜であるヤギにおいて、雌雄配偶子形成過程における細胞死の調節に深く関わっていると考えられているアポトーシス阻害因子の加齢に伴う変化を中心に調べた。

出生直後の仔ヤギの精巣の精細管内において、TUNEL 染色によって求めた精原細胞のアポトーシス頻度は約 4.5%であった。性成熟直前の若ヤギの精細管内の盛んに増殖している精原細胞のアポトーシス頻度は約 1.5%であった。成ヤギの精細管では性上皮サイクルのステージ間でアポトーシス頻度が異なった。ステージIVでは約 4.0%と高かったが他のステージでは1%未満であった。ステージIVの性上皮には精原細胞、前細糸期と厚糸期の精母細胞および先体顆粒が大きく明瞭になって核に接着しているステップ4の精細胞が含まれるが、アポトーシスは精原細胞で検出された。精巣におけるアポトーシス関連因子の mRNA 発現を定量的 PCR 法にて調べた結果、アポトーシス実行因子である TRAIL などの細胞死リガンドとその受容体の TRAIL-receptor など、caspase-8 などの細胞内シグナル伝達因子およびアポトーシス促進因子の Bax などの発現は仔ヤギで高く、これらは加齢に伴って低下した。Inhibitor of apoptosis (IAP) family に属するアポトーシス阻害因子については、細胞死受容体の直下でシグナル伝達を阻害している cellular FLICE like inhibitory protein (cFLIP) およびその下流でミトコンドリアから放出された cytochrome c が protease activating factor-1 および procaspase-9 と複合体を形成することを阻害することでシグナル伝達を阻害している X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) のヤギにおける遺伝子配列が決定していなかったため、まずこれらを決定した。精巣では両者とも発現しており、加齢に伴う変化を調べたところ、cFLIP の発現は加齢に伴って減少し、逆に XIAP は増加した。これらは加齢に伴って発現比が変わりながら、ともに精原細胞の死滅を防いでいると考えられた。

仔ヤギ、若ヤギおよび成ヤギの卵巣におけるアポトーシス関連因子の mRNA 発現を定量的 PCR 法にて調べたところ、細胞死リガンドと受容体は精巣と同様に発現していたが、阻害因子に関しては cFLIP のみが発現しており、精巣と異なって XIAP は発現していなかった。仔ヤギの卵巣においては一次卵胞の卵胞上皮細胞（顆粒層細胞）に cFLIP の高発現が認めら

れ、若ヤギでは低下した。成ヤギでは卵胞の発育ステージで異なり、健常卵胞の顆粒層細胞にのみ高発現が認められ、閉鎖卵胞の顆粒層細胞では非常に低いあるいは検出できないレベルであった。健常卵胞の顆粒層細胞に cFLIP と XIAP とが高発現しているブタなどと異なって、ヤギでは前者のみが高発現していることが特徴的であった。このような顆粒層細胞における cFLIP の発現を調節している機構を調べるために、未成熟な一次および二次卵胞を含むヤギ卵巣皮質の小片を重症免疫不全マウスの腎漿膜下に異種移植し、ヤギ卵胞の発育と顆粒層細胞における cFLIP 発現を調べる実験系を確立した。この系ではマウスに卵胞刺激ホルモンを投与するとヤギ未成熟卵胞の発育が亢進され、この発育卵胞の顆粒層細胞では cFLIP が高発現していることが分かった。

以上のように、本研究で、ヤギの cFLIP と XIAP の遺伝子配列を決定し、精巣においては両者が発現していること、前者の発現量は加齢に伴って減少し、逆に後者は増加することが分かった。これらは成ヤギにおいて精原細胞の細胞死を抑制していると考えられた。卵巣においては cFLIP のみが発現していることが特徴的であること、その発現量は加齢に伴って変化することが分かった。成ヤギでは健常卵胞の顆粒層細胞に cFLIP が高発現しており、これが細胞死を抑制することで卵胞閉鎖を防いでいると考えられた。これらヤギにおける雌雄の配偶子形成過程における細胞死の調節に深く関わっていると考えられているアポトーシス阻害因子の加齢に伴う変化に関わる知見は、家畜繁殖学にとって有意義な研究成果である。申請者の研究業績をとりまとめた論文の内容および関連事項について試験を行った結果、審査委員一同は博士（農学）の学位を受けるに必要な学識を有する者と認め、合格と判定し、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。