

# 博士学位論文要旨

論文題目 線虫 (*C. elegans*) における精子形成・受精関連因子の薬理的および遺伝学的解析

理工学研究科 生命科学専攻 博士後期課程

申請者 氏名 田島 達也  
指導教員 西村 仁, 教授

## 第1部：線虫における精子形成関連因子の薬理的および遺伝学的解析

精子は、有性生殖の根幹となる細胞の一つである。この配偶子は、減数分裂によって産生された精細胞が spermiogenesis と呼ばれる過程を経て形成される。しかし、哺乳類における spermiogenesis は精巣内で起こる為、*in vitro* で再現する実験系が十分に確立されておらず、spermiogenesis のメカニズムの全体像は不明である。

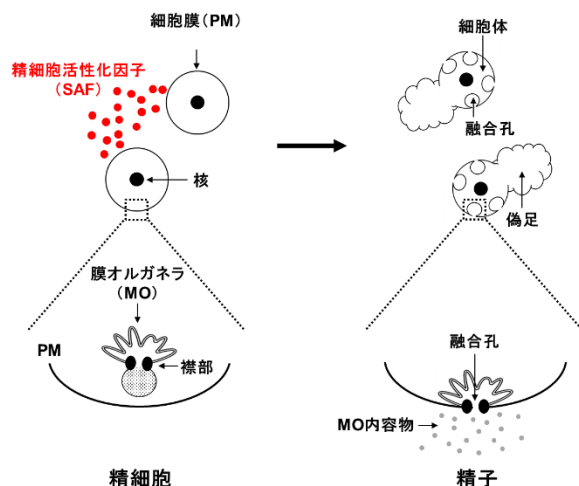


Fig. 1 線虫における精子の形成と活性化

線虫 (*C. elegans*) における spermiogenesis (Fig. 1) は *in vitro* で再現できる為、精子形成の分子基盤を明らかにする上で大変優れたモデルである。線虫の精細胞が精細胞活性化因子 (SAF) により刺激されると、細胞膜から偽足が伸長し、運動能を獲得する。それと同時に、精細胞内の膜オルガネラ (MO) が精細胞の細胞膜と融合し、哺乳類精子の先体反応と類似した精子の活性化が起こる。

線虫には雌雄同体とオスの2つの性があるが、いずれの性においても spermiogenesis が起こる。これまでの研究により、SPE-8 クラスタンパク質 (SPE-8, SPE-12, SPE-19, SPE-27, SPE-29 および SPE-43) に依存的な経路と非依存的な経路が spermiogenesis に関与しており、両経路が下流で合流するモデルが提唱されている。また、どちらの経路を利用するかは性特異的な SAF が決定しており、雌雄同体が産生する SAF (hSAF) は SPE-8 クラス依存的経路を、オスが産生する SAF (mSAF) は非依存的経路を活性化することが示唆されている。hSAF の実体は不明で

あるが、プロナーゼ (Pron, 微生物由来のプロテアーゼ混合物) や亜鉛イオンが SPE-8 クラス依存的経路を活性化する *in vitro* SAF であることが知られている。一方, 遺伝学的解析により, mSAF は TRY-5 (セリンプロテアーゼ) であると考えられている。分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) を活性化する 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF) も *in vitro* SAF であるが, この化合物がどちらの経路 (あるいは両方) を活性化するのは不明である。

線虫における spermiogenesis のメカニズムについて, その全体像が不明である理由の一つは, SPE-8 クラス非依存的経路を活性化する *in vitro* SAF が同定されておらず, この経路を調べる手段がないことである。本研究では, (1) SPE-8 クラス非依存的経路を活性化する *in vitro* SAF の同定, (2) 各種変異体および MAPK 阻害剤を使った SPE-8 クラス依存的および非依存的経路の解析, (3) spermiogenesis を阻害する化合物 (DDI-1) の同定, (4) DDI-1 関連因子の変異体の分離, を行った。

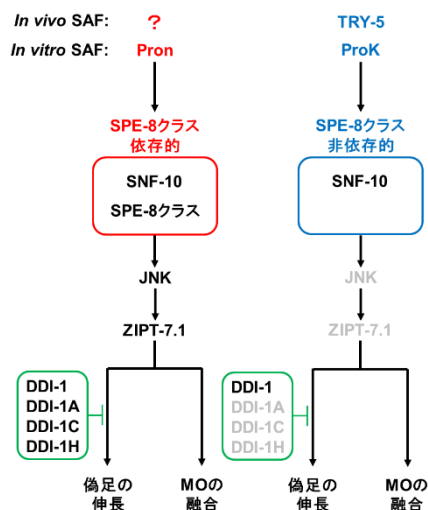
まず, SPE-8 クラス非依存的経路を活性化する *in vitro* SAF について, 生理的な SAF が TRY-5 である可能性が高いことから, 入手可能である幾つかのセリンプロテアーゼについて調べた。その結果, 微生物由来の Proteinase K (ProK) が *spe-8* クラス変異型精細胞の spermiogenesis を惹起し, SPE-8 クラス非依存的経路の *in vitro* SAF であることが明らかとなった。

次に, SPE-8 クラス依存的および非依存的経路と性特異的な spermiogenesis の関係について調べた。最近, 溶質輸送体 6 ファミリーである SNF-10 がオス依存的な spermiogenesis に必須であることが報告された。そこで, Pron と ProK が *snf-10* 変異型精細胞を精子へと活性化するかどうかを調べたところ, 予想通り, ProK はこの精細胞を活性化しなかった。興味深いことに, Pron で刺激しても, *snf-10* 変異型精細胞に spermiogenesis を惹起させることはできなかった。Pron は, 雌雄同体における spermiogenesis に対応している SPE-8 クラス依存的経路の SAF であると考えられていたが, この結果は, SPE-8 クラスタンパク質に依存している経路は複数あり, その中の少なくとも一つがオスにおける spermiogenesis に関与していることが示唆された。

一方, 線虫の亜鉛輸送体である ZIPT-7.1 が SPE-8 クラス依存的経路に関与していることが報告されているので, *zipt-7.1* 変異体を使い, *snf-10* 変異体と同様の方法で調べた。その結果, Pron による刺激では spermiogenesis がほとんど起こらなかったが, ProK で刺激した場合, 野生型と比較して, spermiogenesis の効率が約 30% 低下した。それ故, ZIPT-7.1 は SPE-8 クラス非依存的経路において部分的に関与していると考えられた。さらに, AEBSF は *zipt-7.1* 変異型精細胞を活性化できなかったことから, ZIPT-7.1 は MAPK 系の下流に位置すると思われた。

MAPK である細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK), c-Jun N 末端キナーゼ (JNK) および p38 を活性化する AEBSF が *in vitro* SAF であることから, SPE-8 クラス依存的および非依存的経路と MAPK 系の関係についても調べた。Pron および ProK で惹起される spermiogenesis は, ERK および p38 に対する阻害剤に影響されなかったが, JNK 阻害剤は Pron による spermiogenesis を約 99%, ProK による spermiogenesis を約 35% 阻害した。これらの結果は, プロテアーゼ系 SAF で惹起される spermiogenesis には JNK 型 MAPK が関与しているが, Pron 経路と ProK 経路で JNK の関与が異なることを示しており, 「SPE-8 クラス依存的および非依存的経路は下流で合流する」というモデルとは合致しないと思われた。

さらに, 化合物ライブラリーをスクリーニングして, 線虫の spermiogenesis を阻害する化合物を探索した結果, DDI-1 が得られた。この化合物は, Pron および ProK による偽足の伸長を阻害したものの, MO の融合には大きく影響しなかった。従って, DDI-1 は偽足の伸長反応と MO の融合反応を分離することがわかった。また, いくつかの DDI-1 変体を使った実験では, Pron による精子形成への阻害効果が依然として観察されたが, ProK で惹起される偽足の伸長に対する阻害率が低下した。この結果は, 偽足の伸長反応において, Pron 経路と ProK 経路で異なる分子が関与していること示唆している。一方, AEBSF で精細胞を刺激した場合, DDI-1 およびその変体は, 偽足の伸長および MO の融合を阻害した。それ故, MAPK 系は, DDI-1 およびその変体と結合する分子の上流に存在することが示唆された。



**Fig. 2** 本研究に基づいたspermiogenesis経路のモデル  
灰色で示されたタンパク質と化合物は, その経路における関与の程度が低いことを示している。

と思われる分子は同じではないことから, それぞれの経路が下流で合流している可能性は低い, ことを示唆しており, これまでに考えられていたモデルとは異なるものであった (Fig. 2)。

DDI-1 関連因子を同定する為, エチルメタンスルホン酸を使って線虫ゲノムにランダムな変異を導入した後, DDI-1 存在下であっても Pron で spermiogenesis が起こる精細胞を持つ線虫をスクリーニングした。その結果, 2 種類の変異体が単離され, これらの変異体の原因遺伝子は DDI-1 の阻害活性に関与していると思われた。

本研究のデータは, (1) SPE-8 クラス依存的経路は複数存在し, その一つはオスの spermiogenesis に関係している, (2) 各経路の下流に位置してい

## 第2部：線虫における受精必須遺伝子 *spe-45* の機能解析

線虫の場合、5個の *spe-9* クラス遺伝子は雄性生殖細胞特異的であり、受精に必須である。一方、マウス *Izumo1* も雄性生殖細胞特異的な遺伝子であり、精子と卵子の融合に必要不可欠である。摂南大学の西村らは、新規の *spe-9* クラス遺伝子としてマウス *Izumo1* 様遺伝子が線虫ゲノムに存在するという仮説を立てた。IZUMO1 タンパク質は免疫グロブリン (Ig) 様ドメインを持つ膜貫通タンパク質であることから、西村らは Ig 様膜貫通タンパク質をコードしている線虫遺伝子を探索し、*F28D1.8* を同定した。この遺伝子の欠損変異体は不妊であり、変異体の雄性生殖細胞に不妊の原因があることが示された為、*F28D1.8* は *spe-45* と命名された。しかし、*spe-45* 変異体において、減数分裂による精細胞の産生および精細胞から精子への活性化は正常であった為、本研究では *spe-45* が受精に関与している可能性を調べた。

遺伝子型	L4幼虫期から経過した時間	
	24 h	72 h
N2	139 ± 33(16)	2 ± 4(18)
<i>spe-9(eb19)</i>	93 ± 30(23)	48 ± 30(18)
<i>spe-42(tm2421)</i>	217 ± 29(22)	218 ± 36(20)
<i>spe-45(tm3715)</i>	175 ± 20(18)	110 ± 18(18)

野生型(N2)および各*spe-9*クラス変異体のL4幼虫を20°Cで24または72時間インキュベーションした後、精子核を蛍光染色し、貯精囊内の精子数をカウントした。各データは、貯精囊1個あたりの自己精子数を平均値±標準誤差(n)で示している。なお、雌雄同体1匹あたり貯精囊は2個ある為、雌雄同体が持つ自己精子の数は各データの約2倍と考えられる。

雌雄同体が産生する自己精子は貯精囊内に約 300 個しか存在しない為、自家受精が繰り返し起こることで枯渇する。そこで、野生型および *spe-45* 変異型線虫における時間依存的な自己精子数の減少を調べた。その結果、実験開始から 72 時間後には野生型線虫の自己精子数はほぼゼロとな

ったが、*spe-45* 変異型線虫では約 63%の自己精子が貯精囊内に存在した (Table 1)。この結果は *spe-45* 変異型精子が卵子と受精できないことを示唆しており、*spe-45* が新規 *spe-9* クラス遺伝子であることが考えられた。

さらに、SPE-45 の Ig 様ドメインをマウス IZUMO1 (IgIZUMO1) または受精とは無関係である線虫 IGCM-3 (IgIGCM3) の Ig 様ドメインと交換したキメラ SPE-45 のトランス遺伝子 (TG) を作製し、*spe-45* 変異体で発現させた。その結果、IgIZUMO1\_TG は、変異体の自家受精能を野生型 TG (IgWT\_TG) の約 77%のレベルまで回復させたが、IgIGCM3\_TG のレスキュー活性は 0%であった。本研究は、線虫 SPE-45 とマウス IZUMO1 は進化上約 9 億年離れており、それらの Ig 様ドメインのアミノ酸配列は約 13%の同一性しかないにもかかわらず、受精における機能が保存されていることを示している。これは、ホモロジー検索では相同遺伝子と見なされない異種間の受精関連遺伝子が、機能を共有していることを見出した初めての例である。