

氏 名	富田 圭司
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博士 甲第755号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成28年 3月 10日
学位論文題目	The Effect of D-Aspartate on Spermatogenesis in Mouse Testis (D型アスパラギン酸がマウス精巣において精子形成に与える影響の検討)
審査委員	主査 教授 村上 節 副査 教授 西村 正樹 副査 教授 松浦 博

論 文 内 容 要 旨

*整理番号	762	(ふりがな) 氏 名	とみた けいじ 富田 圭司
学位論文題目	The Effect of D-Aspartate on Spermatogenesis in Mouse Testis (D型アスパラギン酸がマウス精巣において 精子形成に与える影響の検討)		
<p>【目的】</p> <p>アミノ酸にはL型とD型が存在し、生体内のタンパク質を構成するアミノ酸はL型である。近年の研究により、遊離D型アミノ酸も哺乳類のいくつかの臓器に存在することがわかってきた。D型アスパラギン酸 (D-Asp) の合成酵素や特異的トランスポーターは明らかになっておらず生体内 D-Asp の由来は不明である。特異的な分解酵素として唯一、D型アスパラギン酸オキシダーゼ (DDO) が知られている。D-Asp の生理的機能に関して解明されている部分は多くはないが、ラットライディッヒ細胞の培養下でテストステロン合成を亢進することが知られている。またその作用を介して、造精機能を亢進することが推測されているが詳細は明らかにされていない。</p> <p>精子形成は下垂体から分泌される FSH、LH や、LH の作用を受け分泌されるテストステロンなどによりコントロールされている。臨床において、造精機能障害は大きな問題になるにも関わらず、造精機能を改善し、明確な作用機序を持つ物質は、FSH および LH 作用を持つ hCG を除き、ほとんど知られていない。</p> <p>D-Asp を経口摂取などにより投与しても精巣にはほとんど作用せず、これまでに哺乳類精巣特異的に D-Asp を作用させ、影響を検討した報告は存在しない。近年、<i>in vitro</i> 精子産生の手法が初めて報告された。これにより精子形成についてより詳細な検討ができる状況になった。本研究では、マウス精巣での D-Asp、DDO について発達段階における変化を生化学的および組織学的に解析し、<i>in vitro</i> 精子産生法を用いて D-Asp が精子分化に与える影響について検討を行った。</p> <p>【方法】</p> <ol style="list-style-type: none"> ① Asp の含有量は、マウス精巣 (2-20 週齢) を摘出し、ラベル反応後、HPLC (高速液体クロマトグラフィー) を用いて分離・定量した。 ② DDO 活性の測定は、D-Asp を含む反応液にマウス精巣ホモジネート溶液を添加し、1 時間反応させた後、生成するオキザロ酢酸を定量した。 ③ 蛍光免疫染色でマウス精巣における D-Asp、DDO の局在を検討した。 ④ 減数分裂後期に生殖細胞で GFP が発現する Acr-GFP Tg マウスの精巣組織を用いた <i>In vitro</i> 精子産生法の培地へ D-Asp を添加し精子形成への影響を検討した。 			

【結果】

- ① マウス精巣の D-Asp 含有量は、出生直後では低い値であったが、徐々に上昇し 10 週齢でピークとなりプラトーに達した。一方、L-Asp 含有量は発達段階における変化はみられなかった。
- ② DDO の活性は、出生直後が最も高く、成長とともに低下し 6 週齢以降、ほとんど活性を失ったまま推移した。
- ③ D-Asp は分化の進んだ精子細胞の細胞質に局在した。一方、分解酵素 DDO はセルトリ細胞に局在した。
- ④ D-Asp を添加すると、濃度依存的に *In vitro* 精子産生法において精子分化の指標である GFP の発現を抑制した。

【考察】

D-Asp が精子形成に対し正に働くのではないかと考え検討したが、その仮説とは逆の結果となった。これには D-Asp が精巣内で緻密に制御されていることが影響していると考えられる。つまり単純に精巣組織へ D-Asp を作用させることでは、*in vivo* での D-Asp の影響が再現できない可能性がある。

ラットの精巣内で、D-Asp は特に伸長精子細胞の細胞質に多く含まれることが報告されてきた。我々の今回の検討と合わせて考えると、伸長精子細胞の細胞質に存在する D-Asp が、精子の分化と共に精子細胞の残余小体に集積すると考えられる。また成年マウス精巣では他臓器と異なり DDO 活性がほぼ失われていた。つまり、残余小体に存在する D-Asp はセルトリ細胞に取り込まれるが、そこで DDO による分解を受けない。この結果から、DDO の発現制御を介して D-Asp が生理作用を発揮できるレベルに維持されている可能性が示唆される。

In vitro 精子形成のアッセイ系を用いて、外因性 D-Asp が減数分裂を開始する前のマウス生殖細胞の細胞分裂に対し負に働くことが分かった。残余小体に存在する D-Asp は、減数分裂前の生殖細胞に作用することなく、減数分裂を終えた精子細胞内で合成、もしくは精子細胞内へ輸送されたと予想される。その後セルトリ細胞に取り込まれた D-Asp は、ライディッヒ細胞に直接作用するのであれば、精巣間質に放出される。精巣内 D-Asp の一連の流れが、精子細胞の細胞質である残余小体に始まりライディッヒ細胞に作用するとすれば、精巣内において D-Asp は巧妙に制御されながらその生理的活性を発揮していることになる。

【結論】

精子分化の過程において、外因性 D-Asp が抑制的に働く時期や、内因性に集積する時期と部位が明らかになり、精巣内 D-Asp の由来を考える上で重要な情報となりえる。マウス精巣内での D-Asp、DDO の挙動を詳細に検討した今回の結果は、D-Asp の生理的な意義についてより深く理解する一助となる。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	762	氏名	富田 圭司
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)			
<p>生体内のタンパク質を構成するアミノ酸のひとつである L 型アスパラギン酸の光学異性体として存在し、ラット・ライディッシュ細胞からのテストステロン合成促進に働くと考えられる D 型アスパラギン酸 (D-Asp) は、精子形成に促進的に働く可能性がある。本研究では、マウス精巣中の D-Asp の分離・定量ならびに局在とその特異的な分解酵素である D 型アスパラギン酸オキシターゼ (DOD) の活性ならびにその局在を検討し、また減数分裂後期に GFP が発現する Acr-GFP Tg マウスの精巣組織を、近年開発された <i>in vitro</i> 精子形成系に適用することにより、添加した D-Asp の精子形成への影響について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) マウス精巣における D-Asp 含有量は、出生後より週齢とともに増加し、10 週齢でプラトーに達した。 2) DOD の活性は出生後より週齢とともに低下し、6 週齢以降は活性を認めなかった。 3) D-Asp の局在は、分化の進んだ精子の細胞質にあり、DOD はセルトリ細胞に存在した。 4) <i>in vitro</i> 精子形成系において、D-Asp の添加により、精子形成は抑制された。 <p>本論文は、spermatogenesis における D 型アスパラギン酸の影響について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p>			
(総字数 585 字)			
(平成 28 年 1 月 25 日)			