HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Analysis of molecular and cellular mechanisms regulating medaka (Oryzias latipes) spermatogenesis, using a newly established cell culture system [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	佐藤, 竜一
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第13951号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78048
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryuichi_SATOH_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　氏　名　　佐　藤　竜　一

審査担当者	主査	教　授　山　下　正　兼
	副査	教　授　勝　　義　直
	副査	教　授　黒　岩　麻　里
	副査	准教授　木　村　　敦

学 位 論 文 題 名

Analysis of molecular and cellular mechanisms regulating medaka (*Oryzias latipes*) spermatogenesis, using a newly established cell culture system

（新規に開発した細胞培養系を用いたメダカ（*Oryzias latipes*）精子形成を制御する分子細胞機構の解析）

博士学位論文審査等の結果について（報告）

有性生殖を営む生物にとって, 生殖細胞（卵と精子）を作り, それらを受精させることは, 個体の持つ限られた寿命を越えて種を存続させるために必須の過程である。生殖細胞がどの様な制御のもとで形成され, 受精可能になるかを解明することは, 生命科学に課せられた基本命題の一つで, その応用は人工受精, 避妊, 有用生物種の作出など, 我々の生活に深く関係する種々の生殖操作に直結する。精子は雄性生殖細胞の増殖と分化を制御する様々な分子が機能することで形成されるが,その分子実体や作用機序は不明の点が多い。

精子形成を制御する分子細胞機構の解析には精子形成を試験管内で再現する実験系が有用である。近年, 器官培養によってマウスの全精子形成過程を再現することが可能となったが, 分散した細胞を用いた培養（分散培養）では成功していない。一方, 小型魚類であるゼブラフィッシュでは分散培養で全精子形成過程を再現できている。同じく小型魚類のメダカでは, これまで分散培養によって精母細胞から機能的精子を作製できているが, 精原細胞からの作製には成功していない。メダカとゼブラフィッシュは種間の類似性と差異を調べるのに有用で, 両種を比較することで, 精子形成を調節する機構のより良い理解につながると期待される。そこで学位研究は, メダカで精原細胞から精子までの全精子形成過程を再現できる分散培養系を確立し, この系を用いて精子形成を制御する分子細胞機構に迫ることを目的とした。

学位論文は 2 章からなる。第 I 章では, メダカで初めて, 精原細胞から精子までの全精子形成過程を試験管内で再現できる細胞培養系を確立した。まず旧来の培養液（S medium）にホルモン等を加えた新しい培養液（MS medium）を開発した。また, フィーダー細胞としてメダカ精巣由来の体細胞株である Mtp1 を用いた培養（MS medium/Mtp1）も検討した。メダカ精巣細胞からセルソーターで得た精原細胞を多く含む画分を上記 3 条件で培養した結果, S medium よりも MS medium, さらに MS medium/Mtp1 の条件で, DNA 複製が亢進することがわかった。また, MS medium と MS medium/Mtp1 では精原細胞から精子が形成されることを確認した。Mtp1 は複数種の細胞を含む集団と予想されたため, セルトリ細胞, ライディッヒ細胞, 生殖細胞のそれぞれに特異的なマーカー遺伝子の発現を調べた。その結果, Mtp1 にはセルトリ細胞とライディッヒ細胞が混在していると結論された。精原細胞を Mtp1 と共培養すると精子形成が促進されるという結果は, Mtp1 に精子形成に必須のセルトリ細胞とライディッヒ細胞が含まれているためと結論された。細胞培養で作製した精子を用いて卵を授精させる実験により, 得られた精子の機能を評価した。旧来の S

medium では受精卵はほとんど得られなかったのに対し, MS medium では受精が起こり，正常発生胚が得られた。MS medium/Mtp1 では正常胚発生率がさらに向上した。人工授精で得られたメダカ個体は妊性を有し, 継代可能なことも確認した。以上のように, 第 I 章では精原細胞から機能的な精子を作製できる新規分散培養系をメダカで確立することに成功した。これは，脊椎動物においてゼブラフィッシュに続く第二の成功例である。

第Ⅱ章ではまず, ガン抑制遺伝子 *p53* がノックアウトされたメダカの精巣において, 精原細胞の数とサイトカインの 1 種である白血病抑制因子（Lif）をコードする mRNA の発現レベルが増加することを突き止めた。次に, メダカ精巣における Lif の機能を明らかにするため, 第 I 章で確立した培養系を用い, Lif の精原細胞増殖への影響を調べた。その結果, バキュロウイルス産生組換えメダカ Lif タンパク質の培地への添加や Lif 過剰発現 Mtp1 細胞との共培養が, 精原細胞の増殖を促進することを見出した。また, Lif の mRNA とタンパク質が精原細胞とその周囲のセルトリ細胞で発現していることも確認した。これらの結果は Lif がメダカ精原細胞の増殖を調節することを示唆する。このように第Ⅱ章では，Lif が精原細胞の増殖制御に機能している可能性が初めて示された。

これを要するに, 著者はメダカで精原細胞から機能的精子を形成する細胞培養系を新規に確立し, それを用いてサイトカインの Lif が精原細胞の増殖制御に働くことを示した。本研究で開発された新規細胞培養系は, メダカの精子形成制御機構を研究するうえで非常に重要な実験系であり, 生殖生物学分野における重要課題の一つである精子形成を制御する分子の同定とそれらの機能の解明に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は, 北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。