

氏名	Syahrudin SAID
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	学 術
学位授与番号	博甲第2563号
学位授与の日付	平成15年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生命分子科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	STUDIES ON FERTILIZATION OF RAT OOCYTES BY INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION (卵細胞質内精子注入によるラット卵子の受精に関する研究)
論文審査委員	教授 丹羽 皓二 教授 奥田 潔 教授 近藤 康博

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

哺乳類の精子は精巣で形成された後、精巣上体の頭、体、尾と移行する間に徐々に成熟し、射精されるまで精巣上体尾で貯蔵される。この間、精子核 DNA はプロタミンのジスルフィド(SS)結合により徐々に安定化されるが、射精後に精子が卵細胞質内に侵入すると、プロタミンの SS 結合が還元されチオール(SH)結合による核 DNA の脱梱包化が起こり精子核が膨化して胚発生が誘起される。しかし、精巣精子のように核 DNA が不安定な状況においても胚発生を誘起しうるものが、細胞質内精子注入(ICSI)の技術を用いてマウスとヒトにおいて証明されている。また、マウスとラットにおいて、超音波処理により精巣上体尾精子から分離した精子核(頭部)のみの ICSI による産子も得られている。本研究では、ラット精子の精巣・精巣上体移行と射精および超音波処理などの体外処理に伴う核 DNA の安定性の変化を定量的に調べるとともに、異なる部位から得た精子の核の ICSI による受精ならびに胚発生の可能性について調べた。その結果、DNA の安定化は精子の精巣上体成熟の過程でプロタミンの酸化に先行して起こり、DNA の脱梱包化は精子の透明帯貫通中または囿卵腔内侵入時に始まることが明らかになった。さらに、精巣精子の酸に対する DNA の安定性は超音波処理あるいは培養によりむしろ高まるが、精巣、精巣上体頭、精巣上体尾精子のいずれにおいても、プロタミンの酸化が進行した。また、いずれの部位から得た精子においても、精子核のみの ICSI により受精が可能であり、少なくとも一部の受精卵は正常な繁殖能力を有した産子にまで発育し得ることが証明された。さらに、凍結された精巣上体尾組織から得た精子核および凍結乾燥された精巣上体尾精子の核を用いた ICSI を試みた結果、いずれの精子核においても受精は成立するが、凍結乾燥精子の核に由来する受精卵の体外発生は困難であることが示唆された。

論文審査結果の要旨

精子が精巣から精巣上体を移行する間に核 DNA は徐々に安定化されるが、射精後に卵細胞質内に侵入すると核 DNA の脱核包化が起こり精子核が膨化して胚発生が誘起される。しかし、精巣精子のように核 DNA が不安定な状況においても胚発生を誘起しうることも、細胞質内精子注入 (ICSI) の技術を用いて証明されている。本研究は、ラット精子の生体内移行および超音波処理などの体外処理に伴う核 DNA の安定性の変化を定量的に調べるとともに、異なる部位および凍結された精巣上体尾から得た精子、さらに凍結乾燥された精子の核の ICSI による胚発生の可能性を調べる目的で行われ、次のような新しい知見を得ている。

精子細胞および各部位から得た精子を酢酸アルコールで固定し、アクリジンオレンジで染色後に共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて緑色に対する赤色蛍光の割合 (r/g 比) を測定するとともに、mono-bromobimane を用いて精子の蛍光強度を測定して核 DNA の安定性を調べた結果、DNA の安定化は精子の精巣上体成熟の過程でプロタミンの酸化に先行して起こり、DNA の脱核包化は精子の透明帯貫通中に始まることが明らかになった。また、精巣精子の核 DNA の安定性は超音波処理あるいは培養により高まるが、精巣、精巣上体頭、精巣上体尾のいずれの精子においても、これらの処理によりプロタミンの酸化が進行することが明らかになった。一方、精巣、精巣上体頭および精巣上体尾から得た精子から超音波処理により分離した精子核を用いて ICSI を行った結果、いずれの部位から得た精子においても、精子核のみの ICSI により受精卵を得ることが可能であり、少なくとも一部の受精卵は正常な繁殖能力を有した産子にまで発育し得ることが証明された。さらに、凍結された精巣上体尾組織から得た精子核および凍結乾燥された精巣上体尾精子の核を用いた ICSI を試みた結果、いずれの精子核においても受精は成立するが、凍結乾燥精子の核に由来する受精卵の体外発生は困難であることが示唆された。

これらの知見は、哺乳類の受精における精子核の機能に関する研究の進展に寄与するとともに、ラットにおける系統維持などの実用面においても有用である。本学位審査委員会は本論文の内容および参考論文を総合的に審査し、本論文が博士 (学術) の学位に値するものと判定した。