

氏 名 平野 高大

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2339 号

学位授与の日付 2022 年 6 月 30 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 恒温脊椎動物の精子形成における温度の影響の解析

論文審査委員 主 査 長谷部 光泰
基礎生物学専攻 教授
吉田 松生
基礎生物学専攻 教授
亀井 保博
基礎生物学専攻 准教授
小林 悟
筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 教授
山下 朗
名古屋大学 低温プラズマ科学研究センター
特任准教授

(様式3)

博士論文の要旨

氏名 平野 高大

論文題目

恒温脊椎動物の精子形成における温度の影響の解析

(Impact of temperature on spermatogenesis in endothermic vertebrates)

In most mammals, spermatogenesis is a heat-sensitive process that proceeds under low-temperature conditions in the scrotal sacs. Operational translocation of the testis from the scrotal sac into the abdominal cavity causes spermatogenesis defect. Some mammalian species do not have scrotal sacs and their testes stay in the body cavity during development. However, some of these species develop specialized testis-cooling mechanisms, such as the counter-current heat exchange system of dolphins. Thus, it is hypothesized that a high-temperature condition is a causal factor for spermatogenesis defect. However, *in vivo* assays, e.g., artificial cryptorchidism, cannot control the temperature condition or exclude extra-testicular factors. Therefore, the relationship between temperature elevation and spermatogenesis defect still retains some ambiguity.

To overcome such limitations of *in vivo* assays, I have taken advantage of the *ex vivo* culture, which enables the evaluation of the heat sensitivity of mouse spermatogenesis under controlled temperatures and without the influence of extra-testicular factors.

First, I found that the temperature in the scrotal sac was approximately 34°C, by implanting temperature transponders. At 34°C the cultured explants harbored the best-developed spermatogenesis including all stages leading to elongating spermatids. Then, I tested the effect of body-core temperature (38°C) on spermatogenesis in the *ex vivo* culture, and found that round and elongating spermatids were absent at this

temperature. I concluded that a high-temperature condition solely causes spermatogenesis defect in the *ex vivo* culture, independent of extra-testicular factors.

To further dissect the temperature sensitivity of spermatogenesis, I incubated the explants at various temperatures ranging from 30°C to 40°C. Among the temperatures tested, culturing at 34°C supported the best progression of spermatogenesis, whereas elongating spermatids were observed in smaller numbers at 32°C and 35°C, indicating that the scrotum provides the optimal temperature for spermatogenesis. I revealed three temperature-sensitive steps, i.e., zygotene–pachytene transition during meiotic prophase I, completion of meiosis to form round spermatids, and maturation of round spermatids, which are affected at 37°C–38°C (body core temperature), 36°C–37°C, and 35°C–36°C, respectively. It is notable that such a small temperature difference as 1°C affects spermatogenesis differently. These results not only reinforce the prevailing view that high temperature causes spermatogenesis defect, but also indicate that the temperature dependence is more complex than has been usually thought, harboring multiple temperature thresholds at different differentiation steps.

To address the mechanisms of the block of meiosis at high temperatures and the elimination of heat-damaged cells, I examined the progression of meiotic prophase I in testis explants cultured at different temperatures. First, I evaluated the DNA double-strand break (DSB) level and the DSB repair machinery. I found evidence for increased DSBs and compromised DSB repair in spermatocytes cultured at 37–38°C. I also found that inter-chromosomal synapsis was also impaired at 37–38°C. Furthermore, at these temperatures, the progression to late pachytene spermatocytes was blocked, followed by apoptotic cell death. Together, these findings suggest that a surveillance mechanism, known as *meiotic checkpoint*, eliminates cells carrying DSBs and unsynapsed chromosomes. I propose that a high-temperature condition primarily impairs DSB repair and causes asynapsis, which in turn elicits apoptosis by the

surveillance mechanism of meiotic checkpoint.

Moreover, to understand the temperature sensitivity of spermatogenesis in other endothermic vertebrates, I evaluated the heat sensitivity of avian spermatogenesis using Japanese quail. Birds are known to have high body temperatures (42°C), and their testes stay deep in the body cavity. Thus, avian testes may be exposed to considerably high-temperature conditions. However, if and to what extent the air sacs (extensions of the avian respiratory system) cool the testes was not fully elucidated. By using implanted thermometers and blocking the air sac flow, I found that the testes of Japanese quail are cooled by the air sacs by approximately 0.3°C, but their spermatogenesis can proceed even at their body-core temperature, which is higher than that of mammals. To adapt to flight, birds might not have developed the scrotal sacs. Rather, their spermatogenesis may have gained resistance against temperatures as high as 42°C, possibly by altered temperature sensitivity of the molecular machinery including those involved in meiosis.

In conclusion, based on the *ex vivo* culture, I made a number of observations that provide insights into the heat sensitivity of spermatogenesis in mammals, from fundamental and phenomenological descriptions to molecular-level mechanisms, as well as a comparison with that in aves. This study will provide a foundation for a better understanding of the biological significance of the low-temperature conditions required for mammalian spermatogenesis.

Results of the doctoral thesis defense

博士論文審査結果

Name in Full
氏 名 平野 高大

Title
論文題目 恒温脊椎動物の精子形成における温度の影響の解析

哺乳類の精巣は多くが約 34°C の陰嚢内にあり、約 38°C の腹腔に比べて 2°C から 6°C 程度低く保たれている。哺乳類の精子形成が高温環境で障害を受けることは広く知られている。しかし、この現象を解析するために従来用いられてきた人工停留精巣などの *in vivo* の実験系は、温度以外の要因を切り離して温度だけを変化させることができない。さらに、精巣の温度を正確に測定したり、制御したりすることもできない。そのため、温度変化だけが原因で精子形成が障害されるのか、あるいは他の要因も関わっているのかが明らかになっておらず、この現象の理解は進んでいなかった。

申請者は、マウス精巣の器官培養系を用いて温度条件のみを精密に変化させ、精子形成に与える影響を評価した。その結果、37°C から 38°C では第一減数分裂の前期から後期への移行、36°C から 37°C では減数分裂の完了、35°C から 36°C では円形精子細胞から伸長精子細胞への分化が、それぞれ障害されることを見出した。これらの知見から、申請者は、温度のみの影響で精子形成障害が生じうると結論した。さらに、精子形成の高温障害は、複数の温度感受性ステップからなる複合的な現象で、わずか 1°C の違いによって障害を受けるステップが異なることを明らかとした。

次いで、申請者は、減数分裂期にある精母細胞に見られる障害に注目して詳細な解析を行った。深部体温に相当する 37°C から 38°C の高温環境では、染色体ゲノム DNA の二重鎖切断量の指標となる、 γ H2AX 量の著しい増加を見出した。さらに、染色体ゲノム DNA の二重鎖切断の修復過程が障害を受けること、相同染色体ペア間の対合不全が起こることを見出した。これらの障害を受けた精母細胞は、後期パキテン期への正常な進行が阻害され、相同染色体の対合が同調性を失った状態に陥り、アポトーシス細胞死に至ることを見出した。これらの結果は、37°C から 38°C の高温環境で障害を受けた精母細胞は、未修復の DSBs

や対合不全を監視する「減数分裂期チェックポイント」の働きによって取り除かれることを示唆する。

さらに、申請者は、哺乳類と独立に恒温性を進化させた鳥類の精子形成における温度感受性を調べた。鳥類の深部体温は 42°C と哺乳類より高いにも関わらず、精巣は体腔深部に位置する。従来、鳥類の精子形成は高温環境下でも進行できる可能性と、精巣が特有の呼吸器官である気嚢によって冷却され精子形成は体温より低温で進行しているという仮説が提唱されていた。申請者は、ニホンウズラにおいて、ワイヤレス温度センサを用いて精巣温を測定すると共に、気嚢の気流を遮断した時の精子形成を観察した。その結果、精巣は気嚢によって約 0.3°C 冷却されているものの、深部体温と同等である 42°C でも精子形成が進行することが明らかとなった。

以上、申請者は、器官培養を用いることで、マウス精子形成が温度のみの影響で障害を受けること、わずか 1°C の違いによって精子形成障害過程が変化することを明らかにした。そして、深部体温に相当する 37°C から 38°C では、減数分裂期のDNA二重鎖切断修復および相同染色体の対合に障害が生じることを発見し、「減数分裂期チェックポイント」が障害を受けた生殖細胞を除去する役割を果たしている可能性を提唱した。さらに、鳥類の精子形成が体深部の哺乳類よりも高い温度条件で進行することを示し、高温感受性が哺乳類の精子形成に特徴的な性質であることを明らかにした。これらの結果は、哺乳類が深部体温よりも低い温度で精子形成を行う生物学的意義を理解する上で重要な基盤を与えるものである。

以上の理由により、審査委員会は、本論文が学位の授与に値すると判断した。