OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Molecular cloning of a murine homologue of membrane cofactor protein (CD46) : preferential expression in testicular germ cells
Author(s)	辻村, 晃
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41232
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【 25 】

氏名	辻村 晃（つじむら あきら）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 14022 号
学位授与年月日	平成10年4月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Molecular cloning of a murine homologue of membrane cofactor protein (CD46) : preferential expression in testicular germ cells (マウス menbrane cofactor protien (CD46) homologue のクローニング：germ cell に優位に発現)
論文審査委員	(主査) 教授 奥山 明彦 (副査) 教授 谷口 直之　教授 網野 信行

論文内容の要旨

[目　的] membrane cofactor protein (MCP) はCD46と命名された補体制御因子の一つで，humanにおいては赤血球を除く体細胞総てにその発現が確認されている。さらに精子先端においては低分子CD46が特異的に発現していることも報告されている。Humanにおける様々な研究から，この精子特異的な低分子CD46は受精において精子が卵に結合する時のreceptor的役割を担っているのではないかと推測されている。一方，mouseにおいては現在までにCD46の発現は確認されておらず，補体制御能に関してはCD46のfunctional homologueであるCRRYが担っているとされてきた。我々はCD46が補体制御能以外に受精における根元的な役割—精子・卵結合に関与するfunction—を有しているなら，少なくともgerm cellにはその発現を確認できるのではないかと推測し，mouse CD46のcloningとその発現解析を行った。

[方　法] 1) cDNA cloning：既知の各種CD46のsequenceでhomologyの高い部位を見いだし，mouse testis cDNA library ($pAP3^{neo}$) を用いてdegenerate nested PCR法で717 bpのpartial CD46 cDNAのprobeを作製，これを用いてcolony hibridization法にてlibraryをscreeningした。2) message analysis : partial CD46 cDNAをprobeとしてmouse tissue (brain, liver, lung, kidney, muscle, heart, spleen, testis) blot, mouse testisを用いたage (5, 8, 17, 23, 29 days, adult) blot, mutant mouse (W/W^v, Sl/Sl^d, jsd/jsd, Cryptorchid) testisを用いたmutant blotをnorthern blotting法で行った。さらにRT-PCR法でもtissue analysisを行った。3) SDS-PAGE/Immunoblotting：抗CD46ペプチド抗体を用いて，mouse各臓器におけるCD46 proteinの発現をSDS-PAGE/Immunoblotting法で検討した。4) Factor-I-cofactor activity assay：まずmouse CD46 cDNAをexpression vector (pCXN2) にligation後，CHO cellにtransfectionさせmouse CD46 proteinを作製した。次にmouse C3bにmouse factor Iとこのproteinを加え，SDS-PAGEでC3bの不活化を測定することで，補体制御能 (cofactor activity) を検討した。

[成　績] cloningされたmouse CD46 cDNAはORFが1098 bpで，CD46の特徴的な配列である4個のshort con-

census repeat を含む基本的な配列がほぼ conserve されており，human と nucleotide で62%，anino acid で45%の homology を示した。message 解析においては RT-PCR 法で全臓器にその発現が確認された。しかし tissue blot では testis のみに強発現（1.5 kbp）を認め，他の臓器には全く発現を認めなかった。testis age blot では29 days 以降に発現が確認された。さらに spermatogenesis に障害をもつ mutant mouse testis では全く発現を認めなかった。以上より，mouse CD46 は spermatid 以降の mature germ cell に優位に発現している可能性が示唆された。さらに SDS-PAGE/immunoblotting 法でも，調べ得た臓器の中で testis のみに分子量47 KDa の protein を確認し得た。Factor-I -cofactor activity assay では control に比べ，mouse CD46 cDNA transfected CHO cell から得た protein と mouse factor-I の存在下で，C3b が著明に不活化されることを確認し，この protein が補体制御能を有することを証明した。

［総　括］ 今回 cloning を行った mouse CD46 は補体制御能を有する functional protein であるが，その発現が spermatid 以降の mature germ cell にのみ優位に認められた。この事実と mouse には補体制御能を有する CRRY が全細胞に発現していることから，mature germ cell に優位に発現している mouse CD46 は補体制御能よりむしろ生殖において非常に重要な役割を担っている可能性が示唆される。我々はその機能が human において推測されているのと同様，精子・卵結合の receptor 的役割ではないかと考えている。今後，抗 CD46 抗体と mouse の精子，卵を用いた直接的な受精阻害実験とノックアウトマウスの作製を試み，受精における機能解析も行う予定である。

論文審査の結果の要旨

Membrane cofactor protein（MCP，CD46）は human において体細胞総てに発現した補体制御因子の一つである。さらに近年の研究から精子に発現した CD46 は精子・卵結合に関与した分子である可能性が推測されている。本論文は CD46 の mouse homologue を cloning したものであり，さらに message level と protein level の解析を行い，mouse における CD46 は human と異なり testis のみに優位に発現し，特に mature germ cell に限って発現していることを確認したものである。また補体制御能に関する functional assay まで行い，CD46 protein が functional protein であるところまで追及しており，cloning の研究として完結している。Mature germ cell に限局して発現していることより，human で推測されている様に，精子・卵結合に関与した分子である可能性が高まった。現在までに臨床で想定されていない新しい不妊症の意味合いからも，独創的であり興味深く，学位論文に値すると考えられる。