The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Cloning and characterization of a complementary deoxyribonucleic acid encoding haploid-specific alanine-rich acidic protein located on chromosome-X
Author(s)	内田, 欽也
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43169
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【41】

氏　　名	内田欽也（うちだきんや）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　16465　号
学位授与年月日	平成13年7月4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	Cloning and characterization of a complementary deoxyribonucleic acid encoding haploid-specific alanine-rich acidic protein located on chromosome-X. （X染色体上に存在し、アラニンに富む酸性タンパク質をコードする半数体精子細胞特異的cDNAの単離と解析）
論文審査委員	（主査） 教　授　奥山　明彦 （副査） 教　授　村田　雄二　　教　授　西宗　義武

論文内容の要旨

【目的】

精子形成は幹細胞である精原細胞の増殖・分化、精母細胞の減数分裂および半数体の精子細胞の著しい形態変化を経て、最終的に精子を産生する一連の分化過程である。この間に、様々な遺伝子の発現とタンパク質の生合成・修飾・分解がなされ、それらのいずれが障害されても精子形成に問題が生じ、男性不妊症に至るものと思われる。これらの分化過程の各段階に特異的に発現する分子を解析することは、生殖細胞の分化メカニズムの理解のみならず、精子形成不全に伴う男性不妊症の解明とその治療に結びつくものと考えられる。そこで精細胞特異的ポリクローナル抗体を用いてマウス精巣cDNA発現ライブラリーから各分化段階特異的分子をコードする遺伝子を単離し、構造ならびに発現様式について解析を試みた。

【方法ならびに成績】

マウス精巣より分画した精細胞をウサギに免疫し、得られた抗血清を去勢マウスの腹腔内に注射することによりマウス体細胞を認識する抗体を吸収除去し（in vivo 吸収）、マウス精細胞特異的ポリクローナル抗体を作成した。そしてこの抗体によって認識されるタンパク質をコードする遺伝子を、λgt11に組み込んだマウス精巣cDNA発現ライブラリーから単離した。このようにして得られた様々なクローンのうち、マウス半数体精子細胞に特異的な発現様式を示すcDNAクローン haploid-specific alanine-rich acidic protein located on chromosome-X（以下 *halap-X* と略す）について解析を行った。単離したcDNAの全長遺伝子配列の解析、単離したcDNAをプローブとして様々な組織や各日齢の精巣について Northern blotting を行い、さらに、染色体マッピングを行った。また、得られたcDNAをもとにGST融合タンパク質を作成し、このタンパク質に対する特異抗体を作成した（抗 Halap-X 抗体）。この抗体を用いて各日齢の精巣および各組織についての Western blotting を行うとともに、精巣の免疫組織化学的解析により、Halap-X タンパク質の発現様式、局在を調べた。

シークエンスの結果、この遺伝子の全長1010bp の塩基配列が決定された。決定された *halap-X* cDNA の塩基配列についてホモロジー検索を行ったところ、*halap-X* は新規の遺伝子であることが明らかになった。推定アミノ酸配列上には、非常にアラニンに富んだ、特徴的な二つのリピート構造を持つ酸性領域が認められた。

染色体マッピングを行った結果、*halap-X* 遺伝子はX染色体上に存在していることが明らかとなった。

Northern blotting の解析から、組織別では、精巣に特異的な1.1kb の mRNA の発現が認められた。日齢別では

精子細胞の出現する生後18日目以降から発現がみられ、半数体精子細胞特異的と考えられた。

Western blotting の解析から、精巣特異的に分子量約55kDa のバンドが確認された。生後17日以降の精巣において発現がみられ、日齢を追うにつれてその発現量が増加しており、ほぼ mRNA の発現様式と一致する結果となった。

二次元電気泳動では、pH4.3〜4.7を示す極度の酸性タンパク質であることが判明した。

免疫組織染色では、最初は前期精子細胞の核内に Halap-X タンパク質の発現がみられ、徐々にその発現が強くなり、後期精子細胞に形態変化するに伴って細胞質内へと移行するという、非常に興味深い局在生を示した。電顕レベルでも同様の所見を得た。

【総括】

halap-X は新規の遺伝子でX染色体上に存在し、半数体精子細胞特異的な発現形式がみられた。推定アミノ酸配列上、アラニンに富んだ特徴的な繰り返し構造を持っていた。*halap-X* 遺伝子のコードするタンパク質は分子量約55kDa で、pH4.3〜4.7と強い酸性を示していた。免疫組織染色上、Halap-X タンパク質が前期精子細胞の核内に発現し、後期精子細胞では細胞質内へと移行する様が観察された。以前の報告から、酸性タンパク質が、塩基性クロマチンタンパク質と相互作用することによって、精子細胞の核凝集過程に重要な役割を果たしていると示唆されている。強度の酸性タンパク質である Halap-X も同様に、クロマチンタンパク質と相互作用し、核内から細胞質へと局在を変化させることで、クロマチンタンパク質の変遷を助け、精子細胞における核凝集・形態形成過程に重要な役割を果たしているものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

精子形成は幹細胞である精原細胞の増殖・分化、精母細胞の減数分裂および半数体の精子細胞の著しい形態変化を経て、最終的に精子を産生する一連の分化過程である。この間に、様々な遺伝子の発現とタンパク質の生合成・修飾・分解がなされ、それらのいずれが障害されても精子形成に問題が生じ、男性不妊症に至るものと思われる。これらの分化過程の各段階に特異的に発現する分子を解析することは、生殖の分化メカニズムの理解のみならず、精子形成不全に伴う男性不妊症の解明とその治療に結びつくものと考えられる。

本研究では精巣特異的ポリクローナル抗体を用いて、分化段階特異的発現遺伝子を単離・解析したことが独創的である。また、単離した遺伝子のなかで Halap-X (haploid-specific alanine-rich acidic protein located on chromosome-X) は、新規の遺伝子でX染色体上に存在し、半数体精子細胞特異的な発現がみられた。Halap-X 遺伝子のコードするタンパク質は推定アミノ酸配列上、アラニンに富んだ特徴的な繰り返し構造を持ち、pH4.3-4.7と強い酸性を示し、免疫組織染色上、先ず前期精子細胞の核内に発現し、後期精子細胞では細胞質内へと移行するという極めて特徴的な発現様式が認められた。

以上の結果から、強度の酸性タンパク質である Halap-X タンパク質がクロマチンタンパク質と相互作用し、精子細胞における核凝集・形態形成過程に重要な役割を果たしているものと思われた。また今後、この遺伝子のヒト相同遺伝子を単離・解析することが、臨床における男性不妊症の解明と治療を行う上で重要な手がかりを与えるものと考えられる。よって、本研究は学位論文に値するものと認める。