



Title	Molecular Cloning and Characterization of oppo 1 : a Haploid Germ Cell-Specific cDNA Encoding Sperm Tail Protein
Author(s)	中村, 吉宏
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43709
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

氏 名	なかむらよしひろ 中村吉宏
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 9 0 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 14 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科外科系専攻
学 位 論 文 名	Molecular Cloning and Characterization of <i>oppo</i> 1: a Haploid Germ Cell-Specific cDNA Encoding Sperm Tail Protein (精子尾部蛋白質をコードする半数体精細胞特異的 cDNA (<i>oppo</i> 1) のクローニングと解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 奥山 明彦 (副査) 教 授 米田 悦啓 教 授 西宗 義武

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

雄性生殖細胞の最終産物である精子は、精原細胞の増殖と分化、精母細胞の分化と減数分裂、及び半数体精子細胞の著しい形態変化を含む一連の緻密に制御された過程を経て形成される。精巣における精細胞の分化が正確に行われるためには、その分化段階に特異的な遺伝子群の発現が正確に行われることが必要である。著しい形態変化を伴った半数体精子細胞分化のメカニズムを明らかにするためには、そこで特異的に発現する遺伝子群をクローニングし解析することが非常に重要である。本研究は、精子細胞特異的に発現する新規遺伝子 *oppo* 1 をクローニングし、その遺伝子と転写産物の解析を行ったものである。

【方法】

まず、分化の完了した精子細胞を含む35日齢のマウス精巣 cDNA library から半数体精子細胞分化のまだ見られていない17日齢の精巣 mRNA を差し引いた subtracted library から半数体精子細胞特異遺伝子を単離した。その中の一つである MT62 cDNA Tag は、その一次構造解析から、バクテリアの鞭毛に局在するタンパク質に弱い相同性を示すタンパク質をコードする事が確認された。MT62 cDNA Tag をプローブに、マウス精巣の cDNA library から全長 cDNA をクローニングし一次構造を決定した。また、クローニングした全長 cDNA を用いてその mRNA の発現をノーザンブロッティング、*in situ* ハイブリダイゼーションで調べた。さらに、大腸菌でレコンビナントタンパク質を作成し、ウサギに免疫して抗体を作成し、ウェスタンブロッティング、免疫組織染色を行い、*oppo* 1 遺伝子産物の解析を行った。

【成績】

oppo 1 遺伝子 (MT62) は全長1085bp で、33KDa のタンパク質をコードし、その発現は精細胞特異的で精母細胞から弱く転写され精子細胞で強く発現することが明らかとなった。また翻訳は、ウェスタンブロッティングおよび免疫組織染色の結果から、精子細胞特異的であり転写後に翻訳調節が行われていることが明らかとなった。さらに OPPO 1 タンパク質は、精子に存在していることがウェスタンブロッティングの結果から示された。また、マウス精巣上体精子の免疫組織染色において、精子鞭毛の midpiece から principal piece にかけて強いシグナルが認められた。

精子の鞭毛は、その運動に関与する 9 + 2 構造をとる微小管からなり、その周りを取り囲むように outer dense fiber (ODF) が midpiece から principal piece にかけて存在する。そこで、マウス精巣上体精子を Urea にて処理しウエスタンブロッティングを行ったところ、OPPO 1タンパク質は ODF 画分に存在することが示された。次にマウス精巣上体精子を cetyltrimethylammoniumbromide で処理して ODF を露出して免疫組織染色を行ったところ OPPO 1が ODF に局在することが明らかとなった。

【総括】

半数体精子細胞特異的遺伝子の役割として 1) 分化制御に関与する遺伝子、2) 精子の形態形成に関与する遺伝子、3) 精子のエネルギー代謝に関与する遺伝子等が考えられる。ここに報告した *oppo 1* 遺伝子は、精子の鞭毛形成またはその運動性に深い関わりを持つことが推測される。男性不妊症の病因として、精子形成障害、精子輸送路通過障害、副性器感染症、性機能障害等に分けられるが、全体の約半数以上を特発性精子形成障害が占めていることから、精子の形成や運動性を分子レベルで理解することによりこれらの原因を明らかとする事ができるものと考えられる。ここに報告した *oppo 1* 遺伝子は、これら男性不妊症の原因遺伝子の一つである可能性が推測される。

論文審査の結果の要旨

哺乳類の雄性生殖細胞は分化の過程で緻密に制御されており、精原細胞の増殖と分化、精母細胞の減数分裂および半数体精子細胞の形態形成の 3 段階に分けることができる。

特に半数体精子細胞の時期は独特で、体細胞分化の過程とは大きく異なっており、生物学的に興味のある素材である。精子形成メカニズムを探求するにあたり、この時期特異的に発現する遺伝子群を解析することは、多くの情報をもたらすものと考えられる。

本研究は、これら遺伝群のひとつとして新規遺伝子 *oppo 1* を同定し解析したものである。*oppo 1* 遺伝子は、精細胞特異的に発現する。転写は、精母細胞から弱く行われ、精子細胞において強くなる。それに対し翻訳は、精子細胞特異的であり、精子細胞分化に伴った転写後の翻訳調節を受けていることが示された。その産物である OPPO 1タンパク質は雄性生殖細胞の最終産物である精子の鞭毛、特に outer dense fiber に局在する事が示された。このことから、*oppo 1* 遺伝子は、精子の鞭毛形成やその運動性に関与し、男性不妊症の原因遺伝子の 1 つである可能性が推測された。

よって本研究は、学位の授与に値すると考えられる。