

Title	Testis-specific expression of a novel mouse defensin-like gene, Tdl
Author(s)	山本, 美和子
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43887
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名 やまもと みわこ
山 本 美和子

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 7 6 4 8 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 15 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科分子病態医学専攻

学 位 論 文 名 Testis-specific expression of a novel mouse defensin-like gene, *Tdl*
(新規マウス defensin 様遺伝子 *Tdl* の精巣特異的発現)

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 松居 靖久

(副査)
教 授 北村 幸彦 教 授 西宗 義武

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

マウスの始原生殖細胞は 13.5 日胚頃、メスでは減数分裂に入り、オスでは増殖を停止する。しかし、これまでの培養実験などから、オスの始原生殖細胞も実は減数分裂に入る性質を持っているが、オスの生殖隆起の環境に置かれると減数分裂が抑制されることから、オスの生殖隆起には細胞外から作用して減数分裂の開始を抑制する分子が存在することが示唆されている。そこで私は、この減数分裂抑制因子の同定を念頭に置き、マウス生殖隆起の体細胞でオス特異的に発現する分泌型または膜タンパク質をコードする遺伝子のクローニングを試みた。

[方法ならびに成績]

減数分裂抑制因子が存在すると予想される 12.5 日胚のオス由来の生殖隆起と、存在しないと予想される 12.5 日胚のメス由来の生殖隆起から cDNA を合成し、これを材料にして、サブトラクシオンスクリーニング法を行い、オス特異的に発現する遺伝子を濃縮した。この cDNA プールからランダムに 500 クローンを拾い、まずドットプロットハイブリダイゼーションにより、発現に雌雄差があるクローンを選択した。次に、塩基配列情報から、既知の細胞外タンパク質をコードするか、または新規の遺伝子を選択し、最後にホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより、それらがオスの生殖隆起でメスより強く発現していることを確認した。その結果、既知の細胞外タンパク質をコードする遺伝子 5 種類、新規遺伝子 2 種類を同定した。

得られた候補遺伝子のうち、既知の細胞外タンパク質をコードする遺伝子には、L-prostaglandin D2 synthase、Clusterin、SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine)、Desert hedgehog、Integrin $\alpha 9$ があった。このうち L-prostaglandin D2 synthase、Clusterin、SPARC はノックアウトマウスが妊孕性であることから、減数分裂抑制因子の候補から除外した。Desert hedgehog のノックアウトマウスは精細管の形成不全でオス不妊になることが報告されているが、オス胚で生殖細胞が減数分裂に入るという記述はなかった。Integrin $\alpha 9$ のノックアウトマウスは生後一週間ほどで乳び胸により死亡するため、生殖巣の解析はなされていなかった。そこで私は、Dean Sheppard 博士との共同研究で、16.5 日胚の生殖巣の解析を行ったが、オス胚の生殖巣で減数分裂に入っている生殖細胞は存在しなかった。

新規遺伝子のうち *Tdl* と命名した遺伝子は、抗菌ペプチド β -defensin にホモロジーがある遺伝子をコードし、*in situ* ハイブリダイゼーション法により雌雄分化開始直後の胚から成体までセルトリ細胞特異的に発現があった。胚のセルトリ細胞特異的な発現は、減数分裂抑制因子に期待される特徴なので、この遺伝子産物が減数分裂を抑制するかどうかを調べるため、これを全身で発現するトランスジェニックマウスを作製した。コンストラクトには、*Tdl* に加えて IRES-GFP (internal ribosome entry site-green fluorescent protein) を含めることにより、GFP の蛍光を指標にしてトランスジーン発現を確認できるようにした。GFP の発現が確認されたトランスジェニック胚の卵巣をヘマトキシリン・エオジン染色で調べたが、正常な減数分裂像が見られた。このことから、*Tdl* は減数分裂抑制因子ではない可能性が高いが、トランスジーン発現量が、減数分裂を抑制するには不足していた可能性も否定はできない。また、遺伝子の構造から、オス生殖器官の自然免疫に関わっている可能性も考えられる。

[総 括]

新規遺伝子のうち *Tdl* と命名した遺伝子は、抗菌ペプチド β -defensin にホモロジーがある遺伝子をコードし、*in situ* ハイブリダイゼーション法により雌雄分化開始直後の胚から成体までセルトリ細胞特異的に発現があった。抗菌ペプチド様の遺伝子がセルトリ細胞で発現していることが示されたのは初めてであり、また哺乳類の抗菌ペプチド様の遺伝子が、感染ではなく細胞の分化に伴って発現が上昇することを示した初めての例である。この遺伝子を減数分裂抑制因子の候補のひとつとして同定した。

論文審査の結果の要旨

本研究は、新規マウス defensin 様遺伝子 *Tdl* をクローニングし、マウスの発生過程を追ってセルトリ細胞特異的発現を示したものである。

これまで抗菌ペプチドの多くは、上皮や好中球などで、常時発現しているものと感染によって発現が上昇するものが知られていたが、抗菌ペプチド様の遺伝子が、セルトリ細胞特異的に発現し、セルトリ細胞の分化開始とともに発現を開始していることを示した初めての例であり、学位の授与に値すると考えられる。