The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Cloning and characterization of the human tektin-t gene
Author(s)	井口, 尚子
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43958
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　井口尚子（いぐち なおこ）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　17646　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　Cloning and characterization of the human tektin-t gene
（ヒト tektin-t 遺伝子の単離と解析）

論文審査委員　（主査）
教　授　西宗　義武

（副査）
教　授　岡部　勝　　教　授　奥山　朋彦

論文内容の要旨

〔目　的〕

日本・欧米諸国では全夫婦の約1割が不妊に悩まされており、その半数は男性側に要因があると考えられている。精子運動能障害や精子形態異常が男性不妊を引き起こすことが明らかとなっているが、その原因の大部分は不明である。精子細胞特異的遺伝子を同定し、その翻訳産物の機能を明らかにすることは男性不妊の分子メカニズムを理解する上で重要である。我々はマウスにおいて精子細胞特異的に発現し、精子鞭毛に局在する微小管結合蛋白質であるtektin 蛋白質ファミリーの新規遺伝子、tektin-t を同定した。本研究は、精子鞭毛形成・機能に重要と考えられるtektin-t がヒト精子形態形成や精子鞭毛の機能に如何に関与するのか検討するため、ヒト相同遺伝子を単離し、解析を行った。

〔方法ならびに成績〕

1）*h-tektin-t* cDNA の単離と発現解析

以前に単離したマウス *tektin-t* cDNA 全長をプローブとして、ヒト精巣 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、*h-tektin-t* cDNA（1.4 kb）を単離した。得られた cDNA の配列決定の結果、*h-tektin-t* cDNA は 430 アミノ酸をコードする Open Reading Frame（ORF）を持ち、マウス *tektin-t* と高い相同性（DNA レベル：82%、アミノ酸レベル：83%）を示した。推定アミノ酸配列中には Tektin 蛋白質ファミリーにおいて種を越えて非常によく保存されている共通な配列がみられた。様々なヒト組織の Northern blotting の結果、転写産物は精巣に非常に強く発現しており、卵巣においても弱い発現が認められた。

2）抗 h-tektin-t 抗血清作成と蛋白質解析

大腸菌で発現誘導した His-tag 融合 h-Tektin-t 組み換え蛋白質を精製し、これを抗原としてウサギに免疫し、抗 h-Tektin-t 抗血清を得た。これを用いて Western blotting による蛋白質発現解析を行った結果、ヒト精巣（54 kDa）・射出精子（46、54、56 kDa）に発現が確認された。精巣と精子での h-Tektin-t 蛋白質の分子量の違いについて、精子蛋白質抽出液を用いて N 結合型糖鎖を認識するレクチンである Concanavalin A のカラムクロマトグラフィーを行い、54、56 kDa の分子量を示す h-Tektin-t が N 結合型の糖鎖修飾を受けていることを明らかにした。46 kDa の分子は Concanavalin A 非吸着であったことから N 結合型の糖鎖修飾を受けていない分子であることが示唆された。こ

れらの結果からh-Tektin-t蛋白質は精巣内で半数体精子細胞が精子へと分化した後、精巣上体で成熟し、射出するまでの間に糖鎖の付加及び除去という蛋白質修飾を受けていることが明らかとなった。ヒト精子の免疫染色の結果、h-Tektin-t蛋白質は精子鞭毛およびpost-acrosomal領域に局在が認められた。

3）染色体マッピング

h-tektin-t cDNAの3' 非翻訳領域をPCRにより増幅し、これをプローブとしてRadiation hybrid mapping法により*h-tektin-t*遺伝子の染色体位置決定を行った。その結果、この遺伝子は1コピーで第一染色体短腕に存在することを明らかにした。

〔 総　　括 〕

精子は卵に到達するために長い距離を遊泳し、かつ卵を覆う透明体を通過しなければ、最終目的である受精を果たすことができない。その成否は尾部による鞭毛運動に大きく依存していることから、精子鞭毛形成や鞭毛運動の仕組みに関する分子レベルでの研究は重要である。tektin蛋白質は繊毛や鞭毛の微小管に結合する蛋白質であり、様々な種で単離されている。本研究で単離・解析した*h-tektin-t*遺伝子は同じ哺乳類であるマウス*tektin-t*のみならず進化的に離れた生物であるウニtektin遺伝子とも高い相同性を持ち、精子鞭毛への局在・モチーフ配列の厳格な保存などの特徴を示すことからもこの遺伝子が精子鞭毛機能に重要な遺伝子として種を越えて保存されてきたものと推察される。さらに、*h-tektin-t* 遺伝子の存在する染色体領域には男性不妊症患者において転座切断点が多く見られるという報告や、この領域に複数の男性不妊原因遺伝子の候補が存在するという報告があることから、*h-tektin-t* 遺伝子が男性不妊症の原因遺伝子の候補の1つである可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究はマウス精巣生殖細胞特異的subtracted cDNA libraryから単離された新規の遺伝子tektin-tのヒト相同遺伝子（*h-tektin-t*）を初めて単離し、解析したものである。Tektin 蛋白質は鞭毛や繊毛の微小管壁・基底小体・中心小体に存在し、繊維状のポリマーを形成する Tektin 蛋白質ファミリーとして様々な種に存在することが知られている。

本研究で単離、解析した*h-tektin-t*遺伝子は精巣に強く発現し、精子鞭毛に局在し、種を越えて非常によく保存されていることから精子鞭毛機能に重要な遺伝子であり、精子鞭毛形成や鞭毛運動機構を理解する上で重要な手がかりを与えるものと考えられる。また*h-tektin-t*遺伝子が不妊男性で転座や染色体切断が報告されている染色体領域に位置することから、ヒト精子の構造や男性の妊孕性に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後、男性不妊患者におけるこの遺伝子の変異や発現異常を解析することは男性不妊症の解明と治療に重要な情報をもたらすものと考えられる。以上より、本研究は学位論文に値するものと認める。