

Title	Impaired Spermatogenic Ability of Testicular Germ Cells in Mice Deficient in the LIM-Kinase 2 Gene
Author(s)	高橋, 寿明
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44409">https://hdl.handle.net/11094/44409</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</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	高橋 寿明
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 17334 号
学位授与年月日	平成 14 年 10 月 30 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	Impaired Spermatogenic Ability or Testicular Germ Cells in Mice Deficient in the LIM-Kinase 2 Gene (LIM-Kinase 2 遺伝子欠損マウスにおける精子形成異常)
論文審査委員	(主査) 教授 中村 敏一  (副査) 教授 奥山 明彦 教授 西宗 義武

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

私達は蛋白質間相互作用に関わる機能ドメインの一つである LIM ドメインを有する新規のプロテインキナーゼをクローニングし LIM キナーゼ (LIMK) と名付けた。LIMK には脳神経系組織に強く発現している LIMK1 に加え、各種組織に幅広く発現が認められる LIMK2 の 2 つのサブタイプが知られている。LIMK の生物機能は比較的最近まで不明であったが、1998 年、LIMK が低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリー分子による制御を受け、アクチン脱重合因子であるコフィリンをリン酸化しアクチン細胞骨格の再構築に関与することが報告された。これらの結果を背景として LIMK はアクチン細胞骨格の制御を介して脳神経系の発生やネットワーク形成、さらには細胞運動や細胞分裂などにおいて重要な機能を担うことが示唆された。しかしながら個体レベルにおける LIMK の生理機能は依然として不明であった。本研究は LIMK2 の遺伝子欠損マウスを作製し、その性状を解析することにより個体レベルにおける LIMK2 の機能を明らかにすることを目的とした。

#### 【方法ならびに結果】

LIMK2 遺伝子欠損 (*Limk2*<sup>-/-</sup>) マウス作製に先立ちマウス LIMK2 cDNA ならびにその遺伝子をクローニングし、その構造を解析したところ LIMK2 には LIM ドメインを 2 つもつ通常のタイプ (LIMK2a) に加え、選択的スプライシングにより N 末端の構造が異なるアイソフォーム (LIMK2b および tLIMK2) が存在することを見いだした。LIMK2b は LIM ドメインを 1 つしか有しておらず、脳・神経系組織に高発現している。また tLIMK2 は LIM ドメインを完全に欠失したアイソフォームで、その発現は精巣に局限されていた。LIMK の各種変異体を用いた生化学的解析から tLIMK2 は恒常的な活性化型であると考えられ、さらにその細胞内局在も通常の LIMK2a が主に細胞質局在を呈するのに対して tLIMK2 は精細胞の核に局在が認められた。

次に上記の結果に基づき、全ての LIMK2 アイソフォームが破壊されるように Cre-loxP システムを用いてターゲティングベクターを構築した。ターゲティングベクターを ES 細胞に導入後、相同組み換えを起こした ES 細胞を選別した。8 細胞期胚と組み換え ES 細胞との凝集法によりキメラマウスを作製し、常法に従い *Limk2*<sup>-/-</sup> マウスを作出した。*Limk2*<sup>-/-</sup> マウスの発生および出生後の成長過程を詳しく調べた結果、*Limk2*<sup>-/-</sup> マウスでは不妊にはならないものの、明らかな精子形成の異常が観察された。*Limk2*<sup>-/-</sup> マウスでは精巣の重量が野生型に比べて有意に減少し

ているとともに、組織学的解析により分化型精細胞をほとんど欠失する精細管が認められた。さらに *Limk2*<sup>-/-</sup> マウス精巣ではアポトーシス陽性の精細胞が顕著に増加しており、精巣より単離培養した精細胞に対して熱ストレスを負荷すると生存能力の低下が認められた。また *in vitro* の結果と一致して、*Limk2*<sup>-/-</sup> マウスでは *in vivo* 精子再形成モデル（実験的停留精巣・回復実験）において精原細胞から精母細胞への分化に顕著な阻害が認められ、熱ストレスに対する抵抗性の低下は *in vivo* においても確認された。次に精細胞におけるコフィリンのリン酸化状態を検討したところ、野生型精細胞では熱ストレス負荷によりコフィリンのリン酸化が著しく誘導されるのに対し、*Limk2*<sup>-/-</sup> 由来の精細胞ではコフィリンのリン酸化の誘導は認められず、さらに精細胞の核内にコフィリンの凝集像が観察された。ストレス条件下においてコフィリンは脱リン酸化体としてアクチンとともに核内に移行しアクチン・コフィリン凝集体を形成することが知られている。したがって *Limk2*<sup>-/-</sup> マウスの精細胞核内で認められた異常なコフィリン凝集体は、恒常的活性化型として精細胞の核内に局在している tLIMK2 が欠損していることで、リン酸化を介したコフィリン凝集体の核外排除機構が機能しなかったためと考えられる。以上の結果から精細胞の減数分裂の進行・維持に LIMK2/tLIMK2 によるアクチン分子の機能制御が重要な役割を担っていることが示唆された。

#### 【総括】

本研究において LIMK2 遺伝子の欠損は精子細胞の生存と分化を阻害し、精子形成過程の進行を妨げることを明らかにした。最近我々は LIMK1 が体細胞分裂期に活性化し、この LIMK1 の活性化にはサイクリン依存性キナーゼ (CDK) が関与することを見いだした。またアフリカツメガエル卵母細胞の成熟過程に LIMK を強制発現させると微小管構造の形成不全が起り、卵成熟の進行が阻害されることも明らかにしている。以上の結果を考慮すると、LIMK・コフィリンを介した細胞骨格系の制御は細胞分裂の進行・維持に重要であり、とりわけ精子形成の減数分裂期においては LIMK2/tLIMK2 が重要な役割を担っているものと考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

LIM キナーゼ (LIMK) は LIM ドメインと呼ばれるモチーフ構造を有する新しいキナーゼ分子で、LIM 蛋白ファミリーの新しいカテゴリーに属する情報伝達分子として生理的に関心が持たれている。LIMK は低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリー分子による活性化を受け、アクチン脱重合因子であるコフィリンをリン酸化するアクチン細胞骨格の再構築に重要な制御因子であるが、個体レベルにおける LIMK の生理機能は依然として不明であった。LIMK には LIMK1 および LIMK2 の2つのタイプが存在するが、学位申請者はそのうち LIMK2 に注目し、遺伝子欠損マウスを作製することにより LIMK2 が精子形成の進行や維持に重要な役割を担うことを明らかにした。すなわち、LIMK2 欠損マウスは発生および出生後の成長過程において、外見上は野生型と明らかな差は認められなかったが、精巣重量が野生型に比べて有意に減少していた。実際、分化した生殖細胞がほとんど存在しない精細管が存在し、組織学的にも明らかな精子形成の異常が観察されるとともに、精母細胞においてアポトーシス陽性細胞の増加が認められた。さらには精子再形成モデルを用いた解析により、LIMK2 欠損マウスでは精母細胞への分化能が顕著に低下していた。また熱ストレス条件下において LIMK2 欠損マウスの生殖細胞では脱リン酸化体のコフィリンが核内に異常に集積していることも明らかにした。学位申請者はすでに精巣特異的な LIMK2 のアイソフォーム (tLIMK2) が分化した生殖細胞の核内に恒常的活性化型として特異的に発現していることを報告している。このことは tLIMK2 が欠損していることで、リン酸化を介したコフィリン・アクチン凝集体の核外排除機構が機能しなかったことを示唆している。したがって生殖細胞の減数分裂の進行・維持に LIMK2/tLIMK2 によるアクチン分子の機能制御が重要な役割を担っていることを初めて明らかにした研究である。さらに LIMK がアクチン細胞骨格を制御することに加えて、減数分裂の制御にも関与することを明らかにした点でも極めてオリジナリティーの高い研究成果である。

以上の理由により高橋寿明氏の論文は博士の学位授与に値するものである。