

Title	Molecular cloning and characterization of the human orthologue of male germ cell-specific actin capping protein $\alpha 3$ (cp $\alpha 3$)
Author(s)	宮川, 康
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44430
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	宮川 康
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 17287 号
学位授与年月日	平成 14 年 9 月 17 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	Molecular cloning and characterization of the human orthologue of male germ cell-specific actin capping protein $\alpha 3$ (<i>cp\alpha 3</i>) (ヒト雄性生殖細胞特異的アクチンキャッピング蛋白アルファ 3 : <i>cp\alpha 3</i> 遺伝子の単離と解析)
論文審査委員	(主査) 教授 奥山 明彦 (副査) 教授 祖父江憲治 教授 西宗 義武

論文内容の要旨

[目的]

わが国や欧米諸国では、全夫婦の割以上が不妊に悩まされており、その原因の半分は男性側にある。しかし男性不妊については遺伝的素因や環境ホルモンなどの環境因子の関与が示唆されているが大部分が原因不明である。近年、その解明の最も有効な手段のひとつとして雄性生殖細胞特異的遺伝子の単離、解析が行われている。最近、マウス精巣 *subtracted library* からアクチン調節蛋白の一種である Actin Capping Protein α subunit (*cp\alpha*) と相同性を示す半数体精子細胞特異的遺伝子 *cp\alpha 3* が単離された。アクチンはアクチン調節蛋白により制御され、細胞形態の維持と再構成、細胞の遊走や細胞外マトリックスとの結合などの種々の細胞機能に関与する。半数体精子細胞以降の精子形成過程はきわめて特異的な細胞形態変化を伴う細胞分化であり、これにはアクチンが重要な役割を果たしていると考えられている。本研究では、*cp\alpha* がヒトの精子形態や機能と如何に関わるかを検討するステップとしてヒト orthologue 遺伝子 (*hcp\alpha 3*) を単離、解析した。

[方法ならびに成績]

1) *hcp\alpha 3* cDNA クローニングと mRNA 発現解析

まずマウス *cp\alpha 3* (*mcp\alpha 3*) cDNA シークエンスを用いてデータベースを検索し、ヒトゲノム第 12 染色体上に相同性を示す遺伝子を発見した。予測される Open Reading Frame (ORF) を PCR で増幅し、これをプローブとしてヒト精巣 cDNA library をスクリーニングし、*hcp\alpha 3* cDNA の全長を含むクローンを得た。cDNA の全長は 1072 bp、ORF は 897 bp、299a.a. の蛋白をコードすると考えられた。マウスとの比較では DNA レベルで 82.1%、蛋白レベルで 91.3% と高い相同性を示した。特に、アクチン結合に必要なとされる C 末端領域は種を越えて、よく保存されていた。Northern blot analysis にてその mRNA 発現はヒトにおいても精巣特異的であることが分かった。

2) 抗 CP $\alpha 3$ 抗血清作成と蛋白発現解析

mcp\alpha 3 の ORF 全長を pGEX-1 vector へ subclone し、大腸菌に Glutathione S-transferase (GST) fusion protein を発現させ、これを精製し、抗原として日本白ウサギに免疫した。抗血清がリコンビナント hCP $\alpha 3$ 蛋白と特異的に cross-react することを確認後、ヒト精巣および精子を用いて Western blot analysis および免疫染色による解析を行った。その結果、ヒト精巣・精子にて 33 kDa の hCP $\alpha 3$ 蛋白発現が確認された。また CP $\alpha 3$ 蛋白の主な局在は精子

の主に中心体が存在する頸部であり、鞭毛や *postacrosome* にもわずかに存在した。この局在はヒト精子におけるアクチンのそれと一致することが二重免疫染色にて確認された。

3) *cpa3* genome 構造

データベース検索により *mcpa3* cDNA と相同性を有するヒトゲノムクローンは 12p12 領域の一箇所のみであった (NCBI accession number : NT_028330)。PCR と Southern blot analysis から *hcpa3* が intronless gene であることが判明した。また 5' 上流領域には TATA box や GC rich な部分は見られなかったが、cAMP response elements (CRE) が 2 箇所存在した。また 3' 下流領域には典型的な polyadenylation signal やその variant は存在しなかった。これらの特徴はマウスと同様であった。

[総括]

Actin capping protein (CP) はすべての哺乳類細胞に存在し、また進化上、最もよく保存されたアクチン調節蛋白である。CP は α と β の二つの subunit からなる heterodimer を形成しアクチン繊維と結合しその長さを動的に調節するとされる。ヒトの *cpa* gene はこれまでに第 1 および第 7 染色体上にひとつずつ確認されている ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$)。しかしながら *cpb* gene は第 1 染色体にひとつだけで、二つの alternatively spliced variants ($\beta 1$ 、 $\beta 2$) の発現が確認されている。本研究で単離、解析した新規のヒト雄性生殖細胞特異的遺伝子 *cpa3* (DDBJ accession number : AB053259) は体細胞型の *cpa1*、 $\alpha 2$ とは蛋白レベルでの相同性は 34% と低く、また β subunit との結合は確認されていない。しかしながら種を越えて C 末端領域のアクチン結合部位が極めてよく保存され、ヒト精子ではアクチンと局在が一致したことから、雄性生殖細胞のアクチンを調節する新規の *cpa* subunit と考えられ、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 actin capping protein alpha3 (*mcpa3*) のヒト orthologue 遺伝子 (*hcpa3*) をはじめてクローニングし解析したものである。*hcpa3* はマウスと比較して DNA レベルで 82.1%、蛋白レベルで 91.3% と高い相同性を示し、特にアクチン結合に重要な C 末端領域は種を越えてよく保存されていた。またヒトでも *cpa3* mRNA は精巣特異的に発現していた。さらに特異的抗血清を作成し、ヒト精巣および精子にて 33 kDa の蛋白発現を確認した。ヒト精子の免疫化学染色では CP $\alpha 3$ の subcellular localization が主に精子頸部であることまた鞭毛や *postacrosome* にもわずかに存在することが判明した。さらにこの局在はヒト精子特異的なアクチンの局在と一致することをつきとめた。また本研究では *hcpa3* の genome 構造も明らかにし *hcpa3* が 12p12 領域に存在する intronless gene であることが判明した。

精子形成過程や精子機能にアクチンが重要な役割を果たしていることは以前から報告されているが、その調節機構は未だ不明であり、生殖生物学の課題のひとつである。actin capping protein (CP) はすべての哺乳類細胞に存在し、また進化上、最もよく保存されたアクチン調節蛋白とされている。CP は α と β の二つの subunit からなる heterodimer を形成しアクチン繊維と結合しその長さを動的に調節する。これまでにヒトの *cpa* gene は第 1 および第 7 染色体上にひとつずつ確認されている ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$)。本研究で単離、解析した *cpa3* はヒト精巣生殖細胞のアクチンを調節する新規の *cpa* subunit と考えられ、更なる解析によりアクチンの精巣生殖細胞における調節機構を明らかに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考えられたことから、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可能性がある。以上より、本研究は学位論文に値するものと認める。