

Title	マウス半数体精子細胞特異的Tact遺伝子の構造と発現制御機構
Author(s)	久野, 瑞枝
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44800">https://hdl.handle.net/11094/44800</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">〈a href="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">〈/a〉</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	ひさの瑞枝 久野 瑞 枝
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 18641 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	マウス半数体精子細胞特異的 <i>Tact</i> 遺伝子の構造と発現制御機構
論文審査委員	(主査) 教授 西宗 義武 (副査) 教授 山元 弘 教授 西原 力 教授 岡部 勝

#### 論 文 内 容 の 要 旨

精子形成は 1)生殖幹細胞である精原細胞の自己複製から細胞分化への切り替え、2)精母細胞における減数分裂、更には 3)半数体円形精子細胞から伸長精子細胞の段階を経て形態形成を行い完了する。伸長精子細胞になるとゲノム DNA に結合する蛋白質はヒストンからプロタミンに置き換わることにより極めて高度に凝縮するため遺伝子の転写は抑制されるが、その直前の減数分裂 pachytene 期と円形精子細胞は RNA polymerase II の活性が非常に高く、mRNA 合成が盛んである。これらの時期に転写される遺伝子は精巢生殖細胞特異的に発現されるものが多い。特に半数体細胞から精子への形態形成には、この時期特異的に発現する遺伝子群が重要な役割を持つと考えられるが、その実体はほとんど明らかにされていない。そこで半数体精子細胞特異的に発現する遺伝子の構造と発現制御機構、さらにはコードする蛋白質の機能を包括的に解析し、精子形成および受精の分子機構を明らかにすることを目的として、我々の研究室では半数体特異的サブトラクテッド cDNA ライブラリーを作成し、得られた cDNA クローンを単離し解析を進めている。本論文では、それらの中から、マウス精巢生殖細胞特異的に発現する 2 個の、アクチン様蛋白質をコードする遺伝子である *Tact1* と *Tact2* (Testis specific aptin-like 1 & 2) の構造および DNA メチル化による発現の制御機構に焦点をあてた研究成果を報告する。

*Tact1* と *Tact2* 遺伝子を含むゲノムクローンの解析を行ったところ、どちらもシングルコピーのイントロンレス遺伝子であり、第 4 染色体上に 2 kb の間隔で上流を突き合わせて逆向きに存在していた。*Tact* 遺伝子のヒト orthologue を解析したところ、マウス同様にイントロンを有さず、6.4 kb の間隔で上流を突き合わせて逆向きに存在していた。また塩基配列を比較するとマウス *Tact* どうしよりもマウス/ヒト orthologue どうしの方が相同性が高かった。これらの結果は、*Tact1* と *Tact2* 遺伝子は齧歯類と霊長類が分岐する前に、アクチンの祖先遺伝子から、レトロポジションにより *Tact* ができ、そののち遺伝子重複により *Tact1* と *Tact2* 遺伝子ができたことを示唆する。ほとんどのレトロポゾンが偽遺伝子となるのに比べ、*Tact1* と *Tact2* 遺伝子は転写・翻訳され機能する珍しいレトロポゾンであると言える。トランスジェニックマウスの解析により、*Tact1* と *Tact2* 遺伝子間の 2 kb の領域は、双方向性かつ半数体特異的に遺伝子制御を行うことが分った。マウス *Tact* 遺伝子とヒトの orthologue 遺伝子は、ORF のみならず、5' 上流領域と 5' 非 ORF も相同性が高いことから、上流領域に存在する保存された配列が半数体生殖細胞特異的な発現に関与している可能性がある。どちらの遺伝子もプロモーター領域には TATA-、CAAT-や GC-box といった配列はなく、cAMP responsible element (CRE) に似た配列が *Tact1* の 5' 上流領域と *Tact2* の 5' 非 ORF に存在することが分

った。一過性のプロモーター解析により、半数体精子細胞特異的転写因子である CREM $\tau$ が CRE 様配列を介して *Tact1* と *Tact2* の発現を活性化することが示唆された。

マウス *Tact1* 遺伝子の塩基配列を詳細に検討したところ、転写開始点下流 200 bp の ORF 内部に 575 bp からなる CpG アイランドを持っていることが分った。一方、上流は CpG をほとんど持たず、特にコアプロモーターには CpG は存在しなかった。脊椎動物細胞のゲノムでは、5'-CpG-3' 配列の C がメチル基修飾を受けることが知られている。またトランスポゾンやレトロウイルスを用いた遺伝子治療ベクターなどの外来性遺伝子の研究や、ハウスキーピング遺伝子の研究により、ゲノム上に散在する CpG の大部分はメチル化されているにもかかわらず、遺伝子上流 CpG の中には発現と関連して非メチル化状態になっているものがあるということが明らかとなっている。そこで *Tact1* 遺伝子における、遺伝子上のメチル化と遺伝子の発現制御との関係について検討した。その結果 *Tact1* 遺伝子は、その発現が見られない体細胞ではメチル化されていたが、*Tact1* 遺伝子が発現する精巣においては精子形成過程で徐々にメチル化されていないことが分った。また培養細胞を用いた遺伝子導入実験より、5' 上流ではなく ORF のメチル化により転写が抑制されることが分った。同様に ORF のメチル化は精巣生殖細胞においても転写を抑制した。これらの結果より、体細胞において ORF にある CpG アイランドのメチル化が *Tact1* 遺伝子自身の転写を抑制し、また精子細胞においては遺伝子の転写のために脱メチル化が必要であるということが明らかになった。

これまでに精子形成完了から受精までの間に、ゲノムは全体が強くメチル化されることが知られている。そこで、精子細胞で脱メチル化され発現したのち、*Tact1* 領域はいつメチル化されるのかを調べた。その結果、*Tact1* 遺伝子領域は精子が精巣を出たのち精巣上体尾部まではメチル化されていないが、輸精管末端まで移送されるとメチル化されることが明らかとなった。またそのメチル化には輸精管の環境が必要なのではなく、精巣を出て一定の時間が立つとメチル化されることが示唆された。精子が完成したあと、*Tact1* 領域がメチル化されることの意義を検討するために、受精卵内での *Tact1* の転写に対するメチル化の影響を検討した。その結果、受精卵内で *Tact1* 遺伝子は発現するが、その遺伝子内部のメチル化により転写が抑制されることが分った。これらのことより、*Tact1* 遺伝子は受精後の発現を抑制するために精子内でメチル化されると推測された。

## 論文審査の結果の要旨

精子の形態形成には、減数分裂以後発現する遺伝子群が重要な役割を持つと考えられるが、遺伝子構造の特徴と特異的な発現制御機構についてはほとんど明らかにされていない。久野君はこの点を明らかにすることを目的として、マウス精巣生殖細胞特異的に発現する *Tact1* と *Tact2* (Testis specific actin-like 1, 2) 遺伝子の構造および DNA メチル化による発現の制御機構に焦点をあてた研究を行った。

その結果、*Tact1* と *Tact2* 遺伝子は霊長類と齧歯類が分岐する以前にレトロポジションにより生じたイントロンレス遺伝子でマウス第4染色体上に逆向きに並んで存在することを示した。またトランスジェニックマウスの解析により両遺伝子間の 2 kb の領域は双方向性に半数体精子細胞特異的に強い転写活性を持つことを示した。そして一過性のプロモーター解析により、精巣特異的転写因子 CREM $\tau$ が *Tact1* と *Tact2* の上流に作用し、発現を活性化することを示した。

さらに、*Tact1* 遺伝子翻訳領域には CpG アイランドが存在し、体細胞において CpG のメチル化が *Tact1* の発現を抑制し、また精子細胞においては *Tact1* 遺伝子発現のために脱メチル化が必要であることを示した。また、*Tact1* 遺伝子は発現を終えたあと、精子が完成しても再メチル化されず、精子が輸精管末端まで移送された時にメチル化を受けることを示した。この *Tact1* 遺伝子内部のメチル化は受精後の発現抑制に重要であることを示した。

以上の研究結果は、雄性配偶子特異的発現制御機構の解明に大きく貢献することが考えられ、博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。