



| | |
|--------------|---|
| Title | 半数体精子細胞特異的遺伝子の解析 |
| Author(s) | 喜多村, 晃一 |
| Citation | 大阪大学, 2004, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/44807 |
| 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。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

| | |
|------------|---|
| 氏名 | 喜多村 晃 一 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士 (薬学) |
| 学位記番号 | 第 18635 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 | 半数体精子細胞特異的遺伝子の解析 |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 西宗 義武 (副査) 教授 前田 正知 教授 土井 健史 教授 岡部 勝 |

論文内容の要旨

我が国や欧米諸国では夫婦の 10 組に 1 組以上が不妊であると言われており、少子化問題の一因ともなっている。不妊症の原因は様々であるが半数が男性側に要因があり、そのほとんどが原因不明の精子形成障害である。精巣内で行なわれる精子の形態形成は、減数分裂後の半数体精子細胞から始まる。これは核の凝縮、ミトコンドリアの再構成、鞭毛や先体の形成をはじめとする著しい形態変化で、他の体細胞ではみられない現象である。従ってこの時期には、形態形成や後の精子機能に関わる特異的な遺伝子が数多く発現している。この精子細胞の形態形成期に特異的に発現している遺伝子群を単離するために、最初の精子形成が完了する生後 35 日のマウス精巣 cDNA ライブラリーから半数体精子細胞が初めて出現する直前の生後 17 日の精巣 mRNA を差し引くサブトラクテッド cDNA ライブラリーが作成された。本研究では、このサブトラクテッド cDNA ライブラリーから単離された 2 つの新規遺伝子 *haprin* と *ckt1r3*、および以前に同ライブラリーから単離された *oppo1* のヒト相同遺伝子の解析をおこなった。

haprin 遺伝子は配列解析の結果 RBCC モチーフを持つタンパク質をコードしており、その発現は精巣生殖細胞特異的で、発現時期は伸長精子細胞の出現以降であることが mRNA レベル、およびタンパク質レベルで確認された。精巣組織および成熟精子での免疫染色の結果、Haprin タンパク質は伸長精子細胞から成熟した精子までの先体領域に局在し、先体反応後に消失していた。同じモチーフを持つタンパク質が細胞質でエキソサイトーシス制御に関わること、また実際に細胞膜に孔を開けた精子で特異的抗体の作用がみられることから、Haprin は精子頭部細胞質領域に存在すると考えられる。Streptolysin O によって細胞膜を透過させた精子に抗 Haprin 抗体を添加すると、RBCC モチーフの RING finger ドメインに対する抗体が特異的に先体反応を阻害した。一般に RBCC タンパク質は、そのモチーフを介して細胞機能に必要な複合体をリクルートする足場タンパク質であると考えられている。Haprin の RBCC モチーフは先体反応に必要な何らかの複合体の形成に役割をもっており、RING finger ドメインに対する抗体はその複合体形成をブロックしたものと考えられる。また *haprin* 遺伝子はヒトにも存在しており、アミノ酸レベルでの高い相同性および、マウスと同様の発現プロファイルを示した。Haprin 遺伝子はヒトでも高度に保存されており、マウスと同様に先体反応に重要な役割を持つ可能性が示唆された。

ckt1r3 遺伝子のコードするタンパク質は N 末端側が塩基性アミノ酸に富み、特徴的なアラニンのクラスター、システインのクラスターを持っていた。遺伝子発現は精巣生殖細胞特異的で伸長精子細胞出現時期から検出された。約 18 kDa の *ckt1r3* タンパク質は伸長精子細胞および成熟精子の先体後域に存在する perinuclear theca (PT) に局在

した。この先体後域 PT は精子形態形成時には核の形成に関与し、また受精時には精子核とともに卵に侵入して卵の活性化誘導に関わっていると言われている。またマウスゲノム上には3つの関連遺伝子 *ckt1*、*ckt1r1*、*ckt1r2* が存在していた。ゲノム構造の解析から *ckt1*、*ckt1r1* は *ckt1r3* とともに X 染色体上で gene triplication によって生じ、*ckt1r2* は X 連鎖遺伝子より retroposition によって 9 番染色体上に生じた遺伝子だと考えられる。これらの遺伝子の 5' 側近傍の領域は Y 染色体に存在する *Zfy-2* のプロモーター領域と高い相同性を示した。*Zfy-2* は半数体精子細胞に特異的に発現することが報告されており、これらが共通の転写制御をうけている可能性が示された。CKT1R3 および関連タンパク質はいずれも Casein Kinase 2 (CK2) によるリン酸化部位を持っている。CK2 サブユニットの1つである α' をコードする遺伝子のノックアウトマウスは精子核の形態に異常が起きて不妊となることが報告されている。核の形態異常が観察されるのは伸長精子細胞からで、後方側の核膜が広がっており、先体後域 PT の「殻」としての機能に異常があると考えられる。このことから先体後域 PT に局在する CKT1R3 および関連タンパク質は精子形成における CK2 の重要な基質の1つであり、核の形態形成に関与している事が示唆される。

マウス *oppo 1* はその産物が outer dense fiber (ODF) に局在することが示された精巣特異的遺伝子である。ODF は精子鞭毛にユニークな構造で軸系を取り囲むように存在し、軸系を防護する以外でも精子の運動性を制御する役割があるものと考えられる。今回ヒト精巣 cDNA ライブラリーより単離された *h-oppo 1* 遺伝子はマウス *oppo 1* との相同性を示し、ヒト精巣に特異的に発現し、その産物は精子鞭毛に局在した。また、ヒト-マウス間でのゲノムの比較ではエクソン/イントロン構造に差異が見られるものの、染色体において syntenic な領域に存在しており、*h-oppo 1* はマウス *oppo 1* 遺伝子のヒトオースログであると考えられる。また、ゲノム構造の変化は多数の Alu 配列が挿入した結果であることが示唆された。ヒトとマウスの間で *OPPO1* のアミノ酸レベルの相同性は比較的低い値を示すが、これはエクソン/イントロン構造の違いを反映したものといえる。この違いの影響を受けない領域では 60-78% の identity を示した。*h-oppo 1* はヒトにおいても精子鞭毛の構造や運動性に関与する事が示唆され、*ODF4* の名でも呼ばれている。

本研究で新規遺伝子として単離し、機能解析を進めた半数体精子細胞特異的遺伝子 *haprin*、*ckt1r3* およびヒト *oppo1* 相同遺伝子は、それぞれ先体、perinuclear theca、鞭毛といった精子特有の構造と、その機能に関与していることが示された。これらの遺伝子のさらなる解析によって、精子機能における分子機構への理解が深まり、男性不妊症の診断・治療への手がかりとなることが期待される。

論文審査の結果の要旨

男性不妊症は高頻度に存在する障害で、その多くが原因不明の精子形成障害である。その原因を明らかにするためには精子の形態形成、機能の分子機構の解明が必要である。精巣内で行なわれる精子の形態形成は半数体精子細胞から始まる。これは減数分裂後の核の凝縮、ミトコンドリアの再構成、鞭毛や先体の形成をはじめとする著しい形態変化で、他の体細胞ではみられない現象である。本研究では半数体精子細胞で特異的に発現している2つのマウス新規遺伝子 *haprin* と *ckt1r3* を同定し機能解析を行なった。さらに *haprin*、*oppo1* のヒト相同遺伝子を同定しそれらの解析を進めた。その結果、RBCC モチーフを持つタンパク質をコードする *haprin* は半数体精子細胞特異的に発現し、そのモチーフを介して先体反応に必要なタンパク質複合体を形成していることを示した。また、*ckt1r3* のコードするタンパク質は N 末端側が塩基性アミノ酸に富み、システインのクラスター、CK2 のリン酸化サイトを持ち、伸長精子細胞および成熟精子の先体後域に存在する perinuclear theca (PT) に局在し、CK2 のターゲットとして精子核形成に関与する可能性を示唆した。さらに、*haprin*、*oppo1* のヒト相同遺伝子を同定し、マウスでの知見を活用できることを示した。以上の成果は、精子形態形成・機能における分子生物学的理解を進め、男性不妊症の診断・治療への手がかりに資するもので、博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。