The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	半数体精子細胞特異的カイネース Haspinと相互作用する分子の解析
Author(s)	前田, 奈緒子
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44808
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

【16】

氏　　名	前　田　奈緒子（まえだ なおこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　１８６４２　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カイネース Haspin と相互作用する分子の解析**
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

雄性生殖細胞の分化は幹細胞の増殖・分化、減数分裂、精子への形態変化と連続的に周期性を保ちながら行なわれる。哺乳類における雄性生殖細胞の増殖・分化は精巣内に折り畳まれて存在する精細管と呼ばれる細い管の中で行なわれ、管壁から順に精原細胞、精母細胞、半数体精子細胞と次々に分化の進んだ生殖細胞がほぼ同心円状に配列され、分化が完了した精子は精細管中心部内腔を通って精巣外に移送される。また、精巣内には支持細胞のセルトリ細胞やテストステロン産生細胞であるライディッヒ細胞が精巣内体細胞として存在する。

精子形成後期は、先体の形成や核凝縮、鞭毛の形成など体細胞では見られない特異な形態変化を起す。現在、精子形成メカニズムは様々な解析が進められているものの、未解明部分が多い。そこで私達の研究室では、生殖細胞の分化、特に半数体精子細胞の分化機構を分子レベルで理解するために、半数体精子細胞特異的に発現する遺伝子の包括的な解析を行なってきた。

その過程で、半数体精子細胞特異的に発現するセリン/スレオニンカイネース Haspin がサブトラクテッド cDNA ライブラリー（野生型マウス精巣ライブラリーから半数体精子細胞の存在しない mutant マウス精巣ライブラリーを差し引いた）より単離、同定された。これまでの研究から Haspin は DNA との結合能をもち、培養細胞に発現させると G1 期で細胞周期を停止させる事が明らかとなっている。さらに、最近作成された *haspin* 遺伝子欠損マウスは雄性不妊を示した。以上の事から、Haspin は半数体精子細胞の分化、分裂制御に重要な分子であると考えられる。Haspin についてさらなる知見を得るために、今回 yeast two hybrid 法を用いて Haspin と結合するタンパク質を単離し、解析を行なった。

その結果、Haspin と結合する分子として 10 種の遺伝子が得られた。また単離された遺伝子には微小管重合に関与する複数の遺伝子（*importin α6*、*CPAP*：*centrosomal P4.1 associated protein*、*RanBPM*）があり、これらの遺伝子は精巣、特に半数体精子細胞出現時期において高い発現を示した。この事から Haspin はこれらの分子と相互作用して微小管重合に関係する可能性が考えられる。そこでまず、*importin α6*、*CPAP* 遺伝子の精巣における発現について詳細に調べた。

importin α6 の mRNA は 4 kb と 2 kb の転写産物として検出され、前者は他の組織でも発現するのに対し、後者は半数体精子細胞特異的に発現が確認された。また今回 yeast two hybrid 法により単離された *importin α6* は新規の 5'UTR を含んでおり、新規の 5'UTR を含む mRNA は半数体精子細胞特異的に発現する事が明らかとなった。こ

の事から *importin α6* の 2 kb の mRNA の発現が半数体精子細胞出現時期より亢進するのは、promoter の使い分けによるものだと考えられる。また Importin α6 のタンパク質はアクロソーム（受精時に必要とされる種々の加水分解酵素類等のタンパク質を含む小胞の一種）に強く局在する事が明らかとなった。Importin α がタンパク質を輸送する働きを持つ事、また M 期での微小管重合の調節に関与する事から、Importin α6 はアクロソームの形成やタンパク質の輸送、アクロソーム反応時の細胞骨格の再編成に関与する可能性が考えられる。

一方 CPAP は mRNA が減数分裂期の精母細胞出現時期で発現が高く、タンパク質は半数体精子細胞出現時期で高い発現を示した。さらに、その局在はクロマトイドボディ（精細胞特異的な構造体でリボヌクレオプロテインや RNA 等を含む）と鞭毛に局在する事が明らかとなった。以前の報告より CPAP は中心体に存在し、微小管重合に関与する事が示唆されており、さらにクロマトイドボディの形成や配置に微小管が影響する事が示唆されている。この事から、CPAP は精巣内において微小管重合を調節し、クロマトイドボディや鞭毛の形成に重要な役割を果たすものと考えられる。

Importin α6、CPAP は in vitro immune complex kinase assay より Haspin の基質とはならなかったが、共に精細胞特異的な構造体に局在した。この事から、Haspin はこれら分子との相互作用を通じて、精子細胞の形態形成に関与するものと考えられる。

また別に、Haspin 結合分子として yeast two hybrid 法により単離された HABP1 (Hyaluronan binding protein 1) はこれまで精子形成過程および精子での発現が認められ、精子の運動能や受精への関与が示唆されている。したがって、HABP1 の精細胞への影響は Haspin との相互作用によって生じる可能性も考えられる。そこで、HABP1 と Haspin の関係について調べた。今回の免疫染色の結果は、HABP1 が特にアクロソームに強く局在するという以前の結果と一致し、さらに、ヒト培養細胞内で HABP1 は Haspin と結合して特異的にリン酸化される事が明らかとなった。これまでに HABP1 はヒアルロン酸存在化でリン酸化され、細胞内シグナル伝達経路の一つ、ホスホリパーゼ C-イノシトール三リン酸経路の活性を上げる事が示唆されており、また精子においてホスホリパーゼ C-イノシトール三リン酸経路はアクロソーム反応時のシグナル伝達経路の一部である事も示唆されている。さらにヒアルロン酸は精子鞭毛の動きを活発化し、運動能を獲得した精子では HABP1 のリン酸化が亢進する事が報告されている事から、HABP1 は Haspin のリン酸化によって精子の運動能やアクロソーム反応に関与するものと考えられる。

以上の結果から Haspin は Importin α6、CPAP、HABP1 と結合して、アクロソーム反応に伴うシグナル伝達、半数体精子細胞の細胞骨格の編成に関与することが推察される。今後、Haspin と相互作用する分子の関係についてさらに解析を進める事により、Haspin の機能解明、さらには精子形成への理解が深まるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

現在、精子形成メカニズムは様々な解析が進められているものの、未解明部分が多い。そこで、生植細胞の分化、特に半数体精子細胞の分化機構を分子レベルで理解するために、半数体精子細胞特異的に発現する遺伝子の包括的な解析が進められた。その中で半数体精子細胞特異的に発現するセリン/スレオニンカイネース Haspin が単離、同定された。Haspin は精子形成後期過程特異的に発現し、培養細胞内に異所発現させると G1 期で細胞周期を停止させる事から、半数体精子細胞の形態形成、精子機能に重要な働きをする分子であると考えられた。そこで今回、Haspin についてさらなる知見を得るために、yeast two hybrid 法により Haspin と結合するタンパク質が単離され、その解析が行なわれた。

その結果、Haspin と結合する分子をコードする 10 種の遺伝子が得られた。これらの中には微小管重合に関与する複数の遺伝子（*importin α6*、*CPAP : centrosomal P4.1 associated protein*、*RanBPM*）があり、これらの遺伝子は精巣、特に半数体精子細胞出現時期において高い発現を示した。その中で importin α6、CPAP は精細胞特異的な構造体（アクロソーム・クロマトイドボディ・鞭毛など）に局在し、Haspin と培養細胞内で結合する事が明らかとなった。この事から、Haspin はこれらの分子との相互作用を通じて、精子細胞の形態形成に関与するものと考えられる。

また、HABP1（Hyaluronan binding protein 1）がHaspinと結合し、Haspinによってリン酸化される事を明らかにした。これまでにHABP1はヒアルロン酸存在化でリン酸化され、細胞内シグナル伝達経路の一つ、ホスホリパーゼC-イノシトール三リン酸経路の活性を上げる事が示唆されており、また精子においてホスホリパーゼC-イノシトール三リン酸経路はアクロソーム反応時のシグナル伝達経路の一部である事も示唆されている。この事から、HABP1はHaspinによってリン酸化され、アクロソーム反応に関与するものと推察された。

以上の研究成果は、精子形成メカニズムおよび精子機能の解明に貢献すると考えられ、博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。