



Title	Rosbin : A Novel Homeobox-Like Protein Gene Expressed Exclusively in Round Spermatids
Author(s)	高橋, 徹
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45244
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

氏 名	たか はし とおる 高 橋 徹
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 8 5 2 9 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 医学系研究科臓器制御医学専攻
学 位 論 文 名	Rosbin : A Novel Homeobox-Like Protein Gene Expressed Exclusively in Round Spermatids (円形精子細胞で優位に発現している新規ホメオボックス様タンパク ROSBIN)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 奥山 明彦 (副査) 教 授 西宗 義武 教 授 村田 雄二

論 文 内 容 の 要 旨

(目的)

哺乳類における精子形成は、非常に複雑かつ長時間を要する過程を経て精原幹細胞が精子へと成熟分化する。この過程は大きく三つに分けることができる。精原細胞の自己増殖と分化の開始、精母細胞の減数分裂、半数体となった精子細胞の精子への形態形成の三つである。特に形態形成期ではアクロソームと鞭毛の形成、核の凝縮、細胞質の廃棄が時期特異的に生じ、これらは厳密に制御された遺伝子発現機構に支えられている。これは少なくとも二つ以上からなり立っている。一つはクロマチンの再構築であり、もう一つは特異的遺伝子配列に結合する転写因子である。これまでの研究から精子細胞の形態形成期には数種類の転写因子が発現していることが知られ、特に CREM (cAMP responsive element modulator) は Cre 配列に結合することで精子形成を制御していることが示されてきた。しかし精子細胞特異的遺伝子の中にはそのプロモーター領域に Cre 配列のない遺伝子もあり別の転写調節機構が存在するはずである。我々はこれまで半数体精子細胞特異的遺伝子を精巣サブトラクティブライブラリーから単離解析してきた。このライブラリーから得られた遺伝子 Rosbin はホメオボックス様ドメインを持ち新規の転写調節因子の可能性が考えられ、この解析を進めた。

(方法ならびに成績)

我々は以前に半数体精子細胞特異的遺伝子ライブラリーを全ての分化精細胞がそろそろ 35 日齢マウス精巣 cDNA から、未だ半数体精子細胞の出現していない 17 日齢マウス精巣 mRNA を差し引くことで作製した。このライブラリーより得た Rosbin cDNA の推定アミノ酸配列にはホメオボックス様ドメイン、転写活性化ドメイン、核移行シグナルおよび四カ所のプロテインキナーゼ A (PKA) リン酸化サイトが存在した。データベース検索からはヒトホモログ遺伝子の存在も示唆された。Rosbin mRNA は精巣および精細胞特異的発現を示し、マウスでは半数体精子細胞の出現する 17 日齢以降に発現していた。合成ペプチドで免疫したウサギより得た抗体を用いた ROSBIN タンパク質発現解析では精巣特異的に 3 週齢より発現がみられた。精巣組織では CREM の発現とほぼ同じ後期円形精子細胞の核に局限していた。GFP-ROSBIN 組み換えタンパク質を培養細胞に発現させるとこのタンパクは核に局限した。さらに ROSBIN が四カ所のプロテインキナーゼ A (PKA) によりリン酸化を受ける可能性のあるサイトを持つことからリン

酸化について検討した。マウス精巣溶解液より抗 ROSBIN 抗体を用いた免疫沈降法で ROSBIN と PKA が共沈降すること、抗 GFP 抗体を用いた免疫沈降法で GFP-ROSBIN 組み換えタンパク質が PKA でリン酸化されることを見いだした。

(総括)

精細胞の分化を研究する上で、特異的に発現している遺伝子を単離解析することはきわめて重要である。我々は精巣サブトラクティブライブラリーを用いて精子細胞に特異的発現をする遺伝子を多く解析してきた。その中で Rosbin は、ホメオボックス様ドメインと転写活性化ドメインを持ち遺伝子配列特異的に DNA に結合する新規の転写調節因子と考えられる。ROSBIN は精巣で PKA と会合し、ROSBIN 組み換えタンパク質が PKA でリン酸化されることから、PKA によるリン酸化により機能調節される可能性が示唆される。つまり ROSBIN は cAMP を介したシグナル伝達機構下に制御される可能性がある。CREM の遺伝子欠損マウスは円形精子細胞で分化が停止し、雄性不妊であり、ヒト精子形成不全症の一つのモデルとされる。ROSBIN は CREM と同時期に発現する転写調節因子の一つと考えられ、ヒトにも存在することを考えると Rosbin もまたヒト精子形成不全の原因遺伝子の一つの候補になる。

論文審査の結果の要旨

申請者らは半数体精子細胞特異的遺伝子ライブラリーから 5'RACE 法等を用いて新規遺伝子 Rosbin をクローニングし、その解析を行った。Rosbin 転写産物の全長は約 3 kb で、Homeobox domain、核移行シグナル、PKA リン酸化ドメインを含む転写調節因子と考えられる 89 kDa のタンパク質をコードしていた。ウェスタンブロッティング、免疫組織染色、培養細胞を用いたリコンビナントタンパク質の解析の結果、Rosbin タンパク質は非常に限られた段階の精子細胞核に局在し、PKA によりリン酸化されることが明らかとなった。精巣ではゴナドトロピンから cAMP と PKA を介してシグナルが伝達されることから PKA によってリン酸化される転写因子の重要性が理解される。欧米先進各国では生殖年齢カップルの 1 割以上が不妊に悩まされている。その半分は男性側要因で、その多くを原因不明の精子形成不全が占めているが、ヒトにおける Rosbin 相同遺伝子の存在からもこれが精子形成不全の責任遺伝子の一つである可能性が考えられる。本論文はこのような重要性に関連のある新規の遺伝子を報告したものであり、学位に値するものと認められる。