The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	A newly identified AMSH-family protein is specifically expressed in haploid stages of testicular germ cells
Author(s)	北島, 桂子
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45970
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　北島桂子（きたじま　けいこ）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学　位　記　番　号　第　１９０９１　号

学位授与年月日　平成 17 年 1 月 31 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　A newly identified AMSH-family protein is specifically expressed in haploid stages of testicular germ cells
（精巣の半数体細胞に特異的に発現する新規遺伝子 AMSH-family protein の解析）

論　文　審　査　委　員　（主査）
教　授　中村　敏一

（副査）
教　授　高井　義美　　教　授　谷口　直之

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

LIM キナーゼ（LIMK）は申請者の所属する研究室でクローニングされた新規のプロテインキナーゼである。LIMK には LIMK1 ならびに LIMK2 の２つのファミリー分子が存在し、同研究室でなされた LIMK2 欠損マウスの作製により、LIMK2 は精子形成に関与することが明らかにされた。申請者は精巣における LIMK2 の機能を明らかにするため、LIMK2 と相互作用する分子のクローニングを行う過程で AMSH-family protein（AMSH-FP）と名付けた新規の遺伝子をクローニングした。本研究ではとりわけ精巣における精子形成過程を中心に AMSH-FP の詳細な発現を解析するとともに、AMSH-FP の遺伝子配列から類推される構造的特徴に基づいて AMSH-FP の機能を考察した。

【方法ならびに成績】

LIMK2 に結合する分子を探索する過程で得られた新規遺伝子の全長 cDNA をクローニングした。cDNA から予想される一次構造を解析したところ、本分子は Jak2/Jak3-STAM 複合体の下流で、IL-2 や GM-CSF などのサイトカインによる細胞内シグナル伝達に関わる Associated Molecule with SH3 domain of STAM（AMSH）と相同性を有することから、この新規遺伝子をAMSH-family protein（AMSH-FP）と命名した。脳ならびに精巣の cDNA ライブラリーのスクリーニングにより、AMSH-FP には選択的スプライシングの違いにより２つのバリアント（AMSH-FP α と AMSH-FP β）が存在することを明らかにした。両バリアントには c-Jun の活性化に関わる JAB ドメインと相同性を有する配列が保存されており、AMSH-FP α は 437 アミノ酸からなり核内移行シグナルを有する。一方、AMSH-FP β は 271 アミノ酸からなり、これは AMSH-FP α の N 末端 166 アミノ酸残基を欠失した領域に相当している。AMSH-FP α、－FP β に対する cDNA を含む発現ベクターをそれぞれ構築し COS-7 細胞で発現させたところ、予想されるサイズの蛋白質が合成されることが確認された。両バリアントの mRNA の発現を解析したところ、AMSH-FP α が胸腺や脾臓などの免疫系組織を始めとする組織に幅広く発現しているのに対し、AMSH-FP β は精巣に限局して発現していることを見いだした。

上記の結果ならびに LIMK2 が精子形成に関与することをふまえ AMSH-FP β の精巣特異的な発現様式を詳細に検討した。生殖細胞は未分化なものから順に精細管の基底膜より内腔に向かって配列し、精祖細胞から精母細胞への分化成熟過程、精母細胞から精娘細胞への第一減数分裂過程、精娘細胞から精子細胞への第二減数分裂過程、精子細胞

から精子への精子変態過程の４段階を経て精子は成熟する。AMSH-FPβは幼若精巣、精子形成不全や腹腔内停留状態の精巣では発現が認められず、成熟精子の形成開始期である生後 20 日目以降の精巣で発現を確認した。またAMSH-FPβは減数分裂終了後の円形精子細胞に限局して発現し、未分化精細胞やセルトリ細胞、ライディッヒ細胞に発現を認めなかった。一方、LIMK2 の精巣特異的バリアント体 tLIMK2 は精母細胞から円形精子細胞に至る減数分裂期に発現しており、AMSH-FPβと tLIMK2 の機能的関連性が示唆された。

【総括】

これまでに選択的スプライシングにより精巣特異的に発現する様々な遺伝子が、精子形成に関わることが報告されている。AMSH-FPβもまた選択的スプライシングにより精巣特異的に発現が制御されているとともに、とりわけ減数分裂直後の円形精子細胞に限局して発現することから、精子の成熟過程に重要な機能を担っていると考えられる。精子形成過程ではクロマチンの再構成や濃縮、鞭毛の形成、アクロゾームの発達など劇的な形態変化が見られ、精子成熟過程の後半では mRNA の転写は行われず、蛋白質合成の調節機構が存在することが知られている。AMSH-FPは転写因子 c-Jun の活性化に関与する Jab1 と相同性を有することから、AMSH-FPβが円形精子細胞で高発現し、細胞質内で c-Jun と複合体を形成して核内へ移行し、精子成熟に必要な遺伝子群の転写に働く可能性が考えられる。また tLIMK2 が恒常的活性化型として精細胞の核内でリン酸化を介したコフィリン凝集体の核外排除に働くこと、細胞骨格系の制御に重要な役割を担っていることから、AMSH-FPβが tLIMK2 の制御を受け、精子の形態形成に関わっている可能性が考えられた。一方、AMSH-Smad 複合体が Bone Morphogenic Protein（BMP）誘導性の増殖阻害やアポトーシスを抑制することや、円形精子細胞に発現している BMP-8a/b が精子形成の制御に関わることから、AMSH-FPβが BMP シグナルや LIMK2 によるリン酸化制御などを介して、精子細胞成熟過程に重要な機能を担っている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

LIM キナーゼ（LIMK）は LIM ドメインと呼ばれるモチーフ構造を有する新しいキナーゼ分子で、低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリー分子による活性化を受け、アクチン脱重合因子であるコフィリンをリン酸化するアクチン細胞骨格の再構築に重要な制御因子であるが、個体レベルにおける LIMK の生理機能は依然として不明である。LIMK には LIMK1 と LIMK2 の２つのタイプが存在するが、そのうち LIMK2 の遺伝子欠損マウスでは精巣重量が野生型に比べて減少し、精子形成異常が認められた。申請者は LIMK2 の精巣における機能を解析するため、LIMK2 と細胞内で相互作用する分子の探索を行い、新規の遺伝子をクローニングした。この分子が Jak-STAM 複合体の下流で IL-2 や GM-CSF などのサイトカインによる細胞内シグナル伝達に関わる Associated Molecule with SH3 domain of STAM（AMSH）と相同性を有することから、AMSH-family protein（AMSH-FP）と名付け、選択的スプライシングにより AMSH-FPα、-FPβの２つのバリアントが存在することを認めた。このうち AMSH-FPβは成体の精巣に限局して発現しており、in situ hybridization 法を用いて詳細に発現部位を検討した結果、減数分裂終了後の円形精子細胞に限局して発現していることを明らかにした。つまり AMSH-FPβが LIMK2 の制御下でリン酸化を介したコフィリンーアクチン凝集体の核外排除機構に関わり、精子の形態形成に重要な役割を担っている可能性を初めて明らかにした研究である。本研究は学位申請者によってなされた研究であり、LIMK2 および AMSH-FPβの精子形成に関わるシグナル経路を初めて明らかにした点で極めてオリジナリティーの高い研究成果である。

以上の理由から、北島桂子氏の論文は博士の学位授与に値するものと考えられる。