



Title	Cloning and characterization of a mouse spergen-1 localized in sperm mitochondria
Author(s)	松岡, 庸洋
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46313
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	まつ 松 　　おか 岡 　　やす 庸 　　ひろ 洋
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 20140 号
学位授与年月日	平成18年3月24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	Cloning and characterization of a mouse <i>spergen-1</i> localized in sperm mitochondria (マウス精子ミトコンドリアに局在する <i>spergen-1</i> の単離と解析)
論文審査委員	(主査) 教授 奥山 明彦 (副査) 教授 仲野 徹 教授 岡部 勝

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

近年、わが国や欧米諸国では不妊症カップルが増えており、全夫婦の割以上が不妊症である。その原因の半分は男性側にあるとされているが、男性不妊の原因のじつに半分以上が特発性精子形成障害、つまり原因不明である。

精子の成熟は、生殖幹細胞からの増殖分化、減数分裂、形態形成といった生殖細胞に特徴的な過程からなる。これらの過程は緻密に制御されており、正常に行われるには、生殖細胞ならびにそれを取り巻く体細胞においても空間、時間特異的な遺伝子群の発現が正確に行われることが必要とされる。しかし、正常な精子形成のメカニズムに未だ明らかでない部分が多いため、現状における男性不妊症の診断、治療には限界がある。

そこで、精子形成の分子メカニズムを明らかにするために、マウスをモデル動物として用い、なかでも生殖細胞特異的である半数体精子細胞に着目し、そこで特異的に発現する遺伝子群を単離、解析することとした。

〔方法ならびに成績〕

1) 半数体精子細胞特異的サブトラクティッドライブラリーの作成および *spergen-1* cDNA の単離

成熟精子の出現する 35 日齢マウス精巣 cDNA ライブラリーから半数体精子細胞が出現する以前である 17 日齢マウス精巣 mRNA を差し引くことにより半数体精子細胞特異的遺伝子が濃縮されたサブトラクティッドライブラリーを作成し、このライブラリーよりクローニングを順次行った。そのうちのひとつ、TISP7 (0.7 kb) をプローブとしてマウス精巣 cDNA ライブラリーから 1.2 kb の *spergen-1* cDNA を得た。open reading frame は 465 塩基であり、154 アミノ酸からなる 18 kDa の Spergen-1 蛋白をコードしていた。既知のドメイン、モチーフは認めなかった。

2) *spergen-1* cDNA の発現解析

種々の組織におけるノザンプロット解析では精巣特異的な発現を認めた。Age については、23 日齢以前のマウス精巣では発現しておらず、29 日齢から発現がみられた。分化した精細胞を持たないミュータントマウスや停留精巣モデルマウスでは発現がみられなかった。また、精巣内においては、体細胞であるセルトリ細胞、ライディッヒ細胞には発現しておらず、生殖細胞に特異的に発現していた。

3) 抗 Spergen-1 抗体の作成とマウス精巣、精子における蛋白発現解析

C 末端の 65 アミノ酸を抗原としてラットに免疫し特異的抗体を作成した。この抗体がレコンビナント Spergen-1 蛋白を特異的に認識することを確認後、ウェスタンブロット解析、免疫組織化学染色に用いた。種々の組織におけるウェスタンブロット解析では、精巣において 18 kDa のバンドを一本認めた。Age については、4 週齢以降に発現を認め、これは mRNA の発現時期と合致した。生殖細胞を核、ミトコンドリア、細胞質に分画し、ウェスタンブロット解析を行ったところ、Spergen-1 蛋白はミトコンドリアの画分に存在することが明らかとなった。また、マウス精巣切片の免疫組織化学染色では、step 13 以降の伸張精子細胞の尾部にシグナルを認め、これはミトコンドリアの局在と一致すると考えられた。一方、精子の免疫組織化学染色でも、ミトコンドリアの存在する中片部にシグナルを認めた。さらに、精子の細胞内分画におけるウェスタンブロット解析をおこなったところ、ミトコンドリアの外膜に局在が確認された。

[総括]

Spergen-1 はデータベースサーチ上、ラット、ヒトにも発現しており、比較的良好に保存されている。ラットにおける解析では N 末端にミトコンドリアターゲティングシグナルが、C 末端にミトコンドリアを凝集させる領域があるとされている。

精子ミトコンドリアは中片部をらせん状に取り巻いているという、体細胞では観察されない、特徴的な形態をとっている。精子ミトコンドリアに存在する Spergen-1 は伸張精子細胞の後期から出現する。この時期は伸張精子細胞が劇的な形態変化を遂げる時期であり、ミトコンドリアが形態を変え、精子の中片部に位置すべく配置され始める時期でもある。Spergen-1 はミトコンドリアの外膜に発現しており、ミトコンドリア凝集にもかかわっていることから、精子に特徴的な、ミトコンドリアのらせん状の形態をとるのに必要であると推測された。

論文審査の結果の要旨

男性不妊症の半分以上が特発性精子形成障害、つまり原因不明の、分化生殖細胞の減少あるいは消滅である。しかし、正常な精子形成のメカニズムに未だ明らかでない部分が多いため、現状における男性不妊症の診断、治療には限界がある。

本研究では精子形成の分子メカニズムを明らかにするために、マウスをモデル動物として用い、劇的な形態変化をきたす半数体精子細胞に着目し、そこで特異的に発現する遺伝子を単離、解析した。新規の蛋白、Spergen-1 は step 13 以降の半数体精子細胞のミトコンドリアに発現し、成熟した精子でもミトコンドリアに局在することが明らかとなった。また、細胞内分画による解析により、ミトコンドリア外膜に局在することが示された。

本研究により、精子ミトコンドリアの特徴的な形態に Spergen-1 が関与していることが示された。精子形成メカニズムの解明に寄与するものと判断され、学位の授与に値すると考えられる。