

Title	Identification and Characterization of Stem Cell-Specific Transcription of PSF1 in Spermatogenesis
Author(s)	韓, 瑛璐
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49964
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	韓 瑛 瑠
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 22740 号
学位授与年月日	平成21年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学位論文名	Identification and Characterization of Stem Cell-Specific Transcription of <i>PSF1</i> in Spermatogenesis (幹細胞分裂に関与する PSF1 の幹細胞特異的遺伝子発現調整の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 高倉 伸幸 (副査) 教授 岡田 雅人 教授 野島 博

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

造血幹細胞は自己複製能と多分化能を併せ持ったユニークな細胞であり、これまでに我々は造血幹細胞特異的cDNAライブラリーから幹細胞に特異的に発現する新規遺伝子PSF1を同定した。本研究ではPSF1の遺伝子発現調節機構を解析する目的として研究を遂行した。

〔 方法ならびに成績 〕

我々はPSF1抗体を用いた免疫組織染色において、PSF1蛋白の発現は成体マウス精巣では未分化幹細胞であるspermatogonia特異的であることを示してきた。しかし今回、in situ hybridization法では、mRNAレベルにおいて、PSF1はspermatogoniaだけでなく、spermatocytesにも発現していることを解明した。以上から、spermatocytesにおいては、PSF1蛋白の早期変性により蛋白発現が抑制されており、その原因として、spermatogoniaとspermatocytesでは異なるmRNAの産生が生じているのではないかと予想した。そこで、5' RACE法により大腸癌細胞colon26、マウス胎児、および成体マウス精巣からmRNAを調整し、PSF1の転写開始点を解析した。その結果、colon26と胎児由来のmRNAにおいて372bp前後のシングルバンドが得られたが、精巣においてこれよりやや小さなPCR産物による広いバンドが観察された。塩基配列を解析したところ、colon26と胎児からはPSF1の転写開始点が1ヶ所のみ検出されたが、精巣に

おいては転写開始点が少なくとも3ヶ所検出された。この結果はオリゴキャピング法により調整されたcDNAライブラリーを用いた解析結果と一致していた。そこで成体マウス精巣における、この異なるPSF1のmRNA発現をさらに詳細にするために、7週齢の成体マウス精巣からspermatogoniaとそれ以外のspermatocyteを含む分化細胞をセルソーターにより分画し、未分化幹細胞と分化細胞におけるPSF1の転写開始点を比較した。その結果、spermatogoniaにおいては、胎児やcolon26細胞で観察されたのと同様に、1ヶ所に転写開始点が集中していたが、分化細胞において3ヶ所の転写開始点が存在することが判明した。このことから精巣においては少なくとも異なる3つのPSF1mRNAが存在すると考えられた。

〔 総 括 〕

以上の結果より、精巣ではspermatogoniaおよびspermatocytesとともにPSF1mRNAは発現しているが、その転写開始点が異なっていることが判明した。spermatocyteにおいては、spermatogoniaには観察されないshort formのPSF1 mRNAが多く発現しており、このshort form由来の蛋白の発現は不安定であるために分解が促進し、免疫組織染色で解析してもspermatocytesにおいて蛋白としての発現が見いだされないのではないかと考えられる。PSF1の1st intronより5 Kb上流領域の塩基配列を解析したところ、PSF1プロモーターには幹細胞で特異的に機能する複数の転写因子の結合モチーフが存在していた。現時点ではまだ想像の域を超えないが、幹細胞から分化細胞への分化段階において、これら転写因子の結合様式により、異なる転写開始点の変化がもたらされ、幹細胞の分裂あるいは分化といった運命決定がなされている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

PSF1の発現は増殖活性の高い組織に顕著に発現し、マウスの初期発生に重要な機能を持つことが報告されてきた。免疫染色によりPSF1蛋白の発現は成体マウス精巣では未分化幹細胞であるspermatogonia特異的であることが示されてきた。しかし本研究ではPSF1のmRNAはspermatogoniaだけではなくspermatocyteにも発現していることが示された。PSF1の転写開始点を解析すると、spermatogoniaにおいては、Full-length (long-form) のPSF1a mRNAのみが発現していたが、spermatocyteを含む分化細胞においては、short-formのPSF1 mRNAも発現していた。すなわち成体マウス精巣において各々の転写開始点から転写されたmRNAから、少なくとも3種類のアミノ酸長が異なる転写産物ができると示唆された。さらに精巣においてPSF1上流5kbのプロモーター領域の核酸配列を解析したところ、幹細胞特異的に発現する転写因子の結合サイトが複数あり、この転写因子の発現量や結合様式の相違から、異なる転写開始点から転写される複数のPSF1 mRNAが生産される可能性が示唆された。現時点ではまだ推測ではあるが、spermatocyteにおいてPSF1mRNAの発現が観察されるのにも関わらず、PSF1蛋白が検出できない理由として、short formのPSF1蛋白質は早期変性をうけ消失していることが予想された。

以上、本研究はPSF1の特殊な転写開始機構が未分化細胞の自己複製能と多分化能に関わることを示唆しており、現在まだ不明とされる幹細胞の分化および増殖に新たな研究視点を与えたと判断され、博士(医学)の学位授与に値する研究であると評価された。