The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Systematic characterization of human testis-specific actin capping protein β3 as a possible biomarker for male infertility
Author(s)	惣田, 哲次
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61590
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	惣田　哲次
論文題名 Title	Systematic characterization of human testis-specific actin capping protein β3 as a possible biomarker for male infertility （男性不妊症診断バイオマーカー候補としてのヒト精巣特異的アクチンキャッピングプロテインβ3の系統的解析）

論文内容の要旨

〔目　的〕

アクチンキャッピングプロテイン（CP）はαおよびβサブユニットからなるアクチン線維の重要な制御タンパクである。αサブユニットの一つ、CPα3は精巣特異的に発現しており、mutant mouseの解析や男性不妊症患者精液のプロテオミクス解析などから男性不妊症の一因子である可能性が報告されている。一方、ヒトCPα3（hCPα3）とタンパク複合体を形成すると推測されるヒトCPβ3（hCPβ3）もまた重要な男性不妊症の一因子になることが推測されるが、これまで研究はあまり進んでいない。本研究はhCPβ3の男性生殖細胞における発現解析を行い、男性不妊症との関連について解析することを目的とした。

〔方法ならびに成績〕

bovine *cpβ3*の*in silico*ホモロジー検索から特異的エクソン1を有するCAPZB (Homo sapiens capping protein muscle Z-line, beta) gene transcript variant 4が*cpβ3*のヒトオルソログ遺伝子であることが判明した。RT-PCRによりヒト組織中における*hcpβ3* mRNAは精巣特異的に発現していた。ヒト精子を用いたWestern Blottingにより34kDaにhCPβ3のsingle bandを認めた。さらに蛍光免疫組織学的染色により精子頭部postacrosomal regionにhCPβ3のタンパク局在を認め、hCPα3との二重免疫染色では局在が完全に一致していた。hCPα3およびhCPβ3のタンパク複合体解析のため、リコンビナントタンパクhCPβ3-EGFPおよびhCPα3-mRFP1が細胞内で同時発現するベクターを作成し、HEK293細胞へLipofection法による遺伝子導入の後タンパク抽出を行った。抗GFP抗体を用いた共免疫沈降により、これらリコンビナントタンパクがタンパク複合体を形成していることが示され、hCPα3とhCPβ3がタンパク複合体を形成することが示唆された。精巣生検組織を用い、生殖細胞の精子形成過程各段階におけるhCPβ3の発現解析を行った。hCPβ3は精祖細胞の細胞質より発現を開始し、精母細胞以降細胞質に強い発現を認めた。精子細胞では先体や鞭毛の形成に伴い大きな局在変化を認めた。さらにhCPα3との二重免疫染色ではhCPα3とhCPβ3の局在は完全に一致しており、hCPα3およびhCPβ3はタンパク複合体を形成しながら精子の形態形成に関わっていることが示唆された。男性不妊症との関連解析のため、妊孕性の確認された正常ボランティア（正常群：20名）および乏精子症あるいは精子無力症と診断された男性不妊症患者（不妊群：21名）を対象に、射出精子を用いた免疫組織学的染色によるhCPα3およびhCPβ3の発現解析を行った。hCPα3とhCPβ3がともに精子頭部に染色されているものを正常染色精子と定義し、染色欠損や局在異常を認める精子を異常染色精子と定義した。ランダムに100個の精子を選択し異常染色精子の割合を解析した。不妊群では有意に異常染色精子を高頻度に認めた（正常群：31.2±2.5%、不妊群：52.4±3.0%、$P<0.001$）。さらに正常形態精子に限った検討においても不妊群において異常染色精子を高頻度に認めた（正常群：22.5±2.1%、不妊群：39.9±2.9%、$P<0.001$）。

〔総　括〕

hCPβ3はhCPα3とタンパク複合体を形成しながら、精子の形態形成のみならず妊孕能に関わる精子機能に関与していることが示唆された。hCPα3およびhCPβ3は男性不妊症患者の成熟精子において高頻度に発現異常を認め、精子の妊孕能を予測する新たなバイオマーカーとして用いることが期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　惣田　哲次

論文審査担当者		（職）	氏　　名
	主　査	大阪大学教授	野々村　祝夫
	副　査	大阪大学教授	木村　正
	副　査	大阪大学教授	武村　英一

論文審査の結果の要旨

精巣特異的アクチンキャッピングプロテインにはα3およびβ3サブユニットがあり、特にα3サブユニットは近年男性不妊症との関わりが推測されている。一方、β3サブユニットについてはその重要性が推測されるにも関わらず、ヒトにおいて未だ報告されていない。本研究ではアクチンキャッピングプロテインβ3について系統的に発現解析を行い、さらに男性不妊症患者から得られた精液の臨床検体を用いて、アクチンキャッピングプロテインα3およびβ3の発現異常と男性不妊症との関わりについて詳細に解析を行った。

本研究はヒト精巣特異的アクチンキャッピングプロテインβ3についての初めての報告であり、さらにアクチンキャッピングプロテインβ3はα3と伴に男性不妊症患者における精子の妊孕能を予測する新たなバイオマーカーとして用いることが期待されることを初めて示したものである。以上より、本研究の成果は博士（医学）の学位授与に値すると考えられる。