

氏名(本籍)	かしわ ばら しん いち 柏原真一(埼玉県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第1071号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	BIOCHEMICAL STUDIES ON MAMMALIAN SPERM ACROSIN (哺乳動物精子アクロシンに関する生化学的研究)
主査	筑波大学教授 理学博士 新井勇治
副査	筑波大学教授 理学博士 宗像英輔
副査	筑波大学教授 農学博士 近宗干城
副査	筑波大学助教授 農学博士 星野貴行

論 文 の 要 旨

哺乳動物精子アクロソームに存在する(プロ)アクロシンは、そのトリプシン様のセリンプロテアーゼ活性とレクチン様の糖結合活性により、受精に際して重要な役割を果たしていると考えられている。その一次構造、プロアクロシンから成熟型アクロシンへの活性化機構およびアクロシン遺伝子の精子形成過程における転写・翻訳時期を明らかにすることは、受精を理解する上で重要である。

本研究では、これらの点を解明することを目的として、マウスアクロシンのcDNAクローニングを行い、またその発現様式について検討した。さらに、アクロシン欠損マウス作製の予備実験として、ES細胞におけるアクロシン遺伝子のジーンターゲティングを行った。

まず、マウスプロアクロシンの一次構造の推定とその活性化機構について検討した。マウスアクロシンのcDNAクローニングを行い、得られたcDNAの解析をした結果、アクロシンは初め433残基の一本鎖プレプロペプチドとして合成されることが明らかとなった。シグナルペプチドを除いたマウスプロアクロシンは、ブタおよびヒトプロアクロシンとアミノ酸レベルでそれぞれ61.7%、65.3%の相同性を示し、セリンプロテアーゼ活性の発現に必須である電荷リレー系を構成する活性残基(His⁷⁰, Asp¹²⁴, Ser²²²)、基質認識部位(Asp²¹⁶)、2個所のアスパラギン結合型糖鎖付加可能部位(Asn³, Asn¹⁹²)、12個のシステイン残基の位置、さらに活性化の際の切断部位付近の配列は、完全に保存されていた。マウスプロアクロシンの活性化は、まずC末端から23残基が遊離し、ついでN末端側の軽鎖配列と重鎖配列間のArg²³-Ile²⁴の切断により、軽鎖と重鎖が2つのジスルフィド結合で架橋された2本鎖構造の中間型アクロシンになる。さらに、重鎖のC末端より26残基と50残基が段階的に遊離することにより、23残基の軽鎖と295残基の重鎖からなる成熟型アクロシンへと変換さ

れることが推測された。マウス、ブタとヒトの3種間でC末端側の最終切断点がArg-Pro結合であり、トリプシンはこの結合を切断できないのに対して、アクロシンは可能であるという点で興味深い。また、C末端プロ領域を含むマウスプロアクロシンのC末端143残基は、他のセリンプロテアーゼには存在しないアクロシン特有の領域であり、しかもプロセッシング部位以外は、種間においてその相同性が他の領域に比べて低いことから受精において何らかの種特異的機能を担っているのではないかと考えられた。

ついで、アクロソームの形成機構を分子レベルで解明するために、アクロシンの精子形成過程における転写・翻訳時期の検討を行った。先に単離したマウスアクロシンcDNA断片をプローブとしてノーザンブロット解析を行った。アクロシン遺伝子の発現は精巣特異的であり、その1.8kbのmRNAは、生後18日目で検出されはじめ、それ以降成熟に伴い増加していった。さらに詳細な検討を行うために、成熟マウス精巣からコラーゲナーゼとトリプシンにより分散した精細管細胞を調製し、この精子形成細胞懸濁液を2~4%BSA濃度勾配を用いて重力沈降により分画し、パキテン期精母細胞、前期(球状)精細胞および後期精細胞と残余小体を精製した。さらにパキテン期精母細胞については、その精細管細胞が半数体細胞にまで分化していないことが知られている17日齢マウス精巣からも調整した。精製した各種精子形成細胞より調整したRNAに対してノーザンブロット解析をした結果、アクロシン遺伝子の発現は減数分裂期のパキテン期精母細胞で既に開始されており、そのmRNAレベルは前期精細胞で最大に達し、その後著しく減少することが明らかになった。残余小体画分で検出された若干のアクロシンmRNAは、それ以前に転写されたものか、あるいはこの画分に混在する前期精細胞に由来するものと考えられた。さらにアクロシンmRNAは、前期精細胞においてのみならず、パキテン期精母細胞においてもポリソームを形成しており、翻訳されていることが示された。坑ブタアクロシン抗体を用いた研究より、アクロシンの生合成は、長い間前期精細胞でのみ行われるものと考えられていたが、本研究の結果はこれを覆すものである。

さらにアクロシン欠損マウス作製の予備実験として、マウスアクロシン遺伝子のジーンターゲティングを行った。マウスアクロシン遺伝子のエキソン2にネオマイシン耐性遺伝子(neo)を挿入し、さらに染色体遺伝子断片部の5'末端に単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ遺伝子(HSV-tk)を連結させたターゲティングベクターを構築した。このベクターは、neoの5'側で8.1kb、3'側で1.7kbの相同領域を有し、neoの相同領域を有し、neoの挿入によりアクロシン遺伝子は不活性化され、そのセリンプロテアーゼ活性は失われる。上記ベクターを線状にし、エレクトロポレーションによりES細胞株(A3-1, 129/Svマウス由来)に導入後、細胞懸濁液をG418耐性フィーダー細胞にまいた。24時間後に357 μ g/mlのG418、ついで48時間後に2 μ MのGANCを加え、エレクトロポレーション後8日目に両薬剤耐性コロニーを拾いあげた。4 \times 10⁷細胞当たり438個の両薬剤耐性コロニーが得られた。両耐性のコロニーであっても、相同組換え体でないことが多いため、これらコロニーに対してPCRによるスクリーニングを行った。5'側のプライマーはneo遺伝子の3'側の塩基配列、3'側のプライマーはベクターには含まれないゲノム上の塩基配列を用い、相同組換えの場合のみ1.8kb断片の増幅がおこるようにした。287個についてPCRによるスクリーニングを行った結

果、15個の陽性クローンが得られた。相同組換えの頻度は1/19G418^R+GANC^R, 1/144G418^R, 1/1.8×10⁶細胞であった。さらにこれら相同組換え体について、サザンブロットによりランダムインテグレーションのないことを確認した。これらのクローンについて *in vitro*での分化能を調べたところ、浮遊培養に開始直後に細胞塊を形成し、数日後には胚様体を形成した。この胚様体をゼラチン処理した細胞培養用ディッシュに移した場合、その直後にディッシュにはりつき、島状の細胞塊を形成した。そして3週間の間に、神経様細胞、筋様細胞および自律的に収縮を繰り返す心筋様細胞へ分化し、多分化能を有することが示され、キメラマウスの作製に有効であることが判明した。

審 査 の 要 旨

本研究は、精子アクロソームに存在するアクロシンの受精に際しての役割を解明することを目的として、分子生物学的観点から検討したものである。

まず、マウスアクロシンのcDNAクローニングを行い、プレプロアクロシンの一次構造を推定し、さらに活性型アクロシンへのプロセッシング機構を明らかにした。

ついで、マウスアクロシンのcDNAを用いたノーザンブロット解析を行い、アクロシン遺伝子の発現が、精巣特異的であることを示した。さらに、日齢の異なるマウス精巣、分画した各種精子形成細胞について同様の解析を行い、減数分裂期のパキテン期精母細胞でその転写・翻訳が開始されること、前期精細胞で最も活発に合成されることを明らかにした。アクロソームの形成が減数分裂期に開始されることを示したのは本研究が初めてである。

さらに、マウスアクロシン遺伝子のエキソンにネオマイシン耐性遺伝子を、ヘルペスウイルスチミジンキナーゼを相同領域の端に連結させたターゲティングベクターを構築し、ES細胞に導入した。このES細胞は多分化能を有していた。これは、アクロシン欠損マウスの作製に有効な道を開くものとして高く評価される。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。