【106】

氏　名（本籍）	本多　新（茨　城　県） （ほんだ　あらた）
学位の種類	博　士（農　学）
学位記番号	博　甲　第　3089　号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	Identification and Characterization of Mouse Sperm Serine Protease TESP5 （マウス精子セリンプロテアーゼTESP5の同定と機能解析）

主　査	筑波大学教授	農学博士	馬　場　　忠
副　査	筑波大学教授	農学博士	小　林　達　彦
副　査	筑波大学教授	農学博士	深　水　昭　吉
副　査	筑波大学教授	農学博士	田　仲　可　昌

論文の内容の要旨

受精は，生物が種を存続させていくための重要な生命現象である。その現象に関する研究は長い歴史があるが，その分子機構となるといまだに不明な点が数多く残されている。受精に関与する遺伝子のノックアウトマウスが作製・解析されているが，実際に従来の受精に関する仮説を立証した例は少なく，逆に仮説を覆した研究結果が報告されつつある。精子の卵透明帯通過についても同様の結果が得られており，トリプシン様セリンプロテアーゼアクロシンの欠損マウス精子が卵透明帯を通過できることが証明されている。

本論文では，アクロシンに代わって卵透明帯通過で機能する新規セリンプロテアーゼの探索と，その構造と機能の解析を目的として研究を行っている。まず，マウス精子で見いだされる42キロダルトンプロテアーゼの精製を試みたが非常に微量であるために，マウス精巣で発現しているセリンプロテアーゼに着目して42キロダルトンプロテアーゼの遺伝子単離を試みた。次いで，マウス精巣のESTデータベースより得られたA144961クローンの配列をプローブとしてマウス染色体遺伝子ライブラリーをスクリーニングし，単離した遺伝子クローン（TESP5と命名）を解析した。TESP5は6個のエクソンからなるセリンプロテアーゼであり，これまでに明らかになっているtestisin，esp-1，およびtryptase4と同一であった。また，TESP5遺伝子の発現は精巣特異的であった。

抗TESP5抗体を用いて精巣と精子のタンパク質抽出液のウエスタンブロット分析を行ったところ，抗体と反応する42キロダルトンタンパク質を検出した。精子タンパク質の免疫沈降を行うことによって，TESP5は42キロダルトンプロテアーゼに相当することを明確にした。また，精子の免疫染色を行い，TESP5が精子頭部，尾部，および残余小体に局在していることも見いだした。一方，TESP5はそのC末端に疎水性に富むアミノ酸領域を含んでおり，膜タンパク質として精子に存在している可能性があったので，精子タンパク質を非イオン性界面活性剤トリトンX-100で処理した後にショ糖密度勾配遠心分離を行った。TESP5がトリトンX-100可溶性画分だけでなく不溶性画分にも見いだされ，TESP5の一部は精子膜マイクロドメイン（ラフト）に存在していることが示唆された。実際に，TESP5をコードするcDNA断片をHEK293細胞に導入しTESP5に生化学的性質について調べてみると，細胞膜上でGPIアンカー型のタンパク質であることが明らかになった。さらに，合成基質やプロテアーゼ阻害剤を用いてTESP5の酵素化学的な検討を行い，TESP5はトリプシン様のセリンプロテアーゼであることを確認した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

哺乳動物の受精機構に関してはいまだに不明な点が多く，特に精子の卵透明帯通過機構については想像の域を脱していない。この学位論文では，マウスを研究材料として，アクロシンに代わってどのようなセリンプロテアーゼが卵透明帯通過に関与しているのかを明らかにすることを試みている。その結果，新規精子セリンプロテアーゼとしてTESP5を同定することに成功し，その酵素タンパク質の諸性質の検討と機能解析を調べている。

マクロシン活性がマウス特異的に微弱であることと，TESP5活性がラットやハムスター精子タンパク質抽出物中からは検出されないことなどから，哺乳動物精子に含まれるセリンプロテアーゼ群には量的あるいは質的な相違があることが示唆されている。本研究によって，マウス以外の動物ではアクロシンが透明帯の分解に関与しているが，マウスではアクロシンの機能をTESP5が補うことによって精子の卵透明帯通過が成し遂げられている可能性が見いだされている。したがって，精子の卵透明帯通過が動物種の多様性を反映していると考えることもできる。

精子の卵透明帯通過で機能すると考えられる新規セリンプロテアーゼTESP5遺伝子を同定したことは評価できるが，細胞・個体レベルでのTESP5の機能に関する解析までは研究が到達しておらず，今後に残された課題も少なからずある。しかし，研究自体は非常に注意深く行われており，十分な信頼性を有していると判断でき，当該研究分野の発展に貢献をしたと判断できる。

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。