

| | | | |
|---------|---|------|---------|
| 氏名(本籍) | おおひなた やす ひで 大日向 康 秀 (東京都) | | |
| 学位の種類 | 博 士 (農 学) | | |
| 学位記番号 | 博 甲 第 3262 号 | | |
| 学位授与年月日 | 平成 15 年 5 月 31 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 | Peas-Mea1-Ppp2r5d Overlapping Gene Complex: Their Testis Expression and Biological Roles (<i>Peas</i> , <i>Mea1</i> , 及び <i>ppp2r5d</i> 重複遺伝子複合体: 精巣での発現と生物学的役割) | | |
| 主査 | 筑波大学教授 | 農学博士 | 内 山 裕 夫 |
| 副査 | 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 | 深 水 昭 吉 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 理学博士 | 藤 村 達 人 |

論 文 の 内 容 の 要 旨

主要組織適合複合体 (MHC) 遺伝子はヒト 6 番染色体, マウス 17 番染色体上に存在し, 主に免疫システムにおいて重要な役割を担っている事で知られる。しかし, MHC 遺伝子座は免疫システムにおける機能とは無関係と思われる多くの精子形成過程及び胎発生期に発現する遺伝子も含んでいる。近年, Oct3, Oct4, Tctex1, Tas 等, 幾つかの遺伝子については胚分化, 精子機能, 性決定との関係が示されたが, 依然, 多くの遺伝子の機能が判明していない。

一方, 近交系マウスにおいて, 雌の皮膚片を雄あるいは雌に移植した場合, 雄の皮膚片を雄に移植した場合には拒絶されないが, 雄の皮膚片を雌に移植した場合のみ拒絶反応が起こることが知られている。雄性特異抗原 (H-Y 抗原) の候補遺伝子である *Mea1* (Male-enhanced antigen-1 gene) は, マウスにおいて雄の細胞で免疫した雌の抗血清を用いた発現スクリーニングにより単離された。

著者は, 哺乳動物において *Mea1* は MHC 遺伝子座近傍に存在し, 精巣で強く発現することから, *Mea1* が精子形成過程において何らかの機能を担っているのではないかと考え, その構造, 発現の解析を行った。

まず, ゲノムライブラリースクリーニングによりマウス *Mea1* 遺伝子の全長を含むフェージクローンを得て, その配列を決定し, 遺伝子構造を明らかにした。続いてキャッピングエンザイム法を用いた 5' 解析により, 複数の転写開始点を決定し, 少なくとも 7 つの転写開始点が GC に富んだ上流の 2kb 程の領域に散在している事を示した。また, マウス精巣における *in situ* 解析を行ない, *Mea1* 転写産物は Pachytene spermatocyte でも認められるが, spermatide により豊富に存在している事を示した。さらにウサギ抗 *Mea1* ポリクローナル抗体を作製し, マウス精巣において, タンパク質レベルでは elongate spermatide に特異的に存在し, また精子には存在しない事を示した。これらのことより, *Mea1* は精子形成の最後期において, 精子の成熟, 脱核の過程等に関与している可能性を示唆した。

また, *Mea1* 遺伝子解析の過程において, *Mea1* を中心として別の 2 つの遺伝子が *Mea1* の 5' 端, 3' 端とそれぞれ重複し, 3 つの遺伝子よりなる遺伝子複合体を形成している事を発見した。*Mea1* と新規遺伝子 *Peas* は互いの 5' 端において重複し, 精巣特異的的双指向性プロモーターより転写されていた。*Mea1* と

Ppp2r5d は互いの 3' 端において重複しており、それぞれの転写産物の 3' 端は 110 ベースの相補配列を持っていた。この 110 ベースの重複配列 (MPOS, Mea1-Ppp2r5d overlapping segment) はそれぞれの遺伝子の非翻訳領域であるにも関わらず、哺乳動物ではほぼ完全に保存されていた。MPOS はクローバー様の構造をとり得る配列を内部に含んでおり、また、マウスにおいては少なくともゲノムの 2 箇所に転移していることから、これが RNA 分子を媒介するトランスポゾンであることを示した。さらに Mea1 及びこの遺伝子複合体は哺乳動物進化の過程で、両鎖にポリ A 付加シグナルを内包したトランスポゾンの転移によって形成された可能性を示唆した。

さらに解読したゲノム配列を基に、Mea1 の上流に存在する新規遺伝子 Peas の PCR クローニングを行ない 5' 解析を経て、全長 cDNA を得た。ノーザン解析により Peas は精巣特異的に発現している事を、また in situ 解析により、マウス精巣において Peas 転写産物は Pachytene spermatocyte 及び spermatide に存在している事を示した。さらに、ウサギ抗 Peas 抗体を作製し、タンパク質レベルにおいては Pachytene spermatocyte に存在し、細胞質においては顆粒状に、核内においてはクロマチン上にヒモ状に局在することを明らかにした。Peas はその一次構造が抗体及び T 細胞受容体遺伝子の組み換えを活性化する事で知られる Rag2 と類似しており、その精巣における局在から減数分裂期における遺伝的組み換えに関与している可能性を示唆した。

審査の結果の要旨

本研究では、雄性特異抗原 (H-Y 抗原) の候補遺伝子である Mea1、及び精巣特異的に発現する新規遺伝子 Peas について精子形成過程における発現、及び機能を解析し、また Mea1 を中心として構成される重複遺伝子複合体 (Peas-Mea1-Ppp2r5d overlapping gene complex : PMP-complex) についてもその構造、存在意義を明らかにすることを目的とした。まず、精子形成に関わると考えられる Mea1、及び新規遺伝子 Peas について遺伝子構造、及び発現様式を明らかにしており、さらにそれらが担う機能を示唆した。さらに、Peas、Mea1、及び Ppp2r5d が遺伝子複合体を形成している事を発見して詳細な構造を明らかにし、その形成メカニズムを示すとともに、それぞれの意義について関連報文と照らし合わせて的確に論じている。このような哺乳動物精巣における遺伝子の発現を分子的に理解する事は、農学に限らず生物学ならびに医学にも波及しうる基礎的研究の成果として評価できる。また、当該論文では少なくとも遺伝子のクローニングおよび発現解析技術、動物細胞の培養技術、細胞内タンパク質の発現および解析等の手法が用いられ、著者は農学の分野に応用される細胞生物学的、分子細胞学および生化学的技術も理解・修得していると判断される。

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。