

氏名(本籍)	すぎ 杉	うら 浦	しん 伸	(静岡県)
学位の種類	博士(農学)			
学位記番号	博乙第1881号			
学位授与年月日	平成14年12月31日			
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当			
審査研究科	農学研究科			
学位論文題目	哺乳動物精子形成過程での遺伝子転写調節機構の解析			
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	理学博士	藤村	達人

論文の内容の要旨

哺乳類の精子形成は、減数分裂とそれに続く著しい形態変化をともなうプログラム化された細胞の分化過程である。厳密な雄性生殖細胞分化制御には、遺伝子の転写・翻訳レベルでの調節が重要な役割を果たしていると考えられている。すなわち、精子形成の進行に必要な mRNA の時期特異的な合成や蓄積は、個々の遺伝子発現の消長により制御されている。しかし、精子形成での遺伝子発現調節のメカニズムには不明な点が多い。本研究では雄性生殖細胞特異的に存在するセリンプロテアーゼのひとつであるアクロシン遺伝子、さらに、精子アクロソームにおいてアクロシン前駆体に結合し、そのパッケージングに関与していると考えられている sp32 遺伝子をモデルとして、哺乳動物精子形成過程での遺伝子転写調節機構を解析することを目的としている。

まず、アクロシン遺伝子第1エクソンの一部を含むさまざまな長さのプロモーター領域をオワンクラゲグリーン蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子と連結したコンストラクトを構築して、トランスジェニックマウスを作製した。RT-PCR と蛍光顕微鏡を用いての組織観察によって、トランスジーンが発現解析を行ったところ、翻訳開始点上流約 340 塩基対の領域が精巢特異的な発現に必要であることが明らかになった。この領域は CRE 様配列、ETF 結合配列、および Tet-1 結合領域様配列を有しており、アクロシン遺伝子の発現制御に関与している可能性が示唆された。次に、マウス精巢より調製した核タンパク質を用いて翻訳開始点の上流約 240 塩基対の領域をコードする DNA 断片についてゲルシフト分析を行い、その領域に結合する因子の存在を確認した。また、その DNA 領域を断片化し、ゲルシフト分析を行った結果、翻訳開始点より上流 78～50 塩基対の領域に精巢特異的な発現に関与すると考えられるシス配列が見いだされた。さらに、精巢特異的に発現しているほかの遺伝子 (ヒストン H1t, Pgk-2, プロタミン 1 と 2, およびプロエンケファリン遺伝子) プロモーター上にはそのシス配列は存在していなかった。アクロシン遺伝子とこれら遺伝子のプロモーター領域の比較を行ったが、有意な相同性は見られなかった。以上の結果は、アクロシン遺伝子の発現制御機構が上記遺伝子群とは異なっていることを示唆している。

一方、sp32 遺伝子第一エクソンの一部を含む長さの異なる三種類の 5' 上流域にアクロシンシグナルペプチドをコードする領域、続いて EGFP 遺伝子を連結し、トランスジェニックマウスを作製した。トランスジーンが発現解析はノーザンブロット分析と組織の蛍光顕微鏡観察によって行い、sp32 遺伝子の精巢特異的な発現はその翻訳開始点の上流域約 210 塩基対の領域によって制御されていることが明らかになった。その領域には、A-myb 結合配列、AP-4 結合配列、E-box, GC-box, およびイニシエーター配列が存在しており、sp32 遺伝子の発現制御に関与

している可能性が示唆された。また、sp32 遺伝子のプロモーター領域を精巣特異的なほかの遺伝子5'上流域と比較したが有意な相同性はなく、さらに、ヒストンH1tのTEエレメントやプロエンケファリンのGCP1配列のような、その遺伝子特異的な発現に必須とされる配列はsp32 遺伝子プロモーター中には確認できなかった。マウス精巣核タンパク質を用いてsp32 遺伝子プロモーター領域についてゲルシフト分析を行い、そのプロモーター領域と相互作用するタンパク質の存在も明らかにした。これらの結果から、減数分裂前の精母細胞から発現が始まるアクロシン、ヒストンH1t、プロエンケファリン、およびPgk-2 遺伝子などとはsp32 遺伝子の発現制御機構が異なっていることも明確にしている。

審 査 の 結 果 の 要 旨

哺乳動物の精子細胞分化形成機構に関してはいまだに不明な点が多く、その分化過程で機能している遺伝子プロモーターなどの解析も断片的である。この学位論文では精子細胞で特異的に発現しているアクロシンとsp32 遺伝子モデルとして、精子形成過程、特にハプロイド細胞での遺伝子発現制御機構を明らかにする目的で研究を行っている。

雄性生殖細胞は生体外で培養することが難しく、遺伝子の発現制御を調べるためにはトランスジェニックマウス系を利用して、精巣内生殖細胞を直接的に調べることが必要である。EGFP 遺伝子をリポーターとして用いながらその遺伝子産物が発する蛍光を手がかりとして、アクロシンとsp32 遺伝子プロモーター上の発現に関与するシス配列を数100塩基対の領域まで限定することに成功している。また、そのシス配列に結合するトランス因子の存在なども確認している。それらの結果から、アクロシンとsp32 遺伝子間、あるいはそれらと精巣特異的に発現しているほかの遺伝子間で発現制御機構が異なっていると結論している。

雄性生殖細胞での遺伝子発現調節に関与するシス配列をある程度同定したことは当該研究分野の発展に貢献すると考えられるが、さらに一歩踏みこんだ研究成果が乏しく、独創性にもやや欠けている。トランスジェニックマウス系を利用したために、解析までに相当な時間を要したと判断できるが、今後に残された課題も少なからずあると思われる。しかし、研究データは非常に注意深く行われた末に得られており、十分に信頼性があるものと判断できる。

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。