

氏名(本籍)	わた なべ けん 研 (愛知県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第972号
学位授与年月日	平成4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	Structure of the Acrosin Gene (アクロシン遺伝子の構造)

主査	筑波大学教授	理学博士	新井勇治
副査	筑波大学教授	農学博士	村上和雄
副査	筑波大学教授	農学博士	日下部功
副査	筑波大学教授	農学博士	田仲可昌
副査	筑波大学助教授	農学博士	星野貴行

論 文 の 要 旨

アクロシンは、哺乳類精子先体に局在するセリンプロテアーゼであり、哺乳類ライシンの代表的な酵素の一つである。アクロシンは一本鎖のプロアクロシンとして合成され、自己触媒的に活性化し、二本鎖の成熟型へと移行する。その成熟化には分子量の変化をとめない、そのためにアクロシン標品について、様々な分子量が報告されている。また、近年プロアクロシンにフコース結合能があることが報告され、その一次構造に興味注がれた。そこで、ヒトアクロシンのcDNAを単離し一次構造の推定を行った。また、アクロシンの精細胞特異的発現やセリンプロテアーゼとしての分子進化についての情報をうるため、アクロシン遺伝子を単離し、その構造を解析した。

(1) cDNAからのヒトアクロシン一次構造の推定

ブタアクロシンcDNA断片をプローブとしてヒト精巢cDNAライブラリーをスクリーニングしたところ、 8×10^4 個の組換え体ファージより三つのヒトアクロシンcDNAクローンを得た。そのうち最も長いcDNA断片をもつλH4について、cDNA塩基配列の解析を行った。1,388bpのcDNA配列には、421個のアミノ酸よりなるオープンリーディングフレームがあり、その配列はブタアクロシンのものと高い相同性があった。また、重鎖のN末端より250アミノ酸の領域は、他のセリンプロテアーゼと相同性が認められた。フコース結合能に関する領域について検索したところ、レクチンや糖質関連酵素との類似性がみられる領域はなかった。C末端領域にみられるプロリンに富む領域は、CCCCCAをモチーフとする繰返し配列であった。このモチーフは、ヒト特異的であり、ブタやマウスの配列にはみられず、C末端領域の相同性が軽鎖を含むN末端領域に比べてかなり低いことから、

C末端領域は種特異的なものであると考えられる。

(2) アクロシン遺伝子の構造

ヒト遺伝子ライブラリーを構築し、ヒトアクロシンcDNA断片をプローブとして、ヒトアクロシン遺伝子の単離を行った。最初のスクリーニングにより二つのクローンを得たが、5'領域が含まれていなかったため、プローブをかえて再スクリーニングを行った。しかし、新たなクローンは得られなかった。がん研究振興財団より供与されたライブラリーについてスクリーニングしたところ、新たに2つのクローンが得られた。それらはExon 1に相当する部分を含んでいなかった。サザンブロット解析により、Exon 2からExon 5を含むクローンのエクソン部分とエクソン/イントロンの境界の塩基配列を解析した結果、Intron Cのコドンにおける挿入位置が、これまでに報告されている構造と異なっていた。

ついで、マウス遺伝子ライブラリーを作製し、マウスアクロシンcDNAをプローブとしてマウスアクロシン遺伝子の単離を行った。1×10⁶個の独立クローンにより、一つの陽性クローンを得た。塩基配列の解析により、ヒトアクロシン遺伝子と同様に五つのエクソンによりコードされていることがわかった。

アクロシン遺伝子と他のセリンプロテアーゼ遺伝子と比較したところ、トリプシンやカリクレイン遺伝子と顕著な類似性がみられた。これらのことから、アクロシン遺伝子は、トリプシンやカリクレイン遺伝子と同じ祖先型遺伝子から遺伝子重複などにより進化したものと考えられ、受精現象との関連性を考慮すると、哺乳類進化のかなり早い時期には、現在の構造もしくはそれに近い構造を形成していたものと示唆された。

マウスアクロシン遺伝子における転写開始点の解析を行ったところ、複数の開始点を有することがわかった。その上流には、典型的なプロモータ配列であるTATA-boxやGC-boxはなく、そのために複数の開始点となっていることが示唆された。ヒトアクロシン遺伝子の5'上流領域を比較したところ、転写開始点から100bpの領域に高い相同性がみられた。また、精子形成時に特異的に発現するプロタミンやホスホグリセロリン酸キナーゼ2遺伝子との共通配列の検索により、GGGTG-GGのモチーフが転写開始点に近接した領域にみられたことから、このモチーフが精子形成時特異的発現に関与する配列の候補として考えられる。

(3) アクロシン遺伝子のプロモータ領域の精細胞を用いて解析を行うために、精細胞へのDNAの導入を検討し、エレクトロポレーションが最も有効であることがわかった。またSV40のエンハンサーが転写活性を促進することを認めた。SV40エンハンサーを用いて、アクロシン遺伝子5'上流2.2, 0.4, 0.1kbpとCAT融合遺伝子について活性を調べた結果、HeLa細胞では0.1kbpのものが最も活性が高かった。転写開始点より0.1kbpの領域にプロモータが存在することと、0.4kbp上流より0.1kbpの間に活性の制御に関与する領域が存在することが示唆された。また、精細胞では5'領域が短くなるにつれて活性が減少することから、0.1kbpより上流に活性の促進に関与する領域があると考えられた。このシステムを用いたとき、5'上流0.4kbp以内で細胞特異性を示した。このことは、プロタミン遺伝子やホスホグリセロリン酸キナーゼ2遺伝子に関して組織特異性を示すプロモータ領域

の検索実験の結果（転写開始点より数百bp以内で特異性を示す）とよく一致する。アクロシン遺伝子の発現の高度の細胞特異性は、精細胞特異的な転写活性への正の制御と非発現細胞（HeLa細胞）での負の制御の両方の制御機構によるものと示唆された。

審 査 の 要 旨

本論文は、アクロシン遺伝子の構造と精細胞特異的発現に焦点をあて解析を行ったものである。ヒトアクロシンcDNAの塩基配列を決定し、ついでヒトアクロシン遺伝子の塩基配列を解析した。またマウスアクロシン遺伝子の塩基配列を解析した。これらの結果より、セリンプロテアーゼとしての分子進化についての新知見を示唆している。さらにプロモータ領域の検討を行い、アクロシン遺伝子の発現の細胞特異性について新知見を示唆している。受精過程について、分子レベルからの解明に大きな進展を示したものとして高く評価できるものである。

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。