

氏 名 (本 籍)	ひらもと しんすけ 平 本 真 介 (東 京 都)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 2644 号
学位授与年月日	平成 13 年 3 月 23 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	医学研究科
学 位 論 文 題 目	Studies on mMAN2B2:a mouse homologue of the α -D-mannosidase specifically expressed in the male reproductive system (雄性生殖系に特異的なマウスの α -D-マンノシダーゼ:mMAN2B2 に関する研究)
主 査	筑波大学教授 獣医学博士 八 神 健 一
副 査	筑波大学教授 博士 (医学) 高 橋 智
副 査	筑波大学助教授 医学博士 武 島 仁
副 査	筑波大学助教授 医学博士 西 田 正 人

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

精子表層に存在し、受精過程において重要な役割を果たしていると考えられる α -D-マンノシダーゼ (MAN2B2) のマウスでの存在を確認し、その cDNA をクローニングすると共に、その発現部位や受精における役割について解明することを目的とした。

(対象と方法)

ブタ MAN2B2 の cDNA を基に合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとして RT-PCR 法により、ブタと相同なマウス MAN2B2 ホモログ (mMAN2B2) の存在を確かめた。mMAN2B2 の cDNA は、マウス精巣 cDNA ライブラリーから、mMAN2B2 因子は、129SVJ マウスゲノムライブラリーからスクリーニングを行った。更にノーザンブロット法と In situ ハイブリダイゼーション法により、mMAN2B2 mRNA の発現部位を調べた。抗 mMAN2B2 抗体を作製し、mMAN2B2 タンパク質の精巣内、精子上での存在部位を調べた。また、in vitro の受精実験を行い、抗 mMAN2B2 抗体の受精への影響を調べた。

(結果)

RT-PCR 法により mMAN2B2 の主な発現部位は精巣であることが確認された。cDNA のクローニングを行い全塩基配列 (3317bp) を決定した。遺伝子は 19 のエクソンから構成されており、5 番染色体に存在していることを確認した。また、mMAN2B2 mRNA は stage9～12 および 1～4 の精原細胞で発現していることが明らかになった。抗 mMAN2B2 抗体を用いて精巣の免疫染色を行ったところ、mMAN2B2 タンパク質は精子細胞以降の先体部分に存在していることが明らかになった。精巣上体尾部から採取した成熟精子でも、mMAN2B2 タンパク質は先体部分に存在していたが、先体反応を誘導した精子では先体部分の抗原が消失した。さらに、in vitro での受精実験を行ったところ、抗 mMAN2B2 抗体によって受精率が 24.1% 低下する事が明らかになった。

(考察)

ブタと相同なMAN2B2がマウスでも発現していることがRT-PCR法により確かめられた。mMAN2B2のcDNAと遺伝子のクローニングを行い、cDNAの全塩基配列(3317bp)を決定したところ、予想されたアミノ酸配列はブタと62%の相同性を示し、特にN-末端側に著しく高い相同性を示す領域が認められた。遺伝子は19のエクソンから構成され、マウス5番染色体に存在した。また、MAN2B2遺伝子が存在するブタ8番染色体、マウス5番染色体は共にヒト4番染色体と高いsyntenyを持つことが知られており、ヒト4番染色体にもMAN2B2が存在する可能性が示唆された。MAN2B2は雄性生殖系に種を越えて存在するタンパク質であると考えられる。

mMAN2B2のmRNAは精原細胞で精子形成のステージ特異的に発現していた。一方、mMAN2B2タンパク質は精子細胞の先体顆粒にはじめて認められ、以降、先体形成に挙動が一致していた。精巢上部尾部の成熟精子でも先体部分にmMAN2B2タンパク質が認められたが、先体反応後では認められなかった。さらに、抗mMAN2B2抗体によってin vitroでの受精率の低下が認められた。以上のことから、mMAN2B2は受精過程において重要な役割を果たしているタンパク質であることが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

受精現象における精子と卵子の相互作用には未解明な点が多い。本研究は、ブタ精子の細胞表層に存在し受精過程に重要な役割を担うと考えられる α -D-マンノシターゼ(MAN2B2)のマウスでの存在を確認し、mMAN2B2のcDNAをクローニングすると共に、その発現部位や受精における機能解析を目的としたものである。遺伝子のクローニング、全塩基配列の決定を行った後、精子形成過程での発現時期や精子の先体部分での発現を明らかにした。今後、mMAN2B2遺伝子欠損マウスを作製することにより、受精過程における機能がさらに詳細に解析されるものと期待できる。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。