

学 位 論 文 題 名

ヒト AEG (acidic epididymal glycoprotein)
様分子の解析 : cDNA クローニングと組織局在

学位論文内容の要旨

【緒言】

ラットで最初に同定されたAEG (acidic epididymal glycoprotein) は、精子成熟に関与すると想定される精巣上体分泌蛋白質の一つである。本蛋白質は、アンドロゲン依存性に精巣上体主細胞から分泌され、精巣上体管内で精子頭部先体後域に付着する。近年、AEG分子と構造的に類似した蛋白質がマウス精巣において発現されていることが明らかにされた。TPX1と命名されたこの分子の生理的機能は不明であるが、減数分裂後の生殖細胞によって産生され、ラットAEG分子と約55%のアミノ酸配列相似性を有することが明らかにされている。

本研究ではヒトAEG様分子をコードするcDNAクローンを分離し、さらにAEG様分子の組織局在について検討した。

【方法】

(1) 実験試料 ;

精子形成のみられる精巣、精巣上体、精管等の人体組織を50~70歳の成人男子より手術時もしくは剖検時に採取した。射精精液は20~40歳代の健康成人男子から得た。なお、実験試料の採取にあたっては、あらかじめ本人または家族の同意を得た。

(2) ヒトAEG様分子をコードするcDNAクローンの分離とDNA塩基配列の決定 ;

(dT)17- アダプター・プライマーを用いて逆転写を行なうことにより、ヒト精巣上体全細胞RNAからcDNAを合成した。得られたcDNAを鋳型としてone-sided PCRを行なった。プライマーは、既に報告されているラット・マウスAEG分子、ヒト・マウスTPX1分子のアミノ酸配列を比較し、これらの分子間で高度に保存されている配列を基に設計した。次に、PCRによって増幅されたDNA断片をプローブとし、ヒト精巣上体 λ gt 11 cDNAライブラリー (Kirchhoff 博士 より供与) をスクリーニングした。陽性ファージ・クローンのインサートを pBluescript SKII⁺プラスミドにサブクローニングし塩基配列をSanger 法により決定した。

さらに、ヒトAEG 様遺伝子発現の組織特異性を、完全長ヒトAEG 様cDNAクロ

ーンをプローブとしてノーザン・ブロット法で検討した。

(3) ヒトAEG様分子の組織局在；

ヒトAEG様分子の組織局在を検討するため、大腸菌で発現させたりコンビナント・ヒトAEG様蛋白質に対するポリクローナル抗体を作製した。すなわち、ほぼ完全長のヒトAEG様 cDNA 断片を in frame に pMAL-c2 ベクターに組み込み、ヒトAEG様分子をマルトース結合蛋白質との融合蛋白質として大腸菌で発現させた。融合蛋白質で家兎を免疫することにより、ヒトAEG様分子に対する抗体を作製した。

この抗体を用いて、ヒトAEG様分子の組織局在をウェスタン・ブロット法と免疫組織化学染色で検討した。

[結果]

(1) ヒトAEG 様 cDNAクローンの分離とDNA塩基配列の決定；

はじめに、マウスAEG cDNA クローンをプローブとして、ヒト精巣上体cDNAライブラリーのスクリーニングを行なったが、様々な条件下でも陽性クローンは得られなかった。そのため、PCR 法を用いてヒトAEG cDNAクローンを分離することを試みた。その結果、ラット、マウスAEG分子と類似した配列をもった分子をコードする約 750 bp のDNA断片が増幅された。

この増幅DNA断片をプローブとしてヒト精巣上体 cDNAライブラリーをスクリーニングすることにより完全長 cDNAクローンを得た。cDNAクローンの塩基配列から類推される蛋白質は249残基のアミノ酸からなり、その主な特徴としては、

1) N末端に19 残基のシグナル・ペプチドをもっていること、2) C末端側にシステインに富んだ領域をもっていること、3) 酸性アミノ酸に豊んでいること、4) 1ヶ所の N-linked 糖鎖結合可能部位をもっていること、5) 膜貫通領域をもっていないこと、があげられる。シグナル・ペプチドを除いた本蛋白質の分子量は約 26,000と算出された。さらにラット、マウスのAEG分子、ヒト、マウスのTPX1分子との配列相似性を検討したところ、アミノ酸配列で約 40%の相似性を有していた。

ノーザン・ブロット解析により、ヒトAEG 様遺伝子は精巣上体に特異的に発現されていることが判明した。

(2) ヒトAEG様分子の組織局在；

ウェスタン・ブロット解析の結果、ヒトAEG 様分子は 精巣上体、精管、精漿ならびに射精精子において非還元下で約 30 kDの強いバンドと約 26 kDの弱いバンドとして検出された。30 kDのバンドはcDNA 配列から予想されたヒトAEG 様分子のサイズより4kD 大きい、ヒトAEG 様分子には1ヶ所の N-linked 糖鎖結合可能部位が存在する。したがって30 kDのバンドは糖鎖結合型、26kDのバンドは糖鎖非結合型ヒトAEG様分子と推察された。

免疫組織化学染色では、遠位精巣輸尿管、精巣上体管の管腔内容が染色された。射精精子においては、精子頭部先体後域が最も強く染色された。

[考案]

(1) ヒトAEG様分子とラット、マウスAEG分子との関係について

本研究によりヒトAEG様遺伝子は精巣上体にのみ発現され、その蛋白質は精巣上体、精管、精漿ならびに精子頭部先体後域に存在することが示された。この結果は、精巣上体から分泌されたヒトAEG様分子が精子頭部先体後域に付着することを示唆する。また、ヒトAEG様分子は、酸性アミノ酸に富み、1個の*N*-linked糖鎖結合可能部位を持っていた。従って、ヒトAEG様分子はラット、マウスAEG分子の基本的特徴をすべて兼ね備えている。しかしながら、ヒトTPX1分子とマウスTPX1分子のアミノ酸配列相似性が約70%であるのに対し、ヒトAEG様分子とラット、マウスAEG分子間のアミノ酸配列相似性は約40%に過ぎない。しかも、ヒトAEG様分子は、ヒト、マウスのTPX1分子に対しても、ラット、マウスのAEG分子に対するとほぼ同程度のアミノ酸配列相似性(約40%)を有する。これは、今回クローニングされたヒト遺伝子がラット、マウスのAEG遺伝子に直接対応する遺伝子ではないことを強く示唆する。以上の理由により、この遺伝子はヒトAEG分子ではなくヒトAEG様分子をコードするものであると考えられた。

(2) AEGならびにAEG様分子の生理的意義について

AEGならびにAEG様分子の生理的機能の詳細は不明である。しかしながら、ラットでは、AEG分子が、精子-卵形質膜の融合に関与することを示唆する成績が報告されている。おそらくヒトAEG様分子も類似した機能をもつものと想定される。

[結語]

ヒトAEG様分子をコードするcDNAクローンを分離し、類推されるアミノ酸配列を決定した。さらに、ヒトAEG様分子に対するポリクローナル抗体を作製し、その組織局在を明らかにした。

1) ヒトAEG様分子はシグナル・ペプチドを除いて230個のアミノ酸残基から成り、C末端側にシステインに豊んだ領域と1個の*N*-linked糖鎖結合可能部位を含んでいる。さらに、ラット、マウスAEG分子ならびにヒト、マウスTPX1分子と約40%のアミノ酸配列相似性を有する。

2) ヒトAEG様遺伝子は精巣上体においてのみ発現し、その遺伝子産物は、精巣上体、精管、精漿ならびに精子頭部先体後域に存在する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 本 征一郎

副 査 教 授 小 山 富 康

副 査 教 授 大河原 章

学 位 論 文 題 名

ヒト AEG (acidic epididymal glycoprotein)

様分子の解析：cDNA クローニングと組織局在

ラットで最初に同定された *AEG* (acidic epididymal glycoprotein) は、精子成熟に関与すると想定される精巣上体分泌蛋白質の一つである。本蛋白質は、アンドロゲン依存性に精巣上体主細胞から分泌され、精巣上体管内で精子頭部先体後域に付着する。本研究ではヒト *AEG* 様分子をコードする cDNA クローンを分離し、さらに *AEG* 様分子の組織局在について検討した。

精子形成のみられる精巣、精巣上体、精管等の人体組織を50～70歳の成人男子より手術時もしくは剖検時に採取した。射精精液は20～40歳代の健康成人男子から得た。

(dT) 17- アダプター・プライマーを用いて逆転写を行なうことにより、ヒト精巣上体全細胞RNA から cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型として one-sided PCR を行なった。プライマーは、既に報告されているラット・マウス *AEG* 分子、ヒト・マウス TPX1 分子のアミノ酸配列を比較し、これらの分子間で高度に保存されている配列を基に設計した。次に、PCR によって増幅された DNA 断片をプローブとし、ヒト精巣上体 λ gt 11 cDNA ライブラリー (Kirchhoff 博士より供与) をスクリーニングした。陽性ファージ・クローンのインサートを pBluescript SKII-プラスミドにサブクローニングし塩基配列を Sanger 法により決定した。

さらに、ヒト *AEG* 様遺伝子発現の組織特異性を、完全長ヒト *AEG* 様 cDNA クローンをプローブとしてノーザン・ブロット法で検討した。

ヒト *AEG* 様分子の組織局在を検討するため、大腸菌で発現させたリコンビナント・ヒト *AEG* 様蛋白質に対するポリクローナル抗体を作製した。すなわち、ほぼ完全長のヒト *AEG* 様 cDNA 断片を in frame に pMAL-c2 ベクターに組み込み、ヒト *AEG* 様分子をマルトース結合蛋白質との融合蛋白質として大腸菌で発現させた。融合蛋白質で家兎を免疫することにより、ヒト *AEG* 様分子に対する抗体を作製した。

この抗体を用いて、ヒト *AEG* 様分子の組織局在をウエスタン・ブロット法と免疫組織化学染色で検討した。

(1) ヒト *AEG* 様 cDNA クローンの分離と DNA 塩基配列の決定；

PCR 法を用いてヒト *AEG* cDNA クローンを分離した結果、ラット、マウス *AEG* 分子と類似した配

列をもった分子をコードする約 750 bp のDNA 断片が増幅された。

この増幅DNA断片をプローブとしてヒト精巢上体 cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより完全長 cDNA ローンを得た。cDNAクローンの塩基配列から類推される蛋白質は249 残基のアミノ酸からなり、その主な特徴としては、1) N 末端に19残基のシグナル・ペプチドをもっていること、2) C 末端側にシステインに富んだ領域をもっていること、3) 酸性アミノ酸に豊んでいること、4) 1ヶ所のN-linked 糖鎖結合可能部位をもっていること、5) 膜貫通領域をもっていないこと、があげられる。シグナル・ペプチドを除いた本蛋白質の分子量は約 26,000 と算出された。さらにラット、マウスのAEG 分子、ヒト、マウスのTPX1分子との配列相似性を検討したところ、アミノ酸配列で約 40 %の相似性を有していた。

ノーザン・ブロット解析により、ヒト *AEG* 様遺伝子は精巢上体に特異的に発現されていることが判明した。

(2) ヒトAEG 様分子の組織局在；

ウエスタン・ブロット解析の結果、ヒトAEG 様分子は 精巢上体、精管、精漿ならびに射精精子において非還元下で約 30 kDの強いバンドと約 26 kDの弱いバンドとして検出された。30 kD のバンドはcDNA 配列から予想されたヒト *AEG* 様分子のサイズより 4 kD 大きい、ヒト *AEG* 様分子には1ヶ所のN-linked 糖鎖結合可能部位が存在する。したがって30 kD のバンドは糖鎖結合型、26 kD のバンドは糖鎖非結合型ヒトAEG 様分子と推察された。

免疫組織化学染色では、遠位精巢輸尿管、精巢上体管の管腔内容が染色された。射精精子においては、精子頭部先体後域が最も強く染色された。

これらの研究結果から、以下のことがはじめて明確にされた。

1) ヒトAEG 様分子はシグナル・ペプチドを除いて230 個のアミノ酸残基から成り、C 末端側にシステインに豊んだ領域と1個のN-linked 糖鎖結合可能部位を含んでいる。さらに、ラット、マウスAEG 分子ならびにヒト、マウスTPX1分子と約40%のアミノ酸配列相似性を有する。

2) ヒト *AEG* 様遺伝子は精巢上体においてのみ発現し、その遺伝子産物は、精巢上体、精管、精漿ならびに精子頭部先体後域に存在する。

口頭発表に際し、小山富康教授からAEG 様分子が精子形質膜に付着する現象の意義と付着機構について、Polyclonal抗体を用いた理由、そして卵子にAEG 様分子に対するReceptorがあるのか、などの質問があった。また、大河原 章教授からは、動物における加齢とAEG 分子の発現との関係、不妊ラットでの発現の程度、そしてヒトにおける本分子の臨床的意義ならびに応用について、などの質問があった。

申請者は、これらの質問に対し、概ね適格な解答をなした。

発表後、両教授には個別に面接試問による審査を受け、それぞれ合格の判定が下された。

以上、ヒトにおいてAEG 様分子をはじめて解析しえた基礎的検討であり、博士（医学）の授与に価する研究と判断された。