

学 位 論 文 題 名

Molecular cloning of mouse novel testis-specific genes and analysis of their function using the knockout mice

（マウスの新規精巣特異的遺伝子の単離と
ノックアウトマウスを用いた機能解析）

学位論文内容の要旨

精子形成は、精原細胞の分裂増殖と精母細胞への分化、精母細胞における減数分裂、減数分裂によって形成された精子細胞の精子への変態の 3 段階に大きく分けられる。これらの一連の分化過程の正確な進行は、生殖細胞における特異的な遺伝子群の発現や支持細胞との細胞間相互作用により厳密に制御されている。近年、ヒトを含む哺乳類の減数分裂や精子形成を制御する遺伝子が単離され機能の解析がなされているが、その遺伝的制御機構については未だに不明な点が多い。また、遺伝子操作技術の進歩によりトランスジェニックマウスやノックアウトマウスの作製が可能となったために、数多くの不妊モデルマウスが作製され、既に 200 ラインを越えている (Matzuk and Lamb, 2002)。これらのモデル動物の *in vivo* の解析系は、哺乳類の精子形成機構を理解する上で非常に有力なものとなっている。本研究では、哺乳類の減数分裂や精子形成を制御する遺伝子を網羅的に単離し、これらの遺伝子の発現パターンを明らかにした。さらに、単離した精巣特異的遺伝子のノックアウトマウスを作製して生殖器官における表現型を解析したところ、*in vivo* で機能に関して興味深い知見が得られた。

第 1 章では、精巣特異的な新規遺伝子の単離を試みた。特に、減数分裂期に着目し、エルトリエーション法によって分画されたパキテン期精母細胞由来の cDNA ライブラリーを用いて遺伝子のスクリーニングを行った。この cDNA ライブラリーから 120 クローンを単離して、各クローンの 3' 端と 5' 端の塩基配列を決定し、データベースを用いてホモロジー検索を行った。その結果、35 クローンが機能が未知な遺伝子であり、このうち 14 クローンは体細胞由来の EST と相同性をもたなかった。そこでノーザン解析を行ったところ、これら 14 クローンのうち 7 クローンが精巣特異的に発現していた。以上により、パキテン期精母細胞特異的 cDNA ライブラリーを用いた遺伝子スクリーニングは、新規で精巣特異的な遺伝子を得るために非常に効率の良い方法であることが示された。さらに、*in situ* ハイブリダイゼーションにより、新規精巣特異的な 7 クローンの精巣内での発現部位を調べた結果、精母細胞に強く発現するものが 2 つ得られた。これら 2 クローンのうち、公共のデータベースから cDNA の全長配列が入手できた MA0011 クローンを *Pac11* と

命名し、その機能解析を試みた。

第 2 章では、マウス *Pac11* 遺伝子の構造とタンパクの局在を明らかにした。データベースから入手した *Pac11* の cDNA 配列とゲノム DNA 配列の比較から、*Pac11* 遺伝子はゲノム上約 30kb の間に 27 個のエクソンをもち、cDNA の全長は 3493bp でコードするタンパクは 983 アミノ酸から構成されていることがわかった。さらに、*Pac11* タンパクのアミノ酸配列は、タンパク同士の相互作用に関わる Armadillo (ARM) リピートを含んでいることが判明した。また、データベース検索により *Pac11* のラットホモログが得られ、マウス-ラット間で 82% のアミノ酸の一致がみられた。次に、*Pac11* の C 末端領域に対するポリクローナル抗体を作製し、免疫染色を行ったところ、*Pac11* タンパクは精巣内で精母細胞の核とともに前期精子細胞の核にも局在することが示された。これらの結果から、*Pac11* タンパクは減数分裂期だけでなく減数分裂後にも存在し、他のタンパクと共同で精子形成に関与していると推測された。

第 3 章では、*Pac11* 遺伝子のノックアウトマウスを作製し、精巣や雄性生殖器官における表現型を詳細に解析した。本研究では、ゲノムデータベースの情報を基に PCR によって得たゲノム DNA を用いることによって、効率の良い遺伝子ターゲティングを試みた。その結果、短期間でノックアウトマウスを得ることに成功した。興味深いことに、B6/129 系統の遺伝的背景をもつノックアウトマウスでは、野生型マウスにおいてもホモ接合型マウスにおいても精巣の大きさにばらつきがみられたが、これは異なるマウス系統間の遺伝的相互作用に起因すると考えられた。そのため、交配により B6 系統だけの遺伝的背景と 129 系統だけの遺伝的背景をもつノックアウトマウス系統を作出した。これら遺伝的背景を均一化したマウスにおいては、両系統ともに野生型マウスとホモ接合型マウスの間で精巣の大きさにほとんど差がなかった。次に、精子形成の異常を調べるために精巣の病理組織の観察を行ったところ、B6 系統と 129 系統のいずれの遺伝的背景においてもノックアウトマウスの精子形成は正常であった。そこで、雄のノックアウトマウスの妊性を確認するため野生型の B6 系統の雌マウスとの交配実験を行った結果、両系統ともにホモ接合型マウスは妊性を示し産仔数も野生型マウスと比べて差がみられなかった。さらに、精巣上体内の成熟精子の塗抹標本作製し、精子の形態を調べたところ、両系統ともに野生型マウスの精子よりもホモ接合型マウスの精子において中片部の形態異常が多くみられた。また、精巣上体内の精子数もホモ接合型マウスの方が少なかった。以上の結果から、*Pac11* 遺伝子は、生殖能力にはほとんど影響を及ぼさないが、精巣上体における精子数と精子の形態形成に関与する可能性が示唆された。

第 2 章、第 3 章の結果から、*Pac11* タンパクは後期精子細胞以降の細胞には存在しないが、ノックアウトマウスの主な表現型は精巣上体における精子数の減少と精子鞭毛の形態異常であることがわかった。本研究で得られた *Pac11* 遺伝子のノックアウトマウスでは、不完全タンパクが作られていたため観察された表現型は顕著ではなかったが、半数体特異的な遺伝子の転写制御因子である ACT のノックアウトマウスと類似した表現型を示した。*act* 遺伝子のノックアウトマウスも精子形成は正常で妊性をもつが、精巣上体内の精子数の減少と精子鞭毛の異常を示す (Kotaja et

al., 2004)。しかし、ACT タンパクは精巣内で前期精子細胞の核だけでなく後期精子細胞の細胞質にも局在しているのに対し、Pac11 の場合にはタンパクの局在部位と表現型の観察される時期が一致しない点で異なる。そのため、Pac11 遺伝子は前期精子細胞の核において半数体特異的な遺伝子の転写制御に関わっており、そのターゲットとなる遺伝子が鞭毛を構成するタンパクを作っている可能性が考えられた。精子の鞭毛の形成は減数分裂直後の前期精子細胞の細胞質で開始される (Russell *et al.*, 1990) という報告もあり、前述の仮説の可能性を支持している。今後は、免疫沈降やtwo hybrid 法でPac11 のARM リピートと相互作用するタンパクを確認することで、Pac11 の精子形成・精子成熟過程での役割を解明する必要がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 洋 一
副 査 教 授 木 村 正 人
副 査 助教授 瀧 谷 重 治
副 査 助教授 北 田 一 博

学 位 論 文 題 名

Molecular cloning of mouse novel testis-specific genes and analysis of their function using the knockout mice

(マウスの新規精巣特異的遺伝子の単離と
ノックアウトマウスを用いた機能解析)

減数分裂や配偶子形成の遺伝的制御機構に関する研究は、これまで主に出芽酵母を対象として行われてきた。しかし、最近ではマウスからも減数分裂や配偶子形成に関わる遺伝子が数多くの単離され、それらの機能が少しずつ明らかにされてきている。しかし、哺乳類にはまだ未知な遺伝子も数多く存在すると考えられ、その同定と機能の解析が求められている。本研究では、マウスより新規の精巣特異的遺伝子を単離し、その機能の解明を試みた。

マウス精巣から新規の精巣特異的遺伝子を効率よく単離する目的で、C57BL/6J (B6) マウスの精巣からエルトリエーション法を用いてパキテン期精母細胞を分画し、cDNA ライブラリーを作製した。ランダムに cDNA クローンを 120 個単離し、各クローンの 3' 端と 5' 端の部分塩基配列を決定した。塩基配列に基づいてゲノムデータベースを用いて相同性検索を行い、体細胞由来の EST と相同性をもたない未知の 14 クローンを検出した。ノーザン解析の結果、14 クローン中 7 クローンが精巣特異的に発現する新規遺伝子であった。精巣組織を用いた in situ ハイブリダイゼーション解析の結果、精母細胞に強く発現する遺伝子クローンが 2 つ同定された。これら 2 クローンのうち、公共のデータベースから cDNA の全長配列の情報が入手できたクローンを *Pac11* と命名し、その機能解析を試みた。

まずマウス *Pac11* 遺伝子の構造を明らかにした。cDNA 配列とゲノム DNA 配列の比較から、*Pac11* 遺伝子は約 30kb の大きさと 27 個のエクソンをもち、cDNA の全長は 3493 bp で 983 アミノ酸をコードしていることがわかった。さらに、タンパク同士の相互作用に関わる Armadillo (ARM) リピートを含んでいる可能性が示唆され、ラットホモログ

との間で 82%のアミノ酸が一致した。次に、C 末端領域に対するポリクローナル抗体を作製し、免疫染色によって Pac11 タンパクの局在を調べた。その結果、Pac11 は精母細胞と前期精子細胞の核に存在し、核内において他のタンパクと相互作用することによって、精子形成に関わる遺伝子の発現を制御している可能性が示唆された。

最後に、Pac11 遺伝子の機能を調べる目的で、遺伝子ターゲティング法を用いてノックアウトマウスを作製し、精巣や雄性生殖器官における表現型を詳細に解析した。ノックアウトマウスは、129/Sv 由来の ES 細胞のキメラマウス雄と B6 雌との交配によって得られた個体に由来するため、遺伝的なバックグラウンドの影響を排除する目的で、交配によって B6 系統の遺伝的背景と 129 系統の遺伝的背景をもつ系統を作出し、Pac11 遺伝子の機能解析に用いた。両系統とも野生型マウスとホモ接合型マウス (Pac11^{-/-}マウス) の間で精巣の大きさに差は見られず、ノックアウトマウスの妊性は両系統ともに正常であった。また、精子形成の異常を調べるために精巣の組織標本を観察した結果、両系統ともにホモ接合型マウスの精子形成は正常であった。しかし、成熟精子の形態を調べた結果、両系統ともに野生型マウスの精子よりもホモ接合型マウスの精子において鞭毛の形態異常が有意に多くみられた。さらに、精巣上体内の精子数もホモ接合型マウスの方が有意に少なかった。以上の結果から、Pac11 遺伝子は、生殖能力にはほとんど影響を及ぼさないが、精巣上体における精子数と精子の形態形成に関与する可能性が示唆された。また、ノックアウトマウスでは、野生型よりもサイズの小さい mRNA が発現することがノーザン解析によって判明し、さらにウェスタン解析によって不完全タンパクが産生されていることが示された。そのため、産生された不完全タンパクが他のタンパクと相互作用することによってほぼ正常に近い状態で精子形成が進み、顕著な表現型が表れなかった可能性が考えられる。そのため、Pac11 遺伝子は前期精子細胞の核において半数体特異的な遺伝子の転写制御に関わっており、そのターゲットとなる遺伝子が鞭毛を構成するタンパクを作っている可能性が考えられた。精子の鞭毛の形成は減数分裂直後の前期精子細胞の細胞質で開始されるという報告もあり、前述の仮説の可能性を支持している。

今後は、免疫沈降法や two hybrid 法を用いて Pac11 の ARM リピートと相互作用するタンパクを確認することで、Pac11 遺伝子の精子形成・精子成熟過程での役割を解明することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また申請者が研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。