

学位論文題名

Studies on novel serine proteinases expressed
in mouse testis

(マウス精巣に発現する新規セリンプロテアーゼに関する研究)

学位論文内容の要旨

生体内におけるプロテアーゼの役割は、タンパク質の代謝、分解、また、限定分解による他のタンパク質の活性化など多岐にわたり、多くの重要な生理機能を担っている。精巣においてプロテアーゼは、精細胞から精子への形態変化、ペプチドホルモンの産生と分解、ECMの分解や種々のタンパク質のプロセッシング等で重要な役割を果たすと考えられるが、過去の研究は主に精子先体に含まれるプロテアーゼと受精の関わりについておこなわれており、精子形成過程における役割は明らかとなっていない。本研究では、プロテアーゼの中でも精子形成過程で発現する新規分子を探索し、その解析を通して精巣機能、特に精子形成過程の分子機構、に迫ることを目的とした。

本研究は、マウス精巣に発現する新規プロテアーゼ2種、TESSP-1 及び Granzyme N、について、分子生物学的、生化学的、細胞生物学的解析を進め、これらのプロテアーゼが精子形成過程に関与することを明らかにした。

第1章 Granzyme N のクローニングおよび解析

Granzyme N は Granzyme サブファミリーに属する新規のプロテアーゼである。他の Granzyme とは異なり、脾臓細胞で発現せず、オスの生殖細胞に特異的に発現する。また、哺乳類培養細胞を用いたリコンビナントタンパク質の解析、*in situ* hybridization、免疫組織化学染色により、精母細胞、精子細胞において発現する分泌性タンパク質であることを明らかにした。Granzyme-A, B, C はアポトーシスを引き起こす因子であることが知られていたため、Granzyme N と生殖細胞のアポトーシスの関わりについて解析した。生殖細胞のアポトーシスの実験モデルとして用いられる熱ストレスを与えた精巣と、停留辜丸実験マウスを作成し、これらの精巣における Granzyme N の mRNA およびタンパク質レベルでの挙動を調べた。この結果、熱処理により誘導される生殖細胞のアポトーシスには Granzyme N は関与しないことを明らかにした。ヒト精巣で発現する Granzyme B、ラット精巣で発現する Granzyme K の研究とあわせ考察すると Granzyme N は生殖細胞の精細管内腔への移動にともなう細胞外基質の分解に関与すると考えられる。

第2章 TESSP-1 のクローニングおよび基本的な解析

TESSP-1 (Testis specific serine protease-1) cDNA は全長 1128bp からなり、322 アミノ酸残基からなるセリンプロテアーゼをコードしていた。また、ヒトにホモログが存在することから、TESSP-1 は哺乳類に広く保存されていると予想される。mRNA の発現はノーザン解析より精巣特異的であり、1 週齢で弱いながらも発現が始まり、その後性成熟にともない発現量が増加することがわかった。mRNA の精巣内における局在を *in situ* hybridization で調べたところ、精原細胞および精母細胞で発現することがわかった。次に、哺乳類培養細胞で発現させたリコンビナント TESSP-1 の解析により、TESSP-1 は 42kDa の GPI アンカータイプの膜タンパク質であり、糖鎖修飾を受けることが分かった。以上のことから、TESSP-1 は細胞膜上にプロテアーゼドメインを露出する形で存在し、細胞外の基質に作用することが考えられた。

第 3 章 TESSP-1 の生理機能の研究

精巣内における内在性 TESSP-1 タンパク質の機能を調べるために、TESSP-1 抗体を作成し研究をおこなった。この抗体を用いて精巣抽出液をウェスタンブロット解析したところ、35kDa の TESSP-1 の発現が確認された。次に、マウス精巣を用いて免疫組織蛍光染色をおこない、TESSP-1 の局在を調べた。TESSP-1 のシグナルは精細管の基底膜側における精原細胞での細胞膜状に広がったシグナルと、精細管内腔側に存在する精母細胞と精子細胞におけるドット状のシグナルの 2 つの特徴を示した。それぞれのシグナルの存在様式が何を反映しているのかを検討したところ、基底膜におけるシグナルは N-cadherin と共局在し、ドット状のシグナルは Rab6 と共局在することが分かった。N-cadherin は生殖細胞とセルトリ細胞の間の細胞間接着に働くことから、その接着において TESSP-1 が機能すると考える。また、Rab6 のシグナルはゴルジ体マーカーであることから、ドット状の TESSP-1 はゴルジ体に存在すると考えられる。しかしながら、精巣の細胞を分散した後に、TESSP-1 抗体で免疫染色をおこなったところ、TESSP-1 のドット状のシグナルは観察されなくなった。これは、TESSP-1 のドット状のシグナルが生殖細胞とセルトリ細胞の接着が形成されている精巣内でしか観察されないことを表し、TESSP-1 がゴルジ体ではなく、その接着部位に局在することを示唆する結果となった。また、TESSP-1 の分布の変化は生殖細胞の極性形成に伴うものと考えられた。

以上、本研究によって、新規プロテアーゼ Granzyme N 及び TESSP-1 の特性が明らかにされた。さらに、精細管内におけるプロテアーゼと生殖細胞の移動の関わり、また細胞間接着と生殖細胞の極性形成の関わりも明らかにした。よって本研究は、生殖生物学の発展に大きく貢献するものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 孝 行

副 査 教 授 山 下 正 兼

副 査 助 教 授 木 村 敦

学 位 論 文 題 名

Studies on novel serine proteinases expressed in mouse testis

(マウス精巣に発現する新規セリンプロテアーゼに関する研究)

生体内におけるプロテアーゼの役割は、タンパク質の代謝、分解、また、限定分解による他のタンパク質の活性化など多岐にわたり、多くの重要な生理機能を担っている。精巣においてプロテアーゼは、精細胞から精子への形態変化、ペプチドホルモンの産生と分解、ECMの分解や種々のタンパク質のプロセッシング等で重要な役割を果たすと考えられるが、過去の研究は主に精子先体に含まれるプロテアーゼと受精の関わりについておこなわれており、精子形成過程における役割は明らかとなっていない。本研究では、プロテアーゼの中でも精子形成過程で発現する新規分子を探索し、その解析を通して精巣機能、特に精子形成過程の分子機構、に迫ることを目的とした。

本研究は、マウス精巣に発現する新規プロテアーゼ2種、TESSP-1 及び Granzyme N、について、分子生物学的、生化学的、細胞生物学的解析を進め、これらのプロテアーゼが精子形成過程に関与することを明らかにした。

第1章 Granzyme N のクローニングおよび解析

Granzyme N は Granzyme サブファミリーに属する新規のプロテアーゼである。他の Granzyme とは異なり、脾臓細胞で発現せず、オスの生殖細胞に特異的に発現する。また、哺乳類培養細胞を用いたリコンビナントタンパク質の解析、*in situ* hybridization、免疫組織化学染色により、精母細胞、精子細胞において発現する分泌性タンパク質であることを明らかにした。Granzyme-A, B, C はアポトーシスを引き起こす因子であることが知られていたため、Granzyme N と生殖細胞のアポトーシスの関わりについて解析した。生殖細胞のアポトーシスの実験モデルとして用いられる熱ストレスを与えた精巣と、停留睾丸実験マウスを作成し、これらの精巣における Granzyme N の mRNA およびタンパク質レベルでの挙動を調べた。この結果、熱処理により誘導される生殖細胞のアポトーシスには Granzyme N は関与しないことを明らかにした。ヒト精巣で発現する Granzyme B、ラット精巣で発現す

る Granzyme K の研究とあわせ考察すると Granzyme N は生殖細胞の精細管内腔への移動にともなう細胞外基質の分解に関与すると考えられる。

第2章 TESSP-1 のクローニングおよび基本的な解析

TESSP-1 (Testis specific serine protease-1) cDNA は全長 1128bp からなり、322 アミノ酸残基からなるセリンプロテアーゼをコードしていた。また、ヒトにホモログが存在することから、TESSP-1 は哺乳類に広く保存されていると予想される。mRNA の発現はノーザン解析より精巣特異的であり、1 週齢で弱いながらも発現が始まり、その後性成熟にともない発現量が増加することがわかった。mRNA の精巣内における局在を *in situ* hybridization で調べたところ、精原細胞および精母細胞で発現することがわかった。次に、哺乳類培養細胞で発現させたリコンビナント TESSP-1 の解析により、TESSP-1 は 42kDa の GPI アンカータイプの膜タンパク質であり、糖鎖修飾を受けることが分かった。以上のことから、TESSP-1 は細胞膜上にプロテアーゼドメインを露出する形で存在し、細胞外の基質に作用することが考えられた。

第3章 TESSP-1 の生理機能の研究

精巣内における内在性 TESSP-1 タンパク質の機能を調べるために、TESSP-1 抗体を作成し研究をおこなった。この抗体を用いて精巣抽出液をウェスタンブロット解析したところ、35kDa の TESSP-1 の発現が確認された。次に、マウス精巣を用いて免疫組織蛍光染色をおこない、TESSP-1 の局在を調べた。TESSP-1 のシグナルは精細管の基底膜側における精原細胞での細胞膜状に広がったシグナルと、精細管内腔側に存在する精母細胞と精子細胞におけるドット状のシグナルの2つの特徴を示した。それぞれのシグナルの存在様式が何を反映しているのかを検討したところ、基底膜におけるシグナルは N-cadherin と共局在し、ドット状のシグナルは Rab6 と共局在することが分かった。N-cadherin は生殖細胞とセルトリ細胞の間の細胞間接着に働くことから、その接着において TESSP-1 が機能すると考える。また、Rab6 のシグナルはゴルジ体マーカーであることから、ドット状の TESSP-1 はゴルジ体に存在すると考えられる。しかしながら、精巣の細胞を分散した後に、TESSP-1 抗体で免疫染色をおこなったところ、TESSP-1 のドット状のシグナルは観察されなくなった。これは、TESSP-1 のドット状のシグナルが生殖細胞とセルトリ細胞の接着が形成されている精巣内でしか観察されないことを表し、TESSP-1 がゴルジ体ではなく、その接着部位に局在することを示唆する結果となった。また、TESSP-1 の分布の変化は生殖細胞の極性形成に伴うものと考えられた。

以上、本研究によって、新規プロテアーゼ Granzyme N 及び TESSP-1 の特性が明らかにされた。さらに、精細管内におけるプロテアーゼと生殖細胞の移動の関わり、また細胞間接着と生殖細胞の極性形成の関わりも明らかにした。よって本研究は、生殖生物学の発展に大きく貢献するものである。一部の成果は、すでに国際的学術専門誌に公表されており、申請者の研究が世界的レベルで評価を受けていることは明らかである。

よって、申請者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。