

氏名	秋山 耕陽
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学術
学位授与番号	博甲第3616号
学位授与の日付	平成20年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生命分子科学専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Study on the molecular mechanisms of the defect of spermatogenesis in the <i>sk</i> s mutant mice (<i>sk</i> s突然変異マウスにおける精子形成異常の分子機構に関する研究)
論文審査委員	教授 国枝 哲夫 教授 佐藤 勝紀 教授 近藤 康博

学位論文内容の要旨

精子形成は、極めて多くの遺伝子が複雑に関与する分子機構を経て成立する発生過程であり、その解明はヒトの不妊症の治療だけでなく有用動物などに対する効果的な生殖のコントロール法の開発にもつながる重要な課題である。*sk*sマウスは、骨格形成と配偶子形成に異常を呈する突然変異マウスである。*sk*sホモ個体は、胎生期の骨格形成の初期段階に異常が生じるため成体では著しい骨格異常に至るとともに、精子形成が減数分裂第一分裂前期パキテン期以降に進行しない。しかし、これらの異常の原因となる*sk*s遺伝子は未だ同定されていない。そこで本研究では、*sk*sホモ個体の精子形成過程をより詳細に解析するとともに、*sk*s遺伝子を同定し、その機能を解明することを試みた。

*sk*sホモ個体の精子形成異常を詳細に解析するため、まず*Stx2/Epim*遺伝子にナンセンス突然変異が生じることで精子形成異常を呈する*repro34*ホモ個体と*sk*sホモ個体の精子形成過程を組織学および分子遺伝学解析により比較した。その結果*repro34*ホモ個体の精子形成は、減数分裂が終了し精子細胞へ移行する過程で発生が停止するが、*sk*sホモ個体ではより早い発生段階で停止することが強く示唆された。次に幼弱期の精巣について組織学的解析を行い*sk*sホモ個体の精子形成がパキテン期後期までしか進行しないことを特定した。また抗SCP3抗体および抗 γ -H2AX抗体を用いた免疫蛍光染色法により*sk*sホモ個体ではパキテン期において相同染色体の対合に異常が生じていることを明らかにした。さらに連鎖解析により*sk*s遺伝子の位置を第4染色体上の約0.6Mbの領域内に特定し、この領域内に存在する核孔構成タンパク質の1つと考えられている*Tmem48*遺伝子のエクソン6に*sk*sホモ個体に特異的なGGからTTへの塩基置換が存在することを発見した。エクソントラッピングベクターを用いた実験系によりエクソン6に生じた塩基置換がスプライシング異常の原因になることを突き止めるとともに、BACトランスジェニックレスキューを行なうことで*Tmem48*遺伝子に生じた突然変異が*sk*sホモ個体の表現型の原因であり、本遺伝子がマウスの初期発生および配偶子形成に重要な役割を果たしていることを明らかとした。次に*Tmem48*遺伝子の発現パターンを調べ、成体の肺、脾臓、精巣および卵巣そして胎仔において転写されており、特に精巣では精子形成の進行に関わらず一定量転写されていることが明らかになった。次に新規抗体を用いることで*Tmem48*タンパク質は、パキテン期後期の精母細胞および円形精子細胞の細胞質中に局在する分子量約65kDaのタンパク質であることを明らかにした。

本研究では、*sk*sホモ個体の精子形成が、相同染色体の対合異常によりパキテン期以降に進行しなくなること、そして、その原因が*Tmem48*遺伝子に生じた突然変異に起因することを明らかにした。核孔タンパク質群と精子形成の関連は明らかにされていないが、精子形成過程では核-細胞質間輸送が活発であることから、*Tmem48*タンパク質がこの機構に重要な機能を果たしていることが考えられた。以上の結果は、精子形成に機能する新しい遺伝子を同定したものであり、未だ不明な点の多い精子形成機構の解明に寄与できる知見であると考えられる。

論文審査結果の要旨

本研究は、配偶子形成と中軸骨格の形成に異常を呈する *sk*s 突然変異マウスについて、その組織学的解析による精子形成異常の発生機構の検討、および連鎖解析による原因遺伝子の同定と、その遺伝子の機能の解析を試みたものである。その主な結果は以下の通りである。

*Sk*s マウスでは、胎生期の骨格形成の初期段階に異常が生じるとともに、精子形成が減数分裂第一分裂前期以降に進行しない。そこで本研究では、まず *sk*s ホモ個体の精子形成過程を組織学的に詳細に解析した結果、*sk*s ホモ個体では精子形成がパキテン期後期までしか進行しないことを特定するとともに、免疫蛍光染色法により *sk*s ホモ個体ではパキテン期において相同染色体の対合に異常が生じていることを明らかにしている。次に連鎖解析により *sk*s 遺伝子の位置を第4染色体上に特定し、この領域内に存在する遺伝子の塩基配列を解析することで、核孔タンパク質 *Tmem48* の遺伝子に *sk*s ホモ個体に特異的な GG から TT への塩基置換が存在することを見だし、この塩基配列がスプライシング異常を引き起こしていることを明らかにしている。さらにトランスジェニックマウスを用いて、*Tmem48* 遺伝子に生じた突然変異が *sk*s ホモ個体の表現型の原因であることを確認している。次に *Tmem48* 遺伝子の発現パターンを調べるとともに *Tmem48* タンパク質は、パキテン期後期の精母細胞および円形精子細胞の細胞質中に局在することを明らかにしている。以上のことから、*sk*s が *Tmem48* 遺伝子に生じた突然変異に起因し、*Tmem48* タンパク質の欠損が精子形成過程で必用とされる核-細胞質間輸送を阻害することで、精子形成異常を引き起こしていると結論づけている。

以上の結果は、精子形成に機能する新しい遺伝子を同定することで、ほ乳類の精子形成の分子機構の解明に大きく寄与するものであり、当該分野の研究に及ぼす影響は大きく、それゆえ、秋山耕陽氏は自然科学研究科の博士（学術）の学位を受ける資格があるものと判定した。