

氏名	ほそ かわ みほこ 細 川 美穂子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3084 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	Tudor - related proteins TDRD1/MTR - 1, TDRD6 and TDRD7/ TRAP : domain composition, intracellular localization and function in male germ cells in mice (Tudor 関連タンパク質 TDRD1/MTR-1, TDRD6, TDRD7/TRAP のド メイン構造とマウス雄生殖細胞における局在及び機能の解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 篠 原 隆 司 教 授 山 中 伸 弥 教 授 瀬 原 淳 子

論 文 内 容 の 要 旨

生殖細胞は遺伝情報を次世代に伝え、個体発生の起点となる細胞系譜である。生殖細胞細胞質中には生殖顆粒と呼ばれる RNA-蛋白質複合体があり、同構造は多様な動物種で世代を超えて観察される事から、生殖細胞の発生分化及び機能に重要であると考えられる。多くの多細胞動物の生殖細胞は個体発生の初期に母性分子による系譜の限定を受け、これら生殖細胞決定分子の幾つかは生殖顆粒に局在し非対称分配を受ける。一方、哺乳類では胎仔多能性幹細胞が分化誘導を受ける事で予定生殖細胞が決定されるが、この過程に母性分子の関与及び生殖顆粒構造は確認されていない。しかし哺乳類でも同構造は分化過程にある前精原細胞や卵母細胞で観察され、特に減数分裂期精母細胞と半数体精子細胞で明瞭に観察される。これら哺乳類生殖顆粒の構成分子の同定や機能解析は殆ど行われていない。

ショウジョウバエの母性効果遺伝子の一つであり生殖顆粒構成蛋白質をコードする *tudor* 遺伝子は特徴的な Tudor ドメインの繰り返し構造を持つ。また、Tudor 蛋白質の生殖顆粒への局在は、同構造の構成分子の一つをコードする *vasa* 遺伝子により調節される。一方、マウスでは、ショウジョウバエ *tudor* 遺伝子と類似のドメイン構造を持つ *Tdrd1* 遺伝子が生殖細胞の分化過程で発現し、同蛋白質が生殖顆粒に局在することが示されている。本研究では、マウス *tudor* 関連遺伝子群として *Tdrd6*, *Tdrd7* を同定し、同遺伝子の発現と蛋白質局在の詳細な解析を行った。*Tdrd6* 及び *Tdrd7* 遺伝子は分化過程にある雄生殖細胞で特異的に発現し、同蛋白質は生殖顆粒に極めて特異的に局在して TDRD1 及び MVH (Mouse Vasa Homologue) 蛋白質と共に RNA-蛋白質複合体を形成する。このことから Tudor 関連蛋白質群は生殖顆粒構成分子の新規ファミリーを形成することが明らかになった。一方、TDRD 蛋白質は分化段階の異なる雄生殖細胞で生殖顆粒に局在することから、同構造は生殖細胞の分化段階に応じて構成分子が変化する動的なオルガネラであることが明らかになった。更に *Mvh* 遺伝子欠損マウスの雄生殖細胞では生殖顆粒構造が観察されず、TDRD 蛋白質はそれぞれ細胞質内の異なる部位に検出される事から、*Mvh*-TDRD と *vasa*-Tudor 間の分子経路は進化的に保存された重要な機能を持つことが示唆された。

次に、Tudor ドメインの繰り返し構造と TDRD 蛋白質の細胞内局在及び機能との関連を検討するため、マウス生体精巢を用いた過剰発現実験を行った。野生型 TDRD 蛋白質とその欠失変異体ベクターを構築し、体細胞分裂期精原細胞、減数分裂期精母細胞、半数体精子細胞の分化段階毎に *in vivo* electroporation 法を用いて遺伝子導入を行った。精原細胞では野生型、欠失変異体共に特異的な局在及び表現型は観察されなかった。一方、精母細胞では、野生型 TDRD 蛋白質は生殖顆粒へ正常に局在したのに対して、欠失変異体は特異的な局在を示さず、他の生殖顆粒構成分子の細胞内局在にも異常が観察された。更に欠失変異体の過剰発現は精母細胞の生存及び減数分裂の進行を阻害することが明らかになった。一方、精子細胞では野生型、欠失変異体共に特異的な生殖顆粒への局在が観察されたが、Tudor ドメインの分子間相互作用に機能するアミノ酸残基に点置換を加えた欠失変異体では、生殖顆粒への局在が観察されなかった。これらの結果から(1)単一の

Tudor ドメインが生殖顆粒への局在単位として機能する事、(2)Tudor ドメイン構造と同ドメインを介した分子間相互作用が生殖顆粒への局在に重要である事、しかし(3)Tudor ドメインの繰り返し構造は雄生殖細胞の生存分化に重要である事、が明らかになった。

本研究では、Tudor 関連蛋白質群が生殖顆粒構成分子の新規ファミリーを形成し、生殖細胞の発生に極めて重要であることを明らかにした。生殖顆粒は、生殖細胞に必須で進化的に保存された未知の分子基盤を担うと考えられるオルガネラであり、Tudor 関連蛋白質群は生殖顆粒の今後の研究において重要なプローブとなる。

論文審査の結果の要旨

本論文は、生殖細胞に特徴的な細胞内構造である生殖顆粒に着目し、同構造の特異的な構成分子ファミリーとして新たに tudor domain containing (TDRD) 蛋白質群を単離、同定したものである。具体的には TDRD1, 6, 7 蛋白質の生殖細胞における細胞内局在を詳細に解析し、同蛋白質群がマウス生殖顆粒に特異的に局在する事を示した。一方、各 TDRD 蛋白質の局在パターンは相互に異なる事から、生殖顆粒が生殖細胞分化に伴ってその構成分子を変化する動的な構造である事を示した。更にこれら TDRD 蛋白質群の共局在は *Mouse vasa homologu (Mvh)* 遺伝子により制御される事を明らかにした。ショウジョウバエにおいても vasa 遺伝子により Tudor 蛋白質の局在制御が行われる事から、vasa-Tudor/Mvh-TDRD 間の分子カスケードは種及び生殖細胞の分化段階を超えて保存される重要な役割を持つ事が示唆された。

TDRD1, 6, 7 蛋白質は Tudor ドメインの繰り返し構造を持つ事を特徴とする。これら特徴的なドメイン構造と TDRD 蛋白質群の細胞内局在及び生理機能の関連を明らかにする為、マウス生体精巣への電気穿孔法を用いた過剰発現実験を行った。野生型及び欠失変異体の TDRD 蛋白質を雄生殖細胞分化の各段階で過剰発現し、野生型 TDRD 蛋白質の異時的発現は生殖顆粒の形成を誘導しない事、単一の Tudor ドメインが生殖顆粒への局在単位として機能する事、一方、同ドメインの繰り返し構造は雄生殖細胞の分化、特に減数分裂の進行に重要である事を示した。更に Tudor ドメイン内に点置換変異を加えた変異体の過剰発現により、Tudor ドメイン構造と同ドメインを介した分子間相互作用が生殖顆粒への局在に重要である事を示した。

以上の研究は、未だ機能が明らかでない哺乳類生殖顆粒構造が担う分子機構の解明に寄与し、生殖細胞の発生分化制御機構の解明に貢献するものである。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成19年1月26日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。