

氏名	なかむらけんいち 中村健一
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2131号
学位授与の日付	平成11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	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Phophilin, a small GTPase Pho-binding protein, is abundantly expressed in the mouse testis and localized in the principal piece of sperm tail (低分子量 GTPase Pho 結合性蛋白 Phophilin は、マウス精巣に多く発現し、精子尾部の主部に局在する)
	(主査)
論文調査委員	教授 鍋島陽一 教授 清水章 教授 小川修

論 文 内 容 の 要 旨

RhoはRas類似型低分子量GTP結合蛋白質の一群に属し、Rac及びCdc42と共にRhoサブファミリーを構成する。これらは主としてアクチン細胞骨格の制御に関係しており、細胞運動、細胞接着、細胞質分裂及び転写調節などを行い、さらには癌細胞の浸潤、転移への関与も示唆されている。

Rhoの細胞内機能は、GTP水解活性を消失した活性型変異体の強制発現や、Rhoを特異的に不活化するボツリヌス菌菌体外酵素C3を用いて解析されてきた。それらの結果から、細胞外刺激による細胞の伸展や接着に関してRhoが分子スイッチとして機能したり、細胞分裂の際に核分裂のシグナルを受けて活性化されて細胞質分裂を調節することなどが明らかになった。

これらの知見を受けて、Rhoの細胞内情報伝達機構を解明するために、Rhoの直接の標的蛋白質の同定が試みられ、Rhophilinは、その最初のものとして1996年に報告された。Rhophilinは分子量約71kDaの蛋白で、N端にセリン/スレオニンキナーゼであるPKNとホモロジーをもつRho結合領域を持ち、C端にPDZドメインを持つが、その構造の中にキナーゼ領域を有していない。後に同定された他のRhoの標的蛋白質であるROCKファミリーやCitronが、細胞骨格や細胞質分裂において重要な役割を果たしているという報告がなされる一方、Rhophilinについては、その機能は一切不明であった。本研究は、マウスにおいて、RhophilinのmRNAの組織分布や細胞局在を明らかにすることにより、その機能を推定しようとしたものである。

Rhophilin cDNAをプローブとして、ノーザンブロット法を施行したところ精巣に極めて多くのシグナルを認めた。そこで精巣内の細胞構成に注目して、精巣を生後日数に従って摘出し、それらを用いて同様のノーザンブロット法をしたところ、生後18日の精巣から漸増するシグナルを認めた。さらに生殖細胞を欠損した変異体であるW/W^vマウスの精巣ではRhophilinの発現はみられず、この発現は生殖細胞に特異的であることが判明した。

さらに検討を加えるために精製Rhophilin蛋白を用いて抗Rhophilinポリクローナル抗体を作成した。この抗体を使って精子蛋白に対してウェスタンブロット法を行ったところ、分子量71kDaのバンドを検出し、これは特に精子の尾部の分画にみられることがわかった。この抗体のアフィニティー精製を行ったのちに免疫蛍光法で顕微鏡下に精子を観察したところ、精子尾部の主部を縦走する二条の線とそれをつなぐrib状の構造がみられ、これは解剖学的に線維鞘とよばれているものと一致した。線維鞘は哺乳類の精子に特有の構造で、体細胞にはこれに類する構造はみられない。

以上の結果から、Rhophilinは精子尾部の主部に局住し、これは線維鞘に一致すると考えた。またその発現量が、比較的少量であることと、シグナル伝達に関与するといわれるPDZドメインを構造中に有していることから、Rhophilinは構造蛋白ではなく調節蛋白の一員として、機能しているのではないかと考えている。臨床的には、男性不妊症の中に精子無力症と

いう病態があり、鞭毛運動の不全に細胞骨格を制御するRhoや、標的蛋白であるRhophilinの関与もありうると考えられ、本研究はRho標的蛋白と精子の関係について初めて検討されたものであり、その関与についての研究の嚆矢になるものと考えている。

論文審査の結果の要旨

本研究は、Rhoの標的蛋白Rhophilinの組織分布や細胞局在を明らかにして、その機能を推定しようとしたものである。ノーザンブロット法では精巢に極めて多くのシグナルを認め、これは生後18日から漸増した。さらに生殖細胞の欠損変異体での発現はなかった。

抗体で精子蛋白にウェスタンブロット法を行ったところ、特に精子尾部分画にシグナルがみられた。精製抗体で精子を観察したところ、精子尾部の主部を縦走る二条の線とそれをつなぐ構造がみられ、これは線維鞘と一致した。

以上の結果から、Rhophilinは精子の線維鞘に局在し、また発現量が少量で、シグナル伝達に関与するといわれるPDZドメインをもつことから、Rhophilinは調節蛋白の一員ではないかと考えられた。臨床的には、精子無力症に、細胞骨格を制御するRhoや、標的蛋白であるRhophilinの関与もありうると思われ、本研究はRho標的蛋白と精子の関係について初めて検討されたもので、その関与についての研究の嚆矢になるものである。

以上の研究は、Rhoの標的蛋白であるRhophilinの機能の解明に貢献し、精子運動の基礎的研究に寄与するところが多い。

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11年3月3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。