

氏 名	藤 田 明 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2176 号
学位授与の日付	平 成 12 年 1 月 24 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 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻
学位論文題目	Ropporin, a sperm-specific binding protein of rhophilin, that is localized in the fibrous sheath of sperm flagella (Rhophilin 結合蛋白質 ropporin は精子尾部, 線維鞘に局在する)

論文調査委員 (主 査) 教 授 月田承一郎 教 授 小 川 修 教 授 成 宮 周

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 および Cdc 42 と共に Rho サブファミリーを構成し, 細胞骨格系の制御を通じ細胞運動, 細胞接着, 細胞質分裂を制御する。一方で Rho の個体での作用機構の一機序として, 非常に特殊な機能を限定された場所と期間に行っている可能性が予想される。Rho は他の低分子量 GTP 結合蛋白質と同様に, その GTP 結合型において標的蛋白質と結合してその機能を発揮することが知られている。我々は生体高次機能に於ける Rho の作用を探索するため, 我々がこれまでに同定した下流分子のうち, rhophilin に着目した。Rhophilin は成体マウスにおいて, 腎臓, 精巣, 脳に発現しており, 特に精巣において高い発現が認められた。精巣におけるさらなる解析の結果, rhophilin は精子尾部に局在しており, この部位において, 何らかの機能を発揮していると予想された。Rhophilin はそのカルボキシル末端領域に蛋白質結合ドメインとして知られる PDZ ドメインを持ち, その作用発揮のメカニズムとして, アダプター蛋白質として働く可能性が考えられた。我々はこの PDZ ドメインと結合する蛋白質を探索する目的で, 酵母ツーハイブリッド法を用い, マウス精巣の cDNA ライブラリーをスクリーニングした。結果, Rhophilin の PDZ ドメインと特異的に結合する新規蛋白質 ropporin を同定した。この分子は分子量 24 kDa で, アミノ末端に A キナーゼ制御サブユニット (RIIa) の A-kinase anchoring protein (AKAP) 結合領域と相同性を認めるモチーフを有していた。RIIa はこのアミノ末端部のドメインで二量体を形成し AKAP と結合することが知られているが, ropporin も, この領域を介して多量体を形成した。ノザンプロット解析の結果, ropporin は, 精巣にのみ発現しており, 精子形成後期に発現が認められた。我々は ropporin に対する抗体を作成して, この分子の局在を調べた。ropporin は, 精子尾部に存在した。免疫組織学的に局在を調べたところ, rhophilin は尾部の主部にのみ認められるのに対し, ropporin は尾部先端まで存在していた。電子顕微鏡にて免疫染色を試みたところ, rhophilin は精子尾部の outer dense fiber と fibrous sheath に存在した。一方 ropporin は fibrous sheath の内側面に沿って認められた。このように rhophilin と ropporin は非常に近接した局在を示すが, ropporin は fibrous sheath の成分ではなく, むしろこの内側面に結合蛋白質を介して局在していると考えられた。fibrous sheath は, 精子が運動性を獲得する際に, その構成成分がリン酸化されることが知られており, 精子運動に伴うシグナル伝達場と考えられている。しかし, この分子メカニズムの詳細はいまだ明らかではない。Rho の特異的阻害作用を持つ C3 毒素で精子を処理すると精子の運動能が低下したという報告もあり, Rho は精子運動に関与すると考えられる。Ropporin の同定は, 今後精子運動に伴うシグナル伝達への Rho の関与の解明の糸口になると期待される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

Rho は Ras 類似低分子量 G 蛋白質ファミリーに属し, 細胞骨格系を制御する。Rho の下流で働くエフェクター分子の一つである rhophilin は, 成体マウスの精巣に高い発現が認められ精子尾部に局在するが, その機能は不明である。申請者は

酵母ツーハイブリッド法を用いて, rhophilin と結合する蛋白質を探索した。その結果, rhophilin と特異的に結合する新規蛋白質 ropporin を同定した。ropporin は分子量 24 kDa で, アミノ末端において A キナーゼ制御サブユニットの AKAP 結合領域と相同性を認めた。ノザンプロット解析の結果, ropporin は, 精巣にのみ発現しており, 精子形成後期に発現が認められた。免疫組織学的に局在を調べたところ, ropporin は精子尾部の fibrous sheath の内側面に沿って存在した。rhophilin の免疫原性は outer dense fiber の外側面に認められた。

以上の研究は精子運動に伴うシグナル伝達の解明に貢献し細胞生物学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 12 年 1 月 6 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。