

氏 名	劉 成 淑
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2372 号
学位授与の日付	平成 13 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	理 学 研 究 科 生 物 学 専 攻
学位論文題目	Testis-Specific Proteins, MFSJ1 and PRM2, of Japanese Monkey, <i>Macaca fuscata</i> . Molecular cloning of cDNAs, structural analysis, and expressional change during development and reproductive season (ニホンザルの精巣特異的タンパク質, MFSJ1 及び PRM2 : cDNA の molecular cloning, 構造分析, 発達と繁殖季節による発現変化)
論文調査委員	(主 査) 教 授 竹 中 修 教 授 景 山 節 教 授 松 林 清 明

論 文 内 容 の 要 旨

精子形成は細胞の増殖と分化, 減数分裂, 精子完成を含む複雑な過程である。精子形成活動を調節するホルモン等についてはよく知られているが, 精子形成に関連する特異的発現遺伝子についてはまだよく解っていない。新鮮な試料採取が可能でかつ季節繁殖性を示すニホンザル (*Macaca fuscata*) を対象に Differential display PCR 法により精子形成に関与する遺伝子を検索した。発達加齢過程および繁殖期非繁殖期で発現に大きな差違が検出された遺伝子のなかで, MFSJ1 (*Macaca fuscata* spermatogenic DnaJ protein) と名付けた遺伝子および, PRM2 (protamine 2) という遺伝子をさらに解析した。MFSJ1 は242のアミノ酸からなるタンパク質をコードし, DnaJ タンパク質に特徴的な構造であるアミノ末端の J domain とそれに続く Gly/Phe-rich domain を有していた。MFSJ1 の J domain がヒートショックタンパク質 Hsp70 と結合し, タンパク質の折りたたみと細胞内輸送に関与していると思われる。ノーザン分析および in situ ハイブリダイゼーションにより種々の組織での MFSJ1 の発現を調べ, 精巣のみでの発現していること, 発現は精細胞で強く見られ, さらに成体および老齢個体で強く発現しているが若年個体では殆ど発現していないことを明らかにした。成体オス3頭を用い繁殖期, 非繁殖期に同一固体からバイオブシーにより採取した試料の分析から, 各季節での MFSJ1 の発現を調べたところ, 非繁殖期では弱い発現しか見られなかったが血中テストステロン量と精巣重量が増加する繁殖期には精細胞で強い発現が見られた。PRM2 は103のアミノ酸からなるアルギニンに富む塩基性タンパク質をコードし, その配列は他の哺乳類のプロタミンに類似していた。PRM2 は精子形成において精細胞クロマチンの凝縮を起こすヒストン-プロタミン交代に不可欠であるこの遺伝子も精巣でのみ発現しており, 若年個体で発現が見られず, 成体および老齢個体精巣での発現, 特に精細胞での発現を確認するとともに, 発現能力は老齢個体で減少することを明らかにした。ノーザン分析と in situ ハイブリダイゼーションを用いて PRM2 発現の季節変化を調べたところ, 非繁殖期には殆ど発現は見られなかったが精子形成が旺盛な繁殖期には精細胞で強い発現が見られた。以上の結果, MFSJ および PRM2 は精子形成に関与する精巣特異発現遺伝子であり, 加齢と季節変化による発現変化を明らかにした。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究はニホンザルの精巣において発現している遺伝子について Differential Display PCR 法により調べたものである。二つの試料を分析している。一つは発達加齢, 他は繁殖期と非繁殖期の変化である。申請者は二つの遺伝子に注目し分析した。DnaJ タンパク質ファミリーに属すると考えられる MFSJ1 と名付けたタンパク質をコードする遺伝子とプロタミン遺伝子 (PRM2) である。前者はヒートショックタンパク質 HSP40 と共同し, 細胞内のタンパク質の折りたたみや細胞内輸送に関係しているとされ, 塩基配列と推定したアミノ酸配列から DnaJ タンパク質 II に属することを明らかにしている。また後者のタンパク質は精子における核凝縮との関係が示唆されている。

まず13種の臓器や組織を用いたノーザン分析によりこれらの遺伝子は脳や肝臓その他の臓器での発現はなく、精巣でのみで発現されていること、また In situ ハイブリダイゼーション法により精巣組織の中で、精細胞で強く発現していることを明らかにした。発達加齢に伴う変化では、精子形成のない2才の個体ではこの遺伝子の発現が見られないこと、9才の個体での強い発現、31才の老齢個体ではMFSJ1の持続的な発現とPRM2遺伝子発現の減衰を明らかにしている。精子形成の後期における核凝縮との関連で興味のある結果といえる。

さらに明確な季節繁殖性を示すニホンザルに注目した解析として、成体のオスザルの非繁殖期と繁殖期での比較を行っている。非繁殖期のサルではこれらの遺伝子の発現はないこと、繁殖期での強い発現を明らかとした。これらの結果は精子形成とこれらの二つの遺伝子の発現とが密接に関係していることを明らかにした。

以上この研究は、Differential Display PCR 法による発現遺伝子の検出、塩基配列決定、リボヌクレアーゼ分解抵抗性検出法、ノーザン分析、In situ ハイブリダイゼーション法などを駆使し、精子形成と遺伝子発現に迫った研究である。とくにサルにおけるDnaJ遺伝子の初めての研究結果はこれらのタンパク質群の機能を明らかにするための第一歩と言って良い、熟練した実験技術により生体の生理機能発現と遺伝子発現との関連を詳細に記述したことは、申請者が研究者として十分な能力を持つことを示している。

よって本論文は博士（理学）の学位を授与するに価値あるものと認定した。なお、平成13年2月2日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。