

氏 名	しょう じ まさ のぶ 庄 司 昌 伸
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2941 号
学位授与の日付	平 成 18 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	RNA interference during spermatogenesis in mice (マウス雄生殖細胞への遺伝子導入法の開発と RNA 干渉法の応用)

論文調査委員	(主 査) 教 授 篠 原 隆 司	教 授 藤 田 潤	教 授 山 中 伸 弥
--------	----------------------	-----------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

雄生殖幹細胞は自己増殖を繰り返す一方、減数分裂を経て半数体精子への分化を行い、受精を介して次世代に遺伝情報を伝達する。これら雄生殖細胞の発生分化過程を制御する分子機構を明らかにすることは広く幹細胞の増殖分化機構の解明へつながると考えられる。従来遺伝子改変動物の作出等により遺伝子機能の解析が行われてきたが、雄生殖細胞へ直接遺伝子導入を行い迅速に分子生物学的解析を行うための有用な実験系は確立されていなかった。特に哺乳類雄生殖細胞の精子への分化を生体外で再現することが困難であることから、雄生殖細胞への遺伝子導入法として成体精巣を用いたエレクトロポレーション法が試みられてきたが、減数分裂期以前への遺伝子導入は困難であり、遺伝子機能獲得及び抑制解析はほとんど行われていなかった。

本研究では、まず雄生殖細胞の各分化段階、すなわち精原細胞（自己増殖期）、精母細胞（減数分裂期）、半数体精細胞（精子変態期）に対する生体内遺伝子導入条件の作出を検討した。発生段階の異なる幼弱マウス精巣と雄生殖細胞特異的レポーター遺伝子を用い、また遺伝子導入条件の詳細な検討を行うことにより、精原細胞、精母細胞及び精細胞において特異的なレポーターの発現が可能となった。同手法により、迅速に複数の外来遺伝子を雄生殖細胞へ導入することが可能となり、分化段階特異的な過剰発現解析やプロモーター解析を効率良く行うことが可能となった。

次に遺伝子機能抑制系の作出を目的として RNA 干渉法の応用を検討した。RNA 干渉ベクターとレポーター発現ベクターを導入することで精原細胞、精母細胞及び精細胞の各分化段階において配列特異的な導入遺伝子の発現抑制が示され、RNA 干渉に関わる分子機構が雄生殖細胞の分化過程を通じて機能していることが明らかとなった。また、同 RNA 干渉法を用いて減数分裂期に特異的に発現する組換えタンパク質である DMC1 の発現抑制を行うことで精母細胞は分化異常を示し、*Dmc1* ノックアウトマウスと同一の表現型を示すことを確認した。以上の結果から生体精巣への遺伝子導入法を用いた RNA 干渉法により遺伝子機能の抑制が可能であることが示された。

本研究は雄生殖細胞の増殖分化に関わる遺伝子群の機能獲得及び抑制解析のための極めて有効な手法となり、生殖細胞や幹細胞の基礎生物学的研究に貢献すると共に、男性不妊の原因遺伝子の解明等への応用も期待される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、精巣へのエレクトロポレーション法を応用し、雄生殖細胞の *in vivo* における分子生物学的研究のための新たな実験系を開発したものである。

成熟前の精巣における精子形成に着目し、エレクトロポレーション法の条件を検討することにより、精原細胞、精母細胞および半数体精細胞の各分化段階においてマーカーを特異的に強制発現させることに成功している。さらに FACS 解析により遺伝子導入効率を明らかにしており、再現性のある実験系であることを証明している。また、RNA 干渉法を用いることで精子形成の各分化段階において RNA 干渉が誘導されることを見出し、減数分裂特異的な組み換えタンパク質である

Dmc1 をノックダウンすることで精母細胞の分化が停止することを示している。この表現型は *Dmc1* ノックアウトマウスと同一のものであり、精巣へのエレクトロポレーション法により雄生殖細胞特異的遺伝子の機能抑制解析が可能であることを初めて証明している。

以上の研究は、雄生殖細胞の基礎生物学的研究に貢献し、生殖細胞の増殖分化を制御する分子メカニズムの解明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18年1月19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。