

## 審査結果の要旨

氏名 川崎裕史

本研究はマウス精母細胞核—細胞質間を往復するシャトリング蛋白テスミンの生理学的機能解明の一環として、そのシャトリング機構を調べるため、遺伝子工学的手法（デリーションミュータントの作成と細胞導入）を用いてシャトリング機能を担う配列を同定し、さらに、動物実験および細胞実験にて、酸化ストレス投与後のテスミンの細胞内局在変化の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. テスミン分子内に、他のシャトリング分子と相同性を示した核外移行因子と想定される2ヶ所の配列を検索によって探し当て、この配列が、真に核外移行に関与しているかを、テスミンおよび各種欠失配列、点突然変異配列を導入したテスミンを GFP で標識し、培養細胞に発現させた後、leptomycin B 処理を行ない、その発現蛋白の細胞内局在を検討した。その結果、テスミンの C 末端にある典型的 NES 配列を含む 25 アミノ酸残基が機能的 NES 配列(以下 NES<sub>テスミン</sub>)であり、他の1箇所は関与しないことが示された。
2. NES<sub>テスミン</sub>配列の中のアミノ酸を中性アミノ酸に置換する点突然変異の解析により、テスミンの核外輸送には、古典的な4つのロイシン等の疎水性配列のみならず、配列中の458番目のシステインならびにその周辺の電荷アミノ酸残基が重要である事が示され、このシステインが細胞の酸化—還元状態を感知し、細胞内局在を変化させているという可能性が考えられた。
3. 細胞実験において、GFPで標識した NES<sub>テスミン</sub>が発現した培養細胞に酸化ストレスを与えた結果、NES<sub>テスミン</sub>の核内蓄積が示された。「酸化ストレスの4時間の暴露」という処置が「核膜孔の機能不全」などの2次的影響を細胞に与え、結果的にいくらかの蛋白を素通りさせてしまった可能性も否定はできないものの、酸化ストレスの暴露前後における NES<sub>テスミン</sub>の核内蓄積の変化を検討した結果、ジエチルマレイン酸処理により、NES<sub>テスミン</sub>

の核内蓄積は陰性対照である NES<sup>Rev</sup> と比較して明らかに増大した事が示された。したがって、NES<sub>テスミン</sub>がレドックス感受性である可能性が考えられた。

4. 細胞実験において、全長テスミンの酸化ストレスに対する反応を検討した結果、GFP で標識した全長テスミンは培養細胞に発現した後、酸化剤処理によって核内蓄積する割合は、同時に添加した還元剤の濃度に依存して阻害された。また、標識をしていない全長テスミンは、培養細胞内に発現した後、酸化剤処理によって、大半の細胞の核内に強く蓄積したことが免疫組織学的解析によって示された。このテスミンの核内蓄積は、先に示された核外移行因子のシステインの酸化-還元状態認識による機能変化に基づくものと推論された。
5. ホモロジー検索の結果、テスミンのホモログは NES<sub>テスミン</sub>と高い相同性を示したことから、酸化ストレスが NES 機能を阻害する分子機構は、他の動物種にも広く共通する分子機構である可能性が考えられた。

以上、本論文は精巣特異的シャトリング蛋白テスミンにおいて、遺伝子工学的手法による解析により、現在のところ高等真核生物においては、まだ見つかっていないレドックス制御を受ける NES の存在を指摘し、実際に、マウス精母細胞内における酸化ストレスによるテスミンの細胞内局在変化を示す結果を得ている。本研究はこれまで未知に等しかった、精巣における酸化ストレスによるシグナル伝達、男性生殖細胞の分化の解明にも貢献する可能性も考えられ、学位の授与に値すると考えられる。