

論文審査の結果の要旨

申請者氏 盛 真友

本論文は Y 染色体遺伝子群の分子機能解析に関するもので、4 章より構成される。哺乳類の性差を規定する遺伝的要因は、Y 染色体を主とした遺伝学的な性差と、アンドロゲン（男性ホルモン）やエストロゲン（女性ホルモン）といった性ステロイドホルモン作用に依存した性差の二つに大別することができる。

Y 染色体上には X 染色体と組み換えを起こさない非相同領域が存在し、この領域に存在する精子形成を始めとした男性特異的な機能を有する遺伝子群は、雄性化に必須であると考えられる。精子形成に関与する領域は更に少なくとも 3 つに分類され、AZFa、AZFb、AZFc (Azoospermic-factor loci a, b, and c) と呼ばれる。中でも AZFb 領域では *RBMY* 遺伝子が精子形成主要因子として考えられているものの、その機能については全く不明である。このように、Y 染色体非相同領域には約 27 種の遺伝子の存在が予測されているものの、雄性化における大多数の遺伝子機能は不明である。

一方、性ステロイドホルモンは様々な生理作用を通じ雌雄両性において性差を形成する。一般に性ステロイドホルモンは核内レセプターを介し、転写共役因子群（コアクチベーター、コリプレッサー）による転写制御により生理作用を発揮する。最近、エストロゲンレセプター (ER) α KO マウスの観察から精子形成不全が見い出され、女性ホルモンの精子形成への必須性が明らかにされている。しかしながら、ER α の標的生殖細胞種、及びその細胞種での機能は不明である。

本研究では、そこで Y 染色体上に存在する遺伝子群と性ホルモン依存性遺伝子群との機能的相関性を解析することによって、性差、特に雄性化の遺伝学的基盤を探ることを目的とする。

第二章では、ヒト Y 染色体遺伝子群の機能解析を行っている。Y 染色体機能と性ステロイドホルモン作用は共に、精子形成、攻撃性、身長差等の雄性的表現型に寄与することが知られている。しかしながらそれらの作用経路は、独立して捉えられている。そこで、Y 染色体遺伝子群の発現及び機能に対するアンドロゲン、エストロゲン作用、及びレセプターの転写活性化能に対する作用を検討することによって、この 2 つの経路における協調性を検証した。培養細胞系において、DHT、 E_2 に対して応答する遺伝子群は検討した遺伝子 27 種類中、*HSFY*、*BPY*、*CDY*、*ZFY*、*TBL1Y* の 5 種存在した。更に、AR、及び ER α 、ER β への転写活性化能に対する効果をレポーターアッセイにて検討したところ、DAZ は ER α を正に、TSPY、DAZ は AR を負に制御した。中でも *RBMY* 遺伝子は Y 染色体の精子形成不全領域 AZFb に存在し、その機能を担う最有力候補遺伝子であるため、ER α への転写共役機能を詳細に解析した。ER α の 2 つの転写活性化領域 AF-1 及び AF-2 に対する結合を検討した結果、AF-1 領域に対する結合活性を示した。また AF-1 領域内の *RBMY* との結合領域は AF-1 コアと呼ばれる中央部に位置した。これらの結果より、ER α AF-1 の転写活性に対して *RBMY* は転写共役活性化因子（コアクチベーター）として機能することを見い出した。

次に、第一減数分裂阻害をおこす 21 種類の遺伝子について、 E_2 による発現変動を検討

した。その結果、mRNA 発現はテロメラーゼの酵素活性本体である *hTERT* 遺伝子においてのみ亢進した。またゲルシフトアッセイを行った結果、配列特異的に $ER\alpha$ の結合が見られた。精巣癌由来細胞株を用いて経時的 ChIP assay を行った結果、*hTERT* プロモーター上に見られる ERE 様配列に対するリガンド依存的な $ER\alpha$ と RBMY の結合が見られ、経時変化に伴ってエクソン内部に RBMY のみの結合が見られた。このため、転写共役活性化能以外の RBMY の機能としてスプライシングへの関与が期待された。そこで、*hTERT* に対しエストロゲン投与において変動するスプライシング部位を調べた結果、 β スプライス部位として知られる領域において主要なバリエーションの遷移が見られた。更に NEC14 細胞を用いた蛋白質精製から 5 種類の相互作用因子群候補のバンドパターンを得た。

$ER\alpha$ の精子形成に関与する生殖細胞内の分子機構は未解明であり、標的遺伝子も特定されていない。また精子形成不全候補遺伝子としてクローニングされた RBMY もその分子機能は未解明であった。本研究により、この両者が機能的に相関することを初めて見出した。即ち、RBMY は転写共役活性化因子として機能することを証明した。更に、 $ER\alpha$ の標的遺伝子である *hTERT* の転写、及びスプライシングに RBMY は影響を与えることが明らかとなった。*hTERT* KO マウスが精子形成不全を呈することから、 $ER\alpha$ 、RBMY、*hTERT* の精子形成における遺伝子カスケードの一端を明らかにした。

第三章では、マウス Y 染色体遺伝子群のスクリーニングと性状解析を行っている。マウス Y 染色体のゲノムプロジェクトは未完である。そこで、マウス Y 染色体上に位置する新規遺伝子群のスクリーニングを試みた。Direct selection 法を用いて、脳においては 1 種類、精巣においては 41 種類の遺伝子断片を取得した。性ステロイドホルモン作用による性差を生じる分子機構に、Y 染色体上の遺伝子機能による雄性的シグナルや転写共役活性が関与する例は、現在までに報告されていなかった。第二章の結果から、独立した経路であると考えられていた Y 染色体上の遺伝子機能と性ステロイドホルモン作用との雄性化における関連性を、RBMY、TSPY、DAZ 蛋白質の性ホルモンレセプター転写共役因子機能から明らかにすることができた。また、マウス cDNA のスクリーニングによって得られた Y 染色体遺伝子群は大部分が未知遺伝子である。このマウス Y 染色体新規遺伝子群の挙動もまた、Y 染色体と性ステロイドホルモンとの相関性を支持する結果を導いた。

哺乳類の遺伝的性差には、それを規定する二つのカテゴリー、即ち、1) Y 染色体を主とした遺伝学的なカテゴリーと、2) アンドロゲンやエストロゲンといった性ステロイドホルモンに依存したカテゴリーが知られてきた。本研究の結果より、第 3 の分類として、3) Y 染色体遺伝子群と性ステロイドホルモンの協調効果によるカテゴリーが、性差規定における雄性化の遺伝学的基盤の一端を担うことを明らかにした。

以上、本論文は Y 染色体遺伝子機能と性ステロイドホルモン作用との相関性を解明しており、転写制御学、分子発生学いずれの分野においても発展性が期待され、学問上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。