

審査の結果の要旨

浦野 敦司

小児急性白血病因遺伝子の1つである *MLL (Mixed Lineage Leukemia)* は、染色体相互転座により 30 種類以上の遺伝子と融合遺伝子を形成し、白血病発症に関与するが、その転座相手遺伝子は白血病の表現系を規定する。*AF5q31* はファミリー遺伝子の *AF4* や *LAF4* と同様に *MLL* と融合遺伝子を形成し、リンパ性白血病の発症に関与する。本研究は *AF5q31* 遺伝子欠損マウスを作成することにより、生体内における *AF5q31* の機能解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. 21 個のエキソンより構成されるマウス *AF5q31* のうち、1st ATG を含む第 2 エキソンと第 3 エキソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換し、定法に従って *AF5q31* 欠損マウスの作成を行った。*AF5q31* 欠損マウス胎仔繊維芽細胞の total RNA を用いた RT-PCR 法および、精巣を用いた免疫染色法による解析から、*AF5q31* 欠損マウスにおける *AF5q31* の欠損が確認された。
2. *AF5q31* 欠損マウスは胎生 12.5 日目までにその 1/2 が、また 3/8 が生後 24 時間以内に死亡するが、残り 1/8 は正常に発育した。この生存した *AF5q31* 欠損マウスでは、健康状態および行動の異常は観察されず、骨髄細胞や末梢血を用いた血液学的解析からも、異常は認められなかった。
3. 生殖能力テストの結果、オスの *AF5q31* 欠損マウスは一部にプラグ形成が確認されたものの、全ての雄において不妊が確認された。ノーザンブロット法による解析から、*AF5q31* ファミリー遺伝子中、マウス精巣での発現が確認されたものは *AF5q31* のみであった。
4. 解剖学的解析から *AF5q31* 欠損マウスでは精巣および精巣上体の著しい縮小が観察された。精巣上体尾部内の精子数は、*AF5q31* 欠損マウスでは野生型マウスの 0.1 % 以下であり、観察された全ての精子がアポトーシス後の残骸であったことから、*AF5q31* 欠損マウスは無精子症であることが確認された。血中のテストステロン濃度測定では、*AF5q31* 欠損マウスと野生型マウスの間に差は認められなかった。

5. 病理学的解析において、*AF5q31* 欠損マウスの精巣上体尾部に精子は全く観察されなかった。同様の解析を精巣において行った結果、ライディッヒ細胞およびセルトリ細胞は正常に観察され、step 11 までの精子細胞も正常に観察されるが、それ以降の精子細胞および内腔に放出された精子は観察されなかった。
6. 免疫染色法を用いた解析において、*AF5q31* は主にセルトリ細胞において発現が確認された。精子形成に関与する遺伝子の発現を RT-PCR 法を用いて探索した結果、精子細胞におけるヒストンのクロマチン変換に必須である *TP2* および *Prm1*・*Prm2* に著しい発現の低下が認められた。
7. TUNEL 法を用いて野生型マウスおよび *AF5q31* 欠損マウスの精巣を比較したところ、*AF5q31* 欠損マウスにおいて約 6 倍以上の精子細胞がアポトーシスを引き起こしていることが示された。

以上、本論文は遺伝子欠損マウスの解析を通して、*AF5q31* がマウスの発生過程に大きな役割を担っていること、染色体相互転座により生じた MLL-*AF5q31* 融合遺伝子産物は *AF5q31* に対する優性抑制変異体として機能している可能性が低いこと、*AF5q31* は精子形成と生殖細胞の生存に必須であることを示すものである。本研究はこれまで未解明の部分が大きかった *AF5q31* ファミリー遺伝子の機能の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。