

論文の内容の要旨

論文題目 マウスの生殖細胞における転写因子 p63 の発現様式

氏 名 中 牟 田 信 明

様々な研究から、精子形成細胞のアポトーシスや減数分裂の制御、細胞周期の停止における癌抑制因子 p53 の関与が示されている。しかし、非常に重要な機能を担うにもかかわらず、p53 遺伝子欠損マウスが正常に発生し生殖能力をもつことは、何らかの因子によって p53 の機能が代替される可能性を示唆する。p53 ファミリーに属する p63 は、p53 と高い相同性をもつ。p63 遺伝子には 2 つのプロモーターが存在する。N 末端の転写活性化(TA)ドメインをもつ TAp63 と、それを欠くΔNp63 である。TAp63 は細胞周期停止やアポトーシスを誘導し、ΔNp63 は TAp63 や p53 の転写活性を阻害するドミナントネガティブな作用をもつ。さらに、選択的スプライシングによって 3 つのアイソフォーム、α、β、γを生じるため、p63 タンパクには少なくとも 6 通りある。生殖腺における p63 の発現と機能に関しては不明な点が多く、本研究では、これらの点を明らかにするため、マウスの生殖細胞における p63 の発現を、生まれた直後から成体まで(第 2 章)、胎子期(第 3 章)、および、始原生殖細胞の移動・定着期(第 4 章)について調べた。

哺乳類の精子発生過程は、体細胞分裂による精祖細胞の増殖と、精母細胞から精子細胞

に至る減数分裂、および、運動に適した精子へと変形する3つの段階に分けられる。また、新生子の精巣に存在する増殖を停止した生殖細胞は、生後数日経つと分裂して精祖細胞を生じ、生後10日目頃に精母細胞、生後3週目頃に精子細胞が出現し、生後6週目頃に性成熟する。第2章ではまず、生まれてから成体に至るまで、様々な日齢のマウス精巣に、どのp63転写産物が存在するかを検討した。その結果、TAp63のmRNAが生まれた直後から成体に至るまで常に検出されたのに対し、 Δ Np63の発現は、生後1週間と、生後3ないし4週目に限られていた。 Δ Np63の発現が認められたこれらの時期は、生殖細胞の増殖再開時期とアポトーシスのピーク時期にそれぞれ一致し、それらの制御に Δ Np63が関わっている可能性が示唆された。3種類のC末端については、 β でなく α と γ をコードするスプライシング産物が精巣に存在した。次に、様々な日齢のマウス精巣からタンパク試料を調製してウェスタンブロット解析を行ったところ、生まれた直後から成体まで全ての時期に約68 kDのバンドが、また、生まれた直後にだけ約60 kDのバンドが検出された。アミノ酸数から予想される分子量が最も近いのはそれぞれ Δ Np63 α (67.3 kD)とTAp63 β (59.3 kD)であるが、RT-PCRの結果を考慮すると、これらのタンパクはそれぞれ分子量の比較的近いTAp63 α (73.7 kD)と Δ Np63 α (67.3 kD)である可能性が高い。最後に、免疫組織化学でp63タンパクの発現を検討した結果、生後10日目以降の精巣組織にp63陽性反応は観察され、パキテン期以降の精母細胞と円形精子細胞にp63タンパクの局在が示された。精子発生の特定の段階に転写因子であるp63が核に局在することから、このタンパクが精子形成細胞の分化過程で重要な役割を担うこと、特に、精母細胞に発現するp53と同様、減数分裂に不可欠な細胞機能の制御に関わっている可能性が示唆された。

マウスの精巣は胎齢12.5日目の雄胎子生殖腺に精巣索が生じることで形成される。それより前の未分化生殖腺では、形態的に雌雄を区別できない。雌胎子の生殖腺では減数分裂が開始するのに対し、精巣では胎齢13.5日目頃に生殖細胞の増殖が停止する。胎子生殖細胞におけるp53について、正常動物での発現様式やノックアウトマウスの解析が進んでいるのに対し、胎子生殖細胞とp63との関係について調べた報告は無い。そこで、第3章ではマウス胎子生殖腺におけるp63の発現を調べるとともに、精巣については、p63陽性細胞の細胞種を同定するため、p63とセルトリ細胞のマーカーであるSox9との2重染色を行った。まず、RT-PCRによって調べた結果、胎齢13.5日目から18.5日目までの精巣と卵巣の両方に、TAp63と Δ Np63両タイプの発現が示された。3'側については、 α アイソフォーム

μとγアイソフォームは胎齡 13.5 日目から 18.5 日目までの精巣と卵巣で常に検出されたが、βアイソフォームをコードするスプライシング産物は、調べた期間を通して雌雄ともに検出されなかった。免疫組織化学では、胎齡 13.5 日目から 18.5 日目までのマウス胎子精巣および卵巣において、p63 タンパクは生殖細胞に発現していることが示された。発生が進むにつれて、精巣では染色性が減弱したのに対し、卵巣では常に強い陽性反応を認めた。調べた期間を通して、p63 陽性反応は雌雄とも生殖細胞の核に認められ、細胞質は陰性であった。さらに、胎齡 13.5 日目の精巣切片における p63 と Sox9 の 2 重染色では、それぞれの陽性反応が精巣索の中で明らかに異なる細胞に観察され、p63 の発現は生殖細胞に特異的であることが示された。マウス胎子の精巣と卵巣に p63 が発現し、p63 タンパクがマウス胎子生殖細胞の核に局在することから、胎子精巣における生殖細胞の増殖停止やアポトーシスだけでなく、卵巣における減数分裂の制御にも、p63 は p53 と共同して、或いは p53 の非存在下では p53 に代わって、関与しているのかもしれない。

胚発生過程において、生殖細胞は将来生殖腺が形成される領域から離れた場所で生じた後、細胞分裂によって数を増やしながらか、生殖腺原基まで胚体内を移動する。第 4 章ではマウスの生殖細胞における p63 発現が胚発生のいつから始まるのかを検討するため、始原生殖細胞が現れる胎齡 7.5 日目から性分化の起こる胎齡 12.5 日目まで、免疫組織化学により p63 の発現時期と部位を調べた。さらに、始原生殖細胞が移動・定着した生殖腺原基から RNA を調製して RT-PCR 解析を行った。まず、胎齡 7.5 日目のマウス胚について調べたが、始原生殖細胞が生じる尿膜基部には抗体陽性反応を検出できなかった。胎齡 8.5 日目には、後腸の上皮に沿って移動中の始原生殖細胞が p63 を発現していた。胎齡 9.5 日目から胎齡 11.5 日目にかけて、p63 陽性反応は後腸、背側腸間膜、生殖隆起の始原生殖細胞に観察され、胎齡 12.5 日目には精巣原基と卵巣原基の両方で生殖細胞が p63 陽性反応を示した。以上のことから、始原生殖細胞となる細胞の運命決定に p63 タンパクは必要ないが、始原生殖細胞の増殖や運動といった細胞機能の制御に p63 は関わっている可能性が示唆された。

次に、生殖腺原基から RNA を調製して RT-PCR 解析を行った結果、胎齡 10.5 日目の試料からは TAp63 と ΔNp63 の両方が検出された。胎齡 11.5 日目には TAp63 が引き続き増幅されるのに対し、ΔNp63 は増幅されなかった。胎齡 12.5 日目には、TAp63 が雄と雌両方の生殖腺に存在する一方、ΔNp63 は雌雄ともに検出されなかった。これらのデータは始原生殖細胞が尿生殖隆起に定着すると、p63 遺伝子は主として上流の TA プロモーターから転

写されるのに対し、始原生殖細胞がまだマウス胚の背側腸間膜にある時期は TA と ΔN の両プロモーターが使用されることを示唆する。最後に、3'末端におけるスプライシングに関して解析したところ、p63 α と p63 γ が胎齢 10.5 日目から 12.5 日目まで、調べた全ての試料で増幅される一方、 β アイソフォームは胎齢 10.5 日目にだけ検出され、胎齢 11.5 日目と 12.5 日目では検出されなかった。すなわち、生殖腺へ定着する前後を通して認められる α と γ アイソフォームの発現に加えて、背側腸間膜にある時期に特異的な p63 β の発現が RT-PCR によって示された。これらの結果から、胚組織内を移動して生殖腺原基へたどり着いた始原生殖細胞が、生殖腺の形成過程で遺伝子発現を変化させること、p63 はそのような始原生殖細胞の発生に深く関わる遺伝子のひとつであることが示唆された。

以上のように、マウスの生殖細胞における p63 の発現は、これまでに報告されていた成体の精巣だけでなく、生後の発達過程(第 2 章)や胎子期の生殖腺(第 3 章)にも認められることが明らかになった。さらに、p63 の発現は、始原生殖細胞が生殖腺へ移動・定着する時期にまでさかのぼることが出来た(第 4 章)。また、生殖細胞に発現した p63 アイソフォームは、発生の進行につれて複雑に変化することが示唆された。生殖細胞が様々な発生段階でアポトーシスを起こすこと、また、減数分裂や細胞周期停止の起こる時期に p53 と p63 が生殖細胞で共に発現していることは、p63 が p53 と協同して、そして p53 の非存在下では p53 に代わって、これらの細胞機能を制御する可能性を示唆する。複数の p63 アイソフォームが一つの組織に同時に存在することは、アイソフォーム間の相互作用を介した p63 の機能制御機構を考える上で興味深い。p63 タンパクは、異なる種類のアイソフォームが 4 量体を形成して様々な転写活性化能を発揮すると考えられている。ヒトにおける p63 の変異は、眼瞼癒着外胚葉異形成裂隙(AEC)症候群や、欠指外胚葉異形成裂隙(EEC)症候群など、p63-/-マウスの表現型に似た特徴を示す疾患の原因となるが、本研究で示されたように、様々な発生段階の生殖細胞が p63 を発現している事から、生殖機能に関連した疾患に p63 が関わっている可能性は否定できない。今後は、精巣腫瘍や無精子症の患者を対象とした p63 遺伝子の解析が必要と考えられる。