

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 中牟田 信明

精子形成細胞のアポトーシスや減数分裂の制御、細胞周期の停止に癌抑制因子 p53 は関与しているが、p53 遺伝子欠損マウスは生殖能力をもつ。p53 ファミリーに属する p63 は、p53 と高い相同性を示し、N 末端の転写活性化(TA)ドメインをもつ TAp63 と、それを欠く Δ Np63 とに大別される。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 タンパクは少なくとも 6 通り存在する。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いため、本研究では、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と、胎子期、および、始原生殖細胞の移動・定着期について調べた。

第 1 章 (序論) に続く第 2 章では、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 は生まれた直後から成体に至るまで常に検出され、 Δ Np63 の発現は、生後 0 から 1 週目と、生後 3 から 4 週目に限られていた。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。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。

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、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 アイソフォームと γ アイソフォームは胎齢 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、 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、胎齢 13.5 日目から 18.5 日目までのマウス胎子精巣と卵巣において、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。さらに、胎齢 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。

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齢 7.5 日目から性分化の起こる胎齢 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。胎齢 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。

次に、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 解析を行った結果、胎齡 10.5 日目の試料からは TAp63 と Δ Np63 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、 Δ Np63 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、 Δ Np63 は雌雄ともに検出されなかった。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 が胎齡 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齡 10.5 日目にだけ検出され、胎齡 11.5 日目と 12.5 日目では検出されなかった。

本研究はマウスの生殖細胞における p63 の発現が、これまでに報告されていた成体の精巣だけでなく、生後の発達過程や胎子期の生殖腺にも認められることを明らかにし、さらに、p63 の発現開始は、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、また、生殖細胞に発現した p63 アイソフォームが、発生の進行につれて複雑に変化することを示唆するデータを提示している。以上、今回得られた成果は、学術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(獣医学)の学位論文として価値あるものと認めた。