

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 17 年度博士課程 進学
氏名 秋本 千央
指導教員名 加藤 茂明

論文題目 雄性生殖組織における Y 染色体遺伝子群の機能解析

第一章 序論

哺乳類の雌雄において、生殖器官、骨格系をはじめとする様々な組織に性差が存在する。性差を規定する現象は、胎児期における性決定と、性成熟期における性差形成の二つに大別される。性決定は、Y 染色体遺伝子 *Sry* の有無により生殖器官において性の方向性が規定される現象である。一方、性差形成は、性決定後に性特異的に発達した生殖器官で合成される性ステロイドホルモンが、性成熟期に各組織で作用することで完成する。その作用は、雄性においては男性ホルモンであるアンドロゲンが、雌性においては女性ホルモンであるエストロゲンが、核内受容体アンドロゲン受容体 (AR) およびエストロゲン受容体 (ER α , β) を介し、標的遺伝子群の転写制御を行うことで発揮される。

一方哺乳類において性染色体は最も顕著な遺伝的差異といえる。ヒト Y 染色体は 27 種類のタンパク質コード遺伝子と 25 種類の non-coding 遺伝子を有する雄性特異的な性染色体である。Y 染色体は、進化の過程で元来の相同染色体対である X 染色体の原型から、減数分裂での相同組換えの過程で領域欠損や逆位、転座が起こり、現在のサイズへと縮小したため、配列に多様性があることが報告されている。臨床の観点からは、領域欠損、転座による遺伝疾患の報告がなされており、Y 染色体短腕に性腺芽腫関連領域 (GBY)、セントロメア近傍に雄性特異的成長遺伝子 (GCY)、長腕に精子形成責任領域 (AZFa~d) の存在が確認され、生理機能への関与が示唆されてきた。しかしながら雄性特異的生理機能を決定づける Y 染色体上の責任遺伝子はほぼ未同定である。

このような背景から、本研究では Y 染色体遺伝子群による雄性特異的生理機能の制御機構の解明を試みた。これまで遺伝子欠損マウスを用いた解析から、哺乳動物における時期組織特異的な生体内高次機能が明らかにされてきた。しかしながら Y 染色体遺伝子領域欠損モデルマウスは精巣に重篤な機能不全を呈するため、個々の遺伝子の生体内機能は明らかではない。そこで遺伝子自体の分子機能からの生理機能へのアプローチが必要であると考え、最も特徴的な雄性特異的組織である精巣に着目して Y 染色体遺伝子の分子機能の解明を試みた。

まず、ヒト Y 染色体長腕、精子形成責任領域 AZF に存在する遺伝子である *SMCY* 遺伝子に着目し、精子形成におけるエピジェネティック制御における分子機能の解析を試みた。続いて、ヒト Y 染色体短腕 GBY 領域内に存在する *TSPY* 遺伝子に着目し、性ステロイドホルモン作用との協調作用という視点から雄性特異的癌として知られる精巣胚細胞腫瘍 (TGCT: Testicular germ cell tumor) における機能解析を行った。

第二章 精子形成における Y 染色体遺伝子 *SMCY* の機能解析

SMCY 遺伝子は、領域欠損により精子形成不全を呈するヒト Y 染色体長腕 AZF 領域およびマウス Y 染色体短腕 *Spy* 領域に保存された遺伝子であるため、精子形成への機能的関与が推測されてきた。また *SMCY* がヒストン脱メチル化酵素活性を担う *Jmj* ドメインを有する *JARID* ファミリータンパク質に属することから、精子形成において巧みに制御されている生殖細胞でのクロマチン修飾制御との関与に着目し、*SMCY* の機能解析を行った。

まずマウス精巣における *SMCY* の発現パターンを免疫組織化学的手法により解析した。生後の精巣発達の各段階における切片を用いて *SMCY* の発現解析を行ったところ、生後 15 日以降から精母細胞での染色が観察され始め、精巣がほぼ成熟する生後 28 日では、精母細胞から精細胞に渡って *SMCY* の発現が検出された。同時に、精子形成ステージに伴うメチル化ヒストン H3K4 の発現変動も見いだされ、*SMCY* 発現パターンとの関連が示唆された。

そこで次に生化学的手法によりヒト精巣胚細胞腫瘍由来 NEC8 細胞株における *SMCY* の機能的相互作用因子の取得を試みた。NEC8 細胞株において *SMCY* が H3K4 脱メチル化酵素活性を有する事を確認した上で、精巣特異的な *SMCY* 複合体の取得を試みた。NEC8 細胞より調製した核抽出液に対し、リコンビナント FLAG タグ融合 *SMCY* 全長タンパク質をベイトとしてアフィニティー精製を行った。抗 FLAG アフィニティー精製後、グリセロール密度勾配によるサイズ分画を行い、TOF-MS 解析を行った。その結果、精子形成に必須である減数分裂特異的タンパク質 *MSH5* を複合体構成因子として取得した。

MSH5 は減数分裂前期での染色体対合と組換えに必須な DNA 修復因子である。ヒト精巣細胞株から *SMCY/MSH5* 複合体が取得できたことから、マウス精巣における両者の発現を共焦点蛍光顕微鏡で観察した。その結果、*MSH5* は初期レプトテン期の細胞では凝集 DNA との共局在を示さず、*SMCY* の発現が始まるレプトテン/ザイゴテン期の細胞において、凝集した DNA 上での *SMCY* との共局在が観察された。さらに、連続切片を用いた免疫組織化学解析により、*SMCY* および *MSH5* が共発現するレプトテン/ザイゴテン期の細胞において、強いジ、トリメチル化 H3K4 と弱いモノメチル化 H3K4 が観察された。以上の結果から、*SMCY* は精母細胞第一減数分裂前期においては、H3K4 脱メチル化を介してクロマチン状態を制御することによって *MSH5* の凝集 DNA 上へのリクルートに寄与すると推測された¹⁾。

第三章 Y 染色体遺伝子 *TSPY* とアンドロゲン受容体転写活性との機能的相互作用の解析

TSPY 遺伝子は、精巣特異的に発現し、約 30 コピーのクラスターからなるヒト Y 染色体多コピー遺伝子であり、そのコピー数に人種差が存在する事が知られている。未分化生殖腺に発症する性腺芽腫の症例において *TSPY* を含む Y 染色体 GBY 領域の X 染色体への転座が見

られることが知られていた。正常精巣では TSPY は精細胞にのみ発現し、一方 AR は支持細胞であるセルトリ細胞、間質ライディッヒ細胞に発現する。ところが前述の NEC8 細胞において TSPY および AR が共に発現した。NEC8 細胞が雄性特異的組織癌である精巣胚細胞腫瘍由来であることから、その細胞株を正常組織では別の細胞で機能するはずの両者が異所性に共発現する場として、TSPY と AR の機能的相互作用について解析を行った。

まず、転写因子である AR の転写活性化能への TSPY の効果をルシフェラーゼアッセイにより検討した結果、NEC8 細胞においてリガンドであるジヒドロテストステロン(DHT) 依存的な AR 転写活性化を TSPY が抑制することが示された。そこでその転写抑制機構を解明する目的で TSPY と AR との相互作用を検討したところ、TSPY と AR が DHT 非依存的に直接相互作用することが示された。AR および TSPY の細胞内局在を観察した結果、AR が DHT 投与後経時的に細胞質から核への移行を示したのに対し、TSPY は DHT に依存せず常に細胞質での発現が見られ、両者の共局在が細胞質においてのみ観察された。また、TSPY 安定発現 NEC8 細胞を細胞質および核抽出液画分に分画して免疫沈降を行ったところ、TSPY と AR の相互作用は細胞質画分でのみ検出された。そこで、TSPY タンパク量の変化が AR の核移行や転写活性に与える影響を検討した。AR タンパク量は DHT 添加後経時的に増加し、細胞質画分 AR の減少と核画分 AR の増加が確認された。TSPY のノックダウンにより、DHT 添加後の細胞質画分 AR 量が増加したことから、TSPY が核への AR 移行を阻害すると推測された。以上の結果から、TSPY は雄性特異的癌細胞において異所性に共発現した AR への転写活性化抑制作用を示し、その分子機構は、TSPY が細胞質に AR を留め、核移行 AR 量を減少させることに由来する間接的転写抑制機構であると考えられた。

第四章 精巣胚細胞腫瘍におけるアンドロゲン依存性増殖と TSPY 機能の解析

前立腺癌は男性ホルモン依存性増殖亢進を示すことから、抗アンドロゲン作用を治療標的とした化学療法が広く用いられている。精巣胚細胞腫瘍は、組織像からセミノーマと非セミノーマに大別される。前者が予後良好であるのに対し、後者において転移を伴う予後不良例が多く見られる。しかしながら精巣がアンドロゲン産生場であるにも関わらず、精巣腫瘍におけるアンドロゲン作用については不明な点が多い。前章より NEC8 細胞で AR 転写活性が見られたことから、まず精巣腫瘍において細胞増殖へのアンドロゲン応答性が存在するか検討したところ、NEC8 細胞がアンドロゲン依存性に細胞増殖促進を示す事が明らかとなった。そこで TSPY による AR 機能制御がアンドロゲン依存性増殖に及ぼす影響を検討した結果、TSPY 安定発現 NEC8 細胞ではアンドロゲン依存性増殖亢進が抑制された。

続いて精巣腫瘍細胞増殖における AR の分子標的の網羅的探索を行った。発現アレイを用い、野生型 NEC8 細胞および TSPY 安定発現 NEC8 細胞での DHT 添加有無による発現比較を行ったところ、DHT 投与による細胞増殖関連遺伝子群の変動と、TSPY 発現株での逆応答が認められた。定量的 RT-PCR により、野生型 NEC8 細胞と比べ TSPY 安定発現 NEC8 細胞において細胞周期抑制因子群が高発現を示すことが見いだされた。これらの結果から、AR 転写抑制を介して二次的に増殖抑制因子の発現を促したことにより TSPY が精巣腫瘍でのアンドロゲン依存性増殖を抑制したと考えられた。

前章から TSPY 発現量の差が機能制御に関与すると推測されたため、ヒト精巣腫瘍検体を用いて TSPY および AR の発現量解析を行った。その結果、それぞれ異なった発症年齢、病期由来の日本人精巣腫瘍癌組織検体 12 例のうち、悪性度の高い非セミノーマ由来検体群 3 例において AR が高発現を示し、セミノーマ検体群 9 例において逆に AR 発現量が低い傾向が見られた。一方、TSPY 発現量は AR とは逆に非セミノーマ群で高く、セミノーマ群で低い傾向が得られた。TSPY および AR 発現量の逆相関の結果から、AR/TSPY 比はセミノーマ群に対し非セミノーマ群で高値を示し、精巣腫瘍増悪速度の目安として捉えられる可能性が示された。

第五章 総合討論

本研究では、生化学的、細胞生物学的手法を用いた分子機構解析アプローチにより、Y 染色体遺伝子群の発現制御、そして遺伝子固有の分子機能という二つの観点から雄性特異的生理機能における Y 染色体遺伝子群機能解明を試みた。

まず、SMCY は精子形成の進行に伴った発現変動を示し、ステージによって刻一刻と核構造が変換する精子形成において機能のタイミングが調節されていることが示唆された。また SMCY はヒト精巣由来細胞においてヒストン修飾変換活性を示し、時期特異的な機能を示す精子形成制御因子を含む複合体を構成することが見いだされた。腎臓由来 293T 細胞において SMCY が転写抑制に関与する複合体を形成することが報告されている。本研究において、SMCY は時期、組織特異的な複合体を形成する事で、自身の酵素活性を介した雄性特異的な生理機能を発揮すると考えられた。

次に、TSPY は異所性に共発現した AR に対して転写活性抑制作用を示し、精巣胚細胞腫瘍で初めて見られたアンドロゲン依存性増殖への抑制作用を持つことを見いだした。さらに精巣腫瘍検体での遺伝子発現解析からは、AR および TSPY という雄性特異的腫瘍における内因性の癌制御因子の発現レベルによって増悪速度が制御される可能性が示された。細胞骨格タンパク質と AR の相互作用による核移行能制御を介した転写調節機構が知られており、本研究で示された TSPY による AR の細胞質へのトラップ機構は細胞骨格を介する可能性が示唆された。さらに TSPY の発現量の変動によって AR 機能が調節されたことから、腫瘍内の TSPY 発現量の個人差によって個体間での AR 活性の差が生じる可能性が推測された。

本研究では、これまで分子機能、また担う生理機能ともに未知であった Y 染色体遺伝子群において、クロマチン構造のエピジェネティック制御あるいは核内転写因子との協調作用に着目し、分子機能の一端を明らかにした。性差の遺伝的基盤としての Y 染色体は、雄性において精巣だけでなく骨成長、代謝など多くの組織での機能が推測される。Y 染色体遺伝子群が生理機能に重要な鍵因子との協調作用を介して機能発揮することから、時期、組織といった状況に応じて、一般的な機能因子群からパートナーを使い分け各々の組織での雄性化を規定する切り換え因子としての Y 染色体遺伝子群の役割が示唆された。

1 Akimoto, C., Kitagawa, H., Matsumoto, T. & Kato, S. (2007) Sermatogenesis-specific association of SMCY and MSH5 *Genes to Cells*, **submitted**