

## 論文内容の要旨

### Studies on the functions of two proteins, NYD-SP26 and Ski2-12, expression at the specific stages of mouse spermatogenesis

(精子形成の時期特異的に発現するタンパク質の同定と機能解析)

氏 名 川島 明弘

近年、男性生殖細胞に発現するタンパク質は男性不妊のマーカータンパク質や避妊薬のターゲットタンパク質として注目されている。これらのタンパク質は減数分裂以後に発現するものが多く、その検出には以前から幼若マウスや分離生殖細胞などを用いた数多くの研究がなされてきた。しかし、これらの解析系では、1) 幼若マウスと成熟マウスでは精子形成のパターンが異なる点と2) 精子形成は多様な段階を経て分化するので厳密な細胞分離が困難である点が問題となる。これらの問題点を改善するために、私は Busulfan を成熟マウスに投与して精子形成の各段階の生殖細胞を解析する新たな実験系を構築し、時期特異的に発現するタンパク質の探索を試みた。その結果、Superkiller viralicidic activity-2 like-2(Ski2-12)と Testis development protein NYD-SP26(NYD-SP26)の2つの新規タンパク質の同定に成功した。Ski2-12は精母細胞と精子細胞のみに発現し、RNA結合能、ATPase活性を有することを明らかにした。また、NYD-SP26は伸長精子細胞で特異的に発現して精子の鞭毛主部に局在化するカルシウムイオン結合タンパク質であることを明らかにした。

成熟マウスに Busulfan 20mg/kg を腹腔内に投与すると、精細管内の生殖細胞は、投与後 32 日目において未分化精原細胞のみの状態となるが、41 日目には精子形成の復活が観察され、77 日頃には、精子形成がほぼ完全に回復した。続けてこの投与系で精巣内の各細胞のマーカー遺伝子の発現量を解析したところ、体細胞のみに局在する遺伝子の多くは 32 日目で一過的に増加したのに対し、分化生殖細胞に局在する遺伝子は 32、41 日目に著しく低下し、その後回復するパターンを取った。また、その遺伝子が発現する時期は回復期の精子形成の中で各細胞が再び出現する時期に対応していた。

Busulfan 投与後の精巣の各時期の詳細な Proteome 解析から、Ski2-12、NYD-SP26 の2つの新規タンパク質を同定した。両遺伝子の mRNA、タンパク質の発現量の変化はともに分化生殖細胞で発現しているタンパク質と同様であった。これより2つのタンパク質は生殖細胞で時期特異的に発現していると予想し、In situ hybridization ならびに免疫染色により、それぞれの精巣内

での局在を調べた。In situ hybridization により Ski2-12 は精母細胞、NYD-SP26 は伸長精子細胞に特異的に発現していることを明らかにした。免疫染色を精巣、精巣上体尾部精子で行ったところ、Ski2-12 は、精母細胞と精子細胞のみに、NYD-SP26 は伸長精子細胞の細胞質、残渣体および精巣上体尾部成熟精子の鞭毛主部に発現していることを明らかにした。

Ski2-12 の構造解析から、Ski2-12 は DEXH 型 RNA helicase family に属していることが判明し、RNA 結合能や ATPase 活性を持つ可能性が考えられた。そこで、それらの機能ドメインを含む組み替えタンパク質を用いて解析したところ、Ski2-12 が RNA 結合能、ATPase 活性を有することが明らかになった。精子細胞の初期に転写される遺伝子は、すぐに翻訳されずに一時的に貯蔵されて、後に必要な時期に翻訳されることが知られている。この mRNA の一時的な貯蔵に mRNA と結合するタンパク質である messenger ribonucleoprotein(mRNP)が深く関与している。実際、成熟哺乳類精巣に発現している mRNA の 2/3 は mRNP と結合する。Ski2-12 が精母細胞から精子細胞にかけてのみに発現していること、また、RNA 結合能を有していることから、Ski2-12 は他の精巣 RNA helicase において報告されているように mRNP の一つとして働いていることが強く示唆される。

一方、NYD-SP26 遺伝子はカルシウムイオン結合リン酸化タンパク質遺伝子クラスター内に位置しており、このクラスターのタンパク質の多くはカルシウムイオンとの結合能を有している。そこで、Stains-all、Ruthenium red を用いて解析したところ、NYD-SP26 がカルシウムイオンとの結合能を有していることが明らかになった。

また、精巣精子と精巣上体尾部精子とを比較すると NYD-SP26 の 2 次元電気泳動上の泳動位置が異なっていた。すなわち、精巣タンパク質の 2 次元電気泳動上のスポットは酸性部位 (pI 4.1/66kda) に位置していたが、成熟精子タンパク質のスポットは、より中性部位 (pI 5.8/ 58kda) に位置していた。この 2 次元電気泳動上のスポット位置の変化は、成熟精子内の NYD-SP26 がカルシウムイオンと結合したためであると考え、成熟精子タンパク質を EDTA で処理した後に 2 次元電気泳動して、Western blot 解析を行ったところ、大部分が精巣精子で認められる酸性スポット位置に移動した。逆に、精巣精子タンパク質を 5mM カルシウムイオンと反応させた後に 2 次元電気泳動を行うと、成熟精子の NYD-SP26 と同じ位置に一部泳動されることが判明した。これらの実験結果から精巣精子の NYD-SP26 はカルシウムイオンと結合しておらず、排精されて精巣上体で成熟する過程でカルシウムイオンと結合していると考えられる。

カルシウムイオン結合リン酸化タンパク質クラスターに位置するタンパク質は主として酸性タンパク質である。これら酸性タンパク質は負電荷を帯び、陽イオンであるカルシウムや鉄などのイオンと結合する。Stains-all と NYD-SP26 組み替えタンパク質との相互作用のスペクトル解析からも、NYD-SP26 は電荷によりカルシウムイオンと結合していると示唆される結果を得た。また、このクラスターの代表例であるカゼインはタンパク質のリン酸化によりカルシウムイオンの結合能が向上することが報告されている。リン酸化部位の同定、およびリン酸化とカルシウム結合活性との関連については更なる解析が必要である。

超活性化運動精子内でのカルシウムイオン濃度の上昇など、以前からカルシウムイオンが精子の運動能に大きく関与すると考えられている。精子の運動活性化は以下の順に進むと考えられている。まず、重炭酸イオン、カルシウムイオンが精子内に取り込まれ、両イオンがアデニル酸シクラーゼを活性化する。そして、アデニル酸シクラーゼが精子内の cAMP 濃度上昇を引き起こし、PKA が活性化され、精子内タンパク質のリン酸化が起こり、精子の運動が引き起こされる。精子は ER を持たない為、精子内のカルシウムイオンは先体や neck 領域の Redundant nuclear envelop(RNE)で保持されていると考えられている。しかし、カルシウムイオンが精子内でどのように鞭毛運動に作用しているのか未だ不明な点が多い。NYD-SP26 は精子鞭毛内に局在し、精巣から精巣上体尾部へ移動する間にカルシウムイオンと結合するタンパク質である。この移動の間に精子は運動の潜在的な能力を獲得する。これらの事実は、NYD-SP26 がカルシウムシグナリングを通して精子の運動性の調節に関与するタンパク質であることを示唆していると考えられる。

本研究では、Busulfan を用いた新規精子形成解析系を構築し、精子形成時期特異的に発現する 2 つのタンパク質について、それらの精巣内の局在と機能を明らかにした。今後は更に、Ski2-12 および NYD-SP26 の遺伝子欠損マウスなどを用いて、精子形成・成熟の受精過程においてどのような役割を果たしているかを明らかにすることが必要である。また、Busulfan 投与系を用いて、銀染色、蛍光染色などにより更に高感度の Proteome 解析を行うこと、ならびに cDNA マイクロアレイ解析を行うことによって、より詳細に精子形成関連遺伝子の同定を試みたい。