

Molecular Cloning of Spergen-4 Encoding a Spermatogenic Cell-Specific Protein Associated with Sperm Flagella and Acrosome Region in Rat Spermatozoa

アリ, ホワイダ, カラフ

<https://hdl.handle.net/2324/1654941>

出版情報：九州大学, 2015, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）



氏名: アリ ホワイダ カラフ

論文題目: Molecular Cloning of Spergen-4 Encoding a Spermatogenic Cell-Specific Protein Associated with Sperm Flagella and Acrosome Region in Rat Spermatozoa

〔ラット精子の鞭毛と先体領域に局在する精子形成細胞特異的タンパク質をコードする Spergen-4 の分子クローニング〕

区分: 甲

論文内容の要旨

哺乳類の精子形成は、精巣の精細管性上皮における生殖細胞の分化によって進行する。細胞分裂によって増殖した精祖細胞は2回の減数分裂後に半数体の精子細胞となる。半数体精子細胞は球状の細胞から、余分な細胞質の除去、核の濃縮、鞭毛・先体形成を経て、運動性を持った細長い精子へと著しくその形態を変化させる。この半数体精子細胞の形態変化（精子変態）は非常に複雑であり、その制御機構に関しては未解明の点が多々ある。精子変態に関わる新たな遺伝子をクローニングして解析することが本研究の目的である。

精子変態はラットにおいて生後 25 日齢の精巣で開始されることが明らかとなっているので、この時期以降に発現していく遺伝子を単離することが可能なディファランシャルディスプレイ法を用いて新規遺伝子の探索を行った。その結果 2 週齢には発現せず、7 週齢の精巣で発現する遺伝子をクローニングした。NCBI データベース解析により、この遺伝子はデータベース上 a hypothetical protein LOC691909 をコードする C16orf93 homolog として登録されている未解析遺伝子で、332 アミノ酸からなるタンパク質（分子量 38 kDa）をコードしていた。この遺伝子は精巣特異的に発現し、ラット精巣において生後 3 週齢から発現することが RT-PCR 解析によって判明した。この遺伝子の 5' 上流の配列を解析した結果、さらに 77 個のアミノ酸が N 末側に付加されたタンパク質をコードする可能性があった。その場合には、409 個のアミノ酸（分子量約 46kDa）をコードすることになる。本研究では前者を短鎖、後者を長鎖とした。これら 2 種の短鎖および長鎖のどちらが実際にタンパク質に翻訳されているかを明らかにするため、長鎖のみを認識する抗体と両方の分子を認識する抗体をウサギにて作成した。これら抗体の特異性は、COS7 培養細胞に発現させた GFP 融合タンパク質を用いたイムノプロット法によって確認した。ラット精巣および精子をサンプルとして用いたイムノプロット解析によって、これら 2 つの抗体は共に約 50 kDa のタンパク質を認識したことから、精巣において実際に翻訳されている分子は長鎖であると結論した。この分子は Spergen-4 (a spermatogenic cell-specific protein-4) としてデータベースに登録した。

作成した抗体を用いて免疫組織化学的解析を行い、精巣における分子局在を検討した結果、Spergen-4 は伸長精子細胞の精子頭部およびその細胞質のみに検出され、その他の細胞には検出されなかった。また、精巣上体から単離した精子での蛍光顕微鏡解析により、精子頭部の先体領域および精子鞭毛の主部にその発現が観察された。プロゲステロンを用いてラット精子に先体反応を誘起すると、精子先体領域の Spergen-4 は先体から消失した。これらの結果から、クローニングした Spergen-4 は半数体の伸長精子細胞特異的に発現し、精子頭部の先体と鞭毛主部の構成分子として、精子変態過程において精子に組み込まれる事が示唆された。