

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 名	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)			
論文調査委員	主 査	九州大学	教授	飯田 弘
	副 査	九州大学	教授	松山 倫也
	副 査	九州大学	教授	日下部 宜宏

論 文 審 査 の 結 果 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。本論文は精子変態に関わる新たな分子 **Spergen-4** を同定し、その発現・局在解析を行ったものである。

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くる遺伝子を単離することが可能なディファレ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の **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 アミノ酸残基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個のアミノ酸残基がN末端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個のアミノ酸残基 (分子量約 46 kDa) 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製した。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ブ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ブロット解析によって、これら2つの抗体は共に約 **52 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 (spermatogenic cell-specific protein-4)** としてデータベースに登録した。

作製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、それ以外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ことが示唆された。

以上要するに、本研究はラット精巢の伸長精子細胞に特異的に発現する *Spergen-4* をクローニングし、**Spergen-4** 分子が精子頭部の先体領域および鞭毛主部に局在することを明らかにしたものであり、動物学および動物発生学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本論文は博士（農学）の学位に値すると認める。