HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the function and regulation of testis-specific serine proteases during murine spermatogenesis [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	米田, 竜馬
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11411号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56340
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryoma_Yoneda_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　氏　名　　米 田　　竜 馬

学 位 論 文 題 名

Studies on the function and regulation of testis-specific serine proteases during murine spermatogenesis

（マウスの精子形成における精巣特異的セリンプロテアーゼの機能と調節に関する研究）

精子形成のメカニズムは古くから世界中で研究されてきたが、その全容は未だに明らかにされていない。中でも特に研究の遅れている分野として「減数分裂中のプロテアーゼの働き」と「クロマチン構造変化による遺伝子の発現調節機構」がある。本研究では Tessp というマウスの精巣特異的に発現しているセリンプロテアーゼの機能と調節機構の解析を通して、上記二つの未解明なメカニズムの解明を目指した。

4 種類の Tessp のうち、Tessp-1 はマウスの 17 番染色体上で他のセリンプロテアーゼとクラスターを形成しており、Tessp-2, Tessp-3, Tessp-4 は 9 番染色体上でクラスターを形成している。初めに、研究が遅れていた Tessp-2, Tessp-3, Tessp-4 についてまずその発現パターンを同定した。これらの mRNA は生後 14 日齢より発現し始め、21 日齢にかけて発現が急激に上昇し、後期パキテン期の一次精母細胞から二次精母細胞にのみ発現するといった非常に似通った発現パターンを示した。しかし、タンパク質レベルで解析を行うと Tessp-2 は二次精母細胞から精細胞の膜と細胞質に、Tessp-3 は一次精母細胞から精細胞の膜にのみ、Tessp-4 は一次精母細胞から精細胞の細胞質にのみ局在しているといった違いがみられた。Tessp-1 は精原細胞より産生され始めるので、これらの局在の違いから 4 つの Tessp が異なる機能を持つことが考えられた。さらに精巣の器官培養を Tessp-1, Tessp-2, Tessp-3 それぞれの抗体と共に行ったところ、それぞれ精子形成が精原細胞、二次精母細胞、一次精母細胞で停止した。これらのステージは Tessp-1, Tessp-2, Tessp-3 のタンパク質が産生され始める時期と一致することから、Tessp-1, Tessp-2, Tessp-3 が精子形成に関与している可能性が強く示唆された。また、Tessp の抗体を添加することでアポトーシスを起こす生殖細胞が増加したため、Tessp は減数分裂中の生殖細胞の生存に必須であることが考えられた。

発現調節については 9 番染色体上の *Tessp* クラスター周辺にクロマチン構造の緩んでいる領域(DNase I HS)を 6 か所同定し、そのうちの 3 か所は *Tessp* を発現している細胞特異的に存在することが分かった。さらにこれらの DNase I HS と各 *Tessp* promoter の転写活性化に関わるヒストン修飾(H3K9ac と H3K4me3)について調べた。*Tessp* クラスターは精原細胞や一次精母細胞で強くヒストンアセチル化を受けているが二次精母細胞以降ではそのレベルが低下したことなどから、*Tessp* の転写が始まる前の精原細胞からクロマチン構造が緩んでおり、転写に備えていることが考えられる。さらに H3K4me3 のレベルは DNase I HS では低かったが、各 *Tessp* promoter は強い修飾を受けていた。*Tessp-2* と *Tessp-3* の promoter では二次精母細胞までメチル化レベルが上昇し精細胞に分化するとそのレベルが低下するといった転写レベルとの相関がみられた。さらに一番発現量の高い *Tessp-2* の promoter が一番強く修飾を受けていたことから H3K4me3 が *Tessp* の転写量を調節していることが示唆された。また、*Tessp-2* と *Tessp-4* との間に存在する DNase I HS と *Tessp-2* の上流領域が精母細胞においてのみ三次元的に相互作用しており、この相互作用が *Tessp-2* の転写を制御している可能性が示唆された。

以上より、*Tessp* が精巣の減数分裂において各ステージの進行に必須である可能性を見出し、さらに組織・時期特異的な転写にエピジェネティックな修飾とクロマチン相互作用が重要であることを明らかにした。