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_review.pdf, 審査の要旨



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 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

審査担当者	主 査	准教授　木 村 敦	（大学院理学研究院）
	副 査	教 授　高 橋 孝 行	（大学院理学研究院）
	副 査	教 授　山 下 正 兼	（大学院理学研究院）
	副 査	准教授　勝 義 直	（大学院理学研究院）

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）

博士学位論文審査等の結果について（報告）

精子形成は生物の生殖にとって非常に重要な現象であるが、そのメカニズムの全容は解明されていない。著者は、哺乳類の精子形成において特に解明の遅れている 2 つの課題が「減数分裂過程でのプロテアーゼ機能」と「減数分裂過程でのクロマチン調節機構」であるという観点に立ち、マウスの Tessp と呼ばれるプロテアーゼを研究することで、その両方に切り込んだ。結果として、Tessp が減数分裂の各ステップの進行と生殖細胞の生存に重要な役割を持つことを明らかにすると同時に、Tessp 遺伝子座におけるダイナミックなクロマチン構造変化を詳細に調べあげた。これらの成果は、精子形成のメカニズムに対する理解を大きく進めるものであり、生殖生物学分野において大きなインパクトを持つものと評価できる。

Tessp は、本学の高橋孝行教授が 10 年以上前にクローニングした遺伝子であり、Tessp-1 ～Tessp-4 という 4 つのホモログが存在する。このうち Tessp-1 はマウスの 17 番染色体上に存在し、Tess-2～Tessp-4 は 9 番染色体にクラスターを作って存在している。Tessp-1 の発現解析は高橋教授によって報告されていたため、本研究ではまず 9 番染色体上の Tessp-2～Tessp-4 の発現解析を行った。その結果、3 つの Tessp mRNA はすべて精母細胞特異的に発現していることがわかったが、それらのタンパク質は互いに異なる局在を示すことがわかった。すなわち、Tessp-2 が 二次精母細胞と精細胞の細胞膜と細胞質に、Tessp-3 が 精母細胞

と精細胞の細胞膜に、Tessp-4 が 精母細胞と精細胞の細胞質に局在していたのである。このことは、これら 3 つのプロテアーゼが互いに異なる機能を持つことを示唆している。以上のような発現解析はどの研究者でも行うことのできる基本的な実験であると言うこともできるが、しかし本研究ではそれを非常に詳細に行い、極めて信頼度の高いデータを得ている点は高い評価に値する。

本研究では、次にこれらのプロテアーゼの機能解析を行った。一般にプロテアーゼのノックアウトマウスは表現型が出にくいことを考慮して、著者は精巣の器官培養を行うことにした。この培養系はもととなる論文があるものの、それを本研究用に最適化したものであり、極めてオリジナリティの高い実験系となった。著者は、この器官培養系に Tessp-1、Tessp-2、Tessp-3 それぞれに対する特異的抗体を入れることで、各プロテアーゼの機能を阻害した。結果としてこの系は非常にうまくはたらき、Tessp-1 抗体が精原細胞の分化を、Tessp-3 抗体が一次精母細胞の分化を、Tessp-2 抗体が二次精母細胞の分化を止めるという非常に美しいデータとなった。しかも、これらの抗体はいずれも各ステップで生殖細胞にアポトーシスを誘導しており、減数分裂におけるプロテアーゼの重要性が具体的に明らかになった。この器官培養系によるデータは完全に本研究オリジナルであり、得られた結果もきれいであることから、本研究の価値を大きく高めるものである。

最後に、著者は 9 番染色体上の 3 つの Tessp 遺伝子が存在するゲノム領域について、減数分裂過程でのクロマチン構造変化を詳細に解析した。まずは、重要な転写調節領域の指標として知られる DNase I hypersensitive site (HS)を探索した。その結果、この遺伝子座に 6 つの DNase I HS が存在することを明らかにし、そのうち 3 つは生殖細胞のみに存在するものであった。次に、これらの領域におけるヒストン H3 アセチル化とヒストン H3K4 メチル化を調べたところ、これらの修飾は生殖細胞特異的であり、Tessp 遺伝子が発現する前の精原細胞ですでに高いレベルになっていることがわかった。そして、最後に DNase I HS の 1 つと Tessp-2 プロモーターとの物理的な相互作用が、Tessp 遺伝子の発現する時期にのみ見られることも明らかにした。これらの成果は、減数分裂過程でのダイナミックなクロマチン構造変化を初めて詳細に記述したものであり、高く評価できる。

以上のように著者は、最初に述べた 2 つの未解明事象について、十分に深い知見を得ることに成功し、科学の発展に確実に貢献したと言うことができる。よって著者は，北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。