

ルよりもグルココルチコイド活性が低いことを考慮すると、コルチゾール代謝においては血糖値及び肥満の低下を促す方向へ代償機構が働いていることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

CYP3A の酵素活性の指標として  $6\beta$ -OHF の尿排泄量をみることは以前からなされておられ薬物代謝の酵素誘導のマーカーとして確立して使用されている。本研究では CYP3A で代謝される薬物を排除していることから、 $6\beta$ -OHF は肝臓で代謝される内因性のコルチゾール代謝産物を尿でみていると考えてよい。2 型糖尿病患者、コントロール両群ともに尿中  $6\beta$ -OHF は BMI と有意な正相関がみられたが前者の方が強い相関であった。尿中  $6\beta$ -OHF が脂肪肝の初期変化のマーカーとして使用できることを示唆した点が本研究の新しさである。

本研究では肥満度の低い日本人を対象としていることからコルチゾール代謝において、脂肪組織の影響よりも肝臓の影響がより大きく関与したと考えられる。 $11\beta$ -HSD type 1 の活性低下が肝臓で強く出たと考えられることが示唆された。このことは 2 型糖尿病患者における肥満度の低い人にみられる特有のコルチゾール代謝と考えられ、人における 2 型糖尿病のコルチゾール代謝研究に新視点で寄与するものと考えられた。

審査委員は論文内容の審査ならびに公聴会(平成 18 年 1 月 30 日)での審査を行った結果、本論文を博士(医学)学位論文に値するものと認めた。

氏 名	水野 里志
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	生 第 6 号
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	生殖系列細胞における GSE (gonad-specific expression gene) の発現と機能解析に関する研究
論文審査委員 (主 査)	教授 佐 伯 和 弘
(副主査)	教授 松 本 和 也
(副主査)	教授 細 井 美 彦

## 論文内容の要旨

減数分裂は、染色体数が2倍体 (2n) である卵母細胞および精母細胞から、半数体 (n) である卵子および精子を形成するときに見られる特殊な細胞分裂である。これは、一回のDNAの複製に対して細胞分裂が二回連続して起こるために生じる。減数分裂は哺乳類の生殖細胞形成に必須な現象であり、減数分裂が正常に終了しなければ次世代に遺伝情報を伝えることができない。しかしながら、この現象を制御する詳細な分子機構は未だ解明されていない。この解明には、この時期に発現している遺伝子の働きを発生段階あるいは細胞別に詳細に理解する必要がある。

Gse (gonad-specific expression gene) 遺伝子は卵巣および精巣の生殖腺に特異的に発現する新規遺伝子である。これまでの研究から Gse mRNA は、1) ノーザンブロット解析より生殖腺以外の体細胞系列組織では発現しないこと、2) RT-PCR および in situ hybridization による解析より精巣ではパキテン期の精母細胞が出現する生後14日目から発現し始めること、3) RT-PCR による解析より卵巣では減数分裂期にある卵母細胞が存在する分娩時から発現し始めることが示され、生殖細胞の減数分裂に何らかの役割を果たしていることが示唆されている。しかしながら、卵巣における詳しい発現、タンパク質レベルでの発現、さらには GSE タンパク質が生殖腺で果たす生理的機能は未だ解明されていない。本研究では GSE タンパク質が生殖腺で果たす機能を明らかにすることを目的に 1) 生殖腺および初期胚におけるタンパク質レベルでの発現解析、2) Yeast two-hybrid system を使用した卵巣 cDNA ライブラリーからの GSE タンパク質と相互作用するタンパク質の探索、3) siRNA を使用した遺伝子ノックダウンが卵成熟ならびに卵子の第二減数分裂に与える影響を解析した。

第2章では GSE の発現をタンパク質レベルで解析するため、GSE タンパク質を認識する抗体の作製、さらに作製した抗体を使用して生殖腺、卵子および初期胚における発現解析を行った。まず、抗原に使用するペプチド配列を決定し、このペプチドを抗原として抗 GSE ペプチド抗体を作製した。この抗体を用い、卵巣および精巣を含む主要組織におけるウエスタンブロット解析を行った結果、精巣および卵巣において GSE の推定分子量と同じ約 27.6 kDa の位置にバンドが検出された。この結果から、抗 GSE ペプチド抗体は GSE を認識することが示された。このため、生殖腺、卵子および初期胚の免疫染色

には作製した抗体を使用した。精巣における免疫組織化学的解析では GSE タンパク質は、精細管内のパキテン期の第一精母細胞から伸長精子細胞までの精細胞の核に発現していることが明らかにされた。一方、卵巣では原始卵胞内の卵母細胞にはすでに発現し、少なくとも排卵直前のグラーフ卵胞内の卵母細胞までは発現していることが明らかにされた。さらに卵母細胞では核と細胞質の両方に GSE タンパク質は局在していた。卵子における GSE タンパク質は核と細胞質の両方に局在し、受精後、前核期にはすでに核に移行し始め、少なくとも胚盤胞期まで発現することが示された。さらに、胚盤胞では栄養外胚葉 (TE) と内細胞塊 (ICM) の両方にシグナルが確認されたが、ICM に TE と比べて強い発現が確認された。これらの結果から、GSE は発現細胞および発生時期により細胞内の局在が異なることが明らかにされた。このため GSE は発現細胞および発生時期により果たす機能が異なる可能性が示された。また、GSE は生殖細胞や初期胚など次世代に遺伝情報を伝える細胞に特異的に発現していることが明らかにされ、このことから GSE が核の全能性維持や細胞の分化に関与している可能性が考えられた。

第3章では Yeast two-hybrid system を使用した、卵巣 cDNA ライブラリーから GSE タンパク質と相互作用するタンパク質の探索を行った。1回目のスクリーニングでは、GSE と相互作用する候補遺伝子として 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1 (3 $\beta$ -HSD) を単離した。しかし、酵母内で GSE と 3 $\beta$ -HSD の相互作用を再確認した結果、GSE と 3 $\beta$ -HSD は相互作用を示さなかった。2回目のスクリーニングでは相互作用する候補遺伝子として GIAP1 (GSE interacting protein1) を単離した。さらに、酵母内で GSE と GIAP1 の相互作用を再確認した結果、酵母は両タンパク質が相互作用したことを示すロイシンおよび lacZ を発現した。GSE タンパク質と相互作用する候補タンパク質として単離された GIAP1 は、推定アミノ酸配列の中にメチルトランスフェラーゼと予測される配列を機能ドメインに持つ新規遺伝子 (NCBI accession AK003450) であった。ゲノム DNA 中のシトシン塩基のメチル化修飾は遺伝子発現の調節に重要な役割を果たしている。さらに、この DNA のメチル化を調節している酵素がメチルトランスフェラーゼである。このため GSE は生殖細胞および初期胚で遺伝子の発現調節および、その結果として生じる、細胞型の多様性の決定に関与している遺伝子である可能性が示

## 論文審査結果の要旨

唆された。

第4章では、siRNAを使用した遺伝子ノックダウンが卵成熟ならびに胚の前核形成に与える影響を解析した。卵生長期を終えたGV期卵子に、Gse siRNAをマイクロインジェクションし、体外成熟培養した結果、卵子の成熟率にコントロールと比べて有意な差は認められなかった。さらに、得られた成熟卵子はストロンチウム処理により活性化を誘起した。しかしながら、前核形成率においてもコントロールと比べて有意な差は認められなかった。さらに、免疫染色によりGse siRNAの卵子における遺伝子抑制効果の解析を行なった結果、明らかな遺伝子抑制効果は確認できなかった。これらの結果から、卵子におけるGse siRNAの遺伝子抑制に対する有用性および減数分裂期にGSEが果たす生理的機能について明確な結論は得られなかった。このため、本実験と異なる配列のsiRNA、モルフォリノオリゴやノックアウトマウスの作出など異なる遺伝子抑制法の検討が必要であると考えられた。また、遺伝子抑制効果の解析法もreal time PCRなど発現量を定量的に解析可能な方法が必要であると考えられた。

以上の結果から、GSEは生殖細胞および初期胚に特異的に発現していることが示された。さらにGSEタンパク質と相互作用する候補タンパク質として、メチルトランスフェラーゼと予測される配列を機能ドメインに持つ遺伝子が同定された。また、生殖細胞および初期胚はゲノム全体のDNAメチル化状態が大きく変動することが知られている(Santos et al., 2004, Allegrucci et al., 2005)。このためGSEは生殖細胞および初期胚で遺伝子の発現調節および、その結果として生じる細胞型の多様性の決定に関与している遺伝子である可能性が示唆された。

本研究では、哺乳類の減数分裂を制御する分子機構を解明することを目的に、減数分裂期に発現する遺伝子の働きについて検討している。とくに我々が単離したGse (gonad-specific expression gene) 遺伝子の発現および機能に焦点を当て、生殖細胞および初期胚におけるGSEタンパク質の発現、GSEタンパク質と相互作用するタンパク質の探索および遺伝子抑制が減数分裂に与える影響について実験を展開している。

まず、GSEの発現をタンパク質レベルで解析するため、GSEタンパク質を認識する抗体の作製、さらに作製した抗体を使用して生殖腺、卵子および初期胚における発現解析を行った。その結果、GSEはタンパク質に翻訳されていること、生殖腺では生殖細胞に特異的に発現していることが示された。さらに、卵子では核と細胞質の両方に局在するが、受精後、核に移行し少なくとも胚盤胞期まで発現すること、胚盤胞では内部細胞塊に強く発現することが示された。これらの結果から、GSEは次世代に遺伝情報を伝える細胞に特に強く発現していることが示され、核の全能性維持や細胞の分化に関与している可能性が示された。

次に、Yeast two-hybrid systemを使用した、卵巣cDNAライブラリーからGSEタンパク質と相互作用するタンパク質の探索を行った。その結果、GSEタンパク質と相互作用する候補タンパク質としてメチルトランスフェラーゼと予測される配列を機能ドメインに持つ新規遺伝子 (NCBI accession AK003450) が同定された。ゲノムDNA中のシトシン塩基のメチル化修飾は遺伝子発現の調節に重要な役割を果たし、このDNAのメチル化を調節している酵素がメチルトランスフェラーゼである。このためGSEは生殖細胞および初期胚で遺伝子の発現調節および、その結果として生じる、細胞型の多様性の決定に関与している遺伝子である可能性が示唆された。

さらに、GSEの機能を解析するためsiRNAを使用した遺伝子ノックダウンが卵成熟ならびに胚の前核形成に与える影響を検討した。その結果、Gse siRNAによりGse遺伝子がノックダウンされているかを含め、明確な結論は得られなかった。このため、本実験と異なる配列のsiRNA、モルフォリノオリゴやノックアウトマウスの作出など異なる遺伝子抑制法の検討が必要であると考えられた。また、遺伝子抑制効果の検討法もreal time PCRなど発現量を定量的に解析可能な方法が必要であると考えられた。

以上の結果から、GSEは生殖細胞および初期胚に特異的に発現していることが示された。さらにGSEタンパク質と相互作用する候補タンパク質として、メチルトランスフェラーゼと予測される配列を機能ドメインに持つ遺伝子が同定された。また、生殖細胞および初期胚はゲノム全体のDNAメチル化状態が大きく変動することが知られている(Santos et al., 2004, Allegrucci et al., 2005)。このためGSEは生殖細胞および初期胚で遺伝子の発現調節および、その結果として生じる細胞型の多様性の決定に関係している遺伝子である可能性が示唆された。

この研究では、GSEが生殖細胞および初期胚に特異的に発現し、遺伝子の発現調節および、その結果として生じる、細胞型の多様性の決定に関係している遺伝子である可能性が示唆された。この知見は、減数分裂、胚の初期発生および細胞分化に至るまでの分子機構の研究上重要な意味を持つと考えられる。

以上のように、本論文は博士（工学）論文として価値あるものと認められる。

氏名	三沢英貴
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	工業第11号
学位授与の日付	平成18年3月22日
学位授与の要件	学位規定第4条第1項該当
学位論文題目	段ボール箱の生産性向上に関する研究

論文審査委員（主査）	教授	金正和
（副主査）	教授	山一達
（副主査）	教授	五百井清
（副主査）	教授	桑原兵二郎