

学 位 論 文 要 旨

氏名 Ahmed Magzoub Khalid Ali

題 目 : Molecular cloning, gene expression analysis and characterization of spermatogenesis related genes
(精子形成関連遺伝子のクローニング、発現解析ならびに機能分析)

論文要旨 :

The aim of this study is to characterize the genes which are involved in spermatogenesis, analyze their expression, and build a solid base to elucidate their different functions. This may lead to understand the total process of the spermatogenesis from genetic background. Results of screening during spermatogenesis revealed several genes which express during maturation; which are interesting targets because during this process dynamic cell division and morphological changes takes place. Many of these genes are commonly expressed in somatic cells and some of them are related to certain diseases such as cancer. For this purpose I have screened genes specifically expressed in developing testis and characterized their expression according to their expected functions.

In the present study I have screened, identified, and characterized many specific genes from maturing rat testes by differential display (DD). I chose some candidates which are up-regulated in the maturing rat testes. While the functions of some of these have been determined by comparing DNA sequences in the database, many functions remain unknown.

In Chapter I, I have summarized the background of the study. In Chapter II, I focused on a candidate gene *LOC290876*, of unknown biological function. According to ENSEMBL survey I found this gene to contain three EDG-8 motifs. The expression was testis specific and increased at week 7 and continued for 15 weeks. PCR analysis revealed two gene transcript isoforms with similar expression level, which confirmed later by Northern blotting analysis. I identified two splicing variants of *LOC290876*. The deduced amino acid sequences of the two isoforms revealed differences in carboxyl terminal sequences. The major expression of the gene and protein in the testes was in the spermatocytes and the protein expression was localized to the nucleus. In conclusion I suggested that the *LOC290876*- encoded gene product is not involved in sphingosine signaling, but has crucial roles in the nucleus during the processes of spermatocyte maturation and meiosis producing spermatids.

In Chapter III, I studied the expression of the T-cell acute-lymphocytic leukemia (*Tal-1*) gene, suggested CT antigen candidate, in maturing rat testes. TAL-1 has a basic helix-loop-helix (bHLH) domain and can be a positive regulator of several downstream genes expressed in the bone marrow in relation to leukemia. According to the known function of TAL-1, which plays an important role in angiogenesis and hematopoietic differentiation such

as bone marrow erythropoiesis during embryogenesis, as well as in T cell acute lymphocytic leukemia (T-ALL) development. I expected additional function of the gene product on spermatogenesis. Strong expression was detected in the normal maturing rat testes by Northern blotting. Western blotting revealed the protein size to be 34 kDa. Since the expected protein molecular size which reported in sequence database as 22.7 kDa, I analyzed the upstream sequence of the proposed methionine codon, considering the existence of longer ORF. I found that rat testis (Rat-TE) DNA sequence was different from the data base (Rat DB; accession no. NM_001107958). Accordingly, rat *Tal-1* ORF was determined to be 329 amino acids. Protein expression was observed wide-spread in the spermatocytes, spermatids and spermatogonia by immunohistochemistry. Gene expression of *Tal-1* regulatory gene, *NKX3.1*, was negatively correlated with *Tal-1* expression. Human *Tal-1* expression in the maturing testis and bone marrow was observed, which suggest *Tal-1* as a novel cancer-testis antigen candidate. In conclusion, TAL-1 may be involved in cell division, morphological changes, and the development of spermatogenic cells in the normal rat testes.

Finally, in Chapter IV, I utilized DNA microarray considering further high throughput screening of spermatogenesis related genes. I focused on one candidate, tumor suppressor candidate gene 3 (*Tusc3*). The expression was up-regulated in developing rat testis. It is known that *Tusc3* is involved in several biological functions such as magnesium transporter, related to tumor suppression, mental retardation, and expected role in protein N-glycosylation, but the function in spermatogenesis is totally unknown. RT-PCR and Northern blotting showed *Tusc3* gene expression was up-regulated in the normal maturing testes and prostate and other organs such as cerebrum and ovary. TUSC3 protein expression was detected in the same organs with a size of around 40 kDa. *In situ* hybridization and immunohistochemistry showed that mRNA and protein localization was in the spermatocytes and Leydig cells, as well as prostate epithelial cells. These findings, suggest the involvement of TUSC3 in spermatogenesis in the rat testis to induce sperm differentiation and maturation and play important role in prostate development and tumor suppression.

In future work, it will be interesting to determine the precise physiological functions of each candidate to understand the molecular basis to unravel their role in relation to many diseases such as tumor development and suppression in addition to better understanding of spermatogenesis. Gene knockdown experiment in the developing testis may lead to the further understanding for the individual gene functions.

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Ahmed Magzoub Khalid Ali
審査委員	主査：鳥取大学 教授 山野 好章
	副査：鳥取大学 教授 森田 剛仁
	副査：山口大学 教授 山本 芳実
	副査：鳥取大学 准教授 浅野 淳
	副査：鳥取大学 准教授 保坂 善真
題目	Molecular cloning, gene expression analysis and characterization of spermatogenesis related genes (精子形成関連遺伝子のクローニング、発現解析ならびに機能分析)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>本学位論文はラットをモデルとしてホ乳類の精子形成に関わる遺伝子をディファレンシャルディスプレイあるいはDNAマイクロアレイ法により網羅的にスクリーニング、推定機能別の分類、発現解析、さらにはこれらの遺伝子産物が精子形成過程に関わる機能を総合的に解明した内容である。これまでに個別的に精子形成関連遺伝子をスクリーニング、発現解析を行った研究は多々報告されているが、本研究のように総合的に遺伝子発現解析を行った例は少ない。本研究過程において見いだされた精子形成関連遺伝子は体細胞発現遺伝子と大きな相違がないのにも関わらず、精子形成の各段階において時期特異的に特徴的な遺伝子が発現することを明らかにした。すなわち、精巣発達段階における発現遺伝子は体細胞で起こる遺伝子発現を網羅する縮図と理解することもできる。さらに追加して精子形成過程には体細胞には見られない減数分裂過程が存在しこの過程に必要な遺伝子が発現することも推定される。本研究過程において予想されたように、体細胞で共通して発現する遺伝子が数多くスクリーニングされ、併せて、発ガン、ガン抑制関連遺伝子など、疾病に変わる遺伝子も分析することもできた。そこで、これらの遺伝子が精子形成独特の過程においてどのような発現形態をとっているのかを明らかにすることが重要であり、そのために精巣組織における発現解析を行い、これらの遺伝子産物がいかに精子形成に関わっているのかを明確にした。</p> <p>本論文の第1章では有性生殖の意義、精子形成の過程、精子形成過程各段階に発現する遺伝子とその機能、疾病関連遺伝子の発現に関するこれまでの知見をとりまとめ、本研究の位置づけを概説した。</p> <p>第2章では機能が未知の LOC290876 遺伝子の発現解析を行った。本遺伝子産物にはスプ</p>	

ライシグバリアントに起因する 2つのアイソフォームの存在が明らかになり、それぞれのカルボキシル末端側にアミノ酸配列の相違が推定された。いずれのアイソフォームにもスフィンゴシン受容体モチーフの存在が認められたが、細胞内動態は主として精母細胞の核内であることから新規の転写因子として機能していることが推定された。

第 3 章では T-細胞急性リンパ性白血病発現遺伝子 *Tal-1* を正常組織内では成熟精巣にのみ発現する知見をとりまとめている。特定のガン関連遺伝子が精子形成期精巣で発現することは CT (Cancer-Testis) 抗原として知られているが、白血病関連遺伝子の発現を成熟精巣で分析したのはこれが最初の例である。本研究において遺伝子データベースに報告されているラット *Tal-1* シークエンスと比較し、その産物においてアミノ末端側に相違があることを解明している。また、その発現箇所は主として精母細胞であり、白血病発症と精子形成過程の関連性を検討する上で興味深い対象である。

第 4 章はガン抑制遺伝子である *Tusc3* の精子形成期精巣での発現解析を行った結果である。精子形成期精巣において発ガン遺伝子とガン抑制遺伝子が同時に発現する例が認められ、そのバランスにおいて精子形成を進捗、発ガンを抑制する機構が推測される。*Tusc3* の発現は主として精母細胞であったが、ライディヒ細胞、さらには前立腺でも恒常的に発現することが特長であった。本遺伝子産物はマグネシウムトランスポーター、N-グリコシル化酵素機能も併せ持ち、精子形成はもとより、性ホルモン生産、ガン抑制機能も併せ持つことが推定される。今後、精巣内ガン抑制遺伝子の発現に関する分子機構を解明するためには興味深い対象である。

以上、本研究ではラット精子形成期精巣に発現する遺伝子を網羅的にスクリーニングし、機能未知遺伝子の機能推定、あるいは疾病関連遺伝子として発ガン、ガン抑制遺伝子の発現解析をとおして精子形成関連遺伝子を網羅的に解析した。以上の研究成果は野生動物の生殖補助に対する応用のみならず男性不妊の原因追求、さらにはガン発生メカニズムに関する重要な示唆を与えるものと期待される。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位論文として十分な価値があると審査員 5 名全員が判断した。