

349 PCR法を用いたマウス卵管特異糖蛋白質遺伝子の構造解析

山形大学

高橋一広、荒木慶彦、広井正彦

【目的】卵管特異糖蛋白質は哺乳動物間に広く存在しているが、その生殖生理学的活性は未解明である。同分子ノックアウトマウスを作製し生体内意義を明らかにするため遺伝子構造解析を行った。

【方法】我々の報告したマウス、ハムスター及びウシ卵管特異糖蛋白質 cDNA のアミノ酸配列より相同性の高い部分を選択し、この部分に相補的なプライマー (20-25 mer) を合成し、Long PCR を施行した。ゲノムDNAを *KpnI* で処理後、T4-ligase を用い self ligation させ、熱処理法により環状DNAにランダムに nick を導入し、これを鋳型とした互いに逆向きに設定したプライマーを用い Inverse PCR を施行した。【成績】マウスcDNAを数箇所に分けてPCRを施行した。塩基数83-311間1.2kb、83-456間3.0kb、349-1103間7.3kb、349-1444間8.6kb、1066-2037間1.9kbとそれぞれ増幅され、PCR産物は電気泳動上明瞭なバンドとして認められた。マウス卵管特異糖蛋白質をコードする遺伝子を含むゲノムDNAはこれらの結果より、エクソンの5倍長のイントロンをもち、約12kb以上あることが推定された。イントロンは塩基数83-456間エクソン374bpに対し約970bp、349-1103間エクソン755bpに対し約6500bp、1066-2037間はエクソン972bpに対しイントロン950bp含むと予想され、ゲノム前半部分に巨大なイントロンが存在していた。ゲノムDNAを *KpnI* で消化後、self ligation した鋳型を用いた Inverse PCRでは、約3.8kbの増幅物が得られた。この増幅物は再度 *KpnI* で、1箇所のみ切断されることを確認した。【結論】PCR、Inverse PCRによりマウス卵管特異糖蛋白質遺伝子をプロモーター領域を含み増幅すること成功した。

350 LPA (lysophosphatidic acid) の胚輸送に及ぼす影響について

徳島大、同薬学部*

國方建児、名護可容、山崎 淳、山野修司、青野敏博、徳村 彰*

【目的】LPA(lysophosphatidic acid)は、卵胞液中に多量に含まれラット子宮および腸管の平滑筋の収縮を促進するなど様々な生理活性を有することが報告されている。今回我々は子宮と同様に平滑筋を有する卵管の胚輸送に対するLPAの影響とその作用機序について検討した。【方法】6週齢のICR雌マウスをPMSGとhCGで過排卵刺激した後同系雄と交配させ、hCG投与48時間後に卵管を摘出し、以下の実験を行った。1)摘出した卵管を 10^{-5} ~ 10^{-8} MのLPAを加えた培養液(Whittingham's T6+0.4%BSA)中で24時間培養し、全回収胚数に対する卵管外へ排出された胚数の割合(胚輸送率)に及ぼすLPA濃度の影響を検討した。さらにLPA 10^{-5} M加培養液中で培養している卵管の胚輸送能に対する2)indomethacin $10\mu\text{M}$ およびverapamil $10\mu\text{M}$ の培養液への添加の影響ならびに3)Pertussis toxin(PT)200ng/mlの前処置の影響を検討した。

【成績】1)卵管の胚輸送率はLPA 10^{-5} M群では60.5%であり対照群の33.1%に比し有意に高率であった($p<0.05$)。2)LPA 10^{-5} Mにverapamil $10\mu\text{M}$ を添加することにより、LPAの胚輸送促進作用は消失した(LPA群 vs LPA+verapamil 群:60.1% vs 20.4%、 $p<0.01$)³が、LPA 10^{-5} Mにindomethacin $10\mu\text{M}$ を添加しても、LPAの胚輸送促進作用を抑制しなかった(LPA群 vs LPA+indomethacin 群:62.6% vs 56.0%)。3)PT 200ng/mlの前処置によりLPAの胚輸送促進作用は消失した(LPA群 vs LPA+PT 群:58.0% vs 26.1%、 $p<0.05$)。【結論】LPAは卵管における胚輸送能を促進することを明らかにしたが、その作用はG蛋白に連結した受容体を介し、Caチャンネルを作動させることにより起こると考えられる。