

379 胚盤胞形成能に与える精子核クロマチン構造の影響

福島県立医大

片寄治男, 呉竹昭治, 阿久津英憲, 菅沼亮太, 柳田 薫, 佐藤 章

【目的】胚発生能に関わる精子側因子を調査する目的に sperm chromatin structure assay (SCSA) を用いて精子核の質的検討をし、発生能との関連を検討した。

【方法】2000年7月から2001年1月の間に胚盤胞培養を実施した44周期 (25 IVF 周期, 19 ICSI 周期) を対象とした。射出精子には患者の同意を得た余剰精子を用いた。1. acridine orange (AO) test: 遠心 (300xg, 5min) にて精漿を除き, 1mL の精子浮遊液を作成後, スメアを引き, 酸処理を施した (メタノール: 氷酢酸 = 3:1)。以後の操作, 判定は既報と同様に行った。2. flow cytometry: 対象の内15周期 (8 IVF 周期, 7 ICSI 周期) に行った。精子浮遊液500 μ l を sampling tube に容れ, -30 $^{\circ}$ C で測定まで凍結保存した。解凍後, low pH detergent (0.1% TritonX-100, 0.15M NaCl, 0.08N HCl, pH 1.4, 30 sec) 続いて6 mg/L AO (in phosphate-citrate buffer, pH 6.0) 処理し, FACScan (soft: CELL Quest) を使用して10,000精子を測定した。Cytogram と green (ds-DNA) および red (denatured DNA) の蛍光強度 histogram を得, パラメーター (Xgreen, Xred, COMP (cell outside the main population)) とした。胚盤胞形成率は day5 の胚盤胞数を受精卵数 (2PN) で除した%で表した。

【成績】胚盤胞形成率は ICSI 周期の場合 %green (AO test) と負の相関が ($r = 0.789, p = 0.0005$), COMP と正の相関が認められた ($r = 0.948, p = 0.0011$)。IVF 周期では SCSA の結果と相関するパラメーターはなかった。

【結論】DNA packaging の良い精子核をほとんどの精子に含む症例は通常の体外受精では機能的に良質と考えられるが, ICSI の場合, それが胚発生に不利に働く可能性が示唆された。

9 日 (火) 口演

380 精巣にて特異的に発現するヒト遺伝子 (DKFZp434B18143) のマウス相同遺伝子の単離

兵庫医大¹, 同先端医学研究所発生生殖部門²小森慎二¹, 澤井英明², 香山浩二¹

【目的】造精機能には多くの遺伝子関与している。昨年の本学会にて我々はヒト7番染色体にある DKFZp434B18143 遺伝子を同定してその構造と精巣での特異的な発現について報告した。本研究では, その遺伝子の機能をさらに解明するために, マウスの相同遺伝子を単離することをおこなった。

【方法】1)すでに単離しているヒト DKFZp434B18143 の cDNA をプローブにしてマウス精巣 cDNA ライブラリーを検索した。2)同様の遺伝子をもとにマウスのゲノム YAC ライブラリーを検索した。3)単離した遺伝子断片を用いてサザンプロット解析をした。4)反応するバンドの断片の遺伝子の塩基配列を決定した。5)マウス相同ゲノム遺伝子の一部をもとにマウス精巣 RNA を用いて5'及び3' RACE 法を行い, 相同する cDNA の単離を行った。

【成績】1) cDNA ライブラリーを検索しても相同遺伝子は単離できなかった。2)1つのゲノム遺伝子 (YAC クローン) の単離に成功した。3)サザンプロット解析にて, ヒト cDNA 遺伝子と反応するバンドを認めた。4)その塩基配列を決定したところ, ヒト DKFZp434B18143 遺伝子に80%相同する遺伝子領域が同定された。この相同する領域はヒト cDNA 遺伝子での1918番目から1993番目であった。5) マウス RNA を用いた3' RACE 法にてマウスの相同する約1kb の cDNA の単離に成功した。

【結論】DKFZp434B18143は, 精巣で非常に強く発現していることより精巣機能と関連していることが示唆された遺伝子である。今回, その機能を解明する上で重要なマウスの相同遺伝子を単離することに成功した。今後, この遺伝子を用いて, マウスでの機能解析を行う予定である。

381 ヒト精巣における新規のプロゲステロン受容体 (PR) isoform T cDNA のクローニング

山梨医大

平田修司, 正田朋子, 萩原俊太郎, 薬袋牧子, 三宅麻喜, 星 和彦

【目的】ヒトのプロゲステロン受容体 (PR) 遺伝子に exon S が存在し, exon S-4-5-6-7-8 という構造を持つ PR isoform S mRNA が転写されることが明らかにされた。この成績から, PR 遺伝子は従来考えられていたよりも複雑な構造を有している可能性が示唆される。そこで今回, ヒト PR 遺伝子の新規の exon ならびに mRNA isoform の同定を試みた。

【方法】ヒト精巣の cDNA ライブラリーを, ヒト PR cDNA のプロゲステロン結合領域に対応する部分をプローブとしてスクリーニングした。得られたクローンのうち, 新たな PR isoform T cDNA について, 新規配列部分のゲノム上の由来をゲノムクローニングにより解析した。さらに, 患者の同意を得て手術検体より採取した子宮内膜における PR isoform T mRNA の存在を RT-PCR 法により検討した。

【成績】ヒト精巣の cDNA ライブラリーより, exon 4~exon 8 の上流に新規の配列を有する PR isoform T cDNA をクローニングした。この配列は, exon S の5'-側に存在する新たな exon T に由来することが明らかになった。また, 子宮内膜における PR isoform T mRNA の存在を確認した。

【結論】ヒト PR 遺伝子は, exon 1 から exon 8 の8個の exon に加えて, exon S ならびに exon T の少なくとも合計10個の exon から構成されることを明らかにした。このうち, exon T と exon 4~exon 8 によって PR isoform T mRNA が生合成されることが明らかになった。この PR isoform T mRNA がコードする PR isoform T タンパクは, プロゲステロン結合領域は有するが DNA 結合領域を欠失しており, プロゲステロンの「non-genomic」作用との関連が注目される。