P2-244 GnRH receptor mutant (W206X) の機能解析と分子遺伝学的治療の可能性

金沢大

可西直之, 生水真紀夫, 村上弘一, 篠原一朝, 野村一人, 金枝貴史, 岡田政彦, 張波, 南紀子, 井上正樹

【目的】われわれは, GnRH receptor の遺伝子変異により hypogonadotropic hypogonadism をきたした症例を経験した. この変異 (遺伝子 W206X) は, 第二細胞外ループより C 末側のアミノ酸を欠く蛋白質をコードしている. この変異レセプターについて機能解析を行い, 分子標的治療の可能性について検討した. 【方法】学内倫理委員会の承認と文書による同意を得て, この変異レセプターについて機能解析を行なった. 【成績】この変異 cDNA を Cos-7 に発現させたところ, [131I]-LHRH との結合や buserelin による IP₃ の増加反応は認められなかった. N-末端に X-press tag をつけた変異 cDNA をトランスフェクトして検討したところ, 変異レセプター蛋白は細胞質内および細胞膜にほとんど検出されなかったことから, 変異蛋白の分解が亢進しているものと考えられた. さらに変異レセプターには, 野生型レセプターの機能を抑制する dominant negative 作用が観察されたことから, 変異レセプターの膜移行障害 (misrouting) の可能性が強く示唆された. アミノグリコシド添加培地で培養すると, 変異レセプター cDNA をトランスフェクトした細胞にも buserelin に対する反応性が観察されるようになった. この効果は, 細胞透過性 GnRH antagonist である IN3 前処理で増強された. 【結論】以上の成績から, 患者においてもアミノグリコシドや IN3 により機能性レセプターの発現が誘導できる可能性が示唆された.

P2-245 初期胚におけるミトコンドリア DNA 遺伝子の変異出現率と遺伝子量が胚発生に及ぼす影響慶應大¹, 埼玉社会保険病院², 神奈川済生会病院³村越行高¹, 末岡浩¹, 渡邊広是¹, 渡邊昌紀¹, 田島博人², 中林章³, 橋場剛士¹, 浅田弘法¹, 岩田壮吉¹, 久慈直昭¹, 青木大輔¹, 吉村泰典¹

【目的】ミトコンドリア (mt) DNA の変異, 欠失はミトコンドリア病, 不妊, 癌, 老化など多彩な病態を発生させることが指摘されている. それらの変異は野生型と変異型の mtDNA が共存している状態 (heteroplasmy) で遺伝している. そこで配偶子を含む各種細胞について ATPase6 遺伝子を標的とした mtDNA の定量的分析および, 代表的な点変異 T8993G について変異比率を測定し, mtDNA の遺伝形式の解明と胚発生に及ぼす影響を検討した. 【方法】ヒト卵子及び受精卵に存在する mtDNA 量は従来より明確にされていないため ATPase6 遺伝子内の 8993 位に対して 9100copy の mtDNA を有する B 細胞株を対照として検量線を作製し, 卵の定量化を行った. 8993 位の T 及び G に対応する 2 種類の蛍光プローブを設計して, Allelic Discrimination Assay を行い, 各棄却未受精卵, 分割異常胚について変異比率測定を行った. 検体は同意を得て使用した. 【成績】未受精卵 (n=10) mtDNA コピー数は 10749 から 702094 であり, 同一患者の複数の未受精卵からの mtDNA コピー数は 15600 から 462000 と広い分布を示した. また分割異常胚の割球 (n=55) の mtDNA コピー数は 11000 から 702000 に分布した. 未受精卵, 分割異常胚での変異については, 0~0.2% の heteroplasmy 状態で存在していた. また高齢では変異比率が増加する可能性が示唆された. 【結論】未受精卵, 分割異常胚ではその 95% が変異比率 0.2 以上に集積し, 雌雄配偶子における正常と変異の allele の構成比率に明らかな集積分布の差を認めた. 健常者の未受精卵, 異常分割胚に mtDNA 変異が高い heteroplasmy 状態で存在している事が明らかとなり, その受精および初期胚発生への関与が示唆された.

P2-246 MATER/NALP5 のマウス卵細胞における機能

聖マリアンナ医大

津田千春, 齊藤寿一郎, 谷内麻子, 井埜まり絵, 石塚文平

【目的】MATER (Maternal antigen that embryos require) /NALP5 は, マウスにおける早発閉経の病態解明の過程で発見され, 卵細胞が正常な状態を維持するために必要な蛋白である. Mater -/-雌マウスの表現型は正常であるが, その受精卵は 2 細胞期で発育が停止する. 最近, MATER は卵細胞に特異的に発現し, 特にミトコンドリアで発現すると報告された. 今回, Mater -/-マウス卵細胞のミトコンドリア機能を解析することにより, MATER が受精する以前から卵細胞において機能しているか否かを検討した. 【方法】8 週齢の Mater -/-及び Mater wild type (WT) 雌マウスの卵細胞 fragmentation 率と卵胞数をカウントした. また, 卵細胞のミトコンドリア膜電位活性, 活性酸素 (ROS) 活性, グルタチオン濃度を測定した. 【成績】卵細胞 fragmentation 率と卵胞数は両者で有意差はなかった. ミトコンドリア膜電位活性は Mater -/-で有意に高かった. ROS 活性は Mater -/-で高く, グルタチオン濃度は Mater -/-で低い傾向にあった. 【結論】卵細胞 fragmentation 率と卵胞数から 8 週齢では Mater -/-卵細胞の機能は維持されている事が示唆された. しかし, 卵細胞のミトコンドリア機能は, Mater -/-卵細胞のミトコンドリア活性が亢進した結果, 多量の活性酸素が蓄積し, 更に, グルタチオンが減少しているために活性酸素を分解できず, 細胞破綻をきたして細胞死が促進されると考えられる. MATER は卵割期初期において必要な蛋白であり, なおかつ, 受精以前の卵細胞から作用している可能性が示唆された.