

P1-286 Sertoli 細胞での Translationally controlled tumor protein (TCTP) の発現におけるアンドロゲンの影響についての検討

兵庫医大¹, 兵庫医大先端医学研究所発生生殖部門²

小森慎二¹, 霞 弘之², 田中宏幸¹, 香山浩二¹

【目的】アンドロゲンの造精機能に対する作用の詳細は未だ明らかではない。以前にマウスの Sertoli 細胞株 TM4 におけるプロテインチップを用いた解析にてアンドロゲン投与により tubulin binding protein である TCTP が減少することを明らかにした。本研究ではこの遺伝子の発現にアンドロゲンがどのように作用しているかを検討した。【方法】1) TM4 での dihydrotestosterone (DHT) 添加・非添加での TCTP 発現を real time PCR 法にて検討した。2) Balb/C マウスに抗アンドロゲン作用（レセプター阻害作用）のある flutamide を 20μg/g/日 で 4 週間連続投与した群と corn oil のみを投与した群（対照群）より精巣を摘出して、Laser microdissection 法にて Sertoli 細胞を回収し、それらの細胞での TCTP の発現を real time PCR 法にて定量的に測定した。3) TCTP の 5' 上流領域を断片化してアンドロゲン受容体が発現する細胞にアンドロゲン添加した後に核蛋白を抽出して gel shift assay を行いアンドロゲンが作用する領域を検討した。【成績】1) TM4 ではプロテインチップを用いた解析の結果と同じように、DHT 添加により TCTP の発現は減少した。2) 回収した Sertoli 細胞においては、flutamide 投与群は対照群に比べて有意に TCTP 発現の上昇を認めた。3) TCTP の 5' 上流の -700bp ~ -500bp 領域にアンドロゲンが結合をすることを同定した。【結論】Sertoli 細胞にて TCTP の発現調節にはアンドロゲンが関与していることが確認された。TCTP は細胞分裂に関与するのでアンドロゲンはこの分子の発現に影響を及ぼして精子形成過程に関与することが示唆された。

P1-287 INSL3/LGR8 は Gi プロテインを介し、精細胞のアポトーシスを抑制する

秋田大¹, 秋田大保健学科²

熊谷 仁¹, 河村和弘¹, 伊藤恭子¹, 佐々木満枝¹, 福田 淳¹, 児玉英也², 田中俊誠¹

【目的】我々は、Insulin/relaxin ファミリーに属する INSL3 が胎生期の精巣下降において、その受容体である LGR8 を介して重要な役割を担うことを報告した。それに加えて、造精開始後にも INSL3 分泌を認めること、精巣に LGR8 が発現していること、が報告されている。そこで、今回 INSL3/LGR8 の精細胞における作用とシグナル伝達について検討した。【方法】ラット精巣における INSL3 と LGR8 mRNA 発現を in situ hybridization 法を用いて検討した。ビオチン標識 INSL3 を用いて、精巣細胞への binding 実験を行った。GnRH アンタゴニスト処理をしたラットに INSL3 および hCG を投与し精巣の重量を測定し、さらに、精細胞のアポトーシスについて DNA ラダーの検出と DNA fragmentation のラベリングを用いたアポトーシス細胞の検出により行った。培養精細胞に INSL3 および FSH を添加し、その細胞内外 cAMP を RIA 法により測定した。また、Gi プロテインの阻害剤である pertusis toxin 前処置後でも同様に測定した。【成績】ラット精巣では INSL3 は Leydig 細胞に、LGR8 は精細胞に発現していた。ビオチン標識 INSL3 は精細管内細胞に binding を認めた。GnRH アンタゴニスト処理による精巣重量の減少は、INSL3 および hCG 投与により回復した。GnRH アンタゴニスト処理による精細胞のアポトーシスが INSL3 の投与により抑制された。INSL3 単独では精細胞の cAMP 産生に変化はなかったが、INSL3 は forskolin による cAMP 産生を減少させ、その作用は pertusis toxin 前処置で減弱した。【結論】本研究では、(1) INSL3 は LGR8 が発現している精細胞のアポトーシスを抑制すること、(2) INSL3/LGR8 系のシグナル応答に Gi プロテインが関与していること、を明らかにした。

P1-288 ヒト精子における phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) の isoform 特異的な mRNA およびタンパクの検出

山梨大

正田朋子, 平田修司, 星 和彦

【目的】PHGPx は、グルタチオンペルオキシダーゼのひとつで、ミトコンドリア型 (mtPHGPx) および核型 (nPHGPx) の 2 種類の isoform が合成される。mtPHGPx mRNA は、ミトコンドリア移行シーケンスを有する第一エキソン, exon E1 から下流が転写され、また nPHGPx mRNA は、核移行シーケンスを有する第一エキソン, exon Ea から下流が転写され合成される。これまで、ヒト精子において PHGPx の発現が低下している男性不妊症例が報告されているが、各 isoform の精子における機能については未解明である。今回、これらの isoform の役割の解明を目的として、各々の mRNA の定量的解析およびタンパクについての解析した。【方法】ボランティア男性より同意を得て、射出精子を採取した。検体より RNA を調製し、reverse transcription (RT) を施行した。mtPHGPx mRNA および nPHGPx mRNA を特異的に検出するため、exon E1 および exon Ea にセンスプライマーを設定し、また exon 2 に設定したアンチセンスプライマーを用いて、定量的 PCR を施行した。また、ウサギを用いて 2 種類の PHGPx isoform に共通な C 末端部分に対する抗体 (抗 PHGPx 抗体) を作製し、それを用いてヒト精子における PHGPx タンパクの存在の有無について Western blot 法により検討した。【成績】すべての検体において mtPHGPx mRNA および nPHGPx mRNA が検出された。また、それぞれの検体で mtPHGPx および nPHGPx タンパク特異的なシグナルが検出された。【結論】今回、PHGPx isoform mRNA の定量的検討およびタンパクの検討が可能となった。今後、男性不妊の精子機能の評価に有用であると考えられる。