

Title	Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase in Human Male Reproductive Organs and Seminal Plasma
Author(s)	徳川, 吉弘
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41160">https://hdl.handle.net/11094/41160</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	徳川吉弘
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 14023 号
学位授与年月日	平成 10 年 4 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase in Human Male Reproductive Organs and Seminal Plasma (ヒト男性生殖器および精漿中でのリポカリン型プロスタグランディンD合成酵素)
論文審査委員	(主査) 教授 村田 雄二 (副査) 教授 奥山 明彦 教授 青笹 克之

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

ヒト精漿中に  $\beta$ -trace という蛋白が存在することは1960年代に報告されたがその機能については未だに不明であった。最近になって、 $\beta$ -trace がリポカリン型プロスタグランディンD合成酵素 (PGDS) と同じ蛋白であることが明らかとなった。また、ウシでは妊孕性の高い雄の精漿中に PGDS が高濃度に含まれていることが報告されている。そのため、ヒトにおいても PGDS が男性妊孕性に関与している可能性が考えられる。そこで本研究では、ヒト精漿中および男性生殖器における PGDS の存在ならびに機能を解析することを目的とした。

#### 〔方法ならびに成績〕

不妊外来患者の配偶者50名(うち乏精子症10名)より精液を採取した後、精漿を分離し以下の実験に使用した。精漿中のプロスタグランディン (PG) D合成酵素活性は、精漿中に加えた  $[1-^{14}\text{C}]$  PGH<sub>2</sub> から  $[1-^{14}\text{C}]$  PGD<sub>2</sub> への変換率で計算した。 $[1-^{14}\text{C}]$  PGH<sub>2</sub> と  $[1-^{14}\text{C}]$  PGD<sub>2</sub> の分離には薄層クロマトグラフィーを用いた。この精漿中 PGD 合成酵素活性は0.05-1.83 nmol/min/mg protein であり、その活性には DTT が必要であるがグルタチオンは必ずしも必要としないことが判明した。この性質はリポカリン型プロスタグランディンD合成酵素 (PGDS) の特徴と一致している。そこで PGDS 特異的抗体 (1B7) を用いたウェスタンブロッティング法により精漿を検討したところ、PGDS 特異的抗体で認識される27 kD の蛋白が精漿中に存在することが確認できた。次に、この 1B7 抗体で認識される27 kD の蛋白の性質を調べるために、この蛋白を 1B7 を用いたイムノアフィニティカラムクロマトグラフィーにより精製した。このカラムにより精漿中 PGD 合成酵素活性の80%が回収された。また精製された蛋白のサイズは27 kD で、N-Glycanase<sup>®</sup> により糖鎖を切断した後ではサイズは21 kD へと変化した。精製された蛋白のN末端アミノ酸配列は APEAQVSV-QPNFQQDK であり PGDS と一致していた。これらの結果よりヒト精漿中に PCDS が存在することが証明された。

男性妊孕性と精漿中 PGDS との関連を検討するため濃度の測定を行った。精漿中 PGDS 濃度の測定は 1B7 および別の PGDS 特異的抗体 (7F5) を用いたサンドイッチ ELISA 法にて測定した。精漿中 PGDS 濃度の平均は乏精子症群

が2.47 ng/ $\mu$ l, 正常群が9.75 ng/ $\mu$ l で前者が後者より有意に低いことが明らかとなった (P<0.001)。

次に PGDS の産物である PGD<sub>2</sub> が精漿中に存在するかどうかを調べた。PGD<sub>2</sub> 濃度は PGD<sub>2</sub> を PGD<sub>2</sub> methoxine に変換した後 ELISA により測定した。精漿中 PGD<sub>2</sub> 濃度は5.00 $\pm$ 0.65 ng/ml であり, 精漿中 PGD<sub>2</sub> 濃度は精漿中 PGDS 濃度との間に正の相関が見られた。このことから, PGDS は精漿中で PGD<sub>2</sub> を産生していることが示唆された。一方精漿中 PGD<sub>2</sub> 濃度は他の精漿中 PG 濃度に比べると低値であり, また, PGD<sub>2</sub> は血漿中では不安定な物質で容易に PGJ<sub>2</sub> へと変化することが知られている。そこで精漿中での PGD<sub>2</sub> の分解を調べるために, [1-<sup>14</sup>C] PGD<sub>2</sub> を精漿とインキュベーションした後, 薄層クロマトグラフィーで展開しその分解産物の同定を試みた。その結果, PGD<sub>2</sub> は精漿中で分解され PGJ<sub>2</sub>,  $\Delta^{12}$ -PGJ<sub>2</sub> および15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> へと変換されることが証明された。その半減期は約6.5時間であり, 12時間後には約80%の PGD<sub>2</sub> が PGJ<sub>2</sub> シリーズへと変換された。この PGD<sub>2</sub> の不安定性が精漿中 PGD<sub>2</sub> の低濃度の原因である可能性がある。

精漿中 PGDS の由来を検討するため, ノーザンブロッティング法を用いて男性生殖器における mRNA の発現を調べたところ, 前立腺, 精巣上体, 精巣に PGDS の mRNA の発現が認められた。次に PGDS の組織での局在を 1B7 を用いた免疫組織染色により検討した結果, 精巣中のライディッヒ細胞, 前立腺の上皮細胞, 精巣上体管に PGDS の局在が証明され, 精漿中 PGDS はこれらの臓器に由来する可能性が示された。

#### [総括]

1. ヒト精漿中に PGDS が存在し, PGD 合成活性も存在することが証明された。
2. 精漿中 PGDS 濃度は乏精子症群 (2.47 ng/ $\mu$ l) では正常群 (9.75 ng/ $\mu$ l) に比べて低値であることが明らかとなり, 精漿中 PGDS の男性妊孕性への関連が示唆された。
3. 精漿中では PGD<sub>2</sub> は不安定で, 容易に PGJ<sub>2</sub>,  $\Delta^{12}$ -PGJ<sub>2</sub> および15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> へと変換される。
4. 前立腺, 精巣上体, 精巣に PGDS の局在が示され, 精漿中 PGDS はこれらの臓器に由来する可能性が高い。

## 論文審査の結果の要旨

本研究はヒト精漿中にプロスタグランディンD (PGDS) 合成酵素活性があることを証明した最初の報告である。そしてこの精漿中 PGDS 活性の大部分はリポカリン型 PGDS によるものであることを特異的モノクローナル抗体を用いたイムノアフィニティーカラムにより明らかにしただけでなく, この精漿中リポカリン型 PGDS は脳脊髄液中リポカリン型 PGDS と同一であることも同時に証明している。リポカリン型 PGDS の産生部位は前立腺, 精巣上体, 精巣であることから精漿中リポカリン型 PGDS の由来は前立腺と精巣上体であることを明らかにしている。一方リポカリン型 PGDS の産物である PGD<sub>2</sub> の精漿中濃度はリポカリン型 PGDS と正の相関を示すことより, 精漿中 PGD<sub>2</sub> はリポカリン型 PGDS により産生されている可能性を示唆している。さらに重要なことに, 疾患との関連として乏精子症患者の精漿中ではリポカリン型 PGDS は正常者に比べて有意に低値であることを明らかにしている。この事実は乏精子症あるいは不妊症の原因の一つにリポカリン型 PGDS あるいはその産物である PGD<sub>2</sub> が関与している可能性を示唆している。以上本研究内容は独創的であり, その結果はすべて新しい知見である。本研究は近年増加傾向にあるといわれている不妊症の原因究明だけでなく, その治療法の確立の一助となることが期待され, 学位の授与に値すると考えられる。