



Title	Expression of Selenoprotein - P Messenger Ribonucleic Acid in the Rat Testis
Author(s)	古賀, 実
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41634
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	古賀 実 ^{みのる}
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 5 3 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成11年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学 位 論 文 名	Expression of Selenoprotein - P Messenger Ribonucleic Acid in the Rat Testis (ラット精巣におけるセレノプロテインPメッセンジャー RNA の局在)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 奥山 明彦 (副査) 教 授 村田 雄二 教 授 西宗 義武

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

活性酸素種は不妊症を含め多くの疾患の発症に関わっていることが知られている。特に精子は不飽和脂肪酸を多く含み、活性酸素種による障害を受けやすい。しかしながら、生体にはこれらを消去するスカベンジャーも備わっており、精巣や、精子、精漿中においては、カタラーゼ、スーパーオキシドデイズターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ（以下 GPx）などの存在が報告されている。しかし、精巣における GPx やカタラーゼなどの抗酸化活性は他の組織に比べ低いことも知られている。

セレノプロテインは必須微量元素であるセレンウムをセレノシステインの形で持つ蛋白質の総称であり、このファミリーの一つであるセレノプロテインPは、ラット及びヒト血漿より単離された分子量57kDaの糖蛋白質で、全血漿セレンウムの60%以上を占めることが報告されている。また、その機能は未だ不明ではあるものの、同ファミリーの一つである GPx よりも強い抗酸化作用を有することが示唆されている。このセレノプロテインPは種々の臓器で発現するが、精巣においても、その mRNA の強い発現が報告されていることから何らかの重要な役割を演じていることが考えられる。

本研究は、セレノプロテインP mRNA の精巣における生理的役割を理解するため、遺伝子発現の詳細について調べた。

【方法】

- (1) F344/Jcl 雄ラット精巣組織を Leydig cell fraction, germ cell fraction, tubule fraction の3画分に分けた。方法は、精巣白膜を除去した精巣内容を0.1%コラゲナーゼ、0.02M HEPES 含有 MEM 溶液中で精細管を軽くほぐした後、33℃、30分間培養した。この処理にて浮遊した細胞群を Leydig cell fraction とした。次にピペッティングにて精細管外の細胞を除去した後、精細管を細切、ピペッティングにて出現する浮遊細胞群を germ cell fraction とした。最後に、十分に germ cell を除去することで、精細管壁成分 (Sertoli cell) の画分を得、これを tubule fraction とした。それぞれの画分より total RNA を抽出し、ラットセレノプロテインP cDNA をプローブとして Northern blot 解析を行った。
- (2) Leydig cell を選択的にかつ一過性に破壊する ethylene dimethane sulfonate (以下 EDS) を投与することで、

Leydig cell の消失, およびその後の再生に伴うセレノプロテインPの発現の変化を調べた。方法はF344/Jcl雄ラットにEDS (75mg/kg body weight in DMSO : water [1 : 3]) を腹腔内単回投与し, 7, 14, 72日後に精巣を摘除した。また, コントロールとしてDMSO : water [1 : 3] のみを腹腔内へ投与し, 7, 72日後に精巣を摘除した。プローブは, セレノプロテインP cDNA およびLeydig cellのマーカーとして 3β -HSD (3 beta-hydroxy-steroid dehydrogenase) cDNA を用い, 精巣より抽出したtotal RNAを用いてNorthern blot解析を行った。

(3) 精巣での局在をin situ hybridizationを用いて調べた。プローブについては, 5'非翻訳領域を含む228bpをin vitro transcription, ジギキシゲニン標識にてセンス, およびアンチセンスcRNAプローブを作成し, 本実験に用いた。

【成績】

- (1) セレノプロテインP mRNAはLeydig cell fractionに特に強く発現していたことから, 精巣間質の細胞に由来することが考えられた。
- (2) EDS投与による精巣での発現の変化についてはLeydig cellのマーカーである 3β -HSDと同様に, EDS投与1週間後にはLeydig cellのdegenerationに伴う発現の低下とre-generationに伴う発現量の増加が認められた。このことから, 精巣間質細胞のうちLeydig cellに特異的に発現することが考えられた。
- (3) in situ hybridizationでは, 精細管内にはシグナルは全く見られず, 間質の細胞にのみ認めた。

以上の結果より, 精巣におけるセレノプロテインP mRNA Leydig cellに局在することが明らかとなった。

【総括】

セレノプロテインPが分泌蛋白であり, 精子に対する保護作用を有するという仮定から, その発現細胞は精細管内の細胞, 特に, Sertoli cellが推定された。しかしながら, 実際, Leydig cellであったことは非常に興味深い結果であった。Leydig cellはテストステロン合成の場であり, 絶えず活性酸素の産生されている場でもある。これまでの報告から, セレニウム欠乏によるテストステロン合成の低下, および合成酵素活性の低下が指摘されており, これが活性酸素種によるものとも報告されていた。これらの知見と, セレノプロテインP mRNAの局在がLeydig cellであったことは, セレノプロテインPが活性酸素種のスカベンジャーとしてテストステロン合成に関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

精巣は大きく分けて, 将来精子へと分化する各段階のgerm cell, およびその支持細胞であるSertoli cell, テストステロン合成の場であるLeydig cellなどより構成されており, ある遺伝子の機能を考える場合, まず第一にその発現細胞を同定することが重要となる。本論文は, セレノプロテインPの精巣における役割を考察する上でその発現細胞を調べたものであり, 手法として精巣細胞分画法を利用したNorthern blot解析やin situ hybridizationなどの分子生物学的手法を駆使し, これがLeydig cellであったことを非常に明確に, かつ, 初めて示したものである。これまでの報告と今回の結果から, セレノプロテインPとステロイドホルモン合成との関連が示唆され, 今後の研究の発展に大いに貢献することが期待されることより, 学位の授与に値すると考えられる。