

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592387

研究課題名(和文) GABA受容体による生殖細胞形成過程のメカニズムの解明

研究課題名(英文) The elucidation of functional roles of GABA receptor during spermatogenesis process

研究代表者

神原 清人 (Kanbaran, Kiyoto)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：40298758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：精子形成過程において細胞膜受容体であるGABA受容体の1サブユニットが核内に移行するかについてWestern blottingと免疫電顕を用いて調べた。この結果により生殖細胞の発生過程において核内に移行した1サブユニットが核内のクロマチン凝集部位の転写調整因子として働く可能性が示唆された。さらに1サブユニットの遺伝子導入の実験において1サブユニットの核内移行に関して何らかの遺伝子の制御を受けていることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether the alpha 1 subunit of GABA receptor which was cell membrane receptor would be translocated into the nucleus during spermatogenesis process using Western blotting and immunoelectron microscopy. These findings suggested that the alpha 1 subunit which was translocated into the nucleus might function as a gene transcription factor in the area of condensed chromatin during the maturation of germ cells. Furthermore, it was thought that the nuclear translocation of the alpha 1 subunit received some kind of genetic control in the transfection experiment of the alpha 1 subunit.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、泌尿器科学

キーワード：GABA受容体 精子形成過程 核内移行

## 1. 研究開始当初の背景

精子形成過程では体細胞分裂をする精原細胞の過程、減数分裂をする精母細胞の過程、さらに半数体分化する精子細胞の過程の大きく3つの過程が存在する。それらのうち精原細胞過程では自己複製に必須な増殖因子などの GDNF や SCF が活性化され体細胞分裂に関与する。一方、精母細胞の過程では必須の転写因子の活性は若干抑制されるも維持し続け、それ以外は DNA メチル化やクロマチン構造の変化等のエピジェネティクスな働きを介して抑制され、そのことが対合障害を伴う異常な染色体の排除に役立っている。もしこれら転写活性の過程に障害が起きれば不妊の原因になると言われている。このように転写因子の制御がそれぞれの精子形成過程において大きな役割を担っていることが知られるようになってきた。近年、中枢神経系において抑制性のアミノ酸性神経伝達物質として知られていた GABA が末梢組織や癌等に発現し、従来の知られていた神経伝達抑制物質以外の機能を持つことがわかってきた。生殖系においても GABA が精子の先体反応の誘起因子として働くことや progesterone-initiated acrosome reaction に GABA<sub>A</sub> 受容体が関与するという報告がみられ、さらに我々の研究においても精子形成過程の時期に GABA や GABA<sub>B</sub> 受容体が先体に発現し、何らかの機能的役割をもつ可能性があることや GAD Knock-in マウスを使った実

験において精巣上部頭部の上皮に GABA 関連物質の特異的局在がみられたことから精子形成期及び精巣上部で受精能を獲得する時期において GABA system の関与が示唆される。

## 2. 研究の目的

GABA と GABA 受容体等の GABA system が精子形成期の生殖細胞や成熟しつつある精子に対してどのような機能的役割をもつかを検討することにより男性不妊の主要原因となっている特発性造精機能障害の一因を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本来、細胞膜受容体の GABA<sub>A</sub> 受容体の $\alpha 1$  サブユニットが実際に核内移行し転写調整因子として働くには 1. Sterol regulatory element binding protein の様に $\alpha 1$  サブユニットの細胞外に存在する DM DNA binding を含むアミノ末端断片が切断され、核内に移行する場合 2.  $\alpha 1$  サブユニットの核内移行シグナル (PEKPKVKDP) を含んだ細胞内に存在する断片が切断され、核内に移行する場合 3. カベオラの様に $\alpha 1$  サブユニット全体がゴルジさらに ER を経て importin  $\beta$  と結合し核内に移行する場合の3種類の仮説(Fig. 1)が考えられる。このことを調べるため SV40 transgenic mouse の cell line (type B spermatogonia の特徴をもつ cell line)に対

して細胞分画を行った後 $\alpha 1$  サブユニットが細胞膜、細胞質、核のどの部位にまたどのよ  
うな状態で存在するかを Western blotting にて  
確認した。次に各生殖細胞に対して $\alpha 1$  サブユ  
ニットの抗体を用いた免疫電顕を行った。さ  
らに細胞に GABA<sub>A</sub> 受容体の $\alpha 1$  サブユニット  
の遺伝子導入を行うことで実際に $\alpha 1$  サブユ  
ニットが核内移行するかについて調べるこ  
とにした。遺伝子導入実験は $\alpha 1$  サブユニット  
の C 末側を GFP によりラベルした  
pCMV6-AC-GFP ベクター( $\alpha 1$  サブユニット  
の full length を導入したベクター、  
ORIGENE 社)を用いて行った。しかし生殖  
系細胞に関して遺伝子導入に適切な cell line  
がなかったため最初に COS-7 cell line を用  
いて実験を行うことにした。なお遺伝子導入  
には LONZA 社の Nucleofector kit を使用し  
た。

#### 4 . 研究成果

SV40 transgenic mouse の type B  
spermatogonia の特徴をもつ cell line に対す  
る $\alpha 1$  サブユニット抗体を用いた Western  
blotting により細胞膜、細胞質、核どの部位と  
も $\alpha 1$  サブユニットの 51kDa の分子量全体を  
示すバンドがみられた。さらに吸収試験によ  
ってバンドが消失したことから切断されて  
いない $\alpha 1$  サブユニットがそれぞれの部位に  
存在することが確認できた ( Fig. 2 )。次に精  
子形成過程における各生殖細胞の $\alpha 1$  サブユ  
ニットに対する免疫電顕を行ったところパ

キテン期精母細胞において核のクロマチン  
凝集部位に $\alpha 1$  サブユニットの反応がみられ  
た( Fig. 3 )。これらの結果から本来膜受容体で  
ある GABA<sub>A</sub> 受容体の $\alpha 1$  サブユニットが核内  
に移行した後、核内のクロマチン凝集部位の  
転写調整因子として働く可能性が示唆され  
た。さらに実際に $\alpha 1$  サブユニットが核内移行  
するかについて調べるため $\alpha 1$  サブユニット  
が挿入された GFP ベクターを用いて COS-7  
cell line に $\alpha 1$  サブユニットの遺伝子導入実  
験を行った。遺伝子導入実験を行った最初の  
約 1 週間は遺伝子を導入した GFP COS-7 細  
胞の GFP の蛍光が観察され、GFP COS-7 細  
胞の増殖もみられたがその後約 2 ~ 3 週間で  
細胞の増殖は止まり徐々に細胞自体の GFP  
の蛍光も弱くなった。さらに観察を続けたと  
ころ約 3 ~ 4 週間で GFP ベクターを導入した  
GFP COS-7 細胞はすべて死滅した。このこ  
とから GABA<sub>A</sub> 受容体 $\alpha 1$  サブユニットの通常  
の細胞への遺伝子導入には何らかの遺伝子  
の制御を受けている可能性が示唆された。以  
上の結果より精子形成過程において GABA<sub>A</sub>  
受容体 $\alpha 1$  サブユニットの核内移行には核内  
移行を制御する遺伝子の関与が示唆された。

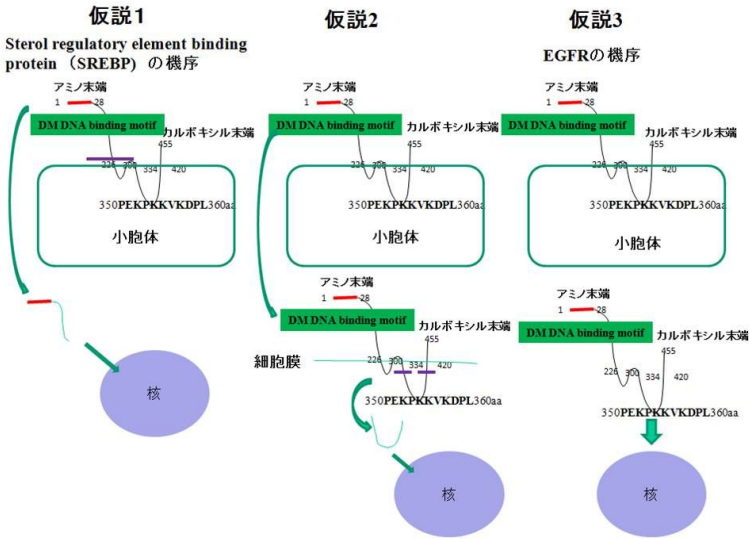


Fig. 1

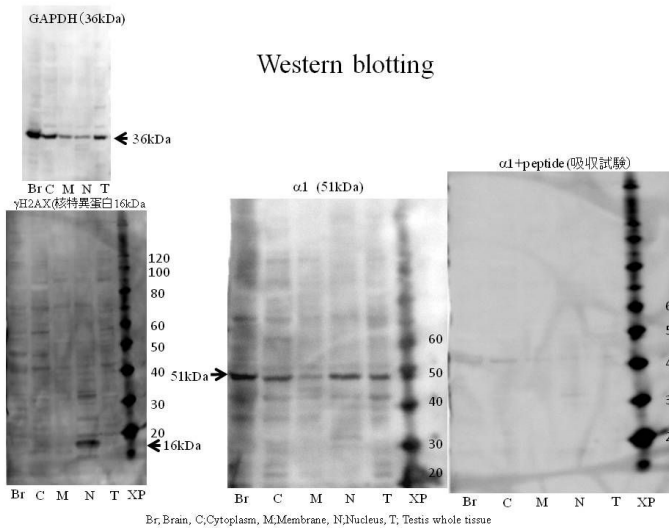


Fig. 2

精母細胞における $\alpha 1$ の局在(免疫電顕)

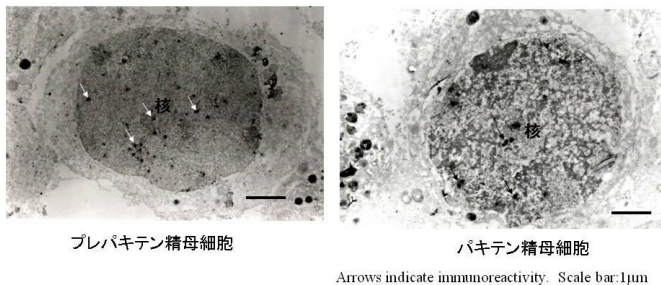


Fig. 3

5. 主な発表論文等  
〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

1) 神原清人、GABA<sub>A</sub> 受容体のマウス生殖細胞形成過程における役割 第 26 回日本生殖免疫学会 2011.12.02 名古屋市

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

神原 清人 (Kanbara Kiyoto)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号:

40298758

(2)研究分担者

森 禎章 (Mori Yoshiaki)

関西福祉科学大学・保健医療学部・教授

研究者番号:

70268192