

平成 21 年 6 月 23 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591817
 研究課題名（和文） 精子形成過程における TCTP の機能解析とアンドロゲンによる発現調節機構の検討
 研究課題名（英文） Study for the function of TCTP in spermatogenesis and analysis for the regulation of the expression of TCTP by androgen.
 研究代表者
 小森 慎二（KOMORI SHINJI）
 兵庫医科大学 医学部 教授
 研究者番号：60195865

研究成果の概要：アンドロゲンにより精巣のセルトリ細胞より分泌されるTCTPは減少することを in vitro及びin vivoにおいて明らかにした。さらにその発現調節に関連する部位も同定することに成功した。このことによりアンドロゲンのセルトリ細胞における機能の一旦を明らかにすることができ、今後の精巣でのアンドロゲン作用の解明に有益な結果を得ることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：精子形成、TCTP、アンドロゲン、セルトリ細胞

1. 研究開始当初の背景

男性不妊症の原因として oligozoospermia 及び azoospermia は比較的高頻度にみられるものである。我々はすでに oligozoospermia の患者において、アンドロゲンレセプター (AR) 遺伝子の exon A の glutamine repeat の数が正常人に比して少ない例が多いことを明らかにした (CAG repeat length of the androgen receptor in Japanese infertile males with oligozoospermia, Mol. Hum. Reprod., 5, 14-16, 1999)。この exon A は AR 遺伝子の発

現及びその標的遺伝子の発現にも関与していると推測されているが、その詳細は未だ明らかでない。また、我々は別の AIS 患者において AR の exon A の glutamine repeat が正常人よりも少なく、そのことにより in vitro の発現系で AR の細胞での発現が低下していることを証明している (Shortage of glutamine (CAG) homopolymeric repeats suppresses the expression of androgen gene in a case with the androgen insensitivity syndrome, Komori S. Tanaka H. Sakata K. Tsuji Y. Shima H. Koyama K., Gynecol. Endocrinol., 12, 1-8, 1998)。一

方、精巣でのアンドロゲンは、主として精細管に存在する Sertoli 細胞に作用してその作用を発揮する。我々は、マウス S Sertoli 細胞株 TM4 を用いたプロテインチップ法による研究により、アンドロゲンを作用させることにより、TCTP(translationally controlled tumor protein)が down regulation を受けることを明らかにした。この TCTP は通常は細胞分裂を抑制する作用があるが down regulation を受けることにより細胞分裂を促進することが示唆された (Analysis of effects of androgen on protein profiles in TM4 mouse Sertoli cells by SELDI-TOF mass spectrometry. (Asia J Androl. 2006)。さらに in vivo においてマウスに抗アンドロゲンレセプター作用のある Fultamide を投与した場合に、精巣の Sertoli 細胞での TCTP の発現を Laser microdissection 法にて細胞を回収して検討したところ、抗アンドロゲン作用により TCTP の発現が up-regulation されていることも明らかにした (manuscript in preparation)。一方 Sertoli 細胞株 TM4 においてアンドロゲンにて Macrophage migration inhibitory factor (MIF) や calgizzarin が up-regulation されることも明らかにした (Asia J Androl. 2006)。

2. 研究の目的

(1) アンドロゲンにより down regulation をうける TCTP の発現調節機構について検討する。

(2) マウス精巣の Sertoli 細胞での androgen の影響を検討するため、GnRH analogue で精巣機能を抑制し上で、アンドロゲンを投与した後の精巣での発現を検討する。

(3) TCTP は精巣では germ cell でも発現している。この germ cell での発現がアンドロゲンによりどのようになるかを

(2) と同じ系で検討する。

これらの検討により、精巣での TCTP の機能とそれを調節するアンドロゲンとの関連が明らかになり、造精機能における精巣でのアンドロゲンの作用機序の解明に非常に有用であると考えられる。

3. 研究の方法

アンドロゲンの TCTP への発現調節の検討

(1) TCTP の 5' 上流領域の単離

マウスの TCTP の遺伝子配列をもとに、TCTP 遺伝子の 5' 上流領域遺伝子の 3Kb 程度の断片を PCR 法を用いて単離する。その遺伝子配列をコンピュータ解析して、一般的な発現調節領域を解析する。

(2) Gel shift 法によるアンドロゲン作用領域の同定

この 5' 上流領域を 200~300bp に細断片化する。それぞれの断片を発光分子で標識する。また、アンドロゲンレセプターを発現するマウス Sertoli cell line TM4 に dihydrotestosterone (DHT) を添加後に核蛋白を抽出する。この核蛋白を先の TCTP の 5' 上流の各断片とを混和し、電気泳動する。その上で各断片のうち、核蛋白が結合して泳動が変動する断片を検討する。変動した断片は、核蛋白が結合したことになるので、さらに同じ断片を用いて、今度はその反応系にさらに抗アンドロゲンレセプター抗体を添加して、最初に認められた変動したバンドよりさらに変動 (supershift) するかどうかを検討する。この Supershift した断片にはアンドロゲン-アンドロゲンレセプター複合体が結合したこととなる。

(3) supershift した断片での footprinting 法による結合部位の検討

変動した断片を RI にて標識した後に核蛋白を混和し、変性ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動して、ゲルを乾燥後に autoradiography にて結合領域の塩基配列を決定する。

(4) Luciferase assay による発現調節断片の検討

4-1) TCTP の 5' 上流領域を luciferase 遺伝子の 5' 上流に導入する。この際、1 つは通常のプロモーターの上流に導入する。もうひとつはプロモーターのない luciferase 遺伝子の 5' 上流に導入する。Androgen は TCTP 遺伝子の発現を抑制する働きがあるので、luciferase 活性が抑制されるかどうかを検討する。

4-2) TCTP の 5' 上流を endonuclease にて 5' 上流側より短くしていき、それぞれの断片を luciferase 遺伝子の 5' 上流に組み込み、

luciferase assayを行い、発現に関する領域を検討同定する。

4. 研究成果

アンドロゲンのTCTPへの発現調節の検討

(1) Gel shift法によるアンドロゲン作用領域の同定

TCTP遺伝子5'上流領域を9つの断片に分けて検討したところ、ひとつの断片(-545bp1から-388bp)に、核蛋白が結合したことが判明した。

(2) Luciferase assayによる発現調節断片の検討

上記で同定した5'上流領域断片をluciferase遺伝子の5'上流に導入することに成功した。セルトリ細胞にDHTを添加した場合としない場合、また、同定した5'上流領域を正方向にluciferase遺伝子の5'上流に組み込んだ場合と逆方向に組み込んだ場合でそれぞれ実験をしたところ、正方向に断片を組み込んだ場合に、DHTを添加した場合に、luciferase活性を有意に抑制されることが明らかとなり、in vitroの実験系でもその作用を証明することに成功した。

マウス精巣にてのandrogenのTCTP発現調節への検討

① Laser microdissection法によるSertoli細胞の回収 左記の精巣の凍結切片を顕微鏡下観察して、精細管内のsertoli細胞をLaser microdissection法にて回収し、その細胞よりmRNAを分離することに成功した。

② RT-PCR法によるTCTP遺伝子の発現量の解析 発現量を検討したところ、Fulutamideにて有意に発現が増強された。一方およびGnRH agonistによる作用とtestosteroneによる作用では有意な差は認めなかった。

③ germ cellでのTCTPの発現を検討

上記と同様にgerm cellでも発現を検討し、TCTPはFulutamideで抑制されることが判明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. Komori S., Sakata K, Kasumi H, Takenobu T, Yamasaki T, Kanemura Y, Koyama K. Analysis of effects of androgen on protein profiles in TM4 mouse Sertoli cells by SELDI-TOF mass spectrometry. Andrologia (submitted)、査読あり
2. Kasumi H., Komori S., Sakata K, Yamamoto N, Yamasaki T, Kanemura Y, Koyama K. Upregulation of macrophage migration inhibitory factor and calgizzarin by androgen in aTM4 mouse Sertoli cells. Asian J Androl 8, 549-554, 2006、査読あり

[学会発表] (計4件)

1. Komori S., Kasumi H., Nakamura Y, Kinuta T, Tanaka H. and Koyama K., androgen downregulates the expression of translationally controlled tumor protein(TCTP) in mouse Sertoli cells 41st annual meeting of Society for Study of Reproduction. Kailua-Kona Hawaii, USA, 27-30 2008
2. Komori S., Kasumi H., Uchida K, Nakamura Y and Koyama K., Analysis of the androgen effect for the expression of translationally controlled tumor protein(TCTP) in mouse Sertoli cells. 63rd annual meeting of the American Society for Reproductive Medicine. Washington DC, USA, 10 13-17 2007
3. Komori S., Sakata K, Kasumi H., Takenobu T, Uchida K, Fukuoka K and Koyama K. Analysis of effects of androgen on protein profiles in TM4 mouse Sertoli cells by SELDI-TOF mass spectrometry. 26th anniversary meeting of American Society for Reproductive Immunology. Nashville Tennessee 6 15-17 2006
4. Tanaka H., Komori S., Sakata K, Kasumi H. and Koyama K., Studies on the androgen effect for the expression of macrophage inhibitory factor (MIF) and translationally controlled tumor protein (TCTP) in mouse Sertoli cells. 10th International congress of Reproductive immunology, Opatija, Croatia, 6

10-14 2007

〔図書〕（計1件）

1. Komori S. Kasumi H. Sakata K. Koyama K.
The role of androgens in spermatogenesis. P25-30, Gamete Biology: Emerging frontiers in Fertility and Contraceptive Development (Edited by Gupta SK. Koyama K. and Murray JF) Nottingham university press 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小森慎二 (KOMORI SHINJI)
兵庫医科大学 医学部 教授
研究者番号：60195865

(2) 研究分担者

田中宏幸 (TANAKA HIROYUKI)
兵庫医科大学 医学部 講師
研究者番号：80330447

(3) 連携研究者

堀内 功 (HORIUCHI ISAO)
兵庫医科大学 医学部 講師
研究者番号：70340974

(4) 連携研究者

霞 弘之 (KASUMI HIROYUKI)
兵庫医科大学 医学部 講師
研究者番号：00289068

(3) 連携研究者

該当なし