

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
安倍弘和	主査 教授 勝 岡 洋 治 副査 教授 大 槻 勝 紀 副査 教授 森 浩 志 副査 教授 芝 山 雄 老 副査 教授 林 秀 行
主論文題名 Epithelial Localization of Green Fluorescent Protein-Positive Cells in Epididymis of the GAD67-GFP Knock-In Mouse (GAD67-GFP ノックインマウスの精巣上体における GFP 陽性細胞の局在について)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>γアミノ酪酸(GABA)は成熟哺乳動物の中樞神経系における主要な抑制性神経伝達物質である。GABA は精巣を始めとする雄性生殖器など様々な非神経組織にも存在することが知られている。GABA はグルタミン酸からグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)によって合成されるが、GAD には GAD65 と GAD67 の 2 つのアイソフォームがある。脳では GAD67 が 90%以上の GABA 合成に関与し、細胞質全体に分布している。他方、GAD65 はシナプス小胞の近くに局在している。従って脳内 GABA ニューロンの分布などをみるために GAD67 の遺伝子に緑色蛍光タンパク(GFP)を導入した GAD67-GFP ノックインマウスが作製された。我々は雄性 GAD67-GFP マウスの生殖器を精査し、精巣上体の上皮細胞の一部に GFP シグナルを見つけた。今回、精巣上体の上皮細胞で GAD67 発現と GABA 受容体の発現を中心として検討した。</p> <p>《研究方法》</p> <p>1) 実験動物および蛍光観察</p> <p>GAD67 遺伝子のエクソン1に GFP 遺伝子を導入することにより作製した雄性 GAD67-GFP マウス(4週～7月齢)と ICR マウス(8週齢)を用いた。GFP 蛍光は麻酔下でリング液に続き 4%ホルマリンで灌流固定後摘出した生殖器の凍結切片を蛍光顕微鏡で観察した。</p> <p>2) RT-PCR</p> <p>GAD65 と GAD67 および GABA_A 受容体と GABA_B 受容体のサブユニットの mRNA 発現分析を RT-PCR 法で行った。</p> <p>3) 免疫組織化学的検討</p> <p>8週齢の GAD67-GFP マウスと ICR マウスを用い、麻酔下でリング液で灌流後 4%パラホルムアルデヒド(GABA に対しては+0.1%グルタルアルデヒド)で固定した後、連続切片を作製、GAD65、GAD67、GABA、GABA_A 受容体サブユニット、GABA_B 受容体のサブユニットに対する免疫組織化学的染色を行った。二次抗体としては Alexa488 あるいは Alexa546 標識抗体を用いた。</p>	

《研究結果》

雄性生殖器官における GAD67-GFP の分布を検討したところ、精巣上体の initial segment と proximal caput の上皮に限局してシグナルが観察され、精巣や前立腺、精管、精嚢などにはシグナルは観察されなかった。精巣上体の GFP 陽性細胞は上皮に存在し、ワイングラス型をしていた。核は他の細胞に比してより管腔側に位置しており、細胞先端は管腔に面していた。この細胞はトルイジン青で濃染された。これらのことから、この細胞は narrow cell と確認できた。GFP 陽性細胞は GAD67 陽性細胞は GAD67 および GABA 免疫陽性を示した。また野生型 ICR マウスの精巣上体においても GAD67-GFP マウスと同様の形態を示す GABA 陽性細胞が確認できた。RT-PCR では 2 種の GAD のうち GAD67 が主である事が確認できた。また GABA_A 受容体サブユニットでは $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\gamma 1$ および $\gamma 3$ の mRNA が確認できた。GABA_B 受容体サブユニットでは R1b と R2 の mRNA が確認できた。mRNA の発現が確認できた GABA 受容体サブユニットの免疫染色では GABA_A 受容体は精巣上体上皮では検出されず、精巣上体管腔内の精子に $\alpha 1$, $\beta 1$, γ サブユニットが検出された。GABA_B 受容体に関しては R1 サブユニットが narrow cell の細胞全体に検出できた。野生型 ICR マウスでも同様であった。R2 サブユニットは narrow cell の核周囲と管腔側にリング状に免疫陽性が観察された。管腔内の精子も R1, R2 サブユニット免疫陽性を示した。

《考 察》

精巣上体の上皮には 5 種類の細胞(principal cell, narrow cell, clear cell, halo cell)が存在する。clear cell は精巣上体尾部に存在し、halo cell はリンパ球あるいはマクロファージである。上皮の大部分を占めるのは principal cell であり、その間に narrow cell が散在する。

narrow cell はミトコンドリアを多く含み、コハク酸脱水素酵素活性が強いことから GABA 合成との関連が示唆される。この細胞の機能に関しては未だ不明な点が多い。本研究では narrow cell が GAD67 によって GABA を合成している可能性が示された。GABA は主として 2 種類の受容体、C1 イオンチャンネル型の GABA_A 受容体と G タンパク共役型の GABA_B 受容体を介してその機能を発揮する。しかし、GABA_A 受容体サブユニットは免疫組織化学的に精巣上体上皮には検出されず、管腔内の精子に $\alpha 2$, $\beta 1$, γ サブユニット免疫陽性細胞が観察された。GABA_A 受容体は α , β , γ サブユニットを各 1 つ含むことで機能的受容体を構成することおよび精子は精巣上体を通過する間に成熟するといわれていることから、narrow cell で合成された GABA が精子に働きかけて何らかの作用を及ぼす可能性が考えられる。さらに GABA_B 受容体は R1 と R2 の 2 つのサブユニットがヘテロダイマーを形成して機能的な受容体となるが、両サブユニットが精子と narrow cell に確認できた。narrow cell に関しては GABA がオートクライン的に作用している可能性が考えられる。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	安倍弘和
論文審査担当者		主 査 教授 勝 岡 洋 治 副 査 教授 大 槻 勝 紀 副 査 教授 森 浩 志 副 査 教授 芝 山 雄 老 副 査 教授 林 秀 行	
主論文題名 Epithelial Localization of Green Fluorescent Protein-Positive Cells in Epididymis of the GAD67-GFP Knock-In Mouse (GAD67-GFP ノックインマウスの精巣上皮における GFP 陽性細胞の局在について)			
論文審査結果の要旨			
<p>γアミノ酪酸(GABA)は成熟哺乳動物の中樞神経系における主要な抑制性神経伝達物質である。GABAは精巣を始めとする雄性生殖器等様々な非神経組織にも存在することが知られている。しかし組織内局在やその働きについてはほとんど知られていない。生殖器においても同様である。申請者は雄性 GAD67-GFP マウスの生殖器を精査し、精巣上皮の上皮細胞の一部に GFP シグナルを見つけた。今回、精巣上皮の上皮細胞で GAD67 発現と GABA 受容体の発現を中心として検討し、以下の結果を得ている。</p> <p>1) 精巣上皮の initial segment と proximal caput の上皮に限局して GFP シグナルが観察され、精巣や前立腺、精管、精嚢などにはシグナルは観察されなかった。精巣上皮の GFP 陽性細胞は上皮に存在し、ワイングラス型をしており、この細胞は narrow cell と確認できた。</p> <p>2) GFP 陽性細胞は GAD67 および GABA 免疫陽性を示した。また野生型 ICR マウスの精巣上皮においても GAD67-GFP マウスと同様の形態を示す GABA 陽性細胞が確認できた。</p> <p>3) RT-PCR では 2 種の GAD のうち GAD67 が主であることが確認できた。また GABA_A 受容体サブユニットでは $\alpha 1$、$\alpha 2$、$\alpha 5$、$\beta 1$、$\gamma 1$ および $\gamma 3$ の mRNA が確認できた。GABA_B 受容体サブユニットでは R1b と R2 の mRNA が確認できた。</p> <p>4) mRNA の発現が確認できた GABA 受容体サブユニットの免疫染色では GABA_A 受容体は精巣上皮上皮では検出されず、精巣上体管腔内の精子に $\alpha 2$、$\beta 1$、γ サブユニットが検出された。GABA_B 受容体に関しては R1 サブユニットが narrow cell の細胞全体に検出できた。野生型 ICR マウスでも同様であった。</p> <p>5) R2 サブユニットは narrow cell の核周囲と管腔側に免疫陽性が観察された。管腔内の精子も R1、R2 サブユニット免疫陽性を示した。</p> <p>以上のことから、精巣上皮に GABA システムの関与する可能性が考えられる。精子は精巣上皮を通過する間に成熟すると言われ、不妊症の治療手段として今後の臨床応用に期待が持たれる。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 9 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p>			

(主論文公表誌)

Journal of Andrology 26(5): 568-577, 2005