

氏 名 (本国籍)	斯 琴 (中華人民共和国)
主 指 導 教 員 名	静岡大学 教授 高 坂 哲 也
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第543号
学 位 授 与 年 月 日	平成22年3月15日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第3条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学 位 論 文 題 目	雄ヤギにおけるリラキシン関連因子の発現と構造・ 機能特性に関する研究
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教授 土 井 守 副査 静岡大学 教授 高 坂 哲 也 副査 静岡大学 准教授 与 語 圭一郎 副査 信州大学 教授 濱 野 光 市 副査 岐阜大学 准教授 岩 澤 淳

論 文 の 内 容 の 要 旨

精巣の機能は多くの分子の複雑な相互作用によって制御されており、それらの制御が繁殖能力の最適な維持に不可欠である。これらの分子の中で、リラキシン関連因子 (RLF) はブタ精巣で最初に発見されたインスリン-リラキシンファミリー遺伝子の一つで、種々の動物の性腺でその発現が見出されてきた。げっ歯類では精巣下降に必須であるが、成体での役割はよくわかっていない。また、RLFはB-C-A鎖ドメインからなる前駆体として生合成されることがcDNA配列より示唆されてきたが、タンパク質レベルでの構造は不明である。本研究はヤギを用い、RLFの発現と構造・機能特性の解明を行った。

第一章では、RLFの生理機能を探るため、ヤギ精巣でのRLFの局在と性成熟に伴う発現パターンを調べた。RLFのA鎖ペプチド抗体を作製し、免疫組織化学とWestern blotを行った結果、RLFはライディッヒ細胞で約12 kDaのタンパク質として翻訳されていた。RLF陽性を示すライディッヒ細胞の面積率は生後3ヵ月齢までに一旦低下した後、春期発動期にあたる4ヵ月齢で再び増加し、成熟と変らないレベルに達した。これはWestern blotの結果と一致した。従って、ヤギではライディッヒ細胞がRLFタンパク質の唯一の産生源で、その発現は性成熟に伴い増加することから、RLFの精巣機能への関与が示唆された。

第二章では、成熟ヤギ精巣よりRLFを単離・精製し、構造解析を行うと共にその特性について調べた。RLFはゲルロカ、陽イオン交換FPLC、逆相HPLCを経て単離した。その結果、ヤギRLFはSDS-PAGEにおいて分子量12 kDaの単一蛋白として単離できた。次いで、精製物をLC-Maldi Tof/Tof MSで解析したところ、A-B-C鎖ヘテロトリメトリック構造のプロRLF配列が72%のプロテインカバレッジで同定され、その質量は12,224であった。

さらに、免疫電子顕微鏡により、RLF はライディッヒ細胞のゴルジ装置で認められた。従って、ヤギ精巣 RLF はライディッヒ細胞のゴルジ装置で A-B-C 鎖ヘテロトリメトリック構造のプロ RLF として貯留されていることが示唆された。

第三章では、RLF の受容体 LGR8 の cDNA 配列を同定し、RLF リガンド-受容体存在の可能性を調べた。RT-PCR により、ヒト LGR8 に相当するヤギの部分 cDNA 配列が同定された。本配列は 167 個のアミノ酸残基からなり、ヒト LGR8 の第 2~5 膜貫通領域とそれに続く第 3 細胞内ループの一部と一致していた。LGR8 と RLF の遺伝子発現は未成熟精巣に比べ成熟精巣で劇的に増加していた。RLF タンパク質はライディッヒ細胞に限局していたが、LGR8 タンパク質はライディッヒ細胞と精細管内の上皮細胞で検出された。従って、ヤギ精巣では RLF-LGR8 リガンド-受容体システム存在の可能性が見出され、RLF は自己分泌または傍分泌機構でライディッヒ細胞や精細管内上皮細胞に作用している可能性が示唆された。

以上、本研究は雄ヤギにおいて RLF が前駆体構造として精巣ライディッヒ細胞のゴルジ装置に貯留され、おそらく構成性分泌により細胞外へ放出され、オートクリンまたはパラクリン様式でライディッヒ細胞や精細管内上皮細胞に存在する本受容体 LGR8 に作用し、性成熟に関連した精巣機能に関与する可能性を示唆した。

審 査 結 果 の 要 旨

精巣の機能は多くの分子の複雑な相互作用によって制御されており、それらの制御が繁殖能力の最適な維持に不可欠である。これらの分子の一つとして、リラキシン関連因子 (RLF) はブタ精巣で発見され、種々の動物の性腺でその発現が見出されてきた。しかし、その役割はよくわかっていない。また、構造面についても cDNA 配列より推察はされているものの、一次構造は明らかでない。このような背景下で、本論文はヤギを用い、RLF の発現と構造・機能特性の解明に着手したものである。

まず、雄ヤギにおける RLF の生理機能を探るために、本ペプチド抗体を作製し、精巣での RLF の局在と性成熟に伴う発現パターンを調べた結果、精巣ライディッヒ細胞が RLF タンパク質の唯一の産生源で、その発現は性成熟に伴い増加することを見出した。次に、精巣より RLF を単離・精製し、構造解析を行うと共にその細胞内局在について調べたところ、RLF が精巣ライディッヒ細胞のゴルジ装置内で A-B-C 鎖ヘテロトリメトリック構造のプロ RLF として貯留されていることを明らかにした。さらに、精巣における RLF の受容体 LGR8 の部分 cDNA 配列とその遺伝子発現ならびに発現細胞の同定を検討した結果、ヒト LGR8 に相当するヤギの部分 cDNA 配列が同定され、その遺伝子発現は成熟精巣で劇的に増加し、本受容体がライディッヒ細胞と精細管内の上皮細胞に局在していることを見出した。これらの結果より、本論文では、RLF が前駆体構造として精巣ライディッヒ細胞のゴルジ装置に貯留され、おそらく構成分泌により細胞外へ放出され、オートクリンまたはパラクリン様式でライディッヒ細胞や精細管内上皮細胞に存在する本受容体 LGR8 に作用し、性成熟に関連した精巣機能に関与する可能性を示唆した。

このように本論文は、未だよくわかっていない RLF の構造と機能に着目し、ヤギ精巣における RLF の発現並びにその構造と機能特性について明らかにしたもので、得

られた知見は学術的に高い価値があると共に、家畜における造精機能の制御に関する新たな研究路線を切り開く先駆的な研究であると評価できる。このことから、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文は以下の通りである。

1. 斯琴・小谷麻衣・青島拓也・中井真理・瀧上麻衣・小田中由貴・菅原靖志・与語圭一郎・名倉義夫・濱野光市・藤田 優・佐々田比呂志・高坂哲也. ヤギ精巣におけるリラキシン関連因子の局在と性成熟に伴う発現パターン 日本畜産学会報 81 巻 1 号, 印刷中, 2010
2. Sigin, Nakai M, Hagi T, Kato S, Pitia AM, Kotani M, Odanaka Y, Sugawara Y, Hamano K, Yogo K, Nagura Y, Fujita M, Sasada H, Sato E, and Kohsaka T. Partial cDNA sequence of a relaxin-like factor (RLF) receptor, LGR8 and possible existence of the RLF ligand-receptor system in goat testes. *Animal Science Journal*, in press.