慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Endogenous expression of Miillerian inhibiting substance in early postnatal rat Sertoli cells requires multiple steroidogenic factor-1 and GATA-4-binding sites.
Sub Title	出生後のラットセルトリ細胞におけるミューラー管退縮物質の内因性発現における複数のSteroidogenic factor-1結合部位とGATA-4結合部位の必要性について
Author	渡邊, 宏治
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.1 (2005. 3) ,p.14-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050302-0014

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Endogenous expression of Müllerian inhibiting substance in early postnatal rat Sertoli cells requires multiple steroidogenic factor-1 and GATA-4-binding sites.

（出生後のラットセルトリ細胞におけるミューラー管退縮物質の内因性発現における複数の Steroidogenic factor-1結合部位とGATA-4結合部位の必要性について）

渡 邊　宏 治

内容の要旨

ミューラー管退縮物質（Müllerian inhibiting substance；MISあるいはantiMüllerian hormone；AMH）は、男児胎生中の精巣において分泌され、女性内生殖器の原基であるミューラー管を退行させることによって正常な男性内生殖器の形成に導く重要な役割を果たしている。正常な性分化過程においてMISの発現は厳密に制御されており、特異的な時間的、空間的発現パターンを示すことがヒト、マウス、ラットなどで詳しく報告されている。最近の研究で性分化に関わる遺伝子産物SF-1およびGATA4蛋白などがMISのトランス発現制御因子として広く認知されるようになったが、その複雑な発現制御がどのようにおこなわれているかはまだ十分に解明されていない。

われわれはこの問題解決のためにMISのシスエレメントの検討が必要と考え、ヒトMISプロモーターの上流-269塩基対を使用して、更に種を超えてよく保存された塩基配列部位がSF-1およびGATA4蛋白のDNA結合配列に一致していることに注目し、これらの結合部位がMISの転写活性にどのように関わっているかを研究した。より生理的な条件下でのMISプロモーター活性を検討するため、培養初期の短期間のみ内因性にMISを発現する生後２日目のラット精巣由来のセルトリ細胞初代培養を用い、セルトリ細胞への遺伝子の導入効率の高いアデノウィルスベクターに種々のMISプロモーターとレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を組み込み、トランジェントアッセイを行った。さらにプロモーター上のDNA－蛋白結合能はDNAse１フットプリント法とゲルシフト法で検討した。

この結果、従来報告されていたSF-1結合部位（proSF-1）とGATA4結合部位（proGATA4）の上流に第二のSF-1結合部位（disSF-1）とGATA結合部位（disGATA）をヒトMISプロモーター上で新たに同定し、これら複数のSF-1結合部位とGATA結合部位の存在がMISの転写活性上昇に必要であることを示した。

論文審査の要旨

性分化過程に重要なミューラー管退縮物質（MISまたはAMH）の発現パターンは、哺乳類において時間的、空間的に厳密な制御がなされているが、その発現制御機構はいまだ十分には解明されていない。本研究ではヒトMISプロモーターの上流-269塩基対の塩基配列部位がMISの転写活性にどのように関わっているか、特にこの範囲内に複数存在する精巣形成に必要なSF-1およびGATA4蛋白のDNA結合配列がどのような役割を果たしているかに注目して検討がおこなわれた。この結果、従来報告されていたSF-1結合部位（proSF-1）とGATA4結合部位（proGATA4）の上流に第２のSF-1結合部位（disSF-1）とGATA結合部位（disGATA）を新たに同定し、複数のSF-1結合部位とGATA結合部位の存在がMISの転写活性上昇に必要であることが示された。

審査ではまず２か所の結合部位の転写活性の調節機序について、特に立体構造学的な検討はあったのかという質問がなされた。これに対し本研究では立体構造学的な検討はなされていないが、SF1とGATA4の蛋白が結合してMISの転写活性を上昇させるという他施設からの報告があること、更にこの上流と下流の結合部位の中間にDNAの屈曲作用があるSOX9の結合部位があり、立体的構造の変化による転写効率の上昇が生じている可能性があるとの説明が行われた。次に初代培養でのSOX9のmRNAの発現の確認と共発現実験についての質問がされた。これに対しSOX9は生後２日目のセルトリ細胞初代培養からははっきりとした発現が確認できなかったこと、共発現の実験は興味があったが今回の検討では行っていないことが説明された。また成人男性でのMISの発現の低下の機序についての説明が可能かどうかとの質問については、テストステロンの上昇にともなうMISの発現低下が一般にいわれているが今回検討した範囲にはテストステロンが作用する結合部位は存在せず別の制御機構が関与するものと推察されるとの回答がなされた。次に初代培養にMISの発現が高い出生前の精巣を使用することは考えなかったかという点と初代培養への生殖細胞の混入による影響について質問がなされた。これに対し実験に十分な量の胎児の精巣を摘出、確保することが困難であったとの説明がなされ了承された。また生殖細胞の混入の可能性は否定できないことの回答に対し、セルトリ細胞を直接染色するようなマーカーにて純度の検討がなされるべきだったとの指摘がおこなわれた。

以上のように、本研究は今後検討すべき課題を残すもののMISの内因性発現のある細胞を用いてプロモーターアッセイを行った点など実験のデザインがよくされており、その結果として複数のSF1およびGATA4の結合部位がMISの転写活性に重要であることを示した点で有意義であると評価された。

論文審査担当者　主査　外科学　北島　政樹
　産婦人科学　吉村　泰典　　解剖学　相磯　貞和
　小児科学　高橋　孝雄
学力確認担当者：北島　政樹、吉村　泰典
　審査委員長：吉村　泰典

試問日：平成16年10月15日