

氏 名	坂 上 倫 久
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 6 1 9 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 2 年 3 月 2 5 日
学 位 論 文 題 目	Factor H in porcine seminal plasma protects sperm against complement attack in genital tracts (ブタ精漿中のH因子は生殖器における補体攻撃から精子を保護する)
審 査 委 員	主 査 教 授 岡 田 裕 作 副 査 教 授 村 上 節 副 査 教 授 松 浦 博

論文内容要旨

※整理番号	624	(ふりがな) 氏名	さかうえ ともひさ 坂上 倫久
学位論文題目	Factor H in porcine seminal plasma protects sperm against complement attack in genital tracts (ブタ精漿中のH因子は生殖器における補体攻撃から精子を保護する)		
<p>【目的】</p> <p>ヒトやマウスの精漿中には補体制御因子が分泌されることは以前より知られている。特に、精漿における補体制御としての活性が、不妊と相関関係があることが近年報告された。</p> <p>今回申請者は、ブタ精漿中に complement regulator protein factor H (FH)が多量に存在する事を明らかにした。FH は血中の C3b に対して親和性を示すことで、補体第二経路における補体活性化の制御に関与すると言われている。一方、これまでヒトやマウスの精漿におけるFHについての報告はない。本研究では、ブタ精漿中よりFHを精製し、その生化学的特性および補体制御活性について解析し、さらには生殖組織および精子膜上におけるFHの局在を明らかにすることで、受精におけるFHの役割について検討した。</p> <p>【方法】</p> <p>(実験1) ブタ精漿中より幾つかのカラムクロマトグラフィーを用いてFHを精製し、その生化学的特性および補体制御活性について、ブタ血清より精製したFHと比較検討した。精製過程におけるFHの定量にはマンシーニ法を用いた。補体活性の測定は、96 ウェル ELISA 用プレートと膜侵襲複合体に対するモノクローナル抗体を用いて行った。</p> <p>(実験2) 精漿由来FHの分泌組織を同定するため、精漿より精製したFHに対するポリクローナル抗体を作成し、ABC法を用いて、免疫組織化学的検討を行った。さらに、組織染色がFH特異的であるかを確認する目的で、生殖組織のホモジネート lysate 中のFHをイムノブロット法を用いて検出した。また同時に、各生殖組織におけるFHの mRNA レベルを RT-PCR 法を用いて検討した。</p> <p>(実験3) 各成熟段階精子および射精後精子膜上におけるFHの局在を明らかにするため、蛍光抗体法を用いて検討を行った。さらに、射精前精子および射精後精子の補体攻撃に対する防御能についても検討した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

(続 紙)

(実験4) ブタ雌雄生殖管内分泌液および精漿中における補体活性について検討した。

【結果】

(実験1) FHはブタ精漿中より精製倍率274倍、収率22.0%で精製され、SDS-PAGE上で単一バンドを示した。精漿由来FHの分子量はSDS-PAGE上で140,000であり、血清由来FHと比べて4,000程度低かった。さらに精漿由来FHのヘパリン結合能は血清由来FHより強く、補体制御活性についても精漿由来FHの方が二倍強かった。これらの違いは、neuraminidaseおよびN-glycanaseを用いた検討によりシアル酸を含む糖鎖の修飾の違いであることが示された。

(実験2) 精漿由来FHに対するポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学的検討を行った結果、FHは精嚢腺における上皮細胞および分泌物において強い染色が認められた。また、イムノブロット法を用いた、精嚢腺の組織ホモジネートlysate中のFHの分子量は、精漿より精製されたFHのものと一致した。さらに、RT-PCR法により精嚢腺において、FHのmRNAを検出した。

(実験3) 蛍光抗体法を用いた実験より、精巢、精巢上体精子膜上にはFHは検出されず、射精後精子膜上に多量のFHが結合していることが明らかとなった。特に、アクロソーム領域に強い局在が認められた。さらに、射精後精子膜上より可溶化後、精製されたFHは精漿由来FHのものと同程度の補体制御活性を示した。また、FHを持つ射精後精子は、FHを持たない精巢上体尾部由来の射精前精子に比べて、3倍程度強く補体攻撃を回避した。

(実験4) 雌性生殖管分泌液は雄性生殖管や精漿に比べ、6-10倍程度の強い補体活性が検出された。

【考察】 本研究によって、ブタ精漿中のFHが雌性生殖管内でおこる補体活性化から精子を特異的に保護する役割を持つことが示された。ヒトやマウスにおいては、CD46やCD55、CD59などの膜型補体制御因子がProstosomeにGPIアンカーされた状態で精漿中に分泌され、これらが精子を特異的に保護するものと報告されている。我々は、ブタ精漿中におけるこれらの補体制御因子について、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた分画法やCD46抗体を用いたイムノブロット法を用いて探索を試みたが、これらの因子は同定されなかった。一方、FHを特異的に除いた精漿では、その補体制御活性が優位に低下し、また、射精後精子膜上のFHも補体制御活性を示したことから、雌性生殖管内で起こる補体攻撃から精子を特異的に保護するためにFHの役割が非常に重要であることが明らかになった。

【結論】 ブタ生殖において、精漿中に分泌されたFHは精子に結合し、生殖管内で起こる強い補体活性から精子を特異的に保護する役割を持つ。

別紙様式8 (課程博士・論文博士共用)

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	624	氏名	さかうえ ともひさ 坂上 倫久
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨)</p> <p>本研究は、ブタ精漿中にFactor H (FH)の存在を見だし、その生化学的特性の解析および補体制御活性の測定を行い、これらを血清由来のものと比較検討したものである。さらに、雄生殖組織および精子膜上におけるFHの局在やその機能の解析、雌雄生殖管内分泌液中の補体活性についても併せて検討することにより、以下の点を明らかにした。</p> <p>(1) FHはブタ精漿中より、SDS-PAGE上で単一標品にまで精製された。</p> <p>(2) 精漿由来FHは血清由来FHのものに比べて2倍程度の強い補体制御活性を示し、この違いは糖鎖構造の中のシアル酸残基の有無によるものであった。</p> <p>(3) FHは精嚢腺で生合成された後、精漿中に分泌される。</p> <p>(4) 射精後精子膜上、特に精子頭部においてFHが局在しており、そのFHは精漿由来FHとほぼ同等の補体制御活性を持つ。</p> <p>(5) FHの結合した射精後精子は、射精前精子に比べて優位に補体攻撃を回避できる。</p> <p>(6) 雄生殖管内分泌液中には補体活性が検出されなかったものの、雌生殖管内では6-10倍の強い補体活性が検出されることから、FHは射精後に起こる補体攻撃から、精子を特異的に保護する役割を持つ。</p> <p>本論文は生殖における補体制御因子Hの役割について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(平成22年1月28日)</p>			