ラット培養セルトリ細胞におけるアデニル酸シクラーゼと サイクリック AMP-ホスホジエステラーゼの 活性の電顕組織化学的観察

神崎 展・新村末雄・石田一夫

新潟大学農学部, 新潟市 950-21

(1991. 3. 27 受付)

Key words : rat, Sertoli cell, cyclic AMP, in vitro, histochemistry

ラットの培養セルトリ細胞は androgen, progestin および estrogen の代謝を行なっていることが多数の研究者によって調べられており^{4-6, 9, 11)}, これらの代謝は FSH によって制御されていることが知られている^{4, 6, 11, 14)}. すなわち, 培養液中に FSH を添加すると, セルトリ細胞のサイクリック AMP (cAMP) 合成が高まって, androgen^{6, 14)} と progestin¹¹⁾ の合成および androgen から estrogen への転換⁴⁾ が活発になるといわれている. 従って, セルトリ細胞のステロイド代謝に及ぼす FSH の影響はアデニル酸シクラーゼ-cAMP 系を介して現れているものと考えられている^{6, 14)}.

一方, ラットの培養セルトリ細胞は cAMP を含有しており^{8, 9)}, ATP から cAMP を合成することが生化学的に^{1, 5)}, また, アデニル酸シクラーゼ活性を持っていることが組織化学的に³⁾ 確かめられている. さらに, ラットの培養セルトリ細胞は, cAMP を 5'-AMP へ代謝できることも生化学的に調べられている^{2, 12)}. しかし, これまでにラットの培養セルトリ細胞における cAMP の合成や代謝, および cAMP の合成酵素であるアデニル酸シクラーゼ活性は, 15 ないし 20 日齢の動物から分離したもので調べられているのみで, 出生から性成熟までの過程を通しては調べられていない.

本実験では, 出生時から 60 日齢までのラットから分離・培養したセルトリ細胞について, アデニル酸シクラーゼと cAMP-ホスホジエステラーゼの活性を電顕組織

化学的に検出して, 培養セルトリ細胞における cAMP の合成と代謝の推移を検討し, セルトリ細胞のステロイド代謝との関連性について考察した.

材料および方法

供試動物として 0, 10, 20, 30 および 60 日齢のウイスター系雄ラットを使用した. 飼育は 24°C に調節した室内で行ない, 点灯は午前 4 時から午後 6 時までの 14 時間とした.

セルトリ細胞は各日齢のラット精巣から STEINBERGER らの方法⁸⁾ に準じて分離し, 10% のウシ胎仔血清 (Gibco Lab., U.S.A.) を含む Eagle's minimum essential medium (日水製薬) で, 37°C で空気 95%, CO₂ 5% の気相下において, ウェル付きスライドグラス (MS103, Bokusui Brown, U.S.A.) を用いて 8 日間培養した.

分離直後および 8 日間培養したセルトリ細胞は, ショ糖を 8% 含む 1% グルタルアルデヒド・0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で, 4°C で 10 分間前固定し, 次いで, ショ糖を 8% 含む 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) および 0.1 M トリス・マレイン酸塩緩衝液 (pH 7.4) で洗浄した. アデニル酸シクラーゼおよび cAMP-ホスホジエステラーゼの活性を検出するために, セルトリ細胞を WAGNER らの方法¹³⁾ および SUGIMURA と MIZUTANI の方法¹⁰⁾ に従ってそれぞれ処置した. なお,

Electron-Histochemical Observations of Adenylate Cyclase and Cyclic AMP-Phosphodiesterase Activity in Cultured Sertoli Cells of the Rat: Makoto KANZAKI, Sueo NIIMURA and Kazuo ISHIDA (Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata-shi 950-21)

Fig. 1. All the pictures are of cultured Sertoli cells separated from testes of 10-day-old rats. $\times 8000$.

a. A strong activity of adenylate cyclase. b. A weak activity of cAMP-phosphodiesterase. c. No activity of adenylate cyclase when incubated in a substrate-free medium.

基質としてアデニル酸シクラーゼ活性検出のためにはアデニルイミドニリン酸テトラリチウム塩 (AMP-PNP, Boehringer Mannheim, Germany), cAMP-ホスホジエステラーゼ活性検出のためには cAMP (Sigma, U.S.A.) をそれぞれ使用した。対照として、基質を含まない液に浸漬したセルトリ細胞を用いた。基質液に浸漬したセルトリ細胞は、ショ糖を8%含む0.1M トリス・マレイン酸塩緩衝液 (pH 7.4) および0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄した後、ショ糖を8%含む1% 四酸化オスmium・カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) に4°Cで30分間浸漬して固定した。これらの処置を施したセルトリ細胞は、アルコール上昇系列で脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片はJUM-7型超ミクロトームを用いて作製し、写真撮影はJEM-100B型電子顕微鏡で行なった。

結 果

アデニル酸シクラーゼ活性検出のためのWAGNERの方法¹³⁾、およびcAMP-ホスホジエステラーゼ活性検出のためのSUGIMURAとMIZUTANIの方法¹⁰⁾に従ってセルトリ細胞を処理すると、セルトリ細胞の細胞膜に高電子密度の鉛顆粒の沈着が観察された (図1a, b)。この顆粒は、基質を含まない液に浸漬した細胞では観察されなかった (図1c)、この顆粒がアデニル酸シクラーゼとcAMP-ホスホジエステラーゼの活性をそれぞれ示していることが確認された。

アデニル酸シクラーゼ活性は、出生直後の動物から分離・培養した細胞において弱く認められ、10日齢では

著しく強くなったが、20日齢では中等度、30日齢と60日齢では弱度であった。一方、cAMP-ホスホジエステラーゼ活性は、出生直後のものでは観察されなかったが、10日齢のもので弱く出現し、30日齢では中等度、60日齢では強度になった。

なお、分離直後のセルトリ細胞において、両種酵素の活性は培養後の細胞のものと相違がなかった。

考 察

15ないし20日齢のラットから分離・培養したセルトリ細胞はATPからcAMPを合成するとともに^{1,5)}、cAMPを5'-AMPへ代謝する能力を持っていることが^{2,12)}生化学的に確かめられている。なお、18ないし60日齢のラットの精巣から分離・培養したセルトリ細胞についてcAMP含量を観察したSTEINBERGERら⁹⁾によると、cAMP含量は18日齢の動物から分離したもので最も多く、その後動物の日齢の増加とともに低下したと述べている。出生時から60日齢までのラットから分離・培養したセルトリ細胞について、アデニル酸シクラーゼとcAMP-ホスホジエステラーゼの活性の検出を電顕組織化学的に試みた本実験の結果から考えると、ラットの培養セルトリ細胞はいずれの日齢の動物から分離したものでcAMPを含有しており、その量は出生直後のものでは少ないが、10日齢のもので最大になり、その後30日齢と60日齢のものでは減少することが示された。このことは、上述のSTEINBERGERらの培養セルトリ細胞におけるcAMP含量についての生化学的な実験結果⁹⁾と一致していた。セルトリ細胞のcAMP合成

については、生化学では FSH を添加した培養系を用いて調べられているが^{1,5,9)}、FSH の代りにフッ化ナトリウムを添加しても、cAMP 合成が高まるという報告⁷⁾もみられる。組織化学では、基質液中に 10 mM のフッ化ナトリウムが賦活剤として添加されているので¹³⁾、培養系に FSH を添加しなくても、本実験におけるような高いアデニル酸シクラーゼ活性が得られたものと思われる。

一方、動物の性成熟過程におけるセルトリ細胞のステロイド代謝の変化については、6 日齢ないし性成熟に達したラットから分離・培養した細胞について調べられており、progesterone¹¹⁾ と androgen¹⁴⁾ の代謝は 6 ないし 17 日齢および 10 ないし 24 日齢のラットから分離・培養したセルトリ細胞でそれぞれ活発であり、10 日齢の動物のもので最も高い代謝活性を示すことが観察されている。なお、本実験において、ラットの培養セルトリ細胞における cAMP 含量は、上述のように、10 日齢のもので最大となることがうかがわれたが、この増加した cAMP がステロイド代謝の活性化に役割を果たしていることが推察される。

文 献

- 1) ATTRAMADAL, H., T. JAHNSEN and V. HANSSON, Regulation of hormone-responsive Sertoli cell adenylate cyclase in a cell-free system. *Mol. Cell. Endocr.*, **34**: 221-228. 1984.
- 2) CONTI, M., R. GEREMIA, S. ADAMO and M. STEFANINI, Regulation of Sertoli cell cyclic adenosine 3':5' monophosphate phosphodiesterase activity by follicle stimulating hormone and dibutyryl cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **98**: 1044-1050. 1981.
- 3) FÁNO, G., V. MARSILI, S. FULLE, L. LONGO and R. PASCOLINI, Adenylate and guanylate cyclase systems in Sertoli cell cultures of immature rats. *Cell Biol. Int. Reports*, **10**: 207. 1986.
- 4) GORE-LANGTON, R., H. MCKERACHER and J.H. DORRINGTON, An alternative method for the study of FSH effects on aromatase activity in Sertoli cell culture. *Endocrinology*, **107**: 464-471. 1980.
- 5) LE GAC, F., H. ATTRAMADAL, T. JAHNSEN and V. HANSSON, Studies on the mechanism of follicle stimulating hormone-induced desensitization of Sertoli cell adenylate cyclase in vitro. *Biol. Reprod.*, **32**: 916-924. 1985.
- 6) ROMMERTS, F.F.G., B. Ch. KRÜGER-SEWNA-RAIN, A. VAN WOERKOM-BLIK, J.A. GRO-OTEGOE and H.J. VAN DER MOLEN, Secretion of proteins by Sertoli cell enriched cultures: effects of follicle stimulating hormone, dibutyryl cAMP and testosterone and correlation with secretion of oestradiol and androgen binding protein. *Mol. Cell. Endocr.*, **10**: 39-55. 1978.
- 7) SICKLE, M.V., J.M. OBERWETTER, L. BIRNBAUMER and A.R. MEANS, Developmental changes in the hormonal regulation of rat testis Sertoli cell adenylate cyclase. *Endocrinology*, **109**: 1270-1280. 1981.
- 8) STEINBERGER, A., J.J. HEINDEL, J.N. LINDSEY, J.S.H. ELIKINGTON, B.M. SANBORN and E. STEINBERGER, Isolation and culture of FSH responsive Sertoli cells. *Endocr. Res. Commun.*, **2**: 261-272. 1975.
- 9) STEINBERGER, A., M. HINTZ and J.J. HEINDEL, Changes in cyclic AMP response to FSH in isolated rat Sertoli cells during sexual maturation. *Biol. Reprod.*, **19**: 566-572. 1978.
- 10) SUGIMURA, K. and A. MIZUTANI, Electron-microscopic cytochemical study of cyclic nucleotide phosphodiesterase in rat brain. *Histochemistry*, **55**: 97-105. 1978.
- 11) TILBE, K.S. and J.P. WIEBE, Sertoli cell capacity to metabolize progesterone: variation with age and the effect of follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, **108**: 597-604. 1981.
- 12) VERHOEVEN, G., J. CAILLEAU and P. DE MOOR, Hormonal control of phosphodiesterase activity in cultured rat Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocr.*, **24**: 41-51. 1981.
- 13) WAGNER, R.C., P. KRIENER, R.J. BARNETT and M.W. BITENSKY, Biochemical characterization and cytochemical localization of a catecholamine-sensitive adenylate cyclase in isolated capillary endothelium. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**: 3175-3179. 1972.
- 14) WELSH, M.J. and J.P. WIEBE, Sertoli cell capacity to metabolize C₁₉ steroids: variation with age and the effect of FSH. *Endocrinology*, **103**: 838-844. 1978.