

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06271

研究課題名(和文) アクロソーム中心に発現する新規糖鎖分解酵素による糖鎖修飾の生物学的意義の解明

研究課題名(英文) Biological significance of glycan degradation by the acrosome specific glycosidase in spermatogenesis

研究代表者

佐藤 隆 (SATO, TAKASHI)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：90371046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：円形精子細胞から伸張精子細胞への分化過程は、精子形成の中でも最も劇的な形態的機能的変化を伴う。我々は、その過程で形成される精子特異的なオルガネラであるアクロソームの中心に存在する糖鎖分解酵素Glb11が精子機能に必須であることを明らかにした。In vitro およびin vivoの解析からGlb11はO結合型糖鎖を分解する酵素活性を有していた。Glb11遺伝子を欠損したマウスの精子は、外見上は正常であったが、卵子細胞の透明帯を通過できないために不妊となった。Glb11による糖鎖リモデリングがアクロソーム内部の酵素群の機能制御に関連している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖は様々な生命現象に関連しているが、リソソーム分解以外で糖鎖分解酵素が生体機能の制御に関わっているという報告は多くなかった。今回、精子形成過程において分解酵素Glb11による糖鎖リモデリングが、精子機能に必須であることが明らかとなった。今後、基質となる糖鎖、糖タンパク質が同定され、分子メカニズムが明らかになれば、糖鎖生物学及び生殖発生学におけるインパクトは大きいと考える。近年、生殖医療の分野では、不妊の原因の半数は精子の機能異常に起因すると言われている。ヒトにおけるGLB1Lの活性低下と受性能を解析することにより、雄性不妊症スクリーニング法及び、治療法の開発につながる可能性も期待できる。

研究成果の概要(英文)：The differentiation of round spermatocytes into elongated spermatocytes is one of the most dramatic morphological and functional changes in spermatogenesis. We found that Glb11, a glycosidase like protein located in the center of the acrosome, a sperm-specific organelle formed in round spermatocytes during this process, is essential for sperm function. Glb11 was found to have galactosidase activity to degrade O-linked glycans by in vitro/vivo experiments. Sperm from mice lacking the Glb11 gene were apparently normal but infertile because they could not pass through the zona pellucida of the oocyte, suggesting that Glb11-mediated glycan remodeling may be related to functional regulation of enzymes in the acrosome.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖分解酵素 精子発生 アクロソーム 糖鎖リモデリング 雄性不妊

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞表面や細胞外へ分泌されるタンパク質のほとんどは糖鎖が付加された糖タンパク質であり、小胞体やゴルジ装置に於いて複雑な糖鎖修飾を受けた成熟型糖タンパク質が生体内外で機能すると考えられている。哺乳類の糖鎖合成に関しては、これまでにおよそ 200 種類の糖転移酵素群が発見されており、これらの協調的あるいは競合的な酵素反応により複雑な糖鎖が合成される。一方、生合成と表裏の関係にある糖鎖の分解に目を向けると、糖鎖分解酵素の機能は、リソソームでの代謝分解がよく知られている。リソソーム以外では、新生糖タンパク質の品質管理機構の小胞体関連分解 (ERAD) や、小胞体で不完全なフォールディングをとった糖タンパク質の細胞質 PNGase などによる分解が知られているが、いずれも *N* 結合型糖鎖の分解であり、*O* 結合型糖鎖に特異的な分解機構は知られていなかった。

(2) 哺乳動物の精子形成過程において、円形精子細胞から伸張精子細胞への分化は最も劇的な細胞形態変化であり、細胞内小器官もゴルジ装置が消失し、代わってアクロソームが出現するなど、空間的、機能的リアレンジメントを受ける。この過程において、糖鎖構造もまた劇的に変化するが、その機能的な役割はわかっていなかった。アクロソームの一般的なマーカーは糖鎖認識タンパク質の一つである PNA レクチンが使用されているが、その糖鎖の役割も未解明であった。

## 2. 研究の目的

我々は、アクロソーム中心に発現する糖鎖分解酵素様タンパク質 G1b11 が *O*-glycan のリモデリングに関与する可能性を見出している。本研究では、G1b11 の遺伝子改変マウスを作製し、精子形成能や受精能などを解析することにより精子発生における G1b11 による糖鎖トリミングの役割を *in vivo* で明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養細胞株を用いた局在解析

G1b11 は円形精子細胞においてはアクロソーム中心に局在するが、アクロソームは精子細胞特異的なオルガネラであり、一般の細胞には存在しない。精子細胞以外の細胞に発現する G1b11 がどこに局在するのかをタグを付加したタンパク質発現系を構築し解析した。

### (2) 培養細胞株を用いた性状解析

遺伝子発現データベースを参照すると、G1b11 は精子細胞以外にもいくつかの組織で発現が確認された。また、培養細胞レベルでも発現している細胞が多く確認された。培養細胞株における機能を解析するためゲノム編集技術により遺伝子破壊を行い、糖鎖構造変化をレクチンマイクロアレイなどを用いて解析した。

### (3) G1b11 遺伝子欠損マウスの作製と機能解析

G1b11 の *in vivo* における機能解析を行うために、遺伝子欠損マウスを作製し、精子の機能解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) G1b11 の発現分布 : G1b11 は精子細胞以外にも、様々な組織・細胞で発現している可能性が考えられた。マウスの各組織の cDNA を用いたリアルタイム PCR を行い、G1b11 の発現分布を調べた。その結果、精巣以外にも腎臓、子宮、精巣上体、脳下垂体などでも発現していることが確認された。ヒトでの遺伝子発現は THE HUMAN PROTEIN ATLAS のデータを参考にしたが、マウス同様、精巣、腎臓の順で発現が見られた。これらの結果は、G1b11 が円形精子細胞のアクロソーム以外でも機能している可能性を示唆するものであった。

(2) G1b11 の細胞内局在解析 : THE HUMAN PROTEIN ATLAS のデータを参照すると、G1b11 は各種培養細胞株においても、広く発現していることが確認された。円形精子細胞においては、G1b11 はアクロソーム中心に局在するが、アクロソームは精子細胞特異的なオルガネラであり一般の細胞には存在しない。そこで G1b11 タンパク質の C 末端に FLAG タグを付与したコンストラクトを構築し、ヒト胎児腎臓由来培養細胞 HEK293 へトランスフェクションし、抗 FLAG 抗体を用いて局在を調べた。抗 FLAG 抗体による細胞染色の結果得られたシグナルは、リソソームマーカーである抗 LAMP2 抗体の染色結果と良くマージした。この結果は、G1b11 が精子以外の細胞では、リソソームに局在し機能している可能性を示唆するものであった。円形精子細胞のアクロソームは、ゴルジ装置から派生したオルガネラであり、先体反応に必要な各種酵素タンパク質を含むとされている。一般的な細胞において、ゴルジ装置からトランスゴルジネットワークを介してリソソームへタンパク質が輸送される経路が知られているが、精子細胞のゴルジ装置からアクロソ

ームへの輸送においても同じ輸送経路、輸送タンパク質が使われているかどうかは大変興味深い。

(3) 細胞内における Glb11 の作用 : Glb11 は *in vitro* の活性測定では、O 結合型糖鎖の core 1 構造のガラクトースを最もよく分解する活性を示した。細胞内においてもこの活性が機能しているかどうかを調べるために、培養細胞株 HEK293 において Glb11 遺伝子をノックアウトした。ノックアウトは CRISPR/Cas9 のゲノム編集技術を用いた。ソーティングした細胞の Glb11 遺伝子配列を PCR で増幅し、N 末端側にフレームシフトを伴う塩基のデリレーションがあることを配列を読んで確認した。Glb11 遺伝子破壊株は、形態上は変化がなく、増殖速度も野生株と変わらないレベルであった。

Glb11 遺伝子破壊株の糖鎖構造変化を調べるために、モデルタンパク質として Colony stimulation factor 1 receptor (CSF1R) の細胞外領域に FLAG タグを付加して発現させた。このコンストラクトでは、CSF1R の細胞外領域は自らのシグナル配列により小胞体、ゴルジ装置を経て細胞外に分泌される。また、これまでの解析から、CSF1R の細胞外領域には N 結合型糖鎖と O 結合型糖鎖が複数箇所結合していることがわかっている。野生型 HEK293 細胞と Glb11 欠損 HEK293 細胞の培養上清から CSF1R タンパク質を抗 FLAG 抗体を用いてそれぞれ精製し、レクチンマイクロアレイ解析を行った。その結果、RCA120、DSA、NPA などの主に N 結合型糖鎖を認識するレクチンのシグナルに違いはなかったが、PNA、ACA など O 結合型糖鎖のコア 1 構造を認識するレクチンのシグナルは、野生型 HEK293 細胞では低値だったのに対し、Glb11 欠損 HEK293 細胞では高値であった。この結果は、Glb11 欠損 HEK293 細胞では、Glb11 酵素によるコア 1 酵素の分解が起こらなかった結果だと考えられた。しかしながら、今回の CSF1R 発現系ではリソソームへの標的化は行っていない。HEK293 細胞での Glb11 の局在はリソソームであるので、CSF1R 発現分泌過程のどこで Glb11 の分解を受けるのかは今後の解析が必要である。

(4) Glb11 欠損マウスの作製 : Glb11 の機能を解明するため、Glb11 遺伝子欠損マウスを作製した。マウス Glb11 遺伝子のコーディング領域は 16 個のエクソンから構成されており、開始コドンと終始コドンを含むエクソンの外側のイントロン部分に CRISPR/Cas9 システムのガイド RNA をそれぞれデザインし、コーディング領域を全てゲノム編集で欠失させる方法で遺伝子欠損マウスを作製した。雌雄ヘテロマウスの交配によりホモマウスは正常に発生したことから、Glb11 遺伝子は個体発生には関与しないことがわかった。8 週齢の Glb11 欠損ホモマウスの精巣を用いて抗 Glb11 抗体で免疫組織染色を行なった結果、アクロソーム中心の Glb11 の染色像は完全に消失していた。Glb11 は糖鎖分解酵素であることから、アクロソーム中心で糖鎖分解が行われているかを検証するため、コア 1 型糖鎖を認識する ACA レクチン及び、GalNAc 糖鎖 (Tn 構造) を認識する HPA レクチンを用いて野生型マウス及び Glb11 欠損ホモマウスの精巣のレクチン染色を行った。その結果、Glb11 欠損では、ACA で染色される精子細胞の数が増えており、一方、HPA レクチンの染色シグナルは減弱していた。Glb11 がコア 1 糖鎖分解酵素であることを考えると、Glb11 遺伝子の欠損により ACA レクチンで染色されるコア 1 構造が残留し、HPA レクチンで染色される分解生成物である GalNAc 糖鎖が減少していると考えられ、アクロソーム中心において Glb11 による糖鎖リモデリングが行われていることが明らかとなった。

(5) Glb11 欠損マウスの表現型解析 : Glb11 は円形精子細胞で発現することから、精子機能への影響を調べた。Glb11 欠損マウスの精巣上体より成熟精子を採取し、体外受精を行なった結果、Glb11 欠損精子の受精能は著しく低下し、ほとんど受精卵が得られないことが明らかとなった。

(6) Glb11 欠損マウスの精子解析 : Glb11 欠損精子の機能をより詳細に解析するために、筑波大学と大阪大学と共同研究を行った。Glb11 欠損による円形精子細胞や伸張精子細胞の数や分布には大きな違いは見られなかった。また、円形精子細胞を TEM 観察したところ、Glb11 欠損精子においてもアクロソーム中心が形成されており、野生型との差異は見いだすことができなかった。加えて、成熟精子を SEM 解析した場合も細胞表面に大きな違いは観察されず、運動能も野生型マウスのもと同じであった。Glb11 欠損精子は形態的、機能的にほぼ野生型精子と変わらなかったが、透明帯の通過能が著しく低下していることがわかった。これはアクロソームに内包されるタンパク質群の何らかの機能不全が原因となっていることが予想された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fuseya S, Suzuki R, Okada R, Hagiwara K, Sato T, Narimatsu H, Yokoi H, Kasahara M, Usui T, Morito N, Yamagata K, Kudo T, Takahashi S.	4. 巻 523
2. 論文標題 Mice lacking core 1-derived O-glycan in podocytes develop transient proteinuria, resulting in focal segmental glomerulosclerosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1007-1013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.01.033	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------