

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09503

研究課題名（和文）糖鎖伸長抑制因子「バイセクト型糖鎖」の雄性生殖細胞分化制御能の解析

研究課題名（英文）Study of mechanisms for regulating spermatogenesis by bisecting GlcNAc

研究代表者

吉武 洋 (Yoshitake, Hiroshi)

順天堂大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：00396574

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：以前我々が作製した抗マウス精子単クローン抗体Ts4は、バイセクト型N-アセチルグルコサミン構造を持つフコシル化2本鎖複合型糖鎖が付加されている複数の糖タンパク質に結合する。本研究ではTs4認識分子の1つである核膜孔複合体を構成するタンパク質であるnuclear pore glycoprotein p62 (NUP62)を介して、本糖鎖の雄性生殖細胞形成過程での分子生物学的機能解明を試みた。その解析ツールとしてはじめにマウス及びヒトに共通する抗原ペプチドを作製し、これをウサギに免役して複数の多クローン抗体を樹立した。今後本抗体を用いて解析を進める予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在本邦では急速な少子化が深刻な問題となっている。一般に少子化は非婚化・晩婚化など社会科学的問題として認識されることが多いが、不妊症・不育症の増加など医学的な原因も無視できない。抗精子抗体が不妊症患者血清中に検出されることがあり、不妊の原因の一つである可能性が提唱されているが、その対応抗原や生物学的機能の詳細については依然不明である。我々が樹立した自己抗体由来の抗マウス精子抗体Ts4が認識する糖鎖とその修飾タンパク質の生物学的機能が明らかとなれば、本分子群を介した受精に関与する一連の分子機構の解明が進み、その結果、これまで原因不明であった不妊症治療のための分子基板を構築できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We generated an anti-mouse sperm auto-monoclonal antibody, Ts4, which immunoreacts to several kinds of glycoproteins possessing N-linked fucosylated agalacto-biantennary with bisecting N-acetylglucosamine (GlcNAc) in male germ cells. We recently identified nuclear pore glycoprotein p62 (NUP62), a component of nuclear pore complexes with roles in nucleocytoplasmic transport as a Ts4-recognized glycoprotein during testicular development. To study mechanisms for regulating spermatogenesis by bisecting GlcNAc, we focused NUP62. We first established rabbit anti-mouse and human NUP62 polyclonal antibodies as molecular probes. Currently we are investigating the reactivity of antibodies using Western blotting and immunohistochemical analyses.

研究分野：生殖生物学

キーワード：バイセクト型糖鎖 NUP62 抗精子抗体

### 1. 研究開始当初の背景

原因不明の不妊症患者血清中では抗精子抗体が検出されることがあり、病態との関連が示唆されている。実際に *in vitro* の検討では、一部の抗精子抗体が多彩な免疫学的機能を呈することが知られており、このことはその標的分子に多様性があり、さらにその分子群が生殖過程で重要な役割を果たしていることを暗示している。そこで我々は抗精子抗体新規標的抗原の探索を目的に、特に人為的操作を加えずに2年以上飼育した老齢雄マウスの脾細胞を用いて、マウス成熟精子頭部に反応する自己抗体由来の単クローン抗体 Ts4 を樹立し<sup>1)</sup>、さらに本抗体がバイセクト型 *N*-アセチルグルコサミン(bisecting GlcNAc)構造を有するフコシル化2本鎖複合型糖鎖(図1)への結合を介して複数の糖タンパク質を認識することを明らかにした<sup>2)</sup>。

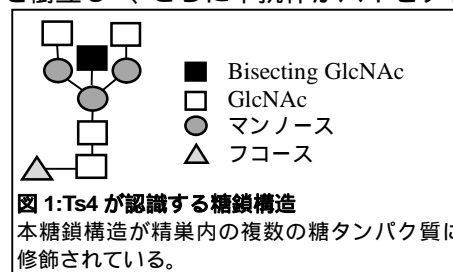


図1:Ts4が認識する糖鎖構造  
本糖鎖構造が精巣内の複数の糖タンパク質に修飾されている。

Bisecting GlcNAc はユニークな分枝型糖鎖構造を形成する糖残基で、GlcNAc 転移酵素 III (GnT-III)によって付加される。一旦本糖残基が付加されると、それ以降の糖鎖の伸長や修飾が停止するため、GnT-III と bisecting GlcNAc は糖鎖構造の複雑化を抑制することにより、付加糖タンパク質の機能調節に寄与していると考えられている。これまでの細胞生物学的検討では、*GnT-III* 遺伝子を癌細胞株に導入すると、インテグリンやカドヘリン、上皮成長因子受容体に bisecting GlcNAc が修飾され、細胞接着の亢進、癌転移の抑制、細胞増殖・分化の抑制が誘導されることが判明している。さらに生体内では、卵巣癌や肝癌などの一部の悪性腫瘍や、アルツハイマー病患者の脳において *GnT-III* の発現量が増加していることが報告されており、*GnT-III*/バイセクト型糖鎖と疾患との関係が注目されている。その一方、正常組織での *GnT-III*/バイセクト型糖鎖の生物学的機能については未だ不明である。

これまで我々は、成熟精子では Ts4 は少なくとも6種類の糖タンパク質に反応することを明らかにしているが<sup>3)</sup>、その1つがヘパラン硫酸分解酵素である  $\alpha$ -*N*-acetylglucosaminidase であり、さらに本抗体が生体外での精子・透明帯結合阻害作用と精子先体反応阻害能を有する機能性抗体であることを既に報告している<sup>4)</sup>。

また Ts4 抗体はマウス成熟精子頭部以外に、成熟精巣内の精母細胞・精子細胞・精巣精子及び初期胚に発現する複数の糖タンパク質に反応するが、その認識分子の1つが生殖細胞マーカー GPI アンカー型糖タンパク質 TEX101 であることが明らかとなっている<sup>1,3)</sup>。遺伝子欠損マウスを用いた検討では、本分子は成熟精子が子宮から卵管へ正常に移行するための機能維持に必須であり、細胞生物学的には精子膜タンパク質 ADAM3 の分子シャペロンとしての機能が推測されている<sup>5)</sup>。

これらに加え、我々は、核膜孔複合体を構成するタンパク質である nuclear pore glycoprotein p62 (NUP62)を、精巣における Ts4 認識分子の1つとして新たに同定した<sup>6)</sup>。

### 2. 研究の目的

我々の最終目的は「生殖過程で発現する bisecting GlcNAc 分枝型糖鎖の生理活性」を明らかにすることであるが、本研究では特に NUP62 を介した雄性生殖細胞形成過程におけるバイセクト型糖鎖の分子生物学的機能解明を目指した。

### 3. 研究の方法

マウス及びヒトに共通する抗原ペプチドを作製し、これをウサギに免疫することにより複数の多クローン抗体を作製した。本抗体の反応性をウェスタンブロット解析で確認した。

### 4. 研究成果

#### (1) 抗マウス及びヒト NUP62 多クローン抗体の作製

全自動ペプチド抗原デザインシステム「MODELAGON™」を用いて最適な抗原ペプチド配列を決定した(表1、図2)。

| ランク | 位置      | ペプチド長 | 配列(N C)       | 分子量     | a/h    | c/d   |
|-----|---------|-------|---------------|---------|--------|-------|
| 1   | 423-435 | 13    | LQHADEEREKTYK | 1646.77 | -1.921 | 0.714 |
| 2   | 376-388 | 13    | HREVEKVKLDQKR | 1664.9  | -1.657 | 0.786 |
| 3   | 441-453 | 13    | DAQLKRMAQDLKD | 1513.72 | -1.014 | 0.571 |
| 4   | 396-408 | 13    | ILSQQKELEDLLS | 1515.71 | -0.057 | 0.429 |

表1: 抗原ペプチド予測結果

a/h 平均疎水性度、c/d 電荷密度

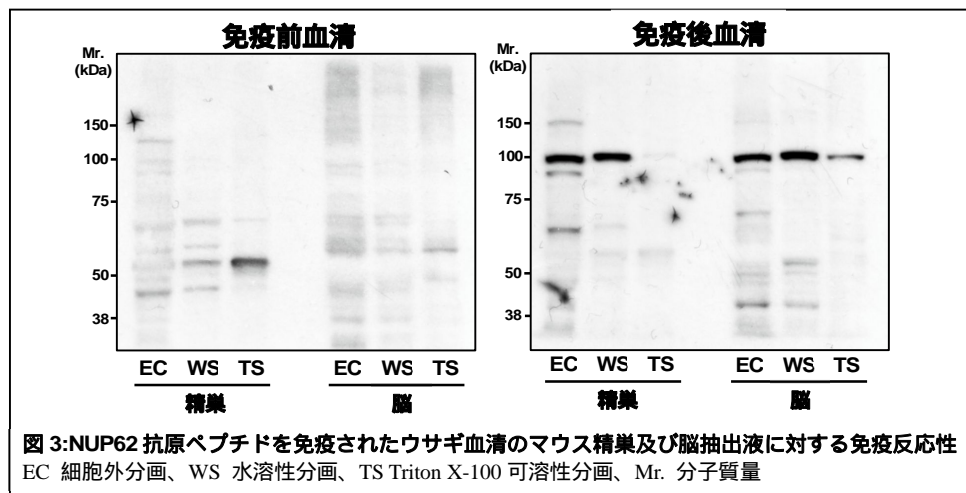
ランク 1 及び 2 のペプチドをそれぞれ 2 匹のウサギに免疫した後、血清を採取した。



(2) ウェスタンブロット解析を用いた新規抗 NUP62 抗体の反応性

以前我々が報告した方法と同様に、性成熟したマウス精巣を細胞外(EC)、水溶性(Ws)、Triton X-100 可溶性分画(TS)に分け<sup>1)</sup>、それぞれの抽出液に対して免疫前後の血清を反応させた。また NUP62 は脳に高発現しているため、同じ個体の脳を同様に分画し、比較対象とした。

精巣の EC 及び WS 分画、脳の全分画で、免疫前血清では認められなかったバンドが、ランク 1 のペプチドを免疫されたマウス血清で約 100 kDa の位置に確認された(図 3)。ランク 2 のペプチドを免疫した血清では明らかなバンドは精巣、脳とも検出されなかった(データ未掲載)。



(3) 得られた成果と今後の展望

本研究で作製した抗 NUP62 抗体の反応性をウェスタンブロット解析で確認したが、想定される位置にバンドが検出されなかった。この結果より、NUP62 はパイセクト型糖鎖だけでなく、その他の糖鎖修飾を受けている可能性がある。今後糖切断酵素等を用いて、本抗体の反応性の変化を検討する予定である。

#### < 引用文献 >

- 1) Yoshitake H. Shirai Y. Mochizuki Y. Iwanari H. Tsubamoto H. Koyama K. Takamori K. Ogawa H. Hasegawa A. Kodama T. Hamakubo T. Araki Y. Molecular diversity of TEX101, a germ cell-specific glycoprotein monitored with monoclonal antibodies: Variety of the molecular characteristics according to subcellular localization within the mouse testis. *J Reprod Immunol* 2008;79:1-11.
- 2) Yoshitake H. Hashii N. Kawasaki N. Endo S. Takamori K. Hasegawa A. Fujiwara H. Araki Y. Chemical characterization of N-linked oligosaccharide as the antigen epitope recognized by an anti-sperm auto-monoclonal antibody, Ts4. *PLoS One* 2015;10:e0133784.
- 3) Shirai Y. Yoshitake H. Maruyama M. Takamori K. Ogawa H. Hasegawa A. Araki Y. Distribution of molecular epitope for Ts4, an anti-sperm auto-monoclonal antibody in the fertilization process. *J Reprod Dev* 2009;55:240-246.
- 4) Yoshitake H. Oda R. Yanagida M. Kawasaki Y. Sakuraba M. Takamori K. Hasegawa A. Fujiwara H. Araki Y. Identification of an anti-sperm auto-monoclonal antibody (Ts4)-recognized molecule in the mouse sperm acrosomal region and its inhibitory effect on fertilization in vitro. *J Reprod Immunol* 2016;115:6-13.
- 5) Fujihara Y. Tokuhira K. Muro Y. Kondoh G. Araki Y. Ikawa M. Okabe M. Expression of TEX101, regulated by ACE, is essential for the production of fertile mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:8111-8116.
- 6) Oda-Sakurai R. Yoshitake H. Miura Y. Kazuno S. Ueno T. Hasegawa A. Yamatoya K. Takamori K. Itakura A. Fujiwara H. Takeda Y. Araki Y. NUP62: the target of an anti-sperm auto-monoclonal antibody during testicular development. *Reproduction* 2019;158:503-516.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Yamatoya Kenji, Kurosawa Masaru, Hirose Michiko, Miura Yoshiki, Taka Hikari, Nakano Tomoyuki, Hasegawa Akiko, Kagami Kyosuke, Yoshitake Hiroshi, Goto Kaoru, Ueno Takashi, Fujiwara Hiroshi, Shinkai Yoichi, Kan Frederick W K, Ogura Atsuo, Araki Yoshihiko | 4. 巻<br>110             |
| 2. 論文標題<br>The fluid factor OVGP1 provides a significant oviductal microenvironment for the reproductive process in golden hamster   | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Biology of Reproduction  | 6. 最初と最後の頁<br>465 ~ 475 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/biolre/ioad159   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する            |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Takizawa Haruko, Araki Yoshihiko, Fujishiro Maki, Tomita Shigeki, Kishikawa Satsuki, Hashizume Akane, Mitsumori Toru, Nitta Hideaki, Iizuka-Honma Hiroko, Sawada Tomohiro, Okubo Mitsuo, Sekiguchi Yasunobu, Ando Miki, Noguchi Masaaki | 4. 巻<br>63            |
| 2. 論文標題<br>Role of TGF-beta1 and TNF-alpha1 produced by neoplastic cells in the pathogenesis of fibrosis in patients with hematologic neoplasms   | 5. 発行年<br>2023年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Clinical and Experimental Hematopathology  | 6. 最初と最後の頁<br>83 ~ 89 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3960/jslirt.22044  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)   | 国際共著<br>-             |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Wakabayashi Ichiro, Sotoda Yoko, Hirooka Shigeki, Orita Hiroyuki, Yanagida Mitsuki, Araki Yoshihiko                                   | 4. 巻<br>376           |
| 2. 論文標題<br>Peptides associated with hypertensive disorders of pregnancy as possible biomarkers for severity of lower extremity arterial disease | 5. 発行年<br>2023年       |
| 3. 雑誌名<br>Atherosclerosis   | 6. 最初と最後の頁<br>63 ~ 70 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.atherosclerosis.2023.06.002   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)   | 国際共著<br>-             |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Nitta Hideaki, Takizawa Haruko, Mitsumori Toru, Iizuka-Honma Hiroko, Araki Yoshihiko, Fujishiro Maki, Tomita Shigeki, Kishikawa Satsuki, Hashizume Akane, Sawada Tomohiro, Okubo Mitsuo, Sekiguchi Yasunobu, Ando Miki, Noguchi Masaaki | 4. 巻<br>12                |
| 2. 論文標題<br>Possible New Histological Prognostic Index for Large B-Cell Lymphoma   | 5. 発行年<br>2023年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Clinical Medicine  | 6. 最初と最後の頁<br>6324 ~ 6324 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/jcm12196324   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)   | 国際共著<br>-                 |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Sendo Fujiro, Yoshitake Hiroshi, Araki Yoshihiko  | 4. 巻<br>66              |
| 2. 論文標題<br>Targeting of neutrophil activation in the early phase of the disease for prevention of Coronavirus disease 19 severity | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Microbiology and Immunology   | 6. 最初と最後の頁<br>264 ~ 276 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/1348-0421.12978   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-               |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Araki Yoshihiko, Yoshitake Hiroshi, Yamatoya Kenji, Fujiwara Hiroshi                           | 4. 巻<br>44              |
| 2. 論文標題<br>An overview of sex and reproductive immunity from an evolutionary/anthropological perspective | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Immunological Medicine   | 6. 最初と最後の頁<br>152 ~ 158 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1080/25785826.2020.1831219  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-               |

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Araki Yoshihiko   | 4. 巻<br>21           |
| 2. 論文標題<br>Embryos, cancers, and parasites: Potential applications to the study of reproductive biology in view of their similarity as biological phenomena | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>Reproductive Medicine and Biology   | 6. 最初と最後の頁<br>e12447 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/rmb2.12447  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-            |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Wakabayashi Ichiro, Yanagida Mitsuaki, Araki Yoshihiko  | 4. 巻<br>44                |
| 2. 論文標題<br>Associations of cardiovascular risk with circulating peptides related to hypertensive disorders of pregnancy | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Hypertension Research   | 6. 最初と最後の頁<br>1641 ~ 1651 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41440-021-00747-6  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Araki Yoshihiko、Miura Yoshiki、Fujiwara Hiroshi   | 4. 巻<br>60          |
| 2. 論文標題<br>Exploration of novel biomarkers for hypertensive disorders of pregnancy by comprehensive analysis of peptide fragments in blood: their potential and technologies supporting quantification | 5. 発行年<br>2021年     |
| 3. 雑誌名<br>Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)  | 6. 最初と最後の頁<br>44～51 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1515/ccIm-2021-0713   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

〔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<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)        | 備考 |
|-------|--|------------------------------|----|
| 研究分担者 | 荒木 慶彦<br>(Araki Yoshihiko)<br>(70250933) | 日本大学・医学部・客員教授<br><br>(32665) |    |

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 |
|---------|---------|