

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462575

研究課題名(和文) 自然抗体により認識される生殖過程特異糖鎖抗原の構造及び生理機能の解明

研究課題名(英文) Structural and functional analyses of reproduction-specific carbohydrate antigen recognized by an auto-antibody, Ts4

研究代表者

荒木 慶彦 (Araki, Yoshihiko)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70250933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞特異マーカー分子TEX101は生殖生理上必須の重要分子である。近年、同分子上のN-型糖鎖が抗精子頭部自然自己抗体(Ts4)と反応することを見出した。この糖鎖抗原は生殖細胞及び初期胚に限局して発現しており、非常に特徴的な構造を持つと推定される。本研究において、質量分析法、レクチン反応性及び特異的糖分解酵素を用いて、この糖鎖抗原の構造解析に成功した。さらTs4抗体の体外受精阻害などの生殖過程における作用を明らかにし、この糖鎖抗原の生殖生理学的意義解明に向けての基礎データを集積した。

研究成果の概要(英文)：TEX101, a glycoprotein specific for germ cell, is an essential molecule in the process of reproduction. Previously, my research group showed that the N-linked oligosaccharide (OS) chain on testicular proteins including TEX101 is antigen-epitope for an anti-sperm auto monoclonal antibody, Ts4. Since the tissue distribution of the Ts4-recognized molecule is limited to reproductive related tissues, Ts4-epitope (OS chain) may have unique structure. The main aim of this study was to clarify chemical structure of the Ts4-epitope. Using LS-MS and lectin binding analyses combined with glycohydrolases digestion, OS structure of the Ts4 epitope is determined as agalacto-biantennary N-glycan with bisecting GlcNAc carrying fucose residues. In addition, Ts4 has an inhibitory effect on the fertilization in vitro. Taken together, the OS structure recognized by Ts4 is suggested to be an important physiological function(s) in the process of reproduction in mice model.

研究分野：生殖生理学 産科婦人科学

キーワード：抗精子抗体 N-結合型糖鎖 受精 生殖細胞 マウス

1. 研究開始当初の背景

抗精子抗体は、女性にアロ抗体として検出されるのみならず男性にも自己抗体として認められることがある。この臨床医学的事実は、男性・女性両側の不妊の原因となり得ることを示唆している。さらに精子抗原に反応するこれらの抗体群は、精子の凝集・不動化、あるいは卵への結合阻害など様々な免疫学的作用を有している場合がある。このことから、これらの作用が単独、或いは複合的に影響して免疫学的不妊が成立する場合があると考えられる。

これら抗精子抗体が惹起すると考えられる(免疫学的)不妊症における機序は、抗精子抗体が認識する分子が多様性を示すと考えられることから様々な状況が考えられる。従ってこれらの機序を理解するためには、まずそれぞれの抗原エピトープの性状、妊娠における役割などを明らかにすることが重要だが、これらは未だ多くの点が不明である。またこれら未知の抗原分子の生殖過程における機能不全の結果、もたらされる病態が現在では「原因不明」の不妊症として分類されている場合も多々あると推定される。従って、これら分子の構造機能連関の研究は不妊症の病態生理を知る上で極めて重要と考えられる。

研究代表者のグループは、これまで配偶子・初期胚の機能不全等が原因と推定される(免疫学的不妊症も含んだ)原因不明不妊症の病態の一端を分子動態的に解明することを最終目的として、特に生殖過程特異抗原の同定、その機能解析を中心に様々な研究を進めてきた。それらの研究の過程で、生殖過程に特異的に発現するマーカー分子の一つとしてTEX101を発見、その構造・細胞生物学的特徴及び生殖生理上の重要性をこれまで明らかにしてきた(Kurita *et al*, *Biol Reprod* 64:935-45, 2001; Takayama *et al*, *Biol Reprod* 72:1315-23, 2005; Takayama *et al*, *Zygote* 13:325-33, 2005; Tsukamoto *et al*, *Biochem Biophys Res Commun* 345:229-38, 2006; Zin *et al*, *Zygote* 14:201-8, 2006; Tsukamoto *et al*, *Mol Reprod Dev* 74:154-62, 2007 他)。これら一連の生殖過程特異抗原の研究で、TEX101とは直接関係するとは予測していなかった別の実験中に、偶然興味深い以下の現象を観察した：我々は抗精子自然自己抗体標的分子の性状解析を目的に、非感作老齢マウス脾臓を用いて機能的成熟精子頭部に反応性を示す自己抗体由来の単クローン抗体を樹立したが、それらの1抗体(Ts4, マウス IgM)がTEX101分子と反応することを見出した(Yoshitake *et al*, *J Reprod Immunol* 79:1-11, 2008)。さらに予備研究により、Ts4及びその対応抗原について以下のことを明らかにした：

- 1) Ts4 抗体の対応抗原は糖鎖である。
- 2) TEX101 上の対応抗原は N-結合型糖鎖である。
- 3) Ts4 は体外受精阻止能を持つ。
- 4) Ts4 の対応抗原は、生殖細胞・初期胚に局限している。
- 5) 生体の主要臓器にはこの抗体に反応する糖鎖構造は認められない。

これらの事実は、「抗精子」自然抗体 Ts4 の対応抗原エピトープは生殖過程(生殖細胞形成/形成後成熟・受精・着床・初期発生)に特異的発現する極めてユニークな構造を持つ糖鎖と推定され、またこの糖鎖抗原は生殖過程において重要な役割を持っている可能性が十分に考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究に於いては、この抗精子自然抗体 Ts4 の抗原エピトープの分子性状を解析し、またこの抗体の生殖過程における影響を検討するため Ts4 対応糖鎖が修飾されている分子を同定することを目標に、Ts4 対応糖鎖抗原の構造を決定、及び Ts4 対応糖鎖抗原の発生時系列における発現の詳細を明らかにすることを旨とする。また受動免疫による Ts4 の生殖過程における効果等を通じて糖鎖抗原の生殖生物学・発生学的意義を解析し、また不妊症(着床不全、習慣流産、不育症を含む)の新規概念を確立することを最終目標として実験を行った。

3. 研究の方法

従来、抗精子抗体の研究には「精子」上の抗原エピトープに焦点を当てたものが殆どである。本研究では、抗精子頭部自然抗体として樹立した Ts4 抗体が、偶然我々が発見し、その分子性状を長年にわたって研究

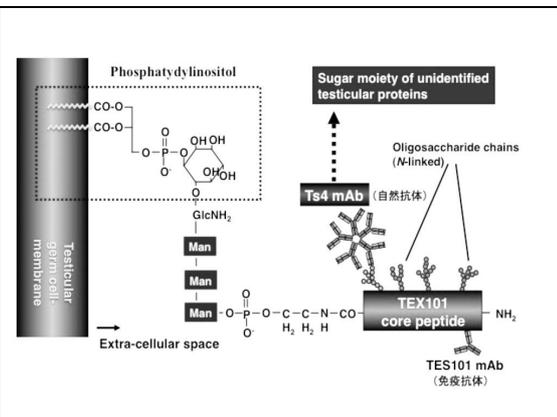


図1 Ts4 はTEX101 分子の N-結合型糖鎖を認識する
Ts4 はTEX101 分子を N-glycanase (N-結合型糖鎖を全て切る酵素) で消化するとその反応性を失う。

してきた TEX101 上にある N-結合型糖鎖構造に反応するという実験結果を原点としている(図1)。TEX101 は精巣内の生殖細胞

膜表面に存在するが、精巢上体尾部内成熟精子頭部には検出されない (Kurita *et al*, *Biol Reprod* 2001; Takayama *et al*, *Zygote*, 2005)。従って、Ts4 の抗原エピトープはこれまで同定されていない、生殖過程に特異的に発現する糖鎖が、生殖の各ステージにおいてその土台 (タンパク質部分) を変え特徴的に出現しているという事になる。

I) Ts4 対応糖鎖修飾分子の解析

これまでの予備研究において、Ts4 が認識している分子は精巢内では TEX101 が主であるが、それ以外の組織では、その認識される糖鎖分子が修飾されているタンパク質はまだわかっていない。精巢以外で、これまで Ts4 が明らかに陽性反応を示すのは精巢上体内精子及び桑実胚である (Shirai *et al*, *J Reprod Dev* 2009)。そこで以下の実験を計画した：

- a. 分析標品の採取：成熟雄 B6D2F1 マウス精巢上体尾部より精子を採取し、また桑実胚の代用としてマウス embryonic stem (ES) cell を適量培養後、試料として採取・調整。
- b. 各検体を、1% TritonX100 を含む緩衝液中で溶解後、免疫沈降用の試料を作成。
- c. これら検体に対し、Ts4 抗体を用いた免疫沈降を行った。得られた沈降物を SDS-PAGE 用緩衝液で処理し、還元下の条件で SDS-PAGE で分離した。
- d. 分離したタンパク質を銀染色で可視化後、Ts4 特異沈降と思われるバンド (またはスポット) を切り出し、質量分析装置を用いたタンパク質の同定を試みた。

II) Ts4 対応糖鎖抗原の構造解明

これまでの研究結果により、Ts4 が反応する分子としては、精巢生殖細胞由来膜成分の TritonX100 可溶分画にあることが判明している (Yoshitake *et al*, *J Reprod Immunol*, 2008) ので、この分画をマウスから調整した。固相化 Ts4 を用いたアフィニティクロマトグラフィにより、上記で調整した分画より Ts4 結合タンパク質を精製した。精製タンパク質が SDS-PAGE 後、CBB 染色を行い、Ts4 対応抗原部分のゲルを切断後、MALDI-TOF 型質量分析装置を用いて解析を行った。

III) Ts4 対応糖鎖抗原の発生時系列における発現の検討

予備研究により Ts4 の抗原糖鎖はマウス精細管内精細胞・精巢上体精子頭部 (先体)・2-4 細胞期胚・桑実胚 (内細胞塊/外細胞塊) に発現し (Yoshitake *et al*, *J Reprod Immunol* 2008; Shirai *et al*, *J Reprod Dev* 2009)、成獣では他の主要組織 (脳、心臓、肺、消化管、肝臓、腎臓、卵巣) には発現を認めない。そこで、Ts4 対応抗原の発現を受精卵から初期胚、及び発生過程にある性腺 (主として精巣) で検討した：

細胞塊) に発現し (Yoshitake *et al*, *J Reprod Immunol* 2008; Shirai *et al*, *J Reprod Dev* 2009)、成獣では他の主要組織 (脳、心臓、肺、消化管、肝臓、腎臓、卵巣) には発現を認めない。そこで、Ts4 対応抗原の発現を受精卵から初期胚、及び発生過程にある性腺 (主として精巣) で検討した：

- a. 組織採取：PMSG および hCG で過剰排卵を誘導した B6D2F1 雌マウスを雄マウスと交配させた。翌朝膣栓を確認したものを 1day-post-coitus (dpc) マウスと定義し、経時的に卵管子宮から受精卵・桑実胚、更に初期胚・後期胚までを採取した。新生児の出産直後を 1day-post partum (dpp) と定義し 1-28 dpp の精巣を採取した。
- b. 採取した受精卵、初期胚、胎児及び新生児精巣は、我々の先行研究で用いた方法に従い PFA 固定後凍結切片を作成し、Ts4 を用いた免疫染色を行った。

IV) 受動免疫による Ts4 の生殖過程における効果の検討

精子頭部へ反応する自然抗体 Ts4 は、糖鎖抗原を認識するが故の交叉反応により、精子のみならず初期胚の内・外細胞塊にも反応することを研究代表者は既に示した (Shirai *et al*, *J Reprod Dev*, 2009)。この事実は、雌個体にも同様の自然抗体価が上昇すれば、受精阻止能を持つ Ts4 のような抗精子抗体が、精子受精能阻害のみならず、着床・初期胚発生を阻害する可能性があることを示している。

そこで、実際に Ts4 が *in vivo* でどのような活性を示すか、以下の実験を行った。

- a. 受動免疫によるマウス生殖能の解析
成熟雌マウス尾静脈より、経時的に Ts4 抗体を注射後、雄マウスと交尾させ膣栓を確認した。経時的に受精卵、初期胚 (卵管内、着床後) をコントロール群との比較を受精率、着床数、出産数 (流産数) 等を指標にして Ts4 の生殖過程の効果を判定した。

4. 研究成果

本研究から得られた研究結果は既に二英文原著論文として発表した。以下、その内容を要約する。

Ts4 の認識する糖鎖構造の決定

Ts4 は、マウス精巢上体精子の先体に免疫反応性を有する。このモノクローナル抗体は、生殖細胞・初期胚にのみ反応性を有し、成体の主要臓器とは全く反応性を示さない。従って極めてユニークな構造をもつと推測される。予備実験の結果から Ts4 の抗原工

ピトープはいくつかの糖加水分解酵素・レクチンに反応性をもつことが判明した。Ts4 免疫沈降物を、液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いて解析したところ、5 種

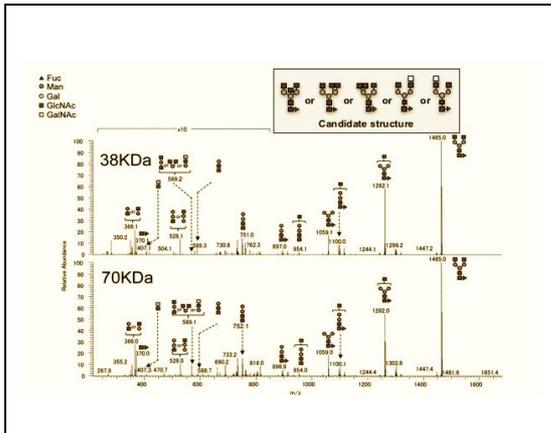
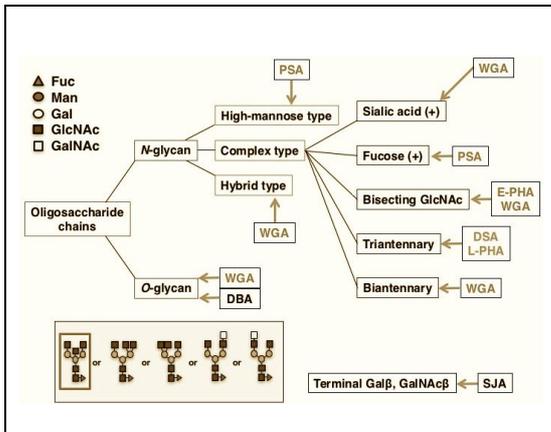


図 2 Ts4 対応糖鎖抗原の質量分析

Ts4 による精巣膜タンパク質分画免疫沈降標品を MALDI-TOF 質量分析したの結果、5 種の候補分子を同定した。

類の糖鎖が Ts4 の抗原エピトープライ候補として同定された(図 2)。さらにこの免疫沈降物をレクチン反応による糖鎖構造推定法(図 3)と一連の endo-/exo-型糖加水分



解酵素処理後の Ts4 用いたウエスタンブロット解析を用いた詳細な解析の結果、Ts4 エピトープの糖鎖は「フコシル化二本鎖複合型 N-結合型糖鎖+バイセクト型 N-アセチルグルコサミン残基」であることを明らかにした。

Ts4 結合糖鎖を持つ糖タンパク質の同定及びその機能解析

マウス精子自然モノクローナル抗体 (Ts4) は、糖タンパク質分子上の N 結合型糖鎖を、抗原エピトープとして結合する。精巣上体精子、精巣生殖細胞と初期の胚の先体内に存在する数種類の糖タンパク質に対し免疫反応性を示す。Ts4 エピトープは上記に示したように「フコシル化二本鎖複合型 N-

結合型糖鎖+バイセクト型 N-アセチルグルコサミン残基」である。精巣において、この糖鎖を有する分子の 1 つは生殖細胞特異抗原 TEX101 である。この糖タンパク質は精巣上体精子には存在せず精母細胞、精子細胞及び精巣内精子に発現している。

本研究において、精巣上体尾部からの成熟精子上に存在する、TEX101 とは異なる Ts4 反応性糖タンパク質を同定した。液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析と免疫沈降法を組み合わせ分析した結果、その分子はアルファ-N-アセチルグルコサミニダーゼ (Naglu;ヘパラン硫酸の分解酵

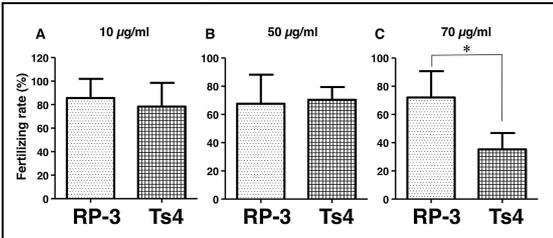


図 4 Ts4 の体外受精における効果

Ts4 は量依存的にマウスの体外受精を部分阻害する。
RP-3: コントロールマウス IgM

素)であった。ウエスタンブロット法と免疫組織化学的分析で、マウス Naglu が 2 つの型 (82-および 77-kDa) で存在し、精巣上体尾部精子の先体部位と尾部に存在することが明らかになった。精子に存在するこれら二つの型の Naglu のうち、Ts4 は、精子先体に存在する 82kDa-Naglu にのみ免疫反応することが明らかになった。Ts4 はマウス受精を部分的に阻害し(図 4) また抗 Naglu 抗体も同様の活性を示した。さらに、ヘパラン硫酸によって誘導される精子先体反応に、これらの抗体は影響を及ぼした。

以上より、Ts4 の抗原エピトープ(糖鎖)は生殖過程において重要な生理学的活性を持つと推察された。

上記の結果から、本研究は確実に成果を上げ、国際専門誌に原著として発表できた。発生時系列によるこの糖鎖の発現、及び Ts4 受動免疫による生殖過程への影響については 2016 年度中に速やかに論文化すべく現在追加データの集積及び論文作成中である。

5 . 主な発表論文等

(*: correspondence)

〔雑誌論文(全て査読あり)〕(計 13 件)

1. 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

- effects on fertilization *in vitro*. *J Reprod Immunol* 115: 6-13, 2016; doi:10.1016/j.jri.2016.04.001
2. Endo S., Yoshitake H., Tsukamoto H., Matsuura H., Kato K., Sakuraba M., Takamori K., Fujiwara H., Takeda S., Araki Y*. TEX101, a glycoprotein essential for sperm fertility, is required for stable expression of Ly6k on testicular germ cells. *Sci.Rep.* 6: 23616; doi: 10.1038/srep23616, 2016.
 3. Fujiwara H*, Araki Y, Imakawa K, Saito S, Daikoku T, Shigeta M, Kanzaki H, Mori T. Dual positive regulation of embryo implantation by endocrine and immune systems-Step-by-Step maternal recognition of the developing embryo. *Am J Reprod Immunol* 75: 281-289, 2016; doi: 10.1111/aji.12478.
 4. 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* 10: e0133784, 2015; doi: 10.1371/journal.pone.0133784
 5. Bodogai M., Moritoh K., Lee-Chang C., Hollander M.C., Sherman-Baust C., Wersto R., Araki Y., Miyoshi I., Yang L., Trinchieri G., Biragyn A*. Regulatory and pro-metastatic function of myeloid-derived suppressive cells requires education from tumor-associated B cells. *Cancer Res.* 75: 3456-3465, 2015; doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3077.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Yoshitake H., Hashii N., Kawasaki N., Oda R., Kawasaki Y., Sakuraba M., Endo S., Takamori K., Hasegawa A., Fujiwara H., Araki Y. Identification and confirmation of carbohydrate structure recognized by an anti-sperm monoclonal antibody Ts4, using lectin-binding and glycohydrolase-digestion assays. The 30th Annual Meeting of the Japan Society for Immunology of Reproduction, November 21-22, Kumamoto, Japan *J Reprod Immunol* 112:131, 2015 (abstract #29)
2. 遠藤周一郎, 竹田 省, 荒木慶彦 雄性生殖細胞におけるTEX101/Ly6k複合体の分子安定性 第67回日本産婦人科学会学術講演会 2015年4月9-12日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) ミニワークショップ(MW-20-4) 日本産科婦人科学会雑誌 67:531(S-297), 2015(日本産科婦人科学会優秀演題賞・受賞)
3. Hamamura K, Nonaka D, Ishikawa H, Banzai M, Yoshida K, Tanaka K, Takeda S, Araki Y. Simple quantitation for potential disease biomarker peptides, primarily identified a peptidomics approach in the serum with pregnancy-induced hypertension. 46th International Congress on Pathophysiology of Pregnancy, September 18-20, 2014, Keio Plaza Hotel, Tokyo, Japan.
4. Yoshitake H, Endo S, Hasegawa A, Hashii N, Kawasaki N, Takamori K, Fujiwara H, Araki Y. Structure of the oligosaccharide chain in the

- molecular epitope for anti-sperm auto-monoclonal antibody, Ts4. *Society for the Study of Reproduction, 46th Annual Meeting Abstracts*, 173-174. (#415) July 22-26, 2013., Montreal, QC, Canada.yosa25000
5. Fujiwara H, Nishioka Y, Matsumoto H, Suginami K, Horie A, Tani H, Matsumura N, Baba T, Sato Y, Araki Y, Konishi I. Eph-ephrin A system is a new candidate to regulate choriocarcinoma invasion. The 2nd IGCS Regional Meeting on Gynecologic Cancers, April 11-13, 2013. Discovery Kartika Plaza Hotel, Bali, Indonesia.

〔図書〕(計 2 件)

1. 荒木慶彦、濱村憲佑 妊娠高血圧症候群のバイオマーカーの探索・開発と診断薬 第13章 11節 「最先端バイオマーカーを用いた診断薬/診断装置開発と薬事対応」 P396-400, 技術情報協会, 東京, 2015
2. Fujiwara H, Araki Y, Saito S, Imakawa K, Kyo S, Shigeta M, Shiotani M, Horie A, Mori T. A novel concept of Fundus-Ovary-Salpinx-Para-Aorta implantation promoting unit during human embryo implantation. In: *New Discoveries of Embryology* (Wu B. ed.) P77-95, InTech Open Access Publisher, Rijeka, Croatia. 2015. DOI:10.5772/60634

〔その他〕

ホームページ等

http://www.juntendo.ac.jp/english/department/gra/gender_specific_medicine/araki.html

プレスリリース

<http://www.juntendo.ac.jp/news/20160413-01.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

荒木 慶彦 (ARAKI, Yoshihiko)
順天堂大学・医学研究科・先任准教授
研究者番号：70250933