

令和元年5月28日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08591

研究課題名(和文) 乳酸トランスポーターのセルトリ細胞-精母細胞間移送メカニズムとセミノリピドの役割

研究課題名(英文) The transport mechanism of the lactate transporter between Sertoli cells and spermatocytes and the role of seminolipid in it.

研究代表者

本家 孝一 (Honke, Koichi)

高知大学・その他部局等・副学長

研究者番号：80190263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の精巣に特異的に発現する硫酸化糖脂質セミノリピドの分子機能を硫酸化酵素CST欠損マウスを用いて解明した。精巣には血液精巣関門があるため、精母細胞は、セルトリ細胞でグルコースを分解して産生される乳酸をエネルギー源として利用する。精母細胞上の乳酸トランスポーターはMCT4で、ベイシジンと複合体を形成してはじめて機能性のトランスポーターとなることを見出した。MCT4遺伝子がセルトリ細胞で転写、翻訳された後、MCT4タンパク質が細胞外小胞内に分泌されて精母細胞に移送されることを見出した。このセルトリ細胞における細胞外小胞の産生分泌がセミノリピドによって促進されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

男性不妊の多くは精子形成障害が原因である。哺乳動物の精子形成は精巣中で起こるが、精子形成細胞と支持細胞のセルトリ細胞の相互作用で進行する。精子形成細胞は2回減数分裂を行い、半数体の精子になる。セミノリピドを欠損したマウスは、第一減数分裂の途中で停止し不妊となることから、精子形成に必須の分子であることがわかっているが、その分子メカニズムは不明であった。本研究によってその分子メカニズムが明らかとなった。本研究により、セルトリ細胞と精子形成細胞間のコミュニケーションに細胞外小胞が使われていることが明らかとなった。正常の発生過程においても細胞外小胞の重要性が明確となった。

研究成果の概要(英文)：We have elucidated the molecular function of seminolipid, which is the sulfated glycolipid specifically expressed in mammalian testes. Since the testis has the blood-testis barrier, spermatocytes utilize lactate that is produced from glucose in Sertoli cells as the energy source. We found that the lactate transporter on the plasma membrane of spermatocytes is MCT4 and it can function only after it forms assembly with basigin. After the MCT4 gene is transcribed and translated in Sertoli cells, MCT4 proteins are found to be secreted into the extracellular vesicles and transported to spermatocytes. We found that this secretion of the extracellular vesicles from Sertoli cells is stimulated by seminolipid.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：精子形成 精母細胞 セルトリ細胞 セミノリピド 乳酸 MCT4 ベイシジン 細胞外小胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

男性不妊の多くは精子形成障害が原因で起こる。哺乳動物の精子形成は、複雑で高度に秩序だったプロセスで、精巣の中にある精細管内で起こる。精細管内には、将来精子になる生殖細胞と、その支持細胞であるセルトリ細胞が存在する。生殖細胞は、セルトリ細胞に密着しながら管周囲から内腔側へと移動しながら、精原細胞から精母細胞、精子細胞へと分化していく。この間、精母細胞は減数分裂を経験して半数体の精子細胞になる。生殖細胞の分化には、生殖細胞とセルトリ細胞との相互作用が重要な役割を果たす。

精細管の基底側に血液精巣関門が存在し、精上皮は基底側と管腔側の区画に仕切られる。精母細胞は、プレプロトテム期からザイゴテム期にかけて血液精巣関門を越え、管腔側に入ってからパキテム期、ディプロテム期精母細胞へと分化し、減数分裂を行う。

哺乳動物細胞の糖脂質は、通常スフィンゴ脂質(脂質部分にセラミドをもつ)であるが、精巣の糖脂質の90%以上は硫酸化グリセロ糖脂質のセミノリピドで占められている。このユニークな糖脂質は、精子形成細胞にのみ特異的に発現している。セミノリピドは、糖脂質硫酸転移酵素(CST)によって合成される(Honke *et al.* JBC 1997;272:4864-8)。Cst 遺伝子欠損マウスは、精巣においてセミノリピドを欠き、精子形成は第一減数分裂中期までに中断して不妊になる(Honke *et al.* PNAS 2002;99:4227-32)。

ベイシジン(CD147)は、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する1回膜貫通型の糖タンパク質で、様々な組織に存在するが、男性生殖細胞にも発現している。ベイシジン欠損マウスも、精子形成が第一減数分裂中期までに中断して不妊になる(Igakura *et al.* Dev Biol 1998;194:152-65)。このように、セミノリピド欠損マウスとベイシジン欠損マウスの精子形成障害の症状が近似しているため、何らかの関連性を示唆していた。

## 2. 研究の目的

マウスの精子形成におけるセミノリピドの分子機能を明らかにし、ベイシジン、乳酸トランスポーターMCT4との関連性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

野生型マウス、セミノリピド欠損マウス、ベイシジン欠損マウスの精巣から精母細胞を単離し、免疫組織化学でセミノリピド、ベイシジン、MCT4の共同存在を、生化学的手法によってこれらの相互作用を調べた。

野生型マウス、セミノリピド欠損マウス、ベイシジン欠損マウスの精母細胞の乳酸取り込み能と乳酸依存性細胞生存率を調べた。

野生型マウス、セミノリピド欠損マウスの精母細胞とセルトリ細胞におけるMCT4のmRNAとタンパク質の発現を調べた。

野生型マウスのセルトリ細胞を無血清培地で培養し、培地中に分泌される細胞外小胞を単離し、電子顕微鏡で観察するとともに、MCT4が細胞外小胞に含まれるかどうかを調べた。

セミノリピドのセルトリ細胞における細胞外小胞産生分泌への影響を調べた。

細胞外小胞からセミノリピド欠損精母細胞への受け渡しを野生型精母細胞と比較した。

## 4. 研究成果

マウス精母細胞の細胞膜脂質ラフト上でセミノリピドとベイシジンが共同存在し相互作用していた。さらに、化学架橋剤を用いた実験で、乳酸トランスポーターの一つであるMCT4(monocarboxylate transporter)4がベイシジンと複合体を形成していることを見出した。MCT4は、ベイシジン欠損マウスでは精母細胞の細胞膜上に発現していたが、セミノリピド欠損マウスでは発現していなかった。以上より、セミノリピドとベイシジンがMCT4の機能発現に関与している可能性が示唆されたため、セミノリピド欠損精母細胞とベイシジン欠損精母細胞の乳酸取り込み能を測定した結果、両者とも劇的に低下していた。また、乳酸依存性細胞生存率も有意に低下していた。これらの結果は、セミノリピド欠損マウス、ベイシジン欠損マウスの精子形成中断の原因が乳酸取り込み障害によるエネルギー源の枯渇によるものであることを示していた。

次に、マウス精巣におけるMCT4の発現を調べると、意外にもmRNAはセルトリ細胞でのみ発現し、生殖細胞には発現していなかった。一方、MCT4タンパク質は生殖細胞にも存在していたため、MCT4は、タンパク質に翻訳された後、セルトリ細胞から生殖細胞に移送されると考えられた。セミノリピド欠損マウスの生殖細胞にはMCT4タンパク質が存在しなかったため、セミノリピド欠損マウスではMCT4タンパク質のセルトリ細胞から生殖細胞への移送が障害されていると考えられた。

セルトリ細胞 - 精母細胞間 MCT4 タンパク質移送メカニズムを解明するため、マウス精巣からセルトリ細胞を単離し、無血清培地で培養した後、培地から細胞外小胞を単離し、電子顕微鏡で直径約 100 nm の小胞を確認した。単離した細胞外小胞を可溶化し、ウエスタンブロッティングで MCT4 の存在を確認した。

MCT4 タンパク質移送プロセスにおけるセミノリピドの役割を解明するため、セルトリ細胞の培地から細胞外小胞を単離し、細胞数あたりの総タンパク質、MCT4、総コレステロールの濃度を定量した。セルトリ細胞培養時の培地にセミノリピドまたはサルファタイド（セミノリピドと同一の硫酸化糖鎖構造をもつスフィンゴ脂質）を添加した際の、細胞数あたりの総タンパク質、MCT4、総コレステロールの濃度を定量して比較した。この結果、セルトリ細胞の細胞外小胞の産生分泌が、セミノリピドあるいはサルファタイドによって促進されることを明らかにした。細胞外小胞から精母細胞への MCT4 タンパク質の受け取りはセミノリピド欠損細胞でも出来たので、このプロセスにはセミノリピドが関与しないことがわかった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Kotani N, Ida Y, Nakano T, Sato I, Kuwahara R, Yamaguchi A, Tomita M, Honke K, Murakoshi T. Tumor-dependent secretion of close homolog of L1 results in elevation of its circulating level in mouse model for human lung tumor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 501, 982-987, 2018. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.096.

2. Imamaki R, Ogawa K, Kizuka Y, Komi Y, Kojima S, Kotani N, Honke K, Honda T, Taniguchi N, Kitazume S. Glycosylation controls cooperative PECAM-VEGFR2- $\beta$ 3 integrin functions at the endothelial surface for tumor angiogenesis. *Oncogene* 37, 4287-4299, 2018. doi: 10.1038/s41388-018-0271-7.

3. Honke K. Biological functions of sulfoglycolipids and the EMARS method for identification of co-clustered molecules in the membrane microdomains. *J. Biochem.* 163, 253-263, 2018. doi: 10.1093/jb/mvx078.

4. Esaki N, Ohkawa Y, Hashimoto N, Tsuda Y, Ohmi Y, Bhuiyan RH, Kotani N, Honke K, Enomoto A, Takahashi M, Furukawa K, Furukawa K. ASC amino acid transporter 2, defined by enzyme-mediated activation of radical sources, enhances malignancy of GD2-positive small-cell lung cancer. *Cancer Sci.* 109, 141-153, 2018. doi: 10.1111/cas.13448.

5. Kotani N, Nakano T, Ida Y, Ito R, Hashizume M, Yamaguchi A, Seo M, Araki T, Hojo Y, Honke K, Murakoshi T. Analysis of lipid raft molecules in the living brain slices. *Neurochem. Int.* 119, 140-150, 2018. doi: 10.1016/j.neuint.2017.08.012.

6. Hirahara Y, Wakabayashi T, Mori T, Koike T, Yao I, Tsuda M, Honke K, Gotoh H, Ono K, Yamada H. Sulfatide species with various fatty acid chains in oligodendrocytes at different developmental stages determined by imaging mass spectrometry. *J. Neurochem.* 140, 435-450, 2017. doi: 10.1111/jnc.13897.

7. Kaneko K, Ohkawa Y, Hashimoto N, Ohmi Y, Kotani N, Honke K, Ogawa M, Okajima T, Furukawa K, Furukawa K. Neogenin, Defined as a GD3-associated Molecule by Enzyme-mediated Activation of Radical Sources, Confers Malignant Properties via Intracytoplasmic Domain in Melanoma Cells. *J. Biol. Chem.* 291, 16630-16643, 2016. doi: 10.1074/jbc.M115.708834.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 本家孝一 . 膜マイクロドメインを視る分子の眼、第 31 回植物脂質シンポジウム(招待講演) 2018 年、高知

2. 本家孝一 . ユニークな脂肪酸組成をもつリン脂質分子種がつくる神経細胞膜機能ドメイン、2018 年生理学研究所研究会「オルガネラ膜ドメインの機能と病態」(招待講演) 2018 年、岡崎

3. 本家孝一 . EMARS 法の膜マイクロドメイン研究への応用、第 123 回 日本解剖学会総会・全国学術集会(招待講演) 2018 年、東京

4. 川端薫子、姜松林、久下英明、本家孝一 . ヒト肺腺がん細胞におけるシアリルルイス X 抗

原キャリアータンパク質の同定、2017年、旭川

5. 久下英明、本家孝一. sn-1 位におけるリン脂質脂肪酸リモデリングによる膜蛋白質の細胞内局在化制御、第59回日本脂質生化学会、2017年、東京

6. Honke K, Yamashita T, Kosugi T, Kadomatsu K. A sulfated glycolipid, seminolipid and basigin are required for the functional expression of the lactate transporter in spermatocytes. NOW-JSPS 2016 Symposium "Glycobiology in Health and Disease"(招待講演 国際学会)2016年、Leiden, Netherland

7. 山下竜幸、仁尾景子、矢生健一、宮原 馨、津田雅之、小杉智規、門松健治、本家孝一. 硫酸化糖脂質セミノリピドはセルトリ細胞のエクソソーム分泌を促進する。第35回日本糖質学会年会、2016年、高知

8. 山下竜幸、仁尾景子、矢生健一、宮原 馨、津田雅之、小杉智規、門松健治、本家孝一. Seminolipid はセルトリ細胞の exosome 分泌を促進して精子形成細胞へ乳酸トランスポーターMCT4 を送達する。第89回日本生化学会大会、シンポジウム(招待講演)2016年、仙台

〔図書〕(計1件)

1. Elbe AD, Honke K. Medical Biochemistry, 5th Ed. (eds by Baynes JW, Dominiczak, MH.),pp. 215-241, Elsevier, 2019

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。