

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16786

研究課題名(和文) 精巣でのテストステロン産生に關与するD型アスパラギン酸合成酵素の同定

研究課題名(英文) Research of D-aspartate synthetase involved in the production of testosterone in the testes

研究代表者

富田 圭司 (Keiji, Tomita)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：30640148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウス精巣のD-Asp含有量は出生直後では極めて低い値であったが、上昇し10週齢でピークとなりプラトーに達した。L-Asp含有量は変化はみられなかった。D-Asp分解酵素(DDO)活性は成長と共に低下、活性を失ったまま推移した。D-Aspは分化の進んだ精子細胞の細胞質に局在した。一方、分解酵素DDOはセルトリ細胞に局在した。In vitro精子形成法にD-Aspを添加すると、精子分化を抑制した。Acr-GFP Tgマウスの精子細胞=D-Asp含有細胞を単離、細胞膜処理しL-Aspとの混合液を解析したがD-Aspの産生は確認できなかった。これよりD型への変換酵素活性は証明されていない状況にある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テストステロン合成に關する研究は、少子高齢化という社会的背景からも、男性不妊・LOH症候群・前立腺癌などの新規治療薬開発に向け、新たな知見が望まれる分野である。我々は、テストステロン合成を亢進する低分子化合物であるD型アスパラギン酸(D-Asp)に着目し、精巣内でのD-Aspの局在・挙動を明らかにした。さらにマウス精子細胞の細胞質でD-Aspが合成されていることを示した。D-Aspは精巣内で合成されると予想され、この合成酵素を同定することでテストステロン合成に対する新たな介入手段を開発し、社会的にも問題となる諸疾患の新規治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In contrast to the consistently elevated testicular levels of L-Asp, HPLC analyses demonstrated that testicular level of D-Asp were initially low and rose to a plateau at 10 weeks of age. We found that DDO activity were highest just after birth and decreased with age, and were barely detectable or undetectable at 10 weeks of age. D-Asp was found to be localized in close proximity to the GFP-expressing acrosomes. DDO was expressed in mouse Sertoli cells at 2 weeks of age. Using in vitro spermatogenesis model, we determined exogenous D-Asp suppresses germ cell differentiation in mouse testis. We analyzed the spermatids of Acr-GFP Tg mouse; the cells of including D-Asp by HPLC, but we did not detect the production of D-Asp. Now we still did not prove the enzyme activity of D-aspartate synthetase.

研究分野：アンドロロジー

キーワード：テストステロン アスパラギン酸

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸にはL型とD型が存在し、生体内のタンパク質を構成するアミノ酸はL型である。近年の研究により、遊離D型アミノ酸も哺乳類のいくつかの臓器に存在することがわかってきた。D型アスパラギン酸(D-Asp)の合成酵素や特異的トランスポーターは明らかになっておらず生体内D-Aspの由来は不明である。特異的な分解酵素として唯一、D型アスパラギン酸オキシダーゼ(DDO)が知られている。D-Aspの生理的機能に関して解明されている部分は多くはないが、ラットライディッシュ細胞の培養下でテストステロン合成を促進することが知られている。またその作用を介して、造精機能を促進することが推測されているが、現在まで詳細は明らかにされていない。

精子形成は下垂体から分泌されるFSH、LHや、LHの作用を受け分泌されるテストステロンなどによりコントロールされている。臨床において、造精機能障害は大きな問題になるにも関わらず、造精機能を改善し、明確な作用機序を持つ物質は、FSHおよびLHを持つhCGを除き、ほぼ知られていない。

2. 研究の目的

テストステロン合成に関する研究は、少子高齢化という社会的背景からも、男性不妊・LOH症候群・前立腺癌などの新規治療薬開発に向け、新たな知見が望まれる分野である。本研究では、マウス精子細胞の細胞質に存在すると予想するD-Asp合成酵素の同定を行い、精巣内D-Aspの由来を明らかにする。

合成酵素を同定することでテストステロン合成に対する新たな介入手段を開発し、社会的にも問題となる諸疾患の新規治療法の開発につなげたい。

3. 研究の方法

D-Asp合成酵素は、精細胞の成熟に伴い精子細胞の細胞質に発現すると予想される。精巣の中でもかなり微小な環境であるため、活性を確認するには精子細胞を精製する必要がある。そこでAcr-GFP Tgマウス精巣を用いる。このTgマウスは、減数分裂以降の精子細胞の先体にGFPを発現する。これまでの我々の免疫染色の結果から、このGFP陽性細胞はD-Asp陽性細胞とほぼ一致する。このマウス精巣組織の酵素処理を行い、細胞を単離する。セルソーターでGFP陽性細胞と陰性細胞に分離する。この操作でGFP陽性細胞 D-Asp陽性細胞が高純度で集積できると予想した。

D-Asp合成酵素の活性を証明するため、1)で精製した精子細胞から酵素を抽出し、その活性を測定する。GFP陽性細胞から、ガラスビーズによる破碎、protein extraction bufferなどのキットを用いて細胞膜を破壊し、酵素を抽出する。そこへL-Aspを添加し、HPLCで経時的にD-Asp濃度を測定する。生体内でのD-Asp合成経路はこのL-Aspのラセミ化が強く推測されているが、N-methyl-D-aspartate (NMDA)からの合成も想定されており、NMDAからもD-Aspが合成されているか同様に測定を行う。

4. 研究成果

液体クロマトグラフィーでマウス精巣のD型アスパラギン酸(D-Asp)含有量を測定したところ、出生直後では極めて低い値であったが、徐々に上昇し、10週齢でピークとなりプラトーに達した。一方、L型アスパラギン酸の含有量は、発達段階における変化はみられなかった。比較対象として肝臓、腎臓でも測定したがD-Aspは含まれなかった。

一方、マウス精巣におけるD型アスパラギン酸分解酵素(DDO)の活性は、出生直後が最も高く、成長とともに低下し6週齢以降、ほとんど活性を失ったまま推移した。肝臓、腎臓においては経時的に酵素活性が認められた。したがって代謝にかかわる臓器である肝臓、腎臓においては常にD-Aspが分解されていると考えられた。

マウス精巣を用いた免疫組織染色の結果、D-Aspは分化の進んだ精子細胞の細胞質に局在した。一方、分解酵素DDOはセルトリ細胞に局在した。

In vitro精子形成法の培地にD-Aspを添加すると、濃度依存的にAcr-GFP Tgマウスで精子分化の指標であるGFP発現を抑制した。これにより精巣において精細胞の分化初期には抑制的に作用するにも関わらず、分化後期の精子細胞にD-Aspが局在することがわかった。また精子細胞の細胞質でD-Aspが合成されていると考えられた。

セルソーターを用いて、Acr-GFP Tgマウス精巣から分化の進んだ精子細胞、すなわちD-Asp含有細胞を単離した。この単離した精子細胞に対し細胞膜処理を施し、これとL-Aspの混合液からD-Aspが産生されているか液体クロマトグラフィーを用いて測定したがD-Aspの産生は確認できなかった。この結果からD型への変換酵素の活性は証明されていない状況にある。手法を変

更し酵素活性を同定できるか引き続き検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----