

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791129

研究課題名（和文）精細管における脂肪酸代謝の特異性の解析

研究課題名（英文）Characterization of the fatty acid metabolism in the seminiferous tubules

研究代表者

深澤 元晶（FUKASAWA MOTOAKI）

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：70387728

研究成果の概要： 精子発生における脂肪酸β酸化系の役割を明らかにするために、精上皮におけるミトコンドリア脂肪酸β酸化系酵素の局在を解析した。研究開始当初、精細管に脂肪酸β酸化系はほとんどない、あるいは極端に少ないと思われた。しかしその後の検討の結果、精上皮ではミトコンドリアの脂肪酸β酸化系が Sertoli 細胞にのみ存在し、一方で精子発生細胞（精祖細胞・精母細胞・精子細胞）には存在しないということが明らかになった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	270,000	2,970,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：アンドロロジー、脂肪酸代謝、精子発生

1. 研究開始当初の背景

高等生物の精子発生は、血液から隔離された特殊な栄養環境下で進行するため、精子発生過程の生殖細胞では体細胞とは栄養代謝が大きく異なると考えられる。また減数分裂を経て半数体となり、球状の細胞から運動能のある精子へと著しい形態変化を行うことから、その栄養代謝には大きな変化が起こると考えられる。

これまでに我々は、精細管において、精子発生過程の生殖細胞に脂肪酸β酸化系の酵素が欠落している一方、脂肪酸 CoA 分解酵素が豊富であるという知見を得ていた。これは、精子発生過程の精子細胞では脂肪酸はβ酸化系には送られず、別の何らかの代謝系で代謝されることを示唆する。減数分裂と栄養代謝の関係、あるいは

精子の質（運動能、数、形態形成）を決める栄養学的要因について知見は乏しい。

精子発生過程での生殖細胞では、精子発生の進行に従って栄養代謝の変化し、精祖細胞・精母細胞・精子では解糖系、精細胞では TCA 回路が主な栄養代謝を行うと考えられてきた。また、精母細胞ではケトン体代謝も行われていることが示唆されている。一方、生殖細胞の脂肪酸代謝については知見は乏しい。精祖細胞と精母細胞では脂肪酸の代謝活性が比較的高く、精母細胞と精細胞では脂肪酸カルニチン転移酵素の発現や脂肪酸合成酵素の活性が報告されている。しかし精子発生過程の生殖細胞において脂肪酸が実際に栄養源として用いられているのか、さらには脂肪酸代謝が精子発生過程において何か役割を持つ

のかは不明である。

2. 研究の目的

- (1) 精細管における脂肪酸代謝酵素群の発現の動態を解明する。
- (2) 精子発生における脂肪酸代謝の役割を調べる。

3. 研究の方法

材料：ラット成体(10週齢)の精巣組織、単離した精細管・間質・Sertoli細胞を用いた。抗体：ミトコンドリア脂肪酸β酸化系の7酵素に対する抗体と、ミトコンドリアのマーカースとしてクエン酸合成酵素の抗体、Sertoli細胞のマーカースとしてチロシン化チユプリン及びビメンチンの抗体を用いた。

生化学的解析：Western blot法により各酵素蛋白質の定量を行った。遺伝子発現をDNAマイクロアレイ法により定量した。

光顕免疫組織化学：4%PFAで灌流固定した凍結切片を用い、間接法で蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

電顕免疫組織化学：4%PFA/0.2%GAで固定した後、Lowicryl K4Mに包埋した。二次抗体としてコロイド金標識抗ウサギIgG(10nm粒子)を用いて後包埋免疫組織化学を行った。電子染色の後、電子顕微鏡にて観察した。画像処理：ミトコンドリアと細胞質の標識率を、各抗体と非免疫IgGで染色した標本について求めた。

【酵素名の略語】

ミトコンドリア脂肪酸β酸化系

VLCAD: very long chain acyl-CoA dehydrogenase

LCAD: long chain acyl-CoA dehydrogenase

MCAD: medium chain acyl-CoA dehydrogenase

SCAD: short chain acyl-CoA dehydrogenase

MH: enoyl-CoA hydratase

HADH: 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase

MTL1: 3-ketoacyl-CoA thiolase

TCA cycle enzyme (ミトコンドリアのマーカースとして)

CS: citrate synthase

4. 研究成果

精巣においてミトコンドリア脂肪酸β酸化系酵素の抗体を用いて蛍光抗体法を行い、これらの酵素の局在を調べた。弱拡大での観察では、間質が陽性であったが、

精細管内は陰性であるように見えた(図1)。ミトコンドリア脂肪酸β酸化系酵素の精巣における分布を調べるため、精細管と間質を分離し(図2)、定量的Western blot法を行ったところ(図3)、各酵素蛋白質は間質では肝臓と同程度存在するが、精細管では間質の1/10程度しか存在しないことがわかった(図4A)。またDNA microarrayにより各酵素遺伝子の発現量を調べると、精細管では間質に比べて発現量が著しく少ないことがわかった(図4B)。

しかしながら、蛍光抗体法を行い、精細管を共焦点レーザー顕微鏡により高倍率で観察したところ、ミトコンドリア脂肪酸β酸化系酵素は精上皮の支持細胞であるSertoli細胞で陽性であり、生殖細胞では陰性であった(図5)。また、免疫電顕法により精巣の各細胞種の細胞内における局在を調べたところ、間質のLeydig細胞および精上皮のSertoli細胞のどちらもミトコンドリアに強いシグナルが見られ、一方、生殖細胞にはいずれも精子発生過程においてもシグナルは弱かった(図6・7)。

以上により、精上皮ではミトコンドリア脂肪酸β酸化系がSertoli細胞にのみ存在し、一方で精子細胞(精祖細胞・精母細胞・精子)には存在しないという中間的結論を得た。現在、Sertoli細胞の機能を解析するため、単離したSertoli細胞と用いて栄養代謝系の局在の解析を行っている。ミトコンドリア脂肪酸β酸化系については、蛍光抗体法により反応陽性であることが確認され(図8A)、またDNAマイクロアレイによると遺伝子発現量は間質よりも少ないが精細管全体よりは多いことがわかった(図8B)。

現在、精上皮ではSertoli細胞にミトコンドリア脂肪酸β酸化系が存在するという内容で論文を執筆中である。精子発生における脂肪酸代謝の役割については今まで顧みられてこなかった。Sertoli細胞の脂肪酸β酸化系は、Sertoli細胞自身の栄養代謝のみならず、生殖細胞との相互作用において授受される成分の合成あるいは分解処理に関与する可能性も考えられる。今後はSertoli細胞における代謝と精子の質の関係について明らかにしたい。

【発表準備中の論文】

図1~7について：Fukasawa M *et al.*, "Immunohistochemical localization of mitochondrial fatty acid β -oxidation enzymes in Sertoli cells of rat testis" (投稿中)

図8について：Fukasawa M *et al.*, "Immunohistochemical analysis on isolated rat Sertoli cell" (投稿準備中)

印刷になった段階でご報告致します。

【図表】

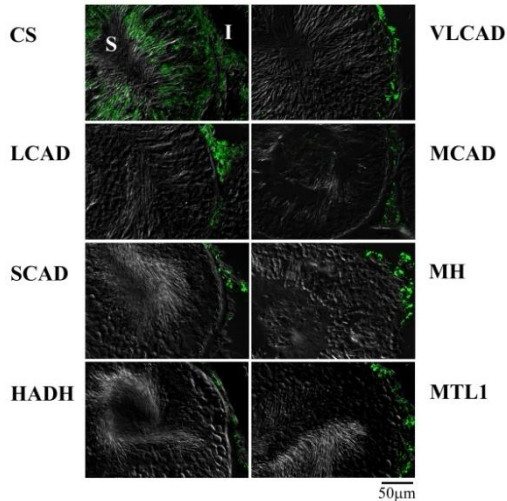


図 1) 蛍光抗体法による脂肪酸β酸化系酵素の検出。S：精細管、I：間質。CSは精細管と間質が共に陽性で、ミトコンドリアが均一に分布していることがわかる。

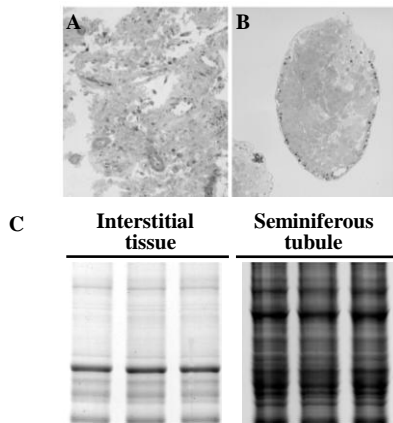


図 2) 精巣組織の分離。A：精巣間質、B：精細管、C：各組織 3 サンプルずつの蛋白質のスラブゲル電気泳動像。間質と精細管で構成蛋白質の組成が全く異なることがわかる。

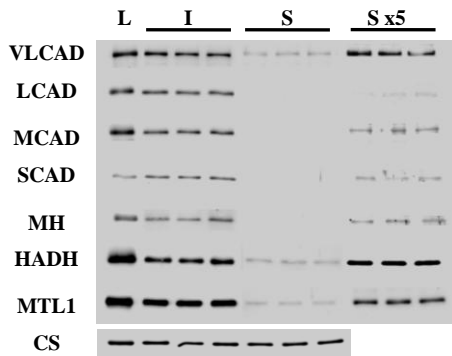


図 3) Westeblot 法による精巣組織の解析。L：肝臓、I：精巣間質、S：精細管。Sx5

には精細管の蛋白質を 5 倍量泳動した。ミトコンドリア脂肪酸β酸化酵素のシグナルはいずれも間質では肝臓と同程度であるが、精細管では著しく弱い。一方 CS のシグナルは組織間で差がない。

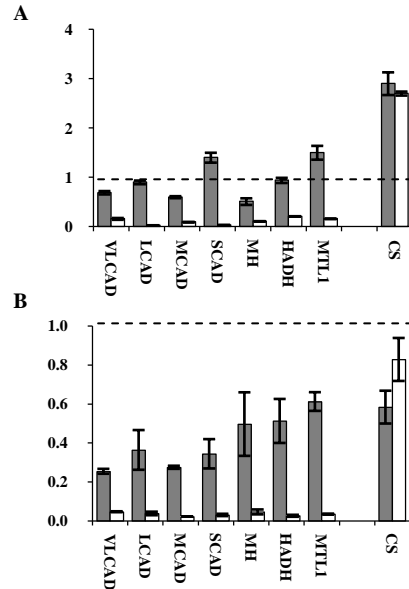


図 4) 精巣間質と精細管におけるミトコンドリア脂肪酸β酸化酵素の定量。A：蛋白質 (Western blot 法、図 3 参照)、B：遺伝子発現量 (DNA microarray 法)。灰色：間質、白色：精細管。error bar：SD。肝臓との比を示した。

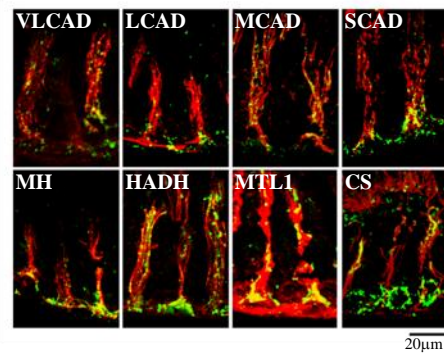


図 5) 蛍光抗体法による脂肪酸β酸化系酵素の検出。共焦点レーザー顕微鏡により精上皮を観察した。緑：各酵素、赤：チロシン化チューブリン (Sertoli 細胞)。

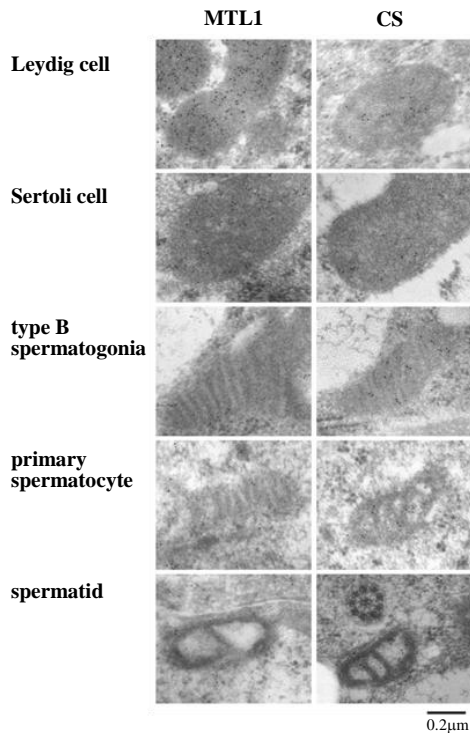


図 6) 免疫電顕法によるミトコンドリア脂肪酸β酸化酵素の検出。MTL1はSertoli細胞のミトコンドリアで陽性であるが、生殖細胞では陰性である。一方CSは、体細胞・生殖細胞の両方で陽性である。

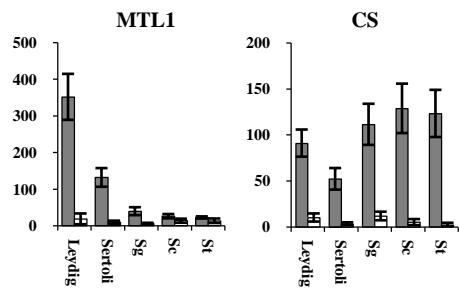


図 7) 免疫電顕法の所見の定量化。精巣の各細胞における単位面積 (μm^2) あたりの金粒子数を求めた。Sg: B型精祖細胞、Sc: 一次精母細胞、St: 精細胞。灰色: ミトコンドリア、白色: 細胞質。error bar: SD。

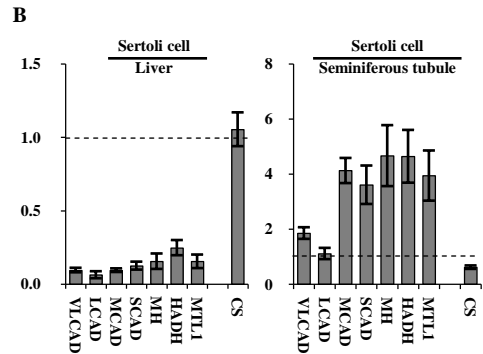
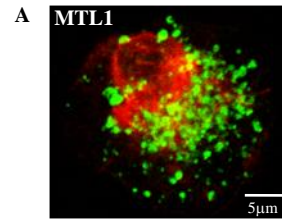


図 8) 単離した Sertoli 細胞の解析。A: 蛍光抗体法。緑: MTL1、赤: チロシン化チュブリン。MTL1 のシグナルは細胞質に顆粒状に見える。B: DNA microarray による遺伝子発現解析。左: 対 肝臓、右: 対 精細管との比を表した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Atsuzawa K, Usuda N, Nakazawa A, Fukasawa M, Danev R, Sugitani S, Nagayama K. High-contrast imaging of plastic-embedded tissues by phase contrast electron microscopy. *Journal of electron microscopy*, 58: 35-45, 2009, 査読有
- ② 大河原剛, 深澤元晶, 厚沢季美江, 臼田信光, 杉山敏. DEHP のメタボリックシンドロームのモデル動物への効果. *Therapeutic Research*, 29: 1913-1914, 2008, 査読無
- ③ 深澤元晶, 臼田信光, 中杉光宏, 厚沢季美江, 杉山敏. ラット腎臓発達過程におけるミトコンドリア脂肪酸β酸化系酵素の局在. *Therapeutic Research*, 28: 1942-1944, 2007, 査読無

[学会発表] (計 1 件)

- ① 深澤元晶, 「免疫組織化学の DNA マイクロアレイ法による評価」、日本解剖学会第 68 回中部支部学術集会、2008 年 10 月 11 日、愛知県名古屋市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深澤 元晶 (FUKASAWA MOTOAKI)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：70387728

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

臼田 信光 (USUDA NOBUTERU)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

厚沢 季美江 (ATSUZAWA KIMIE)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

中沢 綾美 (NAKAZAWA AYAMI)

藤田保健衛生大学・医学部・客員講師

水谷 謙明 (MIZUTANI KENMEI)

藤田保健衛生大学・医学部・助手