

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32425

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659764

研究課題名(和文) 男性不妊症に硫酸化糖脂質が関与する：モデルマウスと人工膜を用いた分子機構の解明

研究課題名(英文) Lack of a sulfated glycolipid results in male infertility: functional analyses in the testis of deficient mice

研究代表者

有富 桂子 (Aritomi, Keiko)

日本薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50142451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：硫酸化糖脂質セミノリピドは精巣糖脂質の90%を占める主要成分であり、精細胞のみに発現している。著者らはセミノリピドを欠損するマウスが、精子形成不全による男性不妊症を発症することを見出した。エーテル脂質欠損マウスや長鎖ガングリオシド欠損マウスにおいても精子形成不全が報告され、精子形成における脂質の重要性が示唆される。セミノリピド欠損が他の脂質へ与える影響を調べるため、野生型および欠損マウス精巣のリン脂質を分析したところ、日齢および遺伝子型による組成の変動がみとめられた。また、2D-DIGEによる精巣プロテオーム解析により、欠損マウス精巣において複数のタンパク質に発現変動がみとめられた。

研究成果の概要(英文)：More than 90% of the glycolipid in mammalian testis consists of a unique sulfated glycolipid, seminolipid. Seminolipid is synthesized by sequential action of the two enzymes, ceramide galactosyltransferase (CGT) and GalCer sulfotransferase (CST). Disruption of the Cgt and/or Cst gene in mice results in male infertility due to the arrest of spermatogenesis prior to the metaphase of the first meiosis. To clarify the process of germ cell degeneration in the absence of seminolipid, testicular lipids and proteins were analyzed in the wild-type and deficient mice. Age and genotype related changes were observed in some phospholipids. Proteomic analysis by two-dimensional DIGE showed that some protein spots were increased in the testis of deficient mice. Because seminolipid is expressed on the cell surface of primary spermatocytes, it was suggested that the lack of seminolipid may affect the formation of functional domains and/or cell junctions, which can mediate normal spermatogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：泌尿器科学

キーワード：硫酸化糖脂質 グリセロ糖脂質 リン脂質 精子形成 不妊症 プロテオーム 遺伝子変異マウス

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、硫酸基を含む糖脂質（硫酸化糖脂質）に関する基礎研究を行ってきた過程で、12種類の新規硫酸化糖脂質の発見と構造決定に成功し、硫酸化糖脂質にもガングリオシドに匹敵する構造の多様性が存在することを明らかにした。哺乳類の代表的な硫酸化糖脂質は、ガラクトシルスルファチド（GalCer I<sup>3</sup>-sulfate）とセミノリピド（GalEAG I<sup>3</sup>-sulfate）である。両者は糖鎖部分の構造は全く同じガラクトース 3-硫酸であるが、脂質部分の構造が異なり、前者はスフィンゴ糖脂質、後者はグリセロ糖脂質に分類され、2大硫酸化糖脂質というべき存在である（図1）。

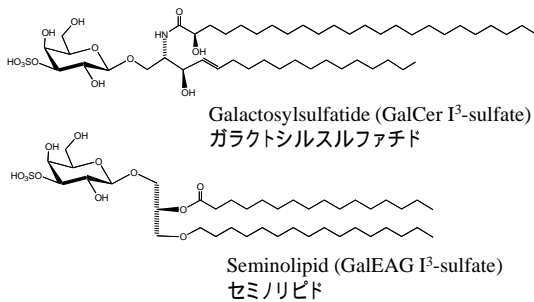


図1 代表的な硫酸化スフィンゴ糖脂質(ガラクトシルスルファチド)と硫酸化グリセロ糖脂質(セミノリピド)の構造

両者は同じ糖鎖構造(Gal 3-硫酸)をもち、脂質部分のみが異なる。

硫酸化スフィンゴ糖脂質の代表であるセミノリピドは脳神経系ミエリン鞘の主要構成脂質であり、次いで腎にも高濃度で存在する。一方、精巣と脳にはグリセロ糖脂質であるセミノリピドおよびその前駆体であるガラクトシルアルキルアシルグリセロール(GalEAG)が存在している。哺乳類で見いだされるグリセロ糖脂質はこの2つのみであり、セミノリピドは唯一の硫酸基をもつグリセロ糖脂質である。当初、共同研究者の1人であった故石塚らは、哺乳類精巣において、精巣と脳のみを発現するこのユニークな硫酸化糖脂質セミノリピドが高濃度に局在(精巣総糖脂質の90%)することを発見し、構造決定・機能解析へと研究を進めてきた。

糖脂質の糖鎖構造は多様であり、発現パターンは細胞の分化、がん化、情報伝達の過程でダイナミックに変化することが報告されている。糖脂質は特異的な糖転移酵素により糖鎖が1つずつ付加されることにより合成される。ペプチドのように遺伝子の直接支配を受けないため機能解析は進展せず、その実態は推測の域を出ていないものが多かった。近年、多くの糖転移酵素遺伝子がクローニングされ、それらを個体レベルで過剰発現あるいはノックアウトすることにより糖脂質組成を改変し、その生理機能を個体レベルで解析することが可能となった。

セミノリピドの生合成に直接関与する2つの酵素、ガラクトシルセラミド合成酵素(CGT)およびセレブロシド硫酸基転移酵素(CST)(図2)についても遺伝子ノックアウトマウスが作成された。CGT欠損(CGT KO)マウス精巣は野生型(WT)マウスの約1/4に萎縮し、正常な精細管の構造と精子形成がみとめられず、萎縮した精細管の中には多核化した細胞や変性した細胞が目立つ。さらに、CGT KOマウスではセミノリピドおよびその前駆体GalEAGの両方を、CST欠損(CST KO)マウスではセミノリピドを欠失し、両変異マウス共に後期パキテン期以降の精母細胞や精子細胞が存在せず、精子形成が第一減数分裂を完了する前に停止していることを見出した。この結果により、「糖脂質が減数分裂の進行に必須である」という全く新しい概念を提示することとなった。

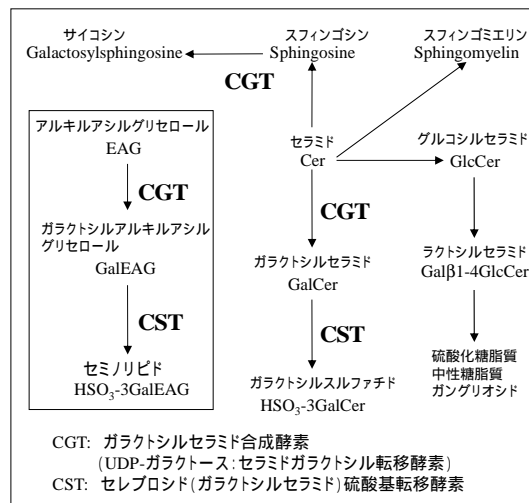


図2 CGT および CST が関与する代謝経路

CGTはセラミド(Cer)にガラクトースを転移してガラクトシルセラミド(GalCer)を合成する酵素であるが、スフィンゴシンにガラクトースを転移してサイコシンを合成する反応も触媒する。一方、精巣ではアルキルアシルグリセロール(EAG)からガラクトシルアルキルアシルグリセロール(GalEAG)を合成する反応を触媒する。GalCer および GalEAG に CST により硫酸基が転移されるとガラクトシルスルファチドおよびセミノリピドが合成される。精巣では EAG からセミノリピドに至る経路が主要経路である。

2. 研究の目的

本研究は、「セミノリピドが欠損するとなぜ精子形成が停止するのか?」という命題の解明を目的とする。脂質部分に注目すると、哺乳類の糖脂質は、その大部分が脂質部分にセラミドをもつスフィンゴ糖脂質であるのに対して、本研究の主題であるセミノリピドとその前駆体は、脂質部分にグリセロール骨格をもつグリセロ糖脂質である。一方、リン脂質についてはその大部分がグリセロリン脂質であり、セラミドをもつのはスフィンゴ

ミエリンのみである。興味深いことに、セミノリピドとその前駆体 GalEAG は、唯一、精細胞と精子にのみ高濃度で発現している。つまり、グリセロ糖脂質は、精巣のみに高濃度で発現していることになる。主要成分であるセミノリピドの欠損は精細胞の細胞膜の機能に著しい影響を与えることが予想され、他の脂質組成に代替的な変化が起きていることも予想される。この脂質組成の変化を分子種も含めて詳細に分析することは、「なぜ精巣だけはグリセロ糖脂質なのか」という命題の解明につながる。脂質代謝に関わる遺伝子変異マウスの中では、エーテル脂質欠損マウスや長鎖ガングリオシド欠損マウスにおいても、精子形成不全が報告され、精子形成における脂質の重要性が示唆される。精子形成における脂質の役割を解明することが、脂質や関連分子を標的とする男性不妊症の治療法や治療薬開発の糸口になると考えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス精巣の採取

ガラクトシルセラミド合成酵素 (CGT) (触媒する経路を図 2 に示す) 遺伝子ノックアウト (CGT KO) マウス、および同腹の野生型 (WT) マウスについて、日齢 (12 ~ 14 日) ごとに精巣を採取した。この時期は WT ではセミノリピド合成が開始し、KO マウスでは精子形成が停止する時期に相当する。

#### (2) 脂質抽出および薄層クロマトグラフィー (TLC)

精巣にクロロホルム/メタノール (2:1) および (1:2) を加えてホモジェナイズし、遠心分離後の上清を総脂質画分とした。

総脂質画分を HPTLC プレート (silica gel 60, Merck) にスポットし、クロロホルム/メタノール/7.5M アンモニア水 (9:5:1) による 1 段階展開、あるいは展開後さらにクロロホルム/メタノール/アセトン/酢酸/水 (8:2:4:2:1) による 2 段階展開により、主要リン脂質を完全に分離した。

展開後のプレートは酢酸銅試薬 (3% 酢酸銅/7% リン酸) で染色し、デンシトメトリー

(Versadoc、バイオ・ラッドラボラトリーズ (株)) により定量した。

(3) MALDI-TOFMS (matrix-assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法-飛行時間型質量分析) による分子種の解析

チタニア粉末 (ジーエルサイエンス株式会社より供与) はコリン残基を持つ脂質を特異的に吸着する性質がある。総脂質画分にチタニア粉末を入れて吸着後、溶出することでコリン含有リン脂質のみを分離し、質量分析用の試料とした。

マトリックスは 2,5-dihydroxybenzoic acid (島津ジーエルシー) を用い、正イオンリフレクトロンモード (Autoflex、Bruker Daltonics) で測定した。

(4) 脂質抽出残渣からのタンパク質抽出および 2-D DIGE (2-dimensional fluorescence difference gel Electrophoresis、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析システム) による解析

(2) の残渣にタンパク質抽出液 (2M チオウレア、7M ウレア、3% CHAPS、1% Triton X100) を加えて溶解し、遠心分離後の上清に 1.5M Tris (pH 8.8) を加えて pH 8 ~ 8.5 とし、これを DIGE の試料とした。

各々の試料について、異なる蛍光色素 (WT は IC3、KO は IC5、同仁化学) を加えて蛍光標識した後混合し、1 枚のゲルで電気泳動を行った。

二次元電気泳動は戸田らの方法に従い、固定化 pH 勾配等電点電気泳動用の乾燥ストリップゲルによる一次元目の等電点電気泳動の後、SDS 処理を経て二次元目の SDS 電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。一次元目は 1PG ストリップゲル (pH 3.0-10.0 NL、バイオ・ラッドラボラトリーズ (株))、二次元目は 12% SDS polyacrylamide を用いた。

泳動後、ゲルを固定・水洗し、Typhoon Trio (GE ヘルスケア・ジャパン (株)) を用いて解析した。

表 1 野生型 (+/+) および CGT 欠損 (-/-) マウス精巣のリン脂質濃度 (mg/g wet tissue)

age (days)	genotype	CL	PE	PC(UB)	PC(LB)	SM(UB)	SM(LB)	PS	PI
12	+/+	0.21	5.00	3.39	1.39	0.26	0.40	1.52	1.73
12	-/-	0.13	3.51	2.41	1.05	0.21	0.26	0.52	1.37
13	+/+	0.16	5.23	3.41	1.64	0.28	0.42	1.86	1.54
13	-/-	0.18	5.27	3.60	1.64	0.29	0.42	1.85	1.61
14	+/+	0.21	5.88	4.69	1.83	0.42	0.57	1.60	1.46
14	-/-	0.18	5.67	4.85	2.17	0.26	0.46	1.82	1.48
adult	+/+	0.14	3.93	4.54	1.48	0.08	0.28	1.66	0.98

TLC デンシトメトリーにより定量した (n=2)。

CL, cardiolipin; PE, phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine; SM, sphingomyelin; PS, phosphatidylserine; PI, phosphatidylinositol; UB, upper band; LB, lower band.

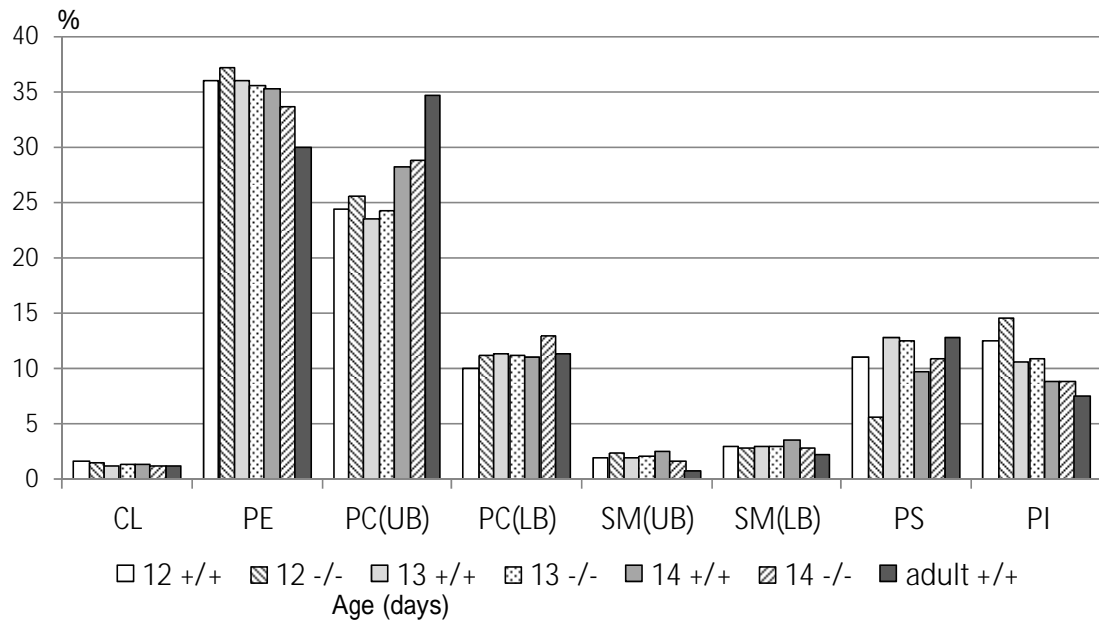


図3 野生型(+/+)およびCGT欠損(-/-)マウス精巢のリン脂質組成  
総リン脂質に対する各リン脂質の割合(%)で表示した。略語は表1参照。

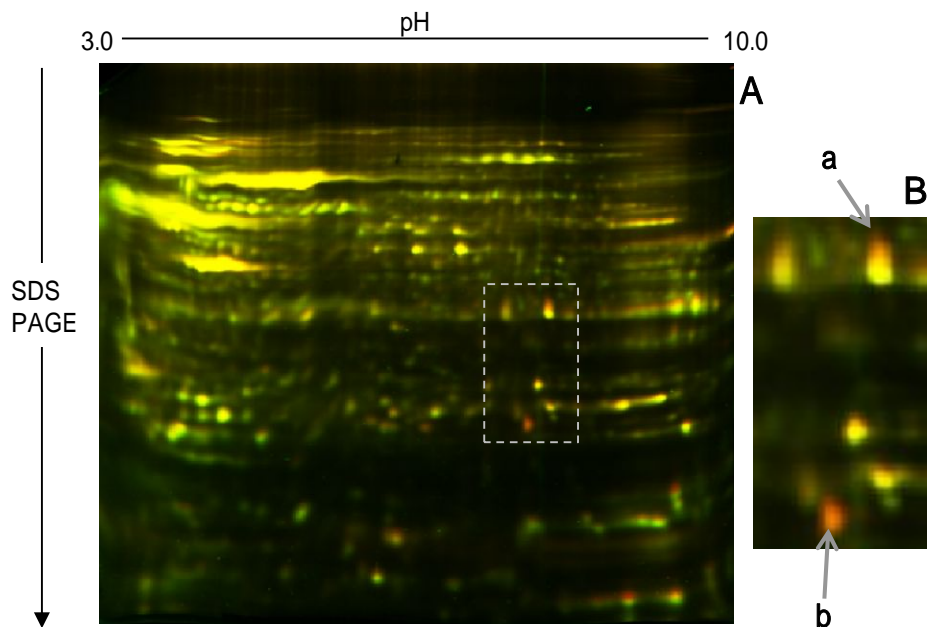


図4 2-D DIGE 法による精巣タンパク質のディファレンシャル解析  
IC3 (緑): 野生型 (+/+) マウス、14 日齢  
IC5 (赤): CGT 欠損 (-/-) マウス、14 日齢  
A : 二次元電気泳動パターン B : A の破線部の拡大図  
13 日齢でも、ほぼ同様の結果が得られた。12 日齢では b は黄色のスポットとして検出された。

#### 4. 研究成果

##### (1) 脂質分析

成熟過程の精巣の糖脂質組成の変化を WT マウスで追ってみると、生後 10 日齢で GalEAG およびセミノリピドが検出され始め、12 日齢では成熟精巣の約 60% の濃度まで著しく増加する。これはザイゴテン期の精母細胞が出現する時期に相当し、 $[^{35}\text{S}]$ 硫酸の取り込み実験から推定されるセミノリピド合成時期と一致する。また、KO マウスにおける精子形成停止の時期ともほぼ一致することが明らかとなっている。

この時期の精巣について主要なリン脂質の定量結果を表 1 および図 3 に示す。精巣リン脂質組成の概略は、ホスファチジルエタノールアミン (PE) とホルファチジルコリン (PC) が約 1/3 ずつを占め、残り 1/3 がホルファチジルセリン (PS) およびホスファチジルイノシトール (PI) で、スフィンゴミエリン (SM) とカルジオリピン (CL) は少ないことが分かった。WT と KO マウスの各リン脂質の濃度を比較すると、12 日齢では、PE、PC、PS が KO で低値であり、14 日齢では SM が低値であった。成熟精巣 (adult) と比較すると、12 日齢の PE を除き、WT、KO ともに PE および SM が高値であった (表 1)。

総リン脂質に対する各リン脂質の割合 (%) を比較すると、PE と PI は日齢とともに減少、PC (upper band) は増加がみとめられ、特に adult で高値であった。また、SM (upper band) は adult で低値を示した。WT と KO の比較では、12 日齢で PS が低値だった以外は大きな差はみとめられなかった (図 3)。

リン脂質はセミノリピドとともに精細胞の細胞膜を構成する脂質であり、12 日齢のみでみとめられた WT と KO の差は、この時期の WT で起こる急激なセミノリピドの増加を反映している可能性も示唆される。精巣全体におけるセミノリピド濃度は総リン脂質濃度の 1/10 程度であり、細胞膜全体でみれば、その脂質組成に与える影響は僅かと考えられるが、ラフトなどの特定の膜領域では大きな変化をもたらしている可能性がある。精子形成過程を正常に進行させるための情報伝達を担う場としての膜ミクロドメインの形成にこれらの変化が意味をもつとすれば、12 日齢あるいはそれ以前にみとめられる脂質組成の変化は、それ以降の精子形成の進行に大きな影響を与えている可能性も否定できない。

コリン含有脂質画分を MALDI-TOFMS で分析した結果、PC および SM に相当する分子関連イオンが検出された。PC のおもな脂肪酸分子種は C32:0 および C34:1、SM のおもなセラミド分子種は C16:0/d18:1 と予想された。定量結果では PC および SM の upper band および lower band の変動に差が認められ、これらは分子種による発現量の違いを反映していると考えられる。今後、より詳細な分子種分析

を行う必要がある。また、今回は精巣全体を用いて脂質を抽出したが、精巣には精細胞に比べて大型のセルトリ細胞が存在する。それぞれの細胞は精子形成において固有の不可欠な役割をもち、相互に協力することで、正常な精子形成が進行する。さらに、セルトリ細胞は血液精巣関門 (BTB) を形成し、精細胞を隔離して保護するとともに、その分化を制御している。セミノリピド欠失が膜ミクロドメイン動態を介して精細胞-BTB 相互作用の異常をもたらし、精細胞分化停止を引き起こすことも予想される。このように、精子形成における脂質の役割を検討するためには、精細胞とセルトリ細胞を分離し、それぞれについて分析する必要がある。両者を高純度、高収率で分取する方法の確立が今後の課題である。

##### (2) タンパク質分析

12~14 日齢の CGT KO マウス精巣タンパク質の二次元電気泳動像を、2-D DIGE 法により同日齢の WT と比較したところ、KO マウスで優位に発現が増加しているスポット (a および b) を見出した (図 4)。a は縦並びの一連のスポットの 1 つと考えられ、翻訳後修飾の違いを反映している可能性が示唆される。b は 12 日齢では差が検出されず、13 および 14 日齢の KO で発現が増加していた。これらのタンパク質は、セミノリピドの欠失から精子形成停止に至る情報伝達や BTB 形成などの過程に関与する可能性が示唆される。今後は再現性を検討するとともに、ゲル内消化-質量分析をもちいたペプチドマスフィンガープリント (PMF) 分析による同定を試みる予定である。

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hisaki H, Matsuda J, Tadano-Aritomi K, Uchida S, Okinaga H, Miyagawa M, Tamamori-Adachi M, Iizuka M, Okazaki T.: Primary polydipsia, but not accumulated ceramide, causes lethal renal damage in saposin D-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 査読有、Vol.303, No.7, 2012, F1049-1059

##### 〔学会発表〕(計 7 件)

久樹晴美、只野 - 有富桂子、宮川 誠、大熊-栗林恵美子、内田俊也、松田純子、戸田年総、岡崎具樹 : Saposin D 欠損マウスの 2D-DIGE タンパク質発現解析-炭酸脱水酵素 (CA2) との関連。第 86 回日本生化学会大会 (2013 年 9 月 11-13 日、横浜)  
久樹晴美、只野 - 有富桂子、宮川誠、内田俊也、松田純子、岡崎具樹 : Saposin D 欠損マウスの腎障害は複数の経産によって軽減する。第 85 回日本生化学会大会

(2012年12月14-16日、福岡)

只野-有富桂子、久樹晴美、宮川誠、岡崎具樹：Saposin D 欠損マウス消化管におけるヒドロキシセラミドの蓄積。第85回日本生化学会大会(2012年12月14-16日、福岡)

横山美紀、市野瀬志津子、市野瀬省三、多田晃弘、寺澤和恵、吉垣純子、只野-有富桂子、古川綱一、柳下正樹、岩淵和久：GM2GD2 合成酵素欠損マウスにおける血液-精巣関門の異常。第84回日本生化学会大会(2011年9月21-24日、京都)

只野-有富桂子、久樹晴美、横山三紀、山下竜幸、本家孝一、岡崎具樹：セミノリピド欠損マウスにおける精子形成不全：血液精巣関門との関連。第84回日本生化学会大会(2011年9月21-24日、京都)

久樹晴美、只野-有富桂子、内田俊也、松田純子、井上菜穂子、瀬藤光利、岡崎具樹：Saposin D 欠損マウスの病態進行とラフト画分へのヒドロキシセラミドの蓄積。第84回日本生化学会大会(2011年9月21-24日、京都)

井上菜穂子、早坂孝宏、Kessiri Kongmanas、Suraj Kadunganattil、Nongnuj Tanphaichitr、只野-有富桂子、久樹晴美、瀬藤光利：イメージングマススペクトロメトリーによる糖脂質の局在解析。第30回日本糖質学会年会(2011年7月11-13日、長岡)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

有富 桂子 (Aritomi, Keiko)  
日本薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号：50142451

### (2) 研究分担者

久樹 晴美 (Hisaki, Harumi)  
帝京大学・医学部・助教  
研究者番号：00094059