

論文の内容の要旨

論文題目： TPCL is a spermatid specific phospholipid species essential for spermatogenesis
(精子特異的に存在するカルジオリピン分子種の生理機能の解析)

氏名： 赤木 聡介

【序論】

生体膜リン脂質は、極性頭部と脂肪酸鎖の組み合わせにより生体内に千種類以上もの分子種が存在している。リン脂質はその多様性から、単なる膜のバリアとしての機能のみならず、膜タンパク質の活性調節等を通じ、様々な細胞機能に影響を及ぼすことが知られている。生体内では、特定の組織にしか存在しない組織特異的なリン脂質分子種が存在することは古くから知られており、近年、それらの組織特異的なリン脂質分子種が組織の機能を制御することが徐々に明らかとなってきている。しかし、生体組織を対象にした包括的なリン脂質リポドミクス解析の事例は乏しく、古くから知られている分子種の他に、生体内にどのような組織特異的なリン脂質分子種が存在するのか、およびその生理機能に関してはほとんど不明である。そこで、私は本研究において、生体組織を対象にしたリン脂質リポドミクス解析を駆使することで、生体内に存在する新たな組織特異的なリン脂質分子種の同定、および機能解明を目指した。

【方法と結果】

1. 飽和脂肪酸のみから構成されるリン脂質分子種 TPCL が精子細胞特異的に存在する

生体内に存在する組織特異的なリン脂質分子種を探索するため、私ははじめに、マウスの様々な組織を対象に、LC-MS/MS を用いたリン脂質リポドミクス解析を行なった。測定された全 293 種のリン脂質分子種に対し、1)絶対量、2)リン脂質クラス内での割合 (%)、に関する全 14 組織間での z-score を算出した。その結果、1), 2)どちらも $p < 0.01$ である 24 種を組織特異的なリン脂質分子種として同定した。これら 24 種のうち、精巣特異的に存在するカルジオリピン分子種 TPCL (Tetrapalmitoyl Cardiolipin。脂肪酸鎖が全て飽和脂肪酸であるパルミチン酸で構成)が最も z-score が高く、着目した。精子形成過程の細胞を調べた結果、TPCL は減数分裂後の、半数体で尾部が形成される過程にある伸長精子細胞で顕著に増加することを見出した。

カルジオリピン (CL)はミトコンドリアに局限して存在し、ミトコンドリア形態維持、呼吸鎖複合体活性など種々のミトコンドリア機能に関与するリン脂質であり、その脂肪酸鎖には通常、不飽和脂肪酸が主に結合している。そのため、飽和脂肪酸のみで構成される TPCL の脂肪酸鎖は非常にユニークであり、TPCL が精子細胞の分化や機能に関与する可能性が考えられた。

2. CDS1 依存的に産生される飽和 CDP-DAG が TPCL の産生に重要である

次に私は、精子細胞における TPCL の生理機能を明らかにするために、TPCL の産生機構の解明を目指した。CL は、グリセロール-3-リン酸を出発点として3つの中間代謝物 PA (Phosphatidic Acid)、CDP-DAG (Cytidine Diphosphate-Diacylglycerol)、PG (Phosphatidylglycerol)を介して

産生される。これらの中間代謝物の脂肪酸鎖組成を LC-MS/MS により解析した結果、精巣中の PA 分子種の中で飽和脂肪酸のみを持つ PA (飽和 PA)の割合はわずかなのに対して、飽和脂肪酸のみを持つ CDP-DAG (飽和 CDP-DAG)、PG 分子種 (飽和 PG)が豊富に存在することを見出した。このことから、TPCL のユニークな脂肪酸鎖組成は、PA を CDP-DAG に代謝する反応により規定されていることが強く示唆された。

PA を CDP-DAG に代謝する酵素の発現を調べたところ、CDS1 (CDP-DAG Synthase 1)が精巣に高発現しており、精子形成過程で発現が上昇することを見出した。そこで、CRISPR-Cas9 システムを用いて CDS1 欠損マウス (Δ/Δ マウス)を作製した。 Δ/Δ マウスの精巣および精子細胞では、飽和 CDP-DAG、飽和 PG、TPCL 量が顕著に減少し、逆に CDS1 の基質である飽和 PA 量が増加していた。このことから、精子形成過程において、CDS1 依存的に飽和 CDP-DAG が産生され、TPCL へと変換されることが明らかとなった。

3. CDS1 Δ/Δ マウスは精子形成異常を示し雄性不妊である

Δ/Δ マウスの精子細胞で TPCL が顕著に減少していたため、次に私は、 Δ/Δ マウスの表現型解析をおこなうことで、TPCL の精子形成への寄与を調べた。その結果、 Δ/Δ マウスは精巣上体中の精子数が 1/10 程度まで減少し、雄性不妊であることがわかった。雌の Δ/Δ マウスは正常な生殖能を示したため、TPCL が精子形成特異的に重要なリン脂質であり、TPCL の減少が雄性不妊の原因となることが明らかとなった。

4. CDS1 Δ/Δ マウスの精巣で、半数体の伸長精子細胞の分化異常が見られる

精子形成過程のどの段階が Δ/Δ マウスで異常となっているかを明らかにするために、次に私は、 Δ/Δ マウスの精巣のさらなる解析をおこなった。まず Δ/Δ マウスの精巣では、精原細胞の分化や減数分裂に異常は見られなかった。一方で、減数分裂後の半数体の精子細胞において、伸長精子細胞の細胞死と細胞数の減少が見られた。透過型電子顕微鏡を用いて詳細な形態を観察した結果、伸長精子細胞の分化後期の頭部形態形成、および細胞質の排出が異常となっていることを見出した。TPCL は伸長精子細胞で顕著に増加するリン脂質分子種であるため、TPCL は伸長精子細胞の分化に必要であり、伸長精子細胞の細胞死を伴う細胞数・精子数の減少が、 Δ/Δ マウスの雄性不妊の原因であることが示唆された。

5. TPCL の減少により、伸長精子細胞中の ROS が増加する

先に記した通り、CL はミトコンドリアに局限して存在し、呼吸鎖複合体をはじめとした様々なミトコンドリアタンパク質の活性を制御するリン脂質であるため、TPCL の減少によるミトコンドリア機能への影響を検証した。まず、 Δ/Δ マウスの精子形成過程の各細胞においてミトコンドリア数および形態に異常は見られなかった。また、 Δ/Δ マウスの精子形成過程の各細胞におけるミトコンドリア膜電位、および精巣の酸素消費速度は野生型と同程度であり、TPCL の減少は呼吸鎖複合体の活性には影響を与えないことがわかった。一方で、 Δ/Δ マウスの伸長精子細胞

において、ROS (活性酸素種)が有意に増加していることを見出した。また、 Δ/Δ マウスの生殖細胞において、CL に結合し、ペルオキシダーゼ活性を持つことが知られている Cytochrome c (Cyt.C)が細胞質へ顕著に放出されていた。これらの結果から、精子細胞特異的な TPCL は Cyt.C の制御を通じて、ROS 蓄積を抑制している可能性が示唆された。

6. TPCL は Cyt.C を強く保持し、ペルオキシダーゼ活性を顕著に上昇させる

Δ/Δ マウスの生殖細胞で Cyt.C の細胞質への放出が見られたため、次に私は、Cyt.C と TPCL の相互作用について *in vitro* のリポソーム共沈降実験により検証した。その結果、Cyt.C は不飽和脂肪酸を持つ体細胞型 CL に比べて TPCL への結合の親和性が高いことを見出した。また、Cyt.C のペルオキシダーゼ活性を調べたところ、体細胞型 CL に比べて TPCL に結合した Cyt.C は、ペルオキシダーゼ活性の顕著な上昇を示した。これらの結果から、TPCL は体細胞型 CL に比べて Cyt.C を強く保持し、ペルオキシダーゼ活性を顕著に上昇させることで ROS のクリアランスを促進している可能性が示唆された。

【まとめと考察】

本研究において私は、TPCL という飽和脂肪酸のみで構成されるリン脂質分子種が精子細胞特異的に存在し、精子形成過程で重要な役割を果たしていることを見出した。

体細胞の CL は不飽和脂肪酸から構成される一方で、精子細胞は TPCL という脂肪酸鎖の特徴が全く異なる CL 分子種を積極的に利用している点は、大変興味深い。CL は呼吸鎖複合体の活性制御に関わる一方で、アポトーシス刺激時には CL に結合した Cyt.C によって脂肪酸鎖の二重結合が酸化を受け、細胞死を促進するという二面性を持つリン脂質である。一方で TPCL の脂肪酸鎖は全て飽和脂肪酸であり、Cyt.C による酸化を受けない。そのため、精子細胞は TPCL を用いることで、尾部形成等の形態変化に伴い産生される ROS を、細胞死を起こさずクリアランスしている可能性が考えられる。これらを合わせると、過剰な ROS に対して、体細胞型の CL は機能不全細胞の細胞死を誘導することで組織恒常性維持に必要な一方で、TPCL は ROS をクリアランスすることで精子を残すために必要である可能性が考えられる。

また、伸長精子細胞は、細胞質成分を Residual Body (RB)として排出することで最終的に小型な精子へと成熟するが、 Δ/Δ マウスの伸長精子細胞は RB の排出異常を示した。*Drosophila*では RB 様構造の排出に、ミトコンドリア外膜上での Caspase 活性化が必要であることが報告されており、また、アポトーシス刺激時に CL は、ミトコンドリア外膜上で Caspase 活性化の足場を形成することも知られている。精子細胞特異的な TPCL は、ミトコンドリア外膜上での Caspase 活性化の足場を形成することで、RB 排出を促進している可能性も考えられる。今後は、*in vivo*, *in vitro* 双方の解析を通じて、精子細胞が TPCL という特徴的な CL 分子種を利用する生物学的意義を明らかにするとともに、本研究により同定された他の組織特異的なリン脂質分子種の生理機能の解析をおこなっていききたい。