

## 審査の結果の要旨

氏名 赤木 聡介

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特有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、赤木は本研究において、リン脂質リポドミクス解析技術を駆使することで、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。

生体内の組織特異的なリン脂質分子種を探索するため、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、脂肪酸鎖が飽和脂肪酸のみで構成される TPCL の存在は驚きであり、TPCL が精子細胞の分化や精子細胞特有の機能に関与する可能性が考えられた。

次に、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。

次に、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 ( $\Delta/\Delta$ マウス) を作製した。 $\Delta/\Delta$ 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。

$\Delta/\Delta$ マウスの精子細胞で TPCL が顕著に減少していたため、次に赤木は、 $\Delta/\Delta$ マウスの表現型解析を行なうことで、TPCL の精子形成への寄与を調べた。その結果、 $\Delta/\Delta$ 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 $\Delta/\Delta$ 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。

次に、 $\Delta/\Delta$ マウスの精巣のさらなる解析を行った結果、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。また、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。これらの結果から、TPCL は伸長精子細胞の分化に必要であり、 $\Delta/\Delta$ マウスの精巣において誘導される伸長精子細胞の細胞死が、精子数の減少に繋がっていると考えられる。

最後に赤木は、TPCL の作用機序の解明を目指した。CL はミトコンドリアに局限して存在し、呼吸能をはじめとした様々なミトコンドリア機能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。しかし、 $\Delta/\Delta$ 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・形態・膜電位は正常であり、単離ミトコンドリアの呼吸能も野生型と同程度であった。そのため、TPCL の減少はこれらのミトコンドリア機能には影響を及ぼさないことがわかった。

一方で、 $\Delta/\Delta$ マウスの伸長精子細胞において、ROS (活性酸素種) の増加が見られ、CL に結合し、ペルオキシダーゼ活性を持つタンパク質である Cytochrome c (Cyt. C) が細胞質へ顕著に放出されていた。また、*in vitro* のリポソーム共沈降実験の結果、Cyt. C は不飽和脂肪酸を持つ体細胞型 CL に比べて TPCL に親和性高く結合することがわかった。さらに、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。以上から、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 の除去を促進している可能性が示唆された。 $\Delta/\Delta$ マウスの精子細胞では TPCL の減少により、Cyt. C を介した ROS 除去能が低下することで、ROS 蓄積と細胞死が誘導されている可能性が示唆される。

本研究において赤木は、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、精子形成に重要であることを明らかにした。体細胞の CL は不飽和脂肪酸で構成される一方、精子細胞は TPCL という脂肪酸鎖の特徴が全く異なる CL 分子種を利用している点は大変興味深い。本研究は TPCL の“発見”に止まらず、“産生機構・生理機能の解明”に引き続き、“作用機序”を示唆するに至っており、首尾一貫した素晴らしい研究であると言える。

現在、カップルの 7 組に 1 組が不妊問題を抱えるなど、男性不妊は国際的な問題となっている。本研究でヒトの男性不妊と CDS1、TPCL の関係性を示唆するには至らなかったが、今後、実際の患者の検体を調べることで、CDS1、TPCL との関係性、ひいては男性不妊の原因の一端の解明に貢献できると期待される。

よって本論文は博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。