

3.Seminolipid、Basigin、monocarboxylate transporter 4 の相互作用は、精子形成におけるエネルギー源供給に必須である。

山下竜幸¹⁾, 仁尾景子¹⁾, 宮原馨²⁾, 本家孝一^{1),2)}

¹⁾高知大学医学部附属システム糖鎖生物学教育研究センター

²⁾高知大学医学部生化学講座

研究の背景と目的：哺乳動物の主要な硫酸化糖脂質の一つである seminolipid は、精巣の生殖細胞に特異的に発現し、cerebroside sulfotransferase(CST)という酵素によって合成される。Cst 遺伝子欠損マウスは、精巣において seminolipid を完全に欠き、精子形成は第一減数分裂中期までに停止して不妊になることから、seminolipid が精子形成において必須の分子であることが証明された。しかしながら、seminolipid の精子形成における分子機能は未だ不明のままであった。一方、糖タンパクの一種である basigin(CD147)も、精巣の生殖細胞に発現しており、このタンパクの欠損マウスは、Cst 遺伝子欠損マウス同様、精子形成が第一減数分裂中期までに停止して不妊になるが、その分子メカニズムについては解明されておらず、seminolipid との関連性についても調べられていなかった。我々は、basigin に対する抗体を用いた免疫組織染色及び免疫沈降実験を行い、精子形成細胞の膜マイクロドメインにおいて seminolipid と basigin が相互作用していることを明らかにした。さらに basigin 抗体を用いて得られた共沈降分子を LC-MS/MS 解析することにより、乳酸トランスポーターの一つである MCT(monocarboxylate transporter)-4 が、これら分子と相互作用している可能性をみいだした。今回の研究では、これら分子の相互関係と作用機序の解明を目的として、seminolipid 欠損マウスにおける MCT4 活性の変動と細胞死への影響を調べ、さらに各分子の役割についても検討した。

方法：まず seminolipid 欠損マウスと野生型マウスから精子形成細胞を取り出し、¹⁴C ラベルした乳酸を含む培地中でそれぞれ培養し、細胞内に取り込まれた ¹⁴C ラベル乳酸を経時的に液体シンチレーションカウンターで測定した。次に seminolipid 欠損マウスと野生型マウスから精子形成細胞を取り出し、低グルコース濃度でかつ乳酸を含む、または含まない培地中で培養し、アポトーシスに陥る時間を WST-1 アッセイ法により比較した。さらに、seminolipid 欠損マウス、basigin 欠損マウス、正常マウスの精子形成細胞 primary culture を seminolipid 抗体、basigin 抗体、MCT4 抗体で western blot 及び免疫染色し、比較検討した。

結果：seminolipid 欠損マウスは正常マウスと比較して有意に乳酸の取り込みの低下が認められた。正常マウスでは乳酸を含む培地でアポトーシスが抑制されるのに対し、seminolipid 欠損マウスでは、乳酸含有培地でもアポトーシスの抑制は認められなかった。以上の結果より、seminolipid 欠損マウスにおいて、MCT4 の機能異常が起こっていることが判明した。primary culture 実験の結果、seminolipid 欠損マウスでは basigin は膜に存在するものの、MCT4 は膜に存在できなくなっていた。basigin 欠損マウスでは seminolipid、MCT4 とともに膜に発現していた。

まとめ：seminolipid 欠損マウス、basigin 欠損マウスの精子形成中断の原因が MCT4 の機能障害によるエネルギー源の枯渇によるものであることが判明した。さらに、seminolipid は膜への MCT4 の輸送に関り、basigin は MCT4 の膜での機能に関わっている可能性が示唆された。