

—総説—

特集：卵子学会トピックス 2018

精子形成におけるペルオキシソームの役割 Peroxisomal protein function and spermatogenesis

水野 由美^{1*}・梶原 健¹・水野 洋介²・石原 理¹
Yumi Mizuno^{1*}, Takeshi Kajiwara¹, Yosuke Mizuno² and Osamu Ishihara¹

¹埼玉医科大学病院産科婦人科 〒350-0495 入間郡

²埼玉医科大学中央研究施設日高ランチ機能部門 〒350-1241 日高市

¹Department of Obstetrics & Gynecology, Saitama Medical University Hospital, 38 Morohongo, Irumagun Moroyamamachi, Saitama 350-0495, Japan

²Hidaka Branch, Biomedical Research Center, Saitama Medical University, 1397-1 Yamane, Hidaka, Saitama 350-1241, Japan

要旨：ペルオキシソームは細胞内小器官の一種で、超長鎖脂肪酸のβ-酸化やフィタン酸の代謝、プラスマローゲン合成、DHA合成、過酸化水素の分解などの重要な役割を担っている。ペルオキシソームに関連する遺伝子を欠損したマウスでは雄性不妊が多くみられることから、ペルオキシソームは精子形成においても重要な働きをしていると考えられる。本稿では、これまでの研究から明らかとなった精巣内のペルオキシソームタンパク質の局在や、ペルオキシソーム関連遺伝子のノックアウトマウスの解析などを考察し、精子形成におけるペルオキシソームの役割について述べたい。

キーワード：精子形成, ペルオキシソーム, 奇形精子

Abstract: Peroxisomes are intracellular organelles responsible for crucial lipid metabolism including β-oxidation of very long chain fatty acids, metabolism of phytanic acid, plasmalogen synthesis, DHA synthesis, and hydrogen peroxide decomposition. Peroxisomes also seem to play important roles in spermatogenesis, as various grade male infertility has been frequently observed in knockout mice lacking genes related to peroxisomes. In this paper, we discuss the role of peroxisomes in spermatogenesis based on the localization of peroxisomal proteins in the testis and the analysis of knockout mice with genes involved in peroxisomal lipid metabolism.

Key words: Spermatogenesis, Peroxisome, Teratozoospermia

はじめに

ペルオキシソームは細胞内小器官の一種で、超長鎖脂肪酸のβ-酸化やフィタン酸の代謝、プラスマローゲン合成などの役割を担っている。ペルオキシソームの異常によって発症するペルオキシソーム病は、一般的にはZellweger症候群や、レフサム病、X連鎖性副腎白質ジストロフィーなどが知られているが、それ以外にもペルオキシソームの形成不

全やペルオキシソームで働く脂質代謝の酵素の欠損など多岐にわたり、その臨床所見もその原因により様々である¹⁾。また近年では、これまでのペルオキシソーム病の報告と異なる軽症例の報告や、アルツハイマー病やパーキンソン病、加齢による神経変性疾患とペルオキシソーム機能の低下との関連が報告されている²⁾。ペルオキシソームの脂質代謝酵素の遺伝子欠損マウスでは、運動障害、神経障害、難聴、低体長・低体重などの症状を併発し、生存期間も野生型マウスに比べて短く^{3,4)}、ペルオキシソーム病様の症状を呈していた。また、興味深いことにこれらのマウスは無精子症による雄性不妊を呈することが明らかとなった⁵⁾。2007年には、Tysnd1 (Trypsin domain containing 1) という新規のペルオキシソームタンパク質が同定された⁶⁾。このTysnd1欠損マウスは、ペルオキシソームの機能低下は軽度であり、一見正

(受付 2019年6月30日／受理 2019年7月19日)

別刷請求先：〒350-0495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38

埼玉医科大学病院産科婦人科

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: yumimi@saitama-med.ac.jp

常に成長するものの奇形精子が多く観察されて雄性不妊を呈した⁷⁾。このように、ペルオキシソームの機能低下が軽度であっても雄性不妊を呈することから、ペルオキシソームが精子形成に重要な役割を持つことが明らかとなった。本稿では、ペルオキシソームの機能と精子形成についてのこれまでの知見をまとめ、精子形成におけるペルオキシソームの役割について考察したい。

精巣でのペルオキシソームの機能

精巣には精細管と呼ばれる管があり、その内側には精子に分化する生殖細胞とその支持細胞であるセルトリ細胞が存在する。生殖細胞は、精原細胞から分化し、減数分裂をして精母細胞を経たのち円形精子細胞が形成される。その後、円形精子細胞はダイナミックな形態変化により尾部が形成されて精子が作られる⁸⁾。セルトリ細胞は、生殖細胞分化における全ての過程の細胞で物理的に密接し、精子形成に必須な役割を持つと考えられている。例えば、精原細胞の複製の維持、減数分裂の開始、ホルモンの分泌、形成された精子の離脱の補助、精子形成後生じる残余小体の貪食などに関与するとされている⁸⁾。そのほか精巣には、精細管の外側でアンドロゲンの産生と分泌に関わるライディッヒ細胞が存在する⁹⁾。

ペルオキシソームは雄性生殖細胞やセルトリ細胞、ライディッヒ細胞のいずれにも存在することが精巣切片の免疫組織学的解析から明らかとなっている¹⁰⁻¹²⁾。ペルオキシソームで働く酵素は、その種類によって細胞内局在に特徴があることが活性染色や免疫組織学的染色により調べられている。例えば、抗酸化に関わるCatalaseは精原細胞¹⁰⁾やライディッヒ細胞^{11, 12)}に局在する。脂肪酸 β -酸化やDHAなどの多価不飽和脂肪酸合成に関わるThiolaseは、ライディッヒ

細胞やセルトリ細胞に局在する¹¹⁾。また、超長鎖脂肪酸の β -酸化に関わるACOX1や脂質のトランスポーターの役割を持つABCD1は、セルトリ細胞や円形精子細胞に多く局在する¹¹⁾。このように、各細胞の役割とペルオキシソーム酵素の働きとはなんらかの関連があるものと考えられる(表1)が、その詳細については未解明な部分があり、今後の課題として多く残されているのが現状である。

ペルオキシソームの脂質代謝関連遺伝子を欠損したマウスでみられる雄性不妊① MFP-2 欠損マウス；無精子症

ペルオキシソームの脂質代謝に関わる酵素を欠損したマウスでは雄性不妊を示すとの報告が複数ある^{4, 5)}。MFP-2 (Maltufunctional Protein 2, D-bifunctional protein) は、超長鎖脂肪酸の β -酸化や分岐鎖脂肪酸の代謝、胆汁酸合成やDHAなどの多価不飽和脂肪酸の合成など多岐にわたる機能を持った酵素であるが、このMFP-2を欠損したマウスは雄性不妊であることをHuygheらが報告している⁵⁾。野生型マウスでは、脂質は主にライディッヒ細胞に多く存在し、精細管内ではほとんど観察されない⁵⁾。しかし、MFP-2欠損マウスでは、精細管内に脂肪滴が出現し、加齢に伴いその脂肪滴が大きくなる様子が観察された⁵⁾。はじめに5週齢で精細管の基底部に小さな脂肪滴が出現し、7週齢ではそれが大きくなるとともに、精子の形態変化に障害が起こるために精巣上体には成熟精子が存在せず、未成熟な円形の精子細胞のみが観察される。さらに、12週齢では精細管のほとんどの細胞が脂肪滴に置き換わっている様子が観察されている⁵⁾。この精細管の脂肪滴の蓄積は、主にセルトリ細胞で観察されており⁵⁾、ペルオキシソームの脂質代謝異常により蓄積した脂肪滴がセルトリ細胞の機能に影響したものと考えられる。

表1 精細管内のペルオキシソームタンパク質の細胞内局在

| Function | Gene name | Localization | Reference |
|---|-----------------------|--|---|
| Rete limiting enzyme of β -oxidation | ACOX1 | Sertoli cells Round spermatids | Nenicu A. et al. ¹¹⁾ Dastig S. et al. ¹²⁾ |
| Tetraminal enzyme of β -oxidation | ACAA1 (Thiolase A) | Leydige cells Sertoli cells | Nenicu A. et al. ¹¹⁾ |
| Lipid transfer, Terminal enzyme of branched chain fatty acids | SCP-2 (SCP2, SCPX) | Leydige cells | Li NC. et al. ¹⁴⁾ |
| Plasmarogen biogenesis | GNPAT | Round spermatids | Nenicu A. et al. ¹¹⁾ |
| ABC transporter | ABCD1 | Sertoli cells Round spermatids | Nenicu A. et al. ¹¹⁾ Dastig S. et al. ¹²⁾ |
| Catalase | CAT | Spermatogonia Leydige cells | Lüers GH. et al. ¹⁰⁾ Nenicu A. et al. ¹¹⁾ Dastig S. et al. ¹²⁾ |
| Peroxiredoxin | PRDX5 | Spermatocyte | Dastig S. et al. ¹²⁾ |
| Peroxisomal import machinery | PEX14 | All germ cells Sertoli cells Residual bodies | Nenicu A. et al. ¹¹⁾ Dastig S. et al. ¹²⁾ Nenicu A. et al. ¹¹⁾ |

新規ペルオキシソームタンパク質 Tysnd1 の同定

ペルオキシソームで働くタンパク質は、転写・翻訳後、ペルオキシソームに運ばれるが、その運搬システムにおいて受容体が認識する配列がペルオキシソーム局在化シグナル (PTS) である。PTSにはタンパク質のC末端に存在するPTS1とN末端に存在するPTS2の2種類があり、それぞれに対応する受容体がPTS配列を認識することでペルオキシソームに運搬される。Tysnd1は、ペルオキシソームの脂質代謝酵素を切断して成熟化させるプロテアーゼであり、PTS1を持つタンパク質とPTS2を持つタンパク質の両方を切断する性質を持つ (図1A)。特にPTS2をもつタンパク質は、ペルオキシソームに運搬された後に、PTS部分でTysnd1によって切断されることで安定してペルオキシソームに局在することができる⁷⁾。このような機能からTysnd1は、ペルオキシソームの脂質代謝の機能に影響を及ぼす。ただし、ペルオキシソームで働くタンパク質の酵素活性そのものはTysnd1による切断の影響を受けないことから、Tysnd1欠損マウスでは、ペルオキシソームの脂質代謝機能が大きく損なわれることはなく、軽度な低下に留まる。(図1B)。

ペルオキシソームの脂質代謝関連遺伝子を欠損したマウスでみられる雄性不妊② Tysnd1欠損マウス；奇形精子

Tysnd1欠損マウスは、体長・体重は正常で、modified-SHIRPAによる観察でも異常はみられなかった⁷⁾。しかし、ペルオキシソーム機能を詳細に解析すると、Tysnd1欠損マウスでは、ペルオキシソームの脂肪酸β酸化活性の低下やフィタン酸の代謝機能低下などがみられた。ただし、Tysnd1欠損マウスは、ペルオキシソーム酵素そのものを欠損した場合と異なり、脂質代謝機能が全くなくなることはなく、ペルオキシソームの脂質代謝機能は軽度の低下にとどまり、超長鎖脂肪酸のβ酸化においては、野生型マウスの約60%の活性があった⁷⁾。この軽度のペルオキシソーム機能低下Tysnd1欠損マウスのオスでは、奇形精子が多くみられ、野生型のメスとの自然交配では全く妊娠せず、雄性不妊であることが分かった。精巣上体精子を詳細に解析したところ、正常とみられる精子と奇形精子が混在し、特に特徴的な奇形では、円型頭部精子 (図2) が多くみられ、正常な精子形態と思われるものは1割程度であった⁷⁾。円形頭部精子では、先体が欠如しているものもみられた。その原因の1つとしては、ペルオキシソームで初期合成が行われるプラスマローゲンを構成する分子種が変化し、先体膜が脆弱になった可能性が考えられた⁷⁾。

まとめ

ペルオキシソームは、生体において重要な脂質代謝を担っており、精子形成においても重要な役割を持っている。精細管においては、生殖細胞やセトリ細胞、ライディッヒ細胞

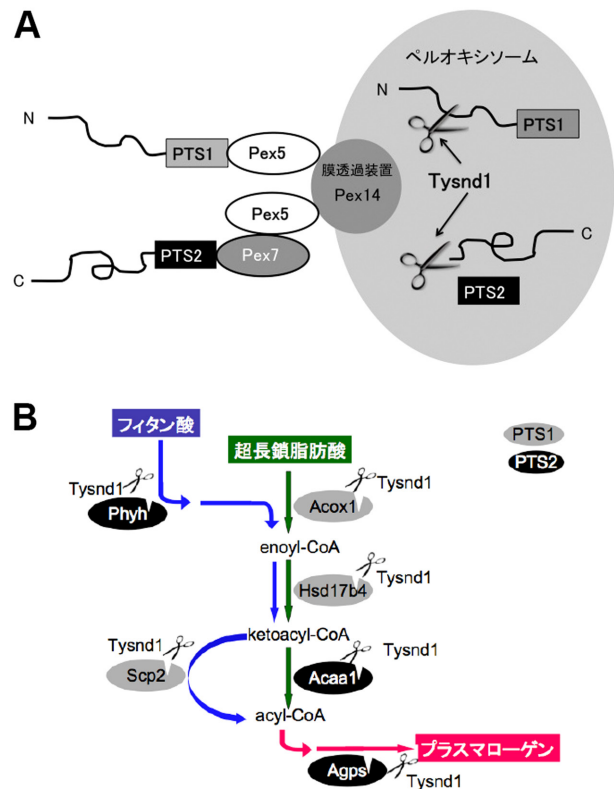


図1 ペルオキシソームで働くTysnd1の役割を簡潔に示した図
A: Tysnd1は、PTS1およびPTS2を持つタンパク質を切断する。PTS1を持つタンパク質はPex5と、PTS2を持つタンパク質は、PTS7またはPTS5とPTS7の複合体と結合し、ペルオキシソームの膜上に存在するPex14の働きによりペルオキシソームのなかに入る。ペルオキシソーム内に入ったタンパク質は、Tysnd1により切断されて成熟化する。B: Tysnd1は、ペルオキシソーム内において脂質代謝に関わる酵素を切断する。PTS1は、ペルオキシソーム局在化シグナルタイプ1を持つタンパク質 (酵素)、PTS2はペルオキシソーム局在化シグナルタイプ2を持つタンパク質 (酵素) である。超長鎖脂肪酸は炭素鎖が24以上の直鎖の脂肪酸であり、緑の矢印の経路により炭素鎖が2つずつ切断されて短くなる (脂肪酸のβ酸化)。フィタン酸は、分岐鎖脂肪酸の一種でPhyhにより炭素鎖19のプリスタン酸に分解された後、超長鎖脂肪酸と同じ酵素によりβ酸化される。ペルオキシソームでβ酸化された超長鎖脂肪酸は長鎖脂肪酸となり、ミトコンドリアに運ばれてさらに代謝されるか、プラスマローゲン合成の材料として使われる。プラスマローゲンは、最終的に小胞体にて合成される。このようなペルオキシソームの脂質代謝を担う主な酵素を切断して活性化する役割を持つのがTysnd1である。

にペルオキシソームが存在している。興味深いことに、ペルオキシソームで働く酵素には、その種類によって特徴的な細胞内局在がみられる。このことから、精細管の基底部分から発生する精子形成過程の秩序立ったシステムの一部として、ペルオキシソーム酵素が何らかの役割を持っていると考えられる。またTysnd1欠損マウスにおける奇形精子の発生に

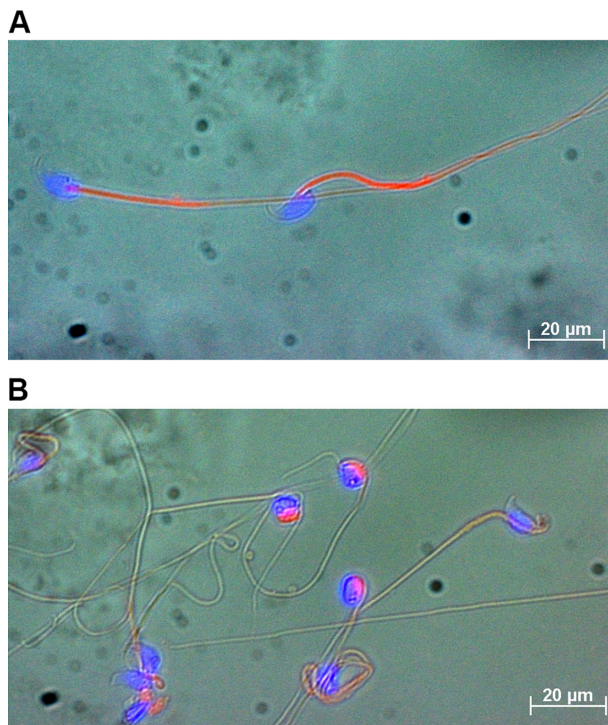


図2 Tysnd1欠損マウスの奇形精子

A：野生型マウスの精子。B：ペルオキシソームの機能が軽度低下したTysnd1欠損マウスの精子。青：DAPIによる核の染色。赤：MitoFluorRedによるミトコンドリアの染色。BのTysnd1欠損マウスの精子は、頭部が丸く、尾部にあるべき中片が頭部に存在している。

関しては、ペルオキシソームの機能低下によるプラズマローゲン合成の低下が原因の1つとして考えられた。プラズマローゲンはペルオキシソーム内で基本骨格が形成された後に小胞体において合成される。このため、ペルオキシソームの機能低下が原因で発症する男性不妊の治療方法を考える場合には、ペルオキシソームで合成されるプラズマローゲンの前駆体の投与が有効である可能性がある。また、精巣のペルオキシソームを活性化させる薬剤の開発なども治療につながる可能性が高い。ペルオキシソームの機能は加齢によって低下するという報告もあるため¹³⁾、今後は、加齢と精子形成の関連においてもペルオキシソームの役割が明らかになると考える。

精子形成は、様々な因子により秩序だったシステムで進行する点で非常に興味深い生命現象であり、精子形成過程の詳細な機構が解明されていくことを期待する。

謝 辞

第59回日本卵子学会において、シンポジウム「精子研究の最前線」での講演の機会をいただきましたことを御礼申し上げます。本稿では、細胞内小器官の一種であるペルオキシソームが精子形成とどのように関わっているのかを中心

に、これまでの研究内容とこれからの展望について執筆させていただきました。本稿が、少しでも皆様のお仕事にお役に立てば幸いです。

本稿は、科学研究費（基盤研究C, 17K11208）および内藤財団女性研究者研究助成金の一部助成を受けたものです。

文 献

- 1) Wanders, R.J.A. (2018): Peroxisomal disorders: Improved laboratory diagnosis, new defects and the complicated route to treatment. *Mol. Cell. Probes*, 240, 60–69.
- 2) Jo, D.S. and Cho, D.H. (2019): Peroxisomal dysfunction in neurodegenerative diseases. *Arch. Pharm. Res.*, 42, 393–406.
- 3) Huyghe, S., Schmalbruch, H., Hulshagen, L., Veldhoven, P.V., Baes, M. and Hartmann, D. (2006): Peroxisomal multifunctional protein-2 deficiency causes motor deficits and glial lesions in the adult central nervous system. *Am. J. Pathol.*, 168, 1321–1334.
- 4) Fan, C.Y., Pan, J, Chu, R, Lee, D, Kluckman, KD, Usuda, N, Singh, I, Yeldandi, AV, Rao, M.S., Maeda, N. and Reddy, J.K. (1996): Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene. *J. Biol. Chem.*, 271, 24698–24710.
- 5) Huyghe, S., Schmalbruch, H., De Gendt, K., Verhoeven, G., Guillou, F., Van Veldhoven, P.P. and Baes, M. (2006): Peroxisomal multifunctional protein 2 is essential for lipid homeostasis in Sertoli cells and male fertility in mice. *Endocrinology*, 147, 2228–2236.
- 6) Kurochkin, I.V., Mizuno, Y., Konagaya, A., Sakaki, Y., Schönbach, C. and Okazaki, Y. (2007): Novel peroxisomal protease Tysnd1 processes PTS1- and PTS2-containing enzymes involved in beta-oxidation of fatty acids. *EMBO J.*, 26, 835–845.
- 7) Mizuno, Y., Ninomiya, Y., Nakachi, Y., Iseki, M., Iwasa, H., Akita, M., Tsukui, T., Shimozawa, N., Ito, C., Toshimori, K., Nishimukai, M., Hara, H., Maeba, R., Okazaki, T., Alodaib, A.N., Al Amoudi, M., Jacob, M., Alkuraya, F.S., Horai, Y., Watanabe, M., Motegi, H., Wakana, S., Noda, T., Kurochkin, I.V., Mizuno, Y., Schönbach, C. and Okazaki, Y. (2013): Tysnd1 deficiency in mice interferes with the peroxisomal localization of PTS2 enzymes, causing lipid metabolic abnormalities and male infertility. *PLoS Genet.*, 9, e1003286.
- 8) 秋山耕陽 (2011): 哺乳類の精子形成を制御する分子機構。動物遺伝育種研究, 39, 75–94
- 9) Dohle, G.R., Smit, M. and Weber, R.F. (2003): Androgens and male fertility. *World J. Urol.*, 21, 341–345.
- 10) Lüers, G.H., Thiele, S., Schad, A., Völkl, A., Yokota, S. and Seitz, J. (2006): Peroxisomes are present in murine spermatogonia and disappear during the course of spermatogenesis. *Histochem. Cell Biol.*, 125, 693–703.

- 11) Nenicu, A., Lüers, G.H., Kovacs, W., Bergmann, M. and Baumgart-Vogt, E. (2007): Peroxisomes in human and mouse testis: differential expression of peroxisomal proteins in germ cells and distinct somatic cell types of the testis. *Biol. Reprod.*, 77, 1060–1072.
- 12) Dastig, S., Nenicu, A., Otte, D.M., Zimmer, A., Seitz, J., Baumgart-Vogt, E. and Lüers, G.H. (2011): Germ cells of male mice express genes for peroxisomal metabolic pathways implicated in the regulation of spermatogenesis and the protection against oxidative stress. *Histochem. Cell Biol.*, 136, 413–425.
- 13) Stewart, A.F. and Kim, E.D. (2011): Fertility concerns for the aging male. *Urology*, 78, 496–499
- 14) Li, N.C., Fan, J. and Papadopoulos, V. (2016): Sterol carrier protein-2, a nonspecific lipid-transfer protein, in intracellular cholesterol trafficking in testicular leydig cells. *PLoS One*, 11, e0149728.