OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Testis-Specific Sulfoglycolipid, Seminolipid Is Essential for Germ Cell Function in Spermatogenesis
Author(s)	張, 彦龍
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45392
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏名	張（チョウ） 彦龍（エン リョウ）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 19260 号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Testis-Specific Sulfoglycolipid, Seminolipid Is Essential for Germ Cell Function in Spermatogenesis **（精巣に特異的な硫酸化糖脂質のセミノリピドは精子形成における胚細胞機能に必須である）**
論文審査委員	（主査） 教授 谷口 直之 （副査） 教授 岡本 光弘　教授 奥山 明彦

論文内容の要旨

〔 目　　的 〕

哺乳動物の精巣では、糖脂質の90%以上はセミノリピドという精巣に特異的な硫酸化糖脂質で占められている。セミノリピドの硫酸化は、ゴルジ膜に局在するセレブロシドスルホトランスフェラーゼ（CST）によって触媒される。CSTノックアウトマウスの精巣はセミノリピドを完全に欠損し、精子形成が第一減数分裂の中期までに中断して男性不妊になる。しかし、この変異マウスでの異常が、胚細胞側にあるのか支持細胞であるセルトリ細胞側にあるのかは不明である。そこで、本研究では、CSTノックアウトマウスの精巣に野生型マウスの胚細胞を移植して精子形成が正常に進むか否かを調べることにより、セミノリピドが胚細胞とセルトリ細胞のどちら側で機能しているかを明らかにすることを目的とした。さらに、セミノリピドを介する分子メカニズムを明らかにするために、マウス精巣におけるセミノリピドの局在と発現時期を明らかにすることを目的とした。

〔 方法ならびに成績 〕

移植後、レシピエント精巣内でのドナー細胞のコロニー形成を明瞭にするために、ドナー細胞はgreen fluorescent protein（GFP）を全身に発現するグリーンマウスの生後6日の精巣から調製した。この時期の精巣は、胚細胞としては殆んどタイプA精原細胞のみから成ることが知られている。このドナー細胞を、ブスルファンで前処理したCSTノックアウトマウスの精細管に移植した結果、GFP陽性の胚細胞は定着し、精細管に沿って増殖伸展した。移植3カ月後、レシピエント精巣は大きくなり、組織学的観察により一部の精細管内に成熟した精子を認めた。移植5ケ月後には、およそ3分の2の精細管の中に成熟した精子を認めた。この結果は野生型の胚細胞はCSTノックアウトマウスの精巣内で正常に精子形成を進行することができることを示し、この変異マウスの異常は胚細胞側に存在することを明確に示した。また、CSTノックアウトマウスの精巣において、体細胞側の機能が保持されていることも判明した。

しかし予想に反し、この移植されたマウスは精巣上体に精子が存在せず、不妊であった。一見成熟した精子に別の異常が存在するか、精巣上体上皮側に何らかの異常が存在する可能性が考えられた。後者の可能性を検証するために、硫酸化糖脂質が精巣上体上皮に存在するか否かを免疫組織化学染色で調べた。野生型マウスとCSTノックアウトマウス由来の精巣上体切片を抗硫酸化糖脂質モノクローナル抗体Sulph1で免疫染色した。その結果、野生型マウスの

精巣上体上皮にのみ顆粒状の染色パターンが認められ、精巣上体上皮にも硫酸化糖脂質が発現していることがわかった。精巣上体における硫酸化糖脂質の構造と機能解明は将来の課題である。

また、マウス精巣におけるセミノリピドの局在を、Sulph1 による免疫組織化学染色で調べた。Sulph1 の反応性を保証するために、野生型マウスと CST ノックアウトマウス由来の精巣を比較した。この結果、CST ノックアウトマウス由来の精巣内ではどの細胞も染色されなかったのに比較して、野生型マウス精巣では精原細胞、精母細胞、精子細胞、精子の細胞膜が明瞭に染色された。

次に、セミノリピドの発現時期を知るために、生後６－18 日の若いマウスの精巣について、CST 遺伝子とセミノリピド前駆体を生合成するセラミドガラクトシルトランスフェラーゼ（CGT）遺伝子の発現を RT-PCR で、セミノリピドの発現を Sulph1 による免疫組織化学染色で調べた。CST 遺伝子と CGT 遺伝子の転写物は、両者とも生後８日から明瞭に出現しはじめた。また、生後６日の精巣は Sulph1 で染色されなかったが、生後８日の精巣では一部の精細管で弱いながら確かな染色を認め、生後 10 日の精巣では一部の精細管で強い染色がみられた。生後 12 日では不均一性が残っていたが、生後 14 日以降は全ての精細管が強く染色された。生後８日はタイプ B 精原細胞が出現する時期にあたることから、セミノリピドは分化した精原細胞以降の胚細胞において細胞膜に発現することが明らかとなった。

〔　総　　括　〕

本研究により、セミノリピドが精子形成における胚細胞機能に必須であることが示され、細胞膜構成分子であるセミノリピドが、胚細胞相互作用において重要な役割を果たすことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

哺乳動物の精巣には、セミノリピドという精巣に特異的な硫酸化糖脂質が存在する。セミノリピドの硫酸化に働くセレブロシドスルホトランスフェラーゼ（CST）のノックアウトマウスでは、精子形成が第一減数分裂の中期までで停止し、不妊になることから、セミノリピドが精子形成に必須であることがわかっていたが、セミノリピドが生殖細胞側の機能に必要なのかセルトリ細胞側の機能に必要なのかは不明であった。本論文は、green fluorescent protein（GFP）を全身に発現するグリーンマウス由来の精原細胞を CST ノックアウトマウスの精細管に移植して、精子形成が正常に進行することを示し、セミノリピドが生殖細胞側の機能に必要であることを明らかにした。さらに、セミノリピドが、タイプ B 精原細胞から精子にいたる生殖細胞においての細胞膜に発現していることを明らかにした。

本論文は、精子形成における必要性が遺伝学的に証明された硫酸化糖脂質の作用点を明らかにし、作用メカニズム解明に寄与した。よって、本学の学位を授与するに値するものと判断した。