

ブタ精子の直進運動におけるグルタチオン産生に関与する機能性酵素の合成

河村 朔良, Wambugu Enoc Njoroge, 島田 昌之

広島大学大学院 統合生命科学研究科

序 論

精子の運動性, 特に高速直進運動は, 体内受精の成功に不可欠であり, 大量のATPを必要とする. この運動はブタ精子では低グルコース条件下で誘導され, 代謝が解糖系からミトコンドリアの酸化的リン酸化 (OXPHOS) へと切り替わる¹⁾. しかし, OXPHOSは効率的にATPを生成する一方で, 活性酸素種 (ROS) も副産物として発生させ, 脂質過酸化やDNA損傷を引き起こすため, 精子は酸化ストレスに極めて弱いことが知られている. そのため, 精子の保存や凍結・融解過程で抗酸化物質を添加することが酸化ストレス軽減に有効であり, 運動性や受精能の維持に寄与する^{2,3)}.

一方で, 精子自体も抗酸化能力を保持しており, グルタチオン (GSH) はその中心的な抗酸化物質である. Zhuらの研究では, ブタ精子がシステイン (Cys) を基質としてグリシン (Gly) やグルタミン酸 (Glu) とともにGSHを合成し, 高速運動性を維持することが示された⁴⁾. CysはGSH合成における律速基質であるが, 精子内では不安定かつ酸化しやすく, 精漿液中でも含有量が非常に少ない⁵⁻⁷⁾. これに対して, メチオニン (Met) とセリン (Ser) はCysの前駆体として豊富に存在し, 精子内でのCysの内因性合成が不可欠であると考えられる^{8,9)}. また, 外因性のCys添加が精子の品質向上やGSH増加に寄与することからも, Cysの重要性が支持されている.

体細胞では, MetからCysへの変換は転硫経路により行われ, シスタチオニン β -シンターゼ (CBS) とシスタチオニン γ -リアーゼ (CTH) という酵素がそれぞれホモシステイン生成とCys生成を担っている^{10,11)}. これらの酵素は不安定で, CBSはユビキチン・プロテアソーム系や小胞体関連分解 (ERAD) によって速やかに分解され, CTHは自己失活することが知られている¹²⁻¹⁴⁾. 特に, 酸化ストレス下では, GSH需要増加に応じてCBSやCTHの発現が誘導されることが報告されて

おり, これら酵素の持続的な合成が必要とされる¹⁵⁻¹⁸⁾.

しかし, 精子は精子形成後には各ゲノムの遺伝子発現やタンパク質合成能を消失しているため, 通常の体細胞のように新たなmRNAを発現し, 翻訳による酵素供給ができない (図1). この制限下において, 精子がCBSやCTHをどれだけ保持しているかは, 酸化ストレスに対する防御力や運動性の維持に直結する重要な要素となり得ると考えた.

ブタ精子におけるCBSおよびCTH量の変化

ブタ精子は, 加温することでATPを産生し, 運動するので, 加温に伴って酸化ストレスが上昇し精子中のCBSおよびCTH量は減少すると考えていたが, 予想に反して, 両酵素は時間経過とともに増加することが確認された. 一方, CysからGSH合成に関わるグルタミン酸—システインリガーゼ触媒性サブユニット (GCLC) およびGSH合成酵素 (GSS) のタンパク質量は変化していなかった. そして, RT-qPCR分析によりCBSおよびCTHのmRNAレベルが時間経過とともに低下したことから, 精子中にCBSとCTHをコードするmRNAが存在し, それが翻訳され, 精子がMetからCysを合成し, その新規合成されたCysを利用してGSHを合成している可能性が示された.

この新規タンパク質合成が精子の酸化ストレスを低減するのに寄与するかを解析するため, MetやCysからGSH合成に必要なSerおよびGly, Gluを添加した培養液を用いて, 精子をインキュベートした結果, すべてのアミノ酸を添加することで精子中のROSは低下し, ミトコンドリアの膜電位活性が上昇し, 運動性も亢進した. さらに, CBS阻害剤を添加した実験から, MetからのGSH合成にはCBSが必須であることが明確化された.

CBSおよびCTH酵素の機能的合成が精子機能に与える影響

精子は, 各ゲノムからの新規遺伝子発現能力は消失し

連絡先: 島田昌之 広島大学大学院統合生命科学研究科
〒739-8528 東広島市鏡山1-4-4
E-mail: mashimad@hiroshima-u.ac.jp

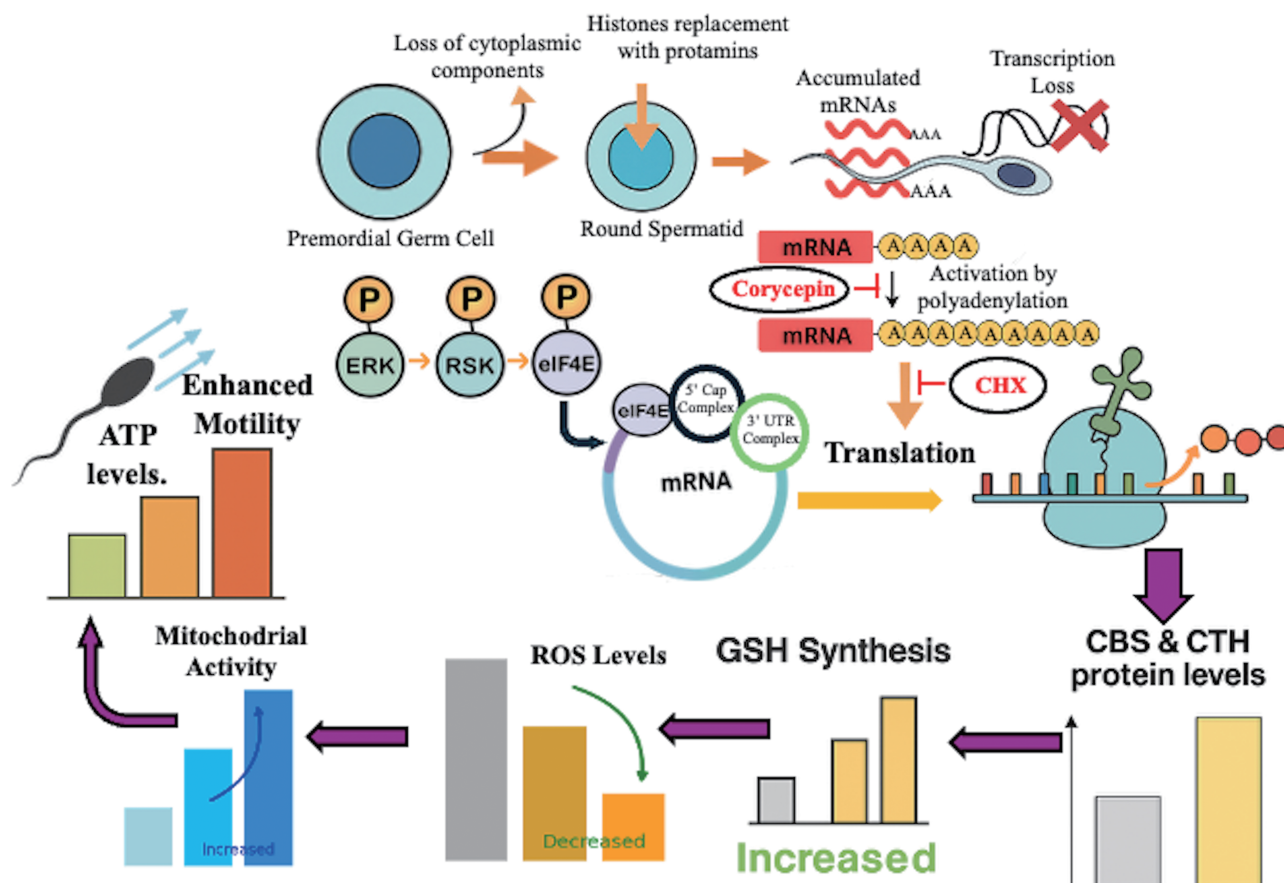


図1 精子に存在する翻訳機構とポリアデニレーション機構の抗酸化に果たす役割

ていることから、精子形成過程で mRNA が蓄積し、それが翻訳されていると考えられた。そこで、精子におけるタンパク質合成機構を解明するため、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX) を使用して、CBS および CTH 酵素の合成を調べた。その結果、CHX により CBS および CTH レベルは低下し、これにより GSH レベル、ミトコンドリア活動、VSL、進行性運動性が有意に低下した。つまり、CHX で翻訳が抑制されたことから、一部で報告がある「精子はミトコンドリアの翻訳システムを用いて、各ゲノム由来の mRNA を翻訳する」メカニズムではなく、通常の細胞体上における翻訳機構を有すると考えられた (図 1)。

そこで、この翻訳機構である ERK1/2-p90RSK-eIF4E シグナル伝達系に着目し、精子における存在とその活性化を解析した。その結果、いずれのタンパク質も検出され、精子の培養に伴いリン酸化したことから、精子がタンパク質の翻訳機構を有することが示された。すなわち、精子は mRNA をタンパク質へと翻訳し、酸化ストレスに反応していることから、精子における CBS と CTH をコードする mRNA に着目した。

まず、 α アミニチンにより転写抑制した時の影響を検

討したが、精子の運動性に影響はなかった。そこで、mRNA の安定性と翻訳効率に重要なポリ A テイル (polyA) 長の検出を試みた。その結果、射出直後のブタ精子には polyA 長の短い CBS をコードする mRNA が検出された。しかし、精子のインキュベーションに伴って、長い polyA 長を有する CBS が検出され、この伸長はポリアデニル化阻害剤であるコルディセピン (cordycepin) で抑制された。

精子における新規タンパク質合成機構の重要性

われわれの研究により、精子に polyA 長の短い安定的な mRNA が存在し、その polyA が伸長されること + タンパク質翻訳系が活性化すること、により酸化ストレス応答に重要な Met から Cys を合成する酵素群が新輝合成されることが示された (図 1)。Cys は、酸化されやすく不安定なアミノ酸であるため、組織液や血液中にフリーの Cys はほとんど存在しない^{5-7, 19, 20)}。実際、ブタ精液中においても Cys 濃度は低いことが報告されている²¹⁾。一方、精液中には Met や Gly, Ser, Glu 量が多いことが報告され、われわれの未発表データでは精子の運動

性が高い精液中では Gly と Glu 濃度が高いことも明らかとなっている^{8,9,22)}。これらのことから、新規に Cys を合成する能力が精子の GSH 合成能であり、それが抗酸化能となっていると考えられる (図 1)。

転写された mRNA は、直ちに翻訳されるか、あるいは分解されるかのどちらかの運命にある不安定な物質である。しかし、卵子および初期胚においては、一時的に遺伝子発現能力を消失するため、その期間に新規タンパク質合成に利用される母性 mRNA が蓄積していることが知られている²³⁻²⁵⁾。この母性 mRNA は、本研究で明らかとした精子に蓄積している CBS をコードする mRNA と同様に polyA 長が短い、polyA の伸長が生じた後タンパク質へと翻訳されるという特徴を持つことから、精子中の polyA 長が短い mRNA は父性 mRNA と呼べるかもしれない^{23,24)}。ただし、受精後の初期胚にまで精子中の polyA 長の短い mRNA が持ち込まれ、タンパク質合成に利用されるかは不明なので、今後の研究が必要である。

われわれは、以前の研究において、精子においてもミトコンドリアではミトコンドリアゲノムの転写は活発であり、ミトコンドリアゲノムがコードする電子伝達系酵素群の新規合成が精子の運動の持続に必須であることを報告してきた^{26,27)}。この報告の中で、精子のミトコンドリアゲノムは酸化ストレスに脆弱であり、外因性の抗酸化因子である PQQ の添加により安定化し、運動を持続できることを示した。しかし、この研究では、Met などの GSH 合成に必要なことが示されたアミノ酸類を溶液中に添加していなかったことから、生理的には内因性の抗酸化因子で精子は酸化ストレス耐性を有し、持続的な運動を可能にしていると考えられた。しかし、各ゲノムからの新規の遺伝子発現能力はないことから、精子の持続的運動を担保する因子は、polyA 長の短い mRNA の蓄積量とタンパク質翻訳機構であると定義できるかもしれない。今後は、精子の運動能の差による両者の違いを解析することで、精子および精液検査の新知見となると期待できる。

引用文献

- Zhu Z, Kawai T, Umehara T, Hoque SM, Zeng W, Shimada M (2019) Negative effects of ROS generated during linear sperm motility on gene expression and ATP generation in boar sperm mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine* 141, 159-171.
- Wang Y, Fu X, Li H (2025) Mechanisms of oxidative stress-induced sperm dysfunction. *Front Endocrinol (Lausanne)* 16, 1520835.
- Chi HJ, Kim JH, Ryu CS, Lee JY, Park JS, Chung DY, Choi SY, Kim MH, Chun EK, Roh SI (2008) Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction* 23 (5), 1023-1028.
- Zhu Z, Zeng Y, Zeng W (2021) Cysteine improves boar sperm quality via glutathione biosynthesis during the liquid storage. *Animal Bioscience* 35 (2), 166.
- Garrido Ruiz D, Sandoval-Perez A, Rangarajan AV, Gunderson EL, Jacobson MP (2022) Cysteine oxidation in proteins: structure, biophysics, and simulation. *Biochemistry* 61 (20), 2165-2176.
- Poole LB (2015) The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radical Biology and Medicine* 80, 148-157.
- Paulsen CE, Carroll KS (2013) Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery. *Chemical reviews* 113 (7), 4633-4679.
- Ugur MR, Dinh T, Hitit M, Kaya A, Topper E, Didion B, Memili E (2020) Amino acids of seminal plasma associated with freezability of bull sperm. *Frontiers in cell and developmental biology* 7, 347.
- Brown-Woodman PD, White IG (1974) Amino acid composition of semen and the secretions of the male reproductive tract. *Australian Journal of Biological Sciences* 27 (4), 415-422.
- Lu SC (2013) Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1830 (5), 3143-3153.
- Lu SC (2009) Regulation of glutathione synthesis. *Molecular aspects of medicine* 30 (1-2), 42-59.
- Araki S, Takata T, Ono K, Sawa T, Kasamatsu S, Ihara H, Kumagai Y, Akaike T, Watanabe Y, Tsuchiya Y (2023) Cystathionine γ -lyase self-inactivates by polysulfidation during cystine metabolism. *International journal of molecular sciences* 24 (12), 9982.
- Zuhra K, Augsburger F, Majtan T, Szabo C (2020) Cystathionine- β -synthase: molecular regulation and pharmacological inhibition. *Biomolecules* 10 (5), 697.
- Mijatovic E, Ascensão K, Szabo C, Majtan T (2024) Cellular turnover and degradation of the most common missense cystathionine beta-synthase variants causing homocystinuria. *Protein Science* 33 (8), e5123.
- Mosharov E, Cranford MR, Banerjee R (2000) The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* 39 (42), 13005-13011.
- Sarna LK, Sid V, Wang P, Siow YL, House JD, OK (2016) Tyrosol attenuates high fat diet-induced hepatic oxidative stress: Potential involvement of cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase. *Lipids* 51, 583-590.
- Shaposhnikov M, Proshkina E, Koval L, Zemskaya N, Zhavoronkov A, Moskalev A (2018) Overexpression of CBS and CSE genes affects lifespan, stress resistance and locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Aging (Albany NY)* 10 (11), 3260.
- Zhu J, Berisa M, Schwörer S, Qin W, Cross JR, Thompson CB (2019) Transsulfuration activity can support cell growth upon extracellular cysteine limitation. *Cell metabolism* 30 (5), 865-876.

19. Di Simplicio P, Franconi F, Frosali S, Di Giuseppe D (2003) Thiolation and nitrosation of cysteines in biological fluids and cells. *Amino Acids* 25 (3), 323–339.
20. Ahmad S, Khan H, Shahab U, Rehman S, Rafi Z, Khan MY, Ansari A, Siddiqui Z, Ashraf JM, Abdullah SM, Habib S (2017) Protein oxidation: an overview of metabolism of sulphur containing amino acid, cysteine. *Front Biosci (Schol Ed)* 9 (1), 71–87.
21. Shrestha A, Gaustad AH, Øiaas JB, Kommisrud E, van Son M, Nordborg A, Alm-Kristiansen AH (2025) A metabolomic study uncovering key amino acids and amines in Duroc boar semen as biomarkers of sexual maturity. *Animal Reproduction Science* 275, 107800.
22. Engel KM, Baumann S, Rolle-Kampczyk U, Schiller J, von Bergen M, Grunewald S (2019) Metabolomic profiling reveals correlations between spermogram parameters and the metabolites present in human spermatozoa and seminal plasma. *PloS one* 14 (2), e0211679.
23. Paynton BV, Bachvarova R (1994) Polyadenylation and deadenylation of maternal mRNAs during oocyte growth and maturation in the mouse. *Molecular reproduction and development* 37 (2), 172–180.
24. Lorenzo-Orts L, Pauli A (2024) The molecular mechanisms underpinning maternal mRNA dormancy. *Biochemical Society Transactions* 52 (2), 861–871.
25. Yang G, Xin Q, Dean J (2024) Degradation and translation of maternal mRNA for embryogenesis. *Trends in Genetics* 40 (3), 238–249.
26. Zhu Z, Umehara T, Okazaki T, Goto M, Fujita Y, Hoque SM, Kawai T, Zeng W, Shimada M (2019) Gene expression and protein synthesis in mitochondria enhance the duration of high-speed linear motility in boar sperm. *Frontiers in Physiology* 10, 252.
27. Zhu Z, Kawai T, Umehara T, Hoque SM, Zeng W, Shimada M (2019) Negative effects of ROS generated during linear sperm motility on gene expression and ATP generation in boar sperm mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine* 141, 159–171.