

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21217

研究課題名(和文) 不妊原因解明を目指した精子形成必須の細胞間架橋内物質輸送関連因子スクリーニング

研究課題名(英文) Screening of essential ICB associate factors for spermatogenesis to understand male infertility

研究代表者

岩森 督子 (Iwamori, Tokuko)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：10711509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：精巣では生殖細胞同士をつなぐIntercellular bridge(ICB)が欠損すると不妊になるが、その機能は未だに不明である。そこで、男性不妊の原因解明を目指し、マウス精子形成におけるICBの意義解明を目的に、その機能に関わる関連因子を網羅的に同定し、相関性プロファイリングを行った。抗体を作製し、精巣における局在などから、新規Ectoplasmic specialization関連タンパク質KIAA1210を同定した。KIAA1210のノックアウトマウス作製に成功し解析を行っており、ICBとその他の細胞間結合との相互作用の理解が深まることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Deletion of intercellular bridge (ICB), which connects all germ cells, caused male infertility. But the function of ICB still remains unknown. To understand the significance of ICB in spermatogenesis, its associating factors were identified and the interactions among each identified protein were comprehensively profiled. Specific antibodies to selected target proteins were developed and used to analyze their localization in testis. As a result, a novel Ectoplasmic Specialization (EPS) associating protein, KIAA1210, was identified. The knockout mouse of KIAA1210 was successfully produced and is under analyses. The results from analyses of KIAA1210 deficient mice will bring deep understandings of interactions between ICB and the other cell junction in spermatogenesis.

研究分野：生殖生物学

キーワード：生殖細胞間架橋 精子形成

1. 研究開始当初の背景

不妊原因の半数は男性側にあるが、体外培養系による配偶子形成が再現できない事もあり、精子形成に関連した病態解明は困難である。

生殖細胞は細胞分裂後も分裂完了せず、Intercellular bridge (ICB, 生殖細胞間架橋) によって繋がれたまま分化する。岩森らは、欠損すると不妊になる ICB の形成維持機構の同定と機能探求を行って来た。ICB は1950年代に電子顕微鏡下でその存在が発見され、精子形成過程にある生殖細胞は ICB で結合している事が認識されていた[1]。2006年に精巣特異的タンパク質 TEX14 が ICB に局在する事が分かり、そのノックアウト (KO) マウスでは ICB が欠損し雄性不妊になった。ICB が精子形成に必須であり、TEX14 が ICB に必要不可欠だと判明したが詳細な分子機構は不明であった[2]。娘細胞同士が完全切断される体細胞分裂では、切断予定部位にMidbodyと呼ばれるタンパク質集合体が形成される。MKLP1がMidbodyの骨格をなし、細胞質から移行したCEP55がMKLP1に結合し、さらに移行して来たALIXとTSG101がCEP55に結合することにより切断が起こる。岩森らはTEX14が骨格をなすMKLP1と切断に働くCEP55の両方をロックするように結合し、ALIXとTSG101のCEP55への結合を阻害することによってICBを形成維持する事を明らかにした[3]。また、マウス精巣ICB濃縮画分のプロテオミクス解析から新規タンパク質RBM44 (RNA binding motif 44) を同定した。RBM44は一部のICBでTEX14と結合し細胞質にも局在する。KOマウス精巣上体の精子数はWTオスの約二倍、一出産あたりの産子数が多いという傾向が見られた[4]。

ICBの形状は環状であり、生殖細胞の成熟に伴いその直径が拡張する[5]。ICBは生殖細胞同士を順序良く保つだけでなく、RBM44のように細胞質とICBに局在するタンパク質が

ICBを介して物質を輸送することにより精子の成熟サイクル調整に働くと考えられる。RBM44の欠損が精子形成に異常な現象を招かなかったことから、RBM44を代替する他のRNA結合タンパク質の存在も予測された。岩森らの研究によって、ICBの形成維持機構は解明されたが、その機能に関しては未明のままである。

2. 研究の目的

ICB局在精巣特異的タンパク質TEX14の欠損により、ICBが形成されず不妊になったことから、ICBが精子形成において、いかに重要な存在であるかは明瞭である。ICBの形態は環状であり、分化段階により大きさや形状の変化が見られるが詳細は分かっていない。また、低分子輸送などの細胞間コミュニケーションを担っていると予想されるが、その機能は未だに不明である。そこで、男性不妊の原因解明と精子体外培養技術開発の一助を目指し、マウス精子形成におけるICBの意義、特にその機能に関わる因子の同定を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 異なる精子形成過程のICB局在因子のプロファイリング

週令の異なるマウス精巣から精子形成段階の異なるICBを精製する事ができる。1、2、3、5、8週令のマウス精巣からICBを濃縮精製し、プロテオミクスおよびRNAシーケンスの手法を用いて、局在するタンパク質、RNA集団のプロファイリングを行う。

(2) 特徴的なタンパク質の局在同定

1で同定された新規精巣特異的遺伝子やRNA、タンパク質結合ドメインを有した遺伝子に関して抗体を作製し、精巣内の局在を同定する。ICBやその他の精巣特異的細胞間結合に局在する遺伝子に着目する。

(3) 結合タンパク質の解析およびRNA結合タンパク質と結合するRNA配列の同定

2で作製した抗体を用いた免疫沈降実験に

よって複合タンパク質もしくは結合 RNA を同定する。

(4)細胞培養実験で機能解析(その後の研究につなげるために)

体細胞に TEX14 を発現させても観察された最大連結細胞は8細胞であったことから、体細胞に TEX14 と同定したタンパク質や RNA を共発現させ細胞の連結と増殖がどのように変化するか観察する。

(5)ノックアウトマウスの作製および機能解析

1～4までの実験を通して、ICB やその他の精巣特異的細胞間結合に関連するタンパク質に着目し、ノックアウトマウスを作製し、機能解析を行う。

4. 研究成果

(1)精巣から膜タンパク質を濃縮する方法を応用した Intercellular bridge (ICB, 細胞間架橋)濃縮精製方法[5]を用いて、精巣懸濁液から ICB 濃縮精製を行った。ICB 濃縮精製物は ICB の立体構造、タンパク質相互作用等を残しており、精子形成過程のステージにより、ICB に付加されていると予想された異なるタンパク質を同定できると考えた。一度目は、幼少期として8日令、14日令、21日令、成獣として8週令の精巣 ICB 濃縮精製物のプロテオミクス解析を行った。2度目は、8週令の代わりに精子の混入のない5週令を用いて、再度4点の日令から行った。2回の実験の結果を合わせて、ICB 構成因子のプロファイリングを行った。また、各令マウスの ICB 濃縮精製物から RNA を回収し、網羅的な RNA シークエンス解析を行う事を予定していたが、タンパク質と直接結合しているもの以外の、実験操作によって回収される DNA や非特異 RNA が検出されたため、サンプルの再考を行う事とした。

(2)プロテオミクスで同定されたタンパク質の中で他のタンパク質や RNA への結合配列を有したタンパク質、精巣特異的新規タンパク質に的を

絞り、抗体を購入ないし作製し、精巣の蛍光免疫組織化学染色により、その局在を観察した。その結果、新規 Ectoplasmic specialization (EPS) 関連遺伝子 KIAA1210 を同定した(Iwamori et al., 2017, 5の主な研究論文等に記載)。

(3)既知 ICB タンパク質および KIAA1210 に対する抗体を用いた免疫沈降実験により回収したタンパク質複合体のプロテオミクス解析により複合体を成すタンパク質群を同定した。また、各タンパク質と結合している RNA を回収するべく、RNA 免疫沈降実験を行った。

(4)十数個の遺伝子にターゲットをしぼり、体細胞で単独ないし、複数の遺伝子を同時導入する事により変化を観察したが、変化が観察されなかった事もあり、予定していた初代培養系を用いたノックダウンアッセイは中止した。

(5)ICB タンパク質と関連のある KIAA1210 のノックアウトマウス作製を国立遺伝研の協力を得て試みた。ノックアウトマウスは誕生し現在解析を進めている。

全体として、目的に添った結果が得られた。各令マウス ICB 濃縮精製物の RNA シークエンス解析と、細胞への遺伝子過剰発現実験および初期培養細胞の遺伝子ノックダウン実験は結果が不鮮明になる可能性、時間と研究費を考慮して中断したが、代替実験として免疫沈降実験により得られた RNA の解析、さらに、直接ノックアウトマウス作製へ踏み切ることで補う事ができた。

<参考文献>

- [1] Fawcett DW, Ito S, Slautterback D. The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. *J Biophys Biochem Cytol* 1959; 5: 453-460.
- [2] Greenbaum MP, Yan W, Wu M-H, Lin Y-N, Agno JE, Sharma M, Braun RE, Rajkovic A, Matzuk MM. TEX14 is

essential for intercellular bridges and fertility in male mice.
Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103:4982-4987.

[3] Iwamori T, Iwamori N, Ma L, Edson MA, Greenbaum MP, Matzuk MM. TEX14 interacts with CEP55 to block cell abscission. Mol Cell Biol 2010; 30:2280-2292.

[4] Iwamori T, Lin Y-N, Ma L, Iwamori N, Matzuk MM. Identification and characterization of RBM44 as a novel intercellular bridge protein. PLoS One 2011; 6:e17066.

[5] Greenbaum MP, Ma L, Matzuk MM. Conversion of midbodies into germ cell intercellular bridges. Dev Biol 2007; 305:389-396.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Iwamori T, Iwamori N, Matsumoto M, Ono E, Matzuk MM. Identification of KIAA1210 as a novel X-chromosome-linked protein that localizes to the acrosome and associates with the ectoplasmic specialization in testes. Biol Reprod. (査読有), 2017 Feb 1;96 (2):469-477. doi: 10.1095/biolreprod.116.145458.

[学会発表] (計 5 件)

1. 岩森督子、岩森巨樹、松本雅記、小野悦郎、Martin M. Matzuk

精巣特異的細胞間結合ICB, ES,BTBの連携作用に機能するタンパク質

生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会大会) 平成29年12月 6-9 日 「(兵庫・神戸)」

2. Tokuko Iwamori, Yuzuru Kato, Naoki Iwamori, Masaki Matsumoto, Yumiko Saga, Etsuro Ono and Martin M. Matzuk

A novel X-chromosome-linked protein, KIAA1210, localizes to the acrosome and associates with the ectoplasmic specialization in testes.

4th World Congress of Reproductive Biology (第110回日本繁殖生物学会大会) 平成29年9月 27-29日 「(日本・沖縄)」

3. 岩森督子、岩森巨樹、松本雅記、小野悦郎、Martin M. Matzuk

精巣特異的アクチン関連細胞間結合

Ectoplasmic specializationとアクロソームに局在する新規タンパク質の同定

第39回九州実験動物研究会 平成28年10月30日 「(福岡・北九州)」

4. 岩森督子、岩森巨樹、松本雅記、小野悦郎、Martin M. Matzuk

Identification and functional analysis of novel protein on testis specific actin related cell-cell junction, ES (Ectoplasmic Specialization)

第38回日本分子生物学会大会 平成27年12月 1-4日 「(兵庫・神戸)」

5. 岩森督子、岩森巨樹、小野悦郎、Martin M. Matzuk

精巣特異的アクチン関連細胞間結合ESに局在する新規タンパク質の同定

第107回日本繁殖生物学会大会 平成26年8月 21-24日 「帯広畜産大 (北海道・帯広)」

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
[http://www.qda.med.kyushu-u.ac.jp:8000/
index.html](http://www.qda.med.kyushu-u.ac.jp:8000/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩森 督子 (Iwamori, Tokuko)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：10711509

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

加藤 譲 (Kato, Yuzuru)
岩森 巨樹 (Iwamori, Naoki)
松本 雅記 (Matsumoto, Masaki)