

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5 月 22 日現在

機関番号：17102
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21570066

研究課題名（和文） テクチンを中心とした哺乳類精子鞭毛の分子構造解析

研究課題名（英文） Structural analysis of mammalian sperm flagella with special reference to Tektins

研究代表者

飯田 弘 (IIDA HIROSHI)
 九州大学・農学研究院・教授
 研究者番号：70150399

研究成果の概要（和文）：

哺乳類精子鞭毛における Tektin2, Tektin3, Tektin4, Tektin5 についてその局在を解析し、Tektin2は外側緻密線維周辺部に、Tektin3は中片ミトコンドリア表層と外側緻密線維周辺部に、Tektin4は外側緻密線維の皮質部に、Tektin5は中片ミトコンドリア内側部に濃縮して存在することを明らかにした。また、Tektin分子と相互作用する分子をクローニングし、Tektin2と相互作用する分子として Tek2-BP1を、Tektin5と相互作用する分子として Tektin4および Odf1をクローニングした。Tek2-BP1は精巣特異的に発現する分子で、成熟精子の鞭毛中片のミトコンドリアに局在する分子であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

We have clarified the subcellular distribution of Tektin2, Tektin3, Tektin4, Tektin5 in rat and mouse spermatozoa. Tektin2 is localized around outer dense fiber (ODF), Tektin3 is on the surface of mitochondria and ODF. Tektin4 is on the surface of ODF cortex, and Tektin5 is present on the inner surface of mitochondria in the middle piece of flagella. By yeast Two-Hybrid system, we isolated a novel molecule Tek2-BP1 as Tektin2-interacting molecule as well as Tektin4 and Odf1 as Tektin5-interacting molecule. We found that Tek2-BP1 is localized on mitochondria of mouse sperm flagella.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | 0 | 0 | 0 |
| 年度 | 0 | 0 | 0 |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 形態・構造

キーワード：精子、鞭毛、形態形成

1. 研究開始当初の背景

日本ではカップルの10組に1組は不妊であり、そのうち約半数は男性側にその原因がある。男性不妊症は、無精子および乏精子症（精子形成不全）と精子無力症（構造脆弱性、低運動性、受精能低下）に大別できる。精子無力症の発症機構は不明であることが多いが、精子鞭毛の構造異常（軸糸、外側緻密線維、線維鞘の構造的欠陥および配列不全など）がその原因であると考えられている。下等な生物の鞭毛の研究と比べて、哺乳類精子鞭毛の構造解析は非常に遅れており、生殖生物学的観点および男性不妊症の観点から、鞭毛を構築する分子アーキテクチャーの解析が必要である。本申請では哺乳類精子鞭毛蛋白質 Tektin（テクチン）を中心とした解析を行なう。

2. 研究の目的

精子鞭毛の基本構造は微小管からなる軸糸である。軸糸は中心微小管とモーター分子ダイニンが付着した外側二重微小管からなる9+2構造を持ち、この軸糸構造は放射状スポークやネキシン等によって維持されている。この鞭毛軸糸は動物界におけるほとんどの精子に見られる形質であり、ウニ精子など下等動物の鞭毛を材料として、多くの構造解析研究がなされてきた。一方、粘性が高い雌性生殖洞を長時間泳がなければならない哺乳類、鳥類および爬虫類の精子では、鞭毛軸糸を取り囲むように軸糸周辺構造体、即ち、外側緻密線維（ODFs）、衛星線維、線維鞘、

および多数のミトコンドリアが存在する。この軸糸周辺構造体は、体外受精を行う動物種（下等動物、魚類、両生類）の精子鞭毛には存在せず、体内受精を行なう爬虫類以降の生物進化過程で獲得されてきた構造であり、精子鞭毛に構造的強度と弾性を与え、また軸糸との有機的結合により鞭毛運動の増幅にも関わっている可能性が示唆されている。また、線維鞘や外側緻密線維には解糖系酵素やアデニレートキナーゼが局在しており、精子鞭毛運動に必要なATPを供給するための足場となる役割も担っている。軸糸の研究と比較して、軸糸周辺構造体の構造解析は遅れている。本研究は下記に記載するように、鞭毛構成分子である Tektin を中心として、精子鞭毛、特に軸糸周辺構造体について、その分子アーキテクチャーの解明を目指すものである。

具体的な目的

- (1) 精子鞭毛の構成成分である Tektin 分子群の局在を電子顕微鏡を用いてナノスケールレベルで明らかにする。
- (2) Tektin 分子と相互作用する分子をクローニングし、その局在を明らかにする。これらの研究によって、哺乳類精子鞭毛の分子アーキテクチャーの解明に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 形態学的研究

Tektin 分子は生物進化上良く保存されている分子で、分子間相互作用に関わる coiled-coil モチーフを複数有している。これ

までにウニにおいて3種類の Tektins (Tektin a, b, c) が報告されている。哺乳類においても Tektin1, Tektin2, Tektin3 がクローニングされ、その後我々の研究室において、Tektin4, Tektin5 がクローニングされた。ウニ精子の鞭毛やクラミドモナス鞭毛において、Tektin は重合して繊維性分子を形成して軸糸の微小管に結合すると考えられ、軸糸形成やその運動制御に関わると考えられている。哺乳類精子においては、しかしながら、全ての Tektin 分子が必ずしも軸糸微小管の結合蛋白質ではなく、軸糸周辺構造体の成分として存在することを我々や他の研究室 (Cao et al, Mol. Cell Proteom. 5:801-810, 2006) が報告した。Tektin4 は外側緻密線維の皮質部に Tektin5 は中片ミトコンドリア内側部に濃縮していることが我々の研究によって明らかとなった。Tektin2, Tektin3 については精子鞭毛に局在することは確かであるが、その詳細な分子局在は不明である。これらの精子鞭毛における分子局在を明らかにするために、Tektin1, Tektin2, Tektin3 に体する特異的抗体を作成する。作成した抗体を用いて、超薄凍結切片 (Tokuyasu 法) を用いた免疫電顕法、および超音波処理によって抗体透過性にした精子を材料にした前包埋法により、抗原の分子局在をナノスケールレベルで解析する。

(2) 生化学的研究

精製したラット精子鞭毛を材料として用いる。Tektin分子はそのcoiled-coilモチーフ配列により、自律的に繊維性重合体を形成する。色々な可溶化剤 (Triton X-100, チオシアン化カリウム, 尿素) で順次精子鞭毛を可溶化する精子分画法によって、精子タンパク質を (a) 形質膜・ミトコンドリア鞘分画、(b) 軸糸分画、(c) 外側緻密線維分画、および (d) 線維鞘分画に分別することができる。

また同じ材料をEDTA-1% SDS 処理することによって、鞭毛鞭毛の軸糸と外側緻密線維皮質部を可溶化することができる。これらの分画サンプルを用いてイムノプロットを行ない、Tektinファミリー分子群の分子局在を生化学的に解析し、(1)の形態学的研究結果と比較検討する。解析は1次および2次元電気泳動法を用いる。

(3) 分子間相互作用の研究

ノックアウトマウス精子の観察から、Tektin2 の欠損は鞭毛の屈曲異常と鞭毛運動の著しい低下および不妊を引き起こすことが報告されている (Tanaka et al, Mol Cell Biol, 24:7958-7964, 2004)。また、Tektin4の欠損では形態的異常は生じないが、エネルギー代謝が低下し (ATPの枯渇)、運動性が著しく低下することが報告されている (Roy et al., FASEB J, 21:1-13, 2007)。ゆえに、Tektin は哺乳類精子鞭毛の分子骨格を構成する重要分子であると推測される。Tektin 分子群の精子鞭毛における生理的機能を明らかにするためには、Tektin 分子の局在の解明に加え、Tektin分子と相互作用する分子を見いだすことが必要となる。

現在我々は、酵母Two-hybrid法によって、Tektin2, Tektin4, Tektin5 と相互作用する分子の検索を行っており、cDNAライブラリーからいくつかの候補分子を同定している (表1, 右端列の候補分子)。Tektin1, Tektin3 についても同様な方法によって、相互作用する分子を探索する。候補分子に対しては、培養細胞へのトランスフェクション/免疫沈降・免疫染色、大腸菌で作製した組換えタンパク質を用いたプルダウン実験を行ない、分子間相互作用をさらに検討する。また、相互作用を確認した分子に関しては、Tektin 分子内のcoiled-coilモチーフが分子間結

合に関与するか否かを検討するために、coiled-coil モチーフを欠損する様々なミュータント分子を作成し、同様な結合アッセイを行なう。候補分子については、(1)の形態学的方法、および(2)の生化学的方法を用いて、精子鞭毛における分子局在を明らかにする。

4. 研究成果

Tektin分子は生物進化上良く保存されている分子で、分子間相互作用に関わるcoiled-coilモチーフを複数有している。これまでにウニにおいて3種類のTektins (Tektin a, b, c)が報告されている。哺乳類においてもTektin1, Tektin2, Tektin3 がクローニングされ、その後我々の研究室において、Tektin4, Tektin5 がクローニングされた。ウニ精子の鞭毛やクラミドモナス鞭毛において、Tektinは重合して繊維性分子を形成して軸糸の微小管に結合すると考えられ、軸糸形成やその運動制御に関わると考えられている。哺乳類精子においては、しかしながら、全てのTektin分子が必ずしも軸糸微小管の結合蛋白質ではなく、軸糸周辺構造体の成分として存在することを我々や他の研究室 (Cao et al, Mol. Cell Proteom. 5:801-810, 2006) が報告した。Tektin4は外側緻密線維の皮質部に、Tektin5は中片ミトコンドリア内側部に濃縮していることが我々の研究によって明らかとなった。Tektin2, Tektin3 については精子鞭毛に局在することは確かであるが、その詳細な分子局在は不明である。これらの精子鞭毛における分子局在を明らかにするために、Tektin2, Tektin3 に対する特異的抗体を作成し、作成した抗体を用いて、超薄凍結切片(Tokuyasu法)を用いた免疫電顕法、および超音波処理によって抗体透過性にした精子を材料にした前包埋法により、抗原の分子局在をナノスケールレベルで解析した。その結果、Tektin2 は外側緻密線維周辺部に、Tektin3 は中片ミトコンドリア表層と外側緻密線維周辺部に濃縮して存在することが明らかとなった。

平成22、23年度はTektin分子と相互作用する分子をクローニングすることを主体に研究を推進し、以下の研究結果を得た。酵母Two-Hybrid法によって、Tektin2と相互作用する新規分子Tek2-BP1をクローニングした。また、Tektin5と相互作用する分子として

Tektin4およびOdf1をクローニングした。さらに、酵母Two-Hybrid法および培養細胞へのトランスフェクション法によって、異なるTektin分子間の相互作用を解析した。その結果、Tektin2-Tektin4, Tektin2-Tektin3, Tektin4-Tektin5の分子間において間相互作用が検出され、これらTektin分子がヘテロ的に重合して鞭毛の繊維成分を構築している可能性が考えられた。また、酵母Two-Hybrid法、培養細胞へのトランスフェクション法によって、Tek2-BP1はTektin2と実際に結合することが示唆された。さらに、特異的抗体を作成し、その発現、局在を解析したところ、Tek2-BP1は精巣特異的に発現する分子で、成熟精子の鞭毛中片のミトコンドリアに局在する分子であることが判明した。

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 6件)

1. Hitoshi Kurio, Hiroshi Hatsuda, Emi Murayama, Takane Kaneko, Hiroshi Iida, Identification of CEACAM6 as an Intermediate Filament-Associated Protein Expressed in Sertoli cells of Rat Testis. Biol Reprod. 85, 924-933, 2011. 査読あり
2. H. Takiguchi, E. Murayama, T.Kaneko, H. Kurio, K. Toshimori, H. Iida. Characterization and Subcellular localization of Tektin 3 in Rat Spermatozoa. Mol Reprod Dev. 78:611- 620, 2011. 査読あり
3. Takane Kaneko, Shizuka Iwamoto, Emi Murayama, Hitoshi Kurio, Tetsuichiro Inai, Senichi Oda, Hiroshi Iida. Immunolocalization of Spetex-1 at the connecting piece in spermatozoa of the musk shrew (*Suncus murinus*). Zool Sci 28:444-452, 2011. 査読あり
4. Sayaka Shimasaki, Etsuko Yamamoto, Emi Murayama, Hitoshi Kurio, Takane Kaneko,

Yosaburo Shibata, Tetsuichiro Inai, Hiroshi Iida.
Subcellular Localization of Tektin2 in Rat
Sperm Flagellum. Zool Sci 27: 755-761, 2010.
査読あり

5. Takane Kaneko, Emi Murayama, Kiyotaka
Toshimori, Akihiko Yamaguchi, Hiroshi Iida.
Characterization of Spetex-1, a New
Component of Satellite Fibrils Associated with
Outer Dense Fibers in the Middle Piece of
Rodent Sperm Flagella. Mol Reprod Dev.
77:363-72, 2010. 査読あり

6. Rieko Yano, Takuya Matsuyama, Takane
Kaneko, Hitoshi Kurio, Emi Murayama,
Kiyotaka Toshimori, Hiroshi Iida.
Bactericidal/Permeability-Increasing Protein
(BPI) Is Associated with the Acrosome Region
of Rodent Epididymal Spermatozoa. Journal of
Andrology, 31:201-214, 2010. 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

- 1) 日本動物学会九州支部三学会合同大会
学会 (2009 年 5 月 23 日 宮崎大学)ラ
ット精子鞭毛における Tektin2 結合蛋
白質の同定と局在. 島崎明佳、村山絵美、
金子たかね、飯田弘.
- 2) 日本発生生物学会(平成 21 年 5 月 28,
新潟 朱鷺メッセ) Tektin2 および
Tektin2 結合蛋白質のラット精子鞭毛
における局在. 島崎明佳、村山絵美、金
子たかね、飯田弘.
- 3) 日本動物学会(平成 21 年 9 月 18 日、
静岡) 食虫目スルクス精子鞭毛の構成
成分 Spetex-1 の研究. 岩本静花、金子
たかね、飯田弘
- 4) 日本動物学会 (平成 22 年 9 月 23、東
京大学) ラット精子鞭毛における

Tektin3 の局在解析. 瀧口裕恵, 村山
絵美, 金子たかね, 飯田弘.

- 5) 日本動物学会 (平成 22 年 9 月 22 日,
旭川) ラット精子鞭毛の構成分子
Tektin5 と相互作用する分子について.
村山絵美 栗尾仁之 金子たかね 飯
田.
- 6) 日本動物学会 (平成 22 年 9 月 22 日,
旭川) ラット精子鞭毛における Akap12
(A-kinase anchoring protein 12) の
局在解析. 福井翔子、村山絵美、栗尾仁
之、飯田弘
- 7) 日本動物学会 (平成 22 年 9 月 22 日)
滝口裕美、村山絵美, 金子たかね, 飯
田弘. ラット精子鞭毛における
Tektin3 の局在解析

[図書] (計 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 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◇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

6. 研究組織
(1) 研究代表者

飯田弘 (IIDA HIROSHI)
九州大学大学院・農学研究院・教授
研究者番号：70150399

(2) 研究分担者

金子たかね (KANEKO TAKANE)
九州大学大学院・農学研究院・助教
研究者番号：20363327

(3) 連携研究者

()

研究者番号：