

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 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：12501
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590168
 研究課題名（和文） 精子形成過程および精子における膜タンパク質ベイシジンの機能の解析
 研究課題名（英文） Analysis of the functions of the membrane protein basigin during spermatogenesis and in spermatozoa
 研究代表者
 前川 眞見子 (MAEKAWA MAMIKO)
 千葉大学・大学院医学研究院・助教
 研究者番号：20181571

研究成果の概要（和文）：精巣および精子におけるベイシジンの機能を解析するため、マウス精巣・精子を用いてベイシジンと相互作用する分子について調べた。その結果、精巣、精子ではモノカルボン酸トランスポーター(MCT)1ではなく、MCT2がベイシジンと共存する可能性が示された。また、精子型ベイシジンは、精巣型ベイシジンのN末のIg-like C2 domainの一部が欠けていた。精子頭部に局在するベイシジン分子も異なることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To analyze the function of the basigin in the testis and sperm, we searched molecules which could bind to the basigin in the mouse testis and sperm. The results indicated that basigin did not co-localize with monocarboxylate transporter (MCT) 1, but with MCT2. Further, sperm-type basigin lacks a part of Ig-like C2 domain, compared to the testis-type basigin. It is also suggested that basigin in the sperm head is different from that in the sperm tail.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

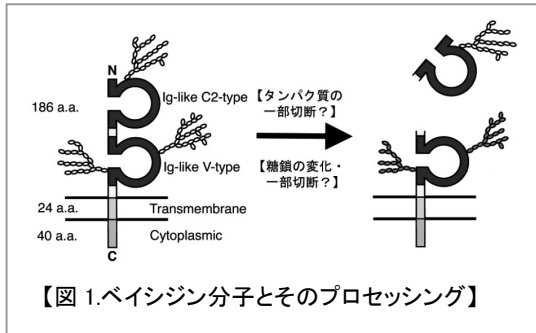
キーワード：発生学・形態形成学

1. 研究開始当初の背景

ベイシジンは細胞外に2つの免疫グロブリン様ドメインを持つ膜糖タンパク質である。3箇所のN型糖鎖付加部位があり、組織によって糖鎖の長さに違いがある（図1参照）。ベイシジン(Basigin/CD147/EMMPRIN)は、多くの組織で発現し、Tリンパ球の活性化、神経細胞とグリア細胞の相互作用、ガンの浸潤などに関与している。

私達のこれまでの研究から、生殖過程においてもベイシジンが重要な役割を担うことがわかってきた。1)ベイシジン分子はマウス精巣において精母細胞、精子細胞および精子鞭毛の主部に局在すること (Maekawa et al, *Arch Histol*, 1998)、2)ベイシジン遺伝子欠損マウスの精巣では減数分裂前期で精子形成が阻止され、精子ができず不妊となること (Igakura et al, *Devel Biol*, 1998; Toyama et al,

Anat Histol Embryol, 1999; Chen et al, Biochem Biophys Res Comm, 2004)、3)ベイスジンは精子においても発現し、受精に関与していること (Saxena et al, Reproduction, 2002) などを見いだした。すなわち、ベイスジン分子は、精子形成から受精へ至る過程で、プロセッシングを受け、その局在を変化させることが分かった(図1参照)。



2. 研究の目的

精巣・精子において、ベイスジンがどのような分子と相互作用し複合体を作るかは、その機能を知る上で重要である。精巣以外の系で、basigin と相互作用する、あるいは複合体を作ると報告されているタンパク質 (caveolin、MMP、MCT、presenilin など) に注目し、精巣や精子における局在を明らかにする。また、マウス精巣・精子からタンパク質を溶出して免疫沈降を行い、Western blot 法や LC-MS/MS 解析により、相互作用する分子の同定をめざす。

3. 研究の方法

(1)動物: ICR 系成熟雄マウス

(2)使用抗体:

- ・抗ベイスジン抗体 (Santa Cruz, sc-9757)
- ・抗カベオリン抗体 (Transduction Lab.)
- ・抗プレセニン抗体 (Chemicon, MAB5232)
- ・抗 MCT1 抗体 (Santa Cruz, sc-50325)
- ・抗 MCT1 抗体 (ミリポア, AB1286)
- ・抗 MCT2 抗体 (Santa Cruz, sc-50323)
- ・抗 MCT4 抗体 (ミリポア, AB3314P)

(3)蛍光抗体法: 精巣、精巣上体を 4%パラフォルムアルデヒドで固定後、凍結切片を作成し、免疫染色した。また、精子を 2%パラフォルムアルデヒドで固定し、スライドグラスに塗布、乾燥させ、免疫染色した。Alexa 標識二次抗体を用い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(4)免疫組織化学法: 精巣をブアン固定後、パラフィン切片を作成し、免疫染色した。HRP 標識二次抗体を用い、DAB/H₂O₂ で発色した。

(5)Western blot: マウス精巣、精子からタンパクを抽出し、SDS-PAGE 後、Western blot を行った。

(6)免疫沈降法: マウス精巣、精巣上部尾部精子を lysis buffer (NP-40 buffer: 1% NP-40, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH8.0) で溶解し、抗ベイスジン抗体と反応後、Dynabeads-Protein G を用いて免疫沈降した。

(6)MS 解析: 得られたサンプルを SDS-PAGE し、Oriole 液で染色後、目的のバンドを切り取り、MS 解析に用いた。また、抗ベイスジン抗体を用いて Western blot を行った。

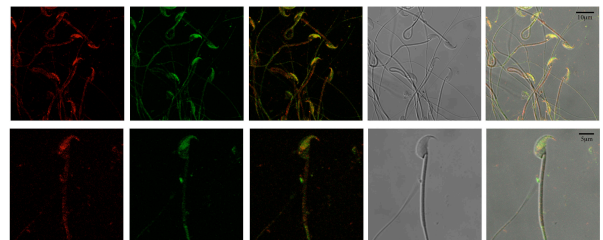
(7)精子頭部と尾部の分離、分画: 精巣上部尾部精子を PBS に懸濁、sonication して精子頭部と尾部を離断。75%、70%、65% sucrose gradient を作り、精子懸濁液を重層して遠心することにより、頭部分画と尾部分画に分離した。

4. 研究成果

(1)他の組織や細胞においてベイスジンと相互作用するとされる分子の抗体を用いて、精巣・精子における局在を調べ、共存の可能性を調べた。

1) プレセニン-1: 精巣および精子において、ベイスジンとの共存は確認できなかった。

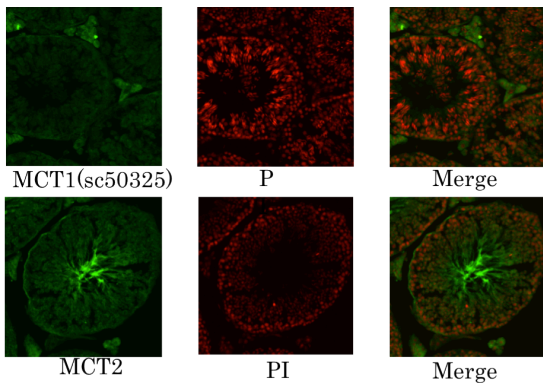
2) カベオリン-1: 抗ベイスジン抗体 G19 (細胞内ドメインを認識) を用いた間接蛍光抗体法により、カベオリン-1 がマウス精子頭部においてベイスジンと共存することがわかった。カベオリンは、さまざまな分子と結合しその機能を調節するという情報伝達調節機能も知られており、ベイスジン機能との関連が示唆された。



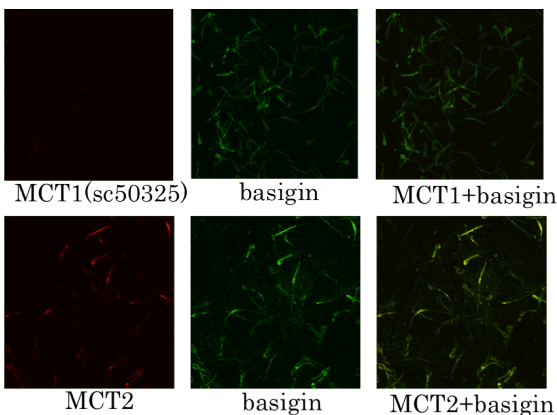
【赤: 抗ベイスジン抗体、緑: 抗カベオリン抗体で免疫染色】

3) モノカルボン酸トランスポーター (MCT): MCT は、乳酸やピルビン酸などの輸送に関与しており、MCT が細胞膜に発現するためには、ベイスジンやエンベジン分子との結合が必要という報告がある。MCT1、MCT2 および MCT4 に対する市販抗体を用いて、マウス精巣・精子における局在を調べ、ベイスジン分子との共存の可能性を調べた。マウス精巣の免疫組織化学を行った結果、MCT1 は、造精細胞に存在したが、精巣内精子尾部には

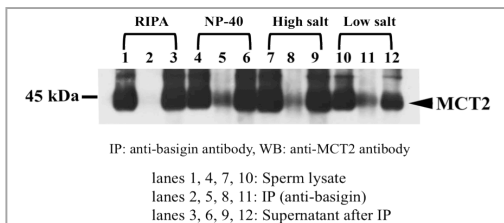
陽性反応は弱かった。MCT2 は、精巣内精子尾部の主部に強く反応し、造精細胞には陽性反応は見られなかった。MCT4 は、Leydig 細胞に強い反応が見られ、造精細胞はほとんど染まらなかった。また MCT2 は、精巣上部頭部精子において精子尾部の主部に、精巣上部尾部精子において精子尾部の中間部に強い反応が出た。この MCT2 の精子における局在は、ベイシジン分子の局在と一致した。また、免疫沈降法により、MCT2 分子が、抗ベイシジン抗体を用いて免疫沈降したとき、共沈することが示された。網膜やガン細胞においては、ベイシジンは MCT1 および MCT4 と複合体を作り、MCT2 とは共存しないと報告されているが、本実験の免疫染色結果により、マウス精子においては、MCT2 はベイシジンと結合しうることがわかった。このことは精子が乳酸を取り込むメカニズムが、他の細胞と異なり、特殊であることを示すのかもしれない。



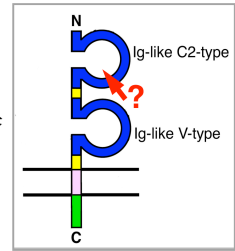
【精巣凍結切片を免疫染色】



【精巣上部尾部精子を免疫染色】

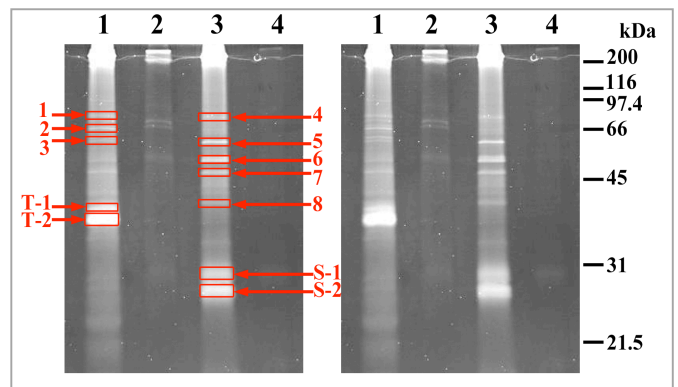


(2)精巣型 (分子量約 38-40kD) および精子型 (約 26-29kDa) ベイシジン分子の違い：マウス精巣および精子タンパクを抗ベイシジン抗体で免疫沈降し SDS-PAGE を行い、ベイシジン分子のバンドを切り出して、LC-MS/MS 解析を行った。その結果、精子型ベイシジンは、精巣型ベイシジンの N 末の Ig-like C2 domain の一部が欠けていることがわかった。



(3)精子尾部と頭部におけるベイシジンについて：精巣上部尾部精子を sucrose gradient を用いて頭部分画と尾部分画に分離し、タンパク質を抽出して抗ベイシジン抗体で Western blot を行った。精子型ベイシジンは少なくとも2つのバンド(S-1 および S-2)が存在するが、精子頭部のベイシジンは、S-1 が優位であり、精子頭部と精子尾部のベイシジン分子 (の修飾) が異なる可能性を示した。

(4)精巣および精子において、ベイシジンと共沈する分子の検索：マウス精巣および精子タンパクを抗ベイシジン抗体で免疫沈降し、SDS-PAGE 後ベイシジンと共沈する分子のバンドを切り出し、LC-MS/MS 解析を行った。いくつかの分子が検出されたが、実際にベイシジンと共存し複合体を形成しているのか、検討を続けている。



【精巣(lanes 1, 2)および精巣上部尾部精子(lanes 3, 4)から NP-40 buffer でタンパク質を抽出し、抗ベイシジン抗体を用いて免疫沈降を行った。Lanes 2, 4 は抗体を用いない negative control である。SDS-PAGE 後、Oriole 染色し、ベイシジンと共沈したと思われる 1~8 のバンドを切り出し、LC-MS/MS 解析を行った。】

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 5 件)

①Toyama Y, Chen C, Yamatoya K, Maekawa M, Ito C, Toshimori K. Unique structures of organelles observed in primary spermatocytes after micro-injection of protein solutions such as immunoglobulin into the lumen of the seminiferous tubules in mice and rats. *Andrologia*. 2012, in press.

DOI: 10.1111/and.12030. 査読有

②Maekawa M, Ito C, Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Fujita E, Momoi T, Toshimori K. Localization of RA175 (Cadm1), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, in the mouse testis and analysis of male infertility in the RA175-deficient mouse. *Andrologia*. 43(3): 180-188. 2011.

DOI: 10.1111/j.1439-0272.2010.01049.x 査読有

③Suzuki-Toyota F, Ito C, Maekawa M, Toyama Y, Toshimori K. Adhesion between the plasma membrane and the mitochondria in relation to migration of the cytoplasmic droplet during epididymal maturation in guinea pig spermatozoa. *Cell Tissue Res*. 341(3):429-440. 2010.

DOI: 10.1007/s00441-010-1012-6 査読有

④Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Maekawa M, Miyado K, Toshimori K. Tetraspanin family protein CD9 in the mouse sperm: unique localization, appearance, behavior and fate during fertilization. *Cell Tissue Res*. 340(3):583-594. 2010.

DOI: 10.1007/s00441-010-0967-7 査読有

⑤Yoshida K, Ito C, Yamatoya K, Maekawa M, Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Toshimori K. A model of the acrosome reaction progression via the acrosomal membrane-anchored protein equatorin. *Reproduction*. 139(3): 533-544. 2010.

DOI: 10.1530/REP-09-0434 査読有

[学会発表] (計 20 件)

①前川眞見子、大和屋健二、陳城、野崎正美、伊藤千鶴、年森清隆 「マウス精巣および精子における膜タンパク質ベシジン分子の解析」第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、サンポート高松・かがわ国際会議場 (香川県) 2013 年 3 月 30 日

②年森清隆、伊藤千鶴、大和屋健二、陳城、前川眞見子「EQT-EGFP transgenic mouse を用いた time laps imaging と微細構造の対比による先体膜タンパク質 equatorin の挙動解析」第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、サンポート高松・かがわ国際会議場 (香川県) 2013 年 3 月 30 日

③伊藤千鶴、大和屋健二、陳城、前川眞見子、神村今日子、武藤透、年森清隆「抗 equatorin 抗体はヒト先体マーカーとして有効である」第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、サンポート高松・かがわ国際会議場 (香川県) 2013 年 3 月 30 日

④大和屋健二、伊藤千鶴、大澤光次郎、陳城、前川眞見子、岩間厚志、幡野雅彦、年森清隆 「精子先体赤道部は、先体反応の過程で IZUMO1 の flip-flop による N 末端の露出の後、脆くなる」第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、サンポート高松・かがわ国際会議場 (香川県) 2013 年 3 月 30 日

⑤Yamatoya K, Ito C, Osawa M, Chen C, Maekawa M, Iwama A, Hatano M, Toshimori K. Categorization of acrosome reaction and isolation of those sperm for biochemical analyses. International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animal and Plants. Joint Meeting of the 2nd Allo-authentication Meeting and the 5th Egg-Coat Meeting(MCBEEC). Hotel Nagoya Garden Palace. Nagoya (Japan), 2012.11.12-16.

⑥前川眞見子、陳城、大和屋健二、伊藤千鶴、年森清隆 「マウス精巣および精子におけるベシジン分子の解析」日本顕微鏡学会 第 68 回学術講演会、つくば国際会議場 (茨城県) 2012 年 5 月 14 日

⑦伊藤千鶴、大和屋健二、陳城、前川眞見子、年森清隆「先体膜タンパク質 Equatorin を指標したマウス先体形成の解析」日本顕微鏡学会 第 68 回学術講演会、つくば国際会議場 (茨城県) 2012 年 5 月 14 日

⑧大和屋健二、伊藤千鶴、陳城、前川眞見子、年森清隆「初期の先体反応における精子の形態とタンパク質の解析」日本顕微鏡学会 第 68 回学術講演会、つくば国際会議場 (茨城県) 2012 年 5 月 14 日

⑨前川眞見子、大和屋健二、陳城、伊藤千鶴、外山芳郎、年森清隆「マウス精巣および精子におけるモノカルボン酸トランスポーターの局在」第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会、山梨大学甲府キャンパス (山梨県) 2012 年 3 月 28 日

⑩Toshimori K, Ito C, Yamatoya K, Maekawa M, Toyama Y. Fertilization

analyzed by live imaging in the mouse. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会、山梨大学甲府キャンパス (山梨県) 2012 年 3 月 28 日

⑪ Yamatoya K, Ito C, Cheng C, Maekawa M, Toyama Y, Toshimori K. Separation of early stage acrosome reacted sperm and analysis of the proteins. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会、山梨大学甲府キャンパス (山梨県) 2012 年 3 月 28 日

⑫ Maekawa M, Yamatoya K, Chen C, Ando S, Ito C, Toyama Y, Toshimori K. Expression of monocarboxylate transporters in the mouse testis and sperm, and their association with basigin. Proceeding of the 88th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan and the 116th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists, Yokohama (Japan), 2011. 3. 28-30.

⑬ Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Hatano M, Miyado K, Toyama Y, Maekawa M, Chen C, Toshimori K. Integration mechanism of a fertilization-related protein equatorin into the acrosomal membrane using transgenic mice. Proceeding of the 88th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan and the 116th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists, Yokohama (Japan), 2011.3.28-30.

⑭ Toyama Y, Ito C, Maekawa M, Yamatoya K, Toshimori K. It's a time to go back to "junctional specializations" in the testis. Proceeding of the 88th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan and the 116th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists, Yokohama (Japan), 2011.3.28-30.

⑮ Yamatoya K, Ito C, Chen C, Maekawa M, Toyama Y, Toshimori K. Analysis of acrosomal proteins during acrosome reaction progression. Proceeding of the 88th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan and the 116th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists, Yokohama (Japan), 2011.3.28-30.

⑯ Maekawa M, Yamatoya K, Yoshida K, Ito C, Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Toshimori K. Analysis of the basigin in the mouse sperm using three antibodies against different epitopes of the basigin molecule. 11th International Symposium on Spermatology, Okinawa convention center, Okinawa (Japan). 2010.6.25

⑰ Toshimori K, Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Maekawa M, Miyado K, Toyama Y. Tetraspanin family protein CD9 in the mouse sperm: unique localization, appearance, behavior and fate during fertilization. 11th International Symposium on Spermatology, Okinawa convention center, Okinawa (Japan). 2010.6.25

⑱ Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Akutsu H, Yao R, Kyono K, Suzuki-Toyota F, Toyama Y, Maekawa M, Noda T, Toshimori K. Oocyte-activation ability correlates with presence of perinuclear theca substance MN13, whose organization is associated with acrosome formation. 11th International Symposium on Spermatology, Okinawa convention center, Okinawa (Japan). 2010.6.25

⑲ Yamatoya K, Yoshida K, Ito C, Maekawa M, Yanagida M, Araki Y, Miyado K, Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Toshimori K. Further characterization of acrosomal protein Equatorin. 11th International Symposium on Spermatology, Okinawa convention center, Okinawa (Japan). 2010.6.25

⑳ Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Maekawa M, Ito C, Yamatoya K, Yoshida K, Toshimori K. Strange organelles observed in primary spermatocytes after micro-injection of protein solutions into the seminiferous tubules. 11th International Symposium on Spermatology, Okinawa convention center, Okinawa (Japan). 2010.6.25

[その他]
ホームページ等
<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/devbiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前川 眞見子 (MAEKAWA MAMIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：20182571

(2) 連携研究者

大和屋 健二 (YAMATOYA KENJI)
千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員
研究者番号：80447309
(H24 年度より研究協力者)

伊藤 千鶴 (ITO CHIZURU)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：80347054

外山 芳郎 (TOYAMA YOSHIRO)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：70009637
(2011年3月退職)

年森 清隆 (TOSHIMORI KIYOTAKA)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：20094097

(3) 研究協力者

陳 城 (CHEN CHENG)
千葉大学・大学院医学研究院・大学院生