

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570073

研究課題名(和文) 精上皮に発現するイムノグロブリンスーパーファミリー分子 Ceacam の解析

研究課題名(英文) Analysis of Ceacam molecule, a member of immunoglobulin superfamily expressed in the seminiferous epithelium

研究代表者

飯田 弘 (HIROSHI, IIDA)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70150399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：CEACAMは細胞間接着分子で、我々はその一つである Ceacam2-L が精巣性上皮に高発現することを発見した。CEACAM2-Lは伸長精子細胞の細胞質を囲む形質膜に特異的に存在し、セルトリ細胞に発現する Poliovirus receptor (PVR)と近接していた。免疫沈降法により、これらが分子間相互作用することが判明した。さらにCOS7培養細胞を用いた実験によって、Ceacam2-L とPVRがヘテロ4量体の複合体を形成することが判明した。これらの結果は、伸長精子細胞の余剰細胞質をセルトリ細胞が認識する過程に、Ceacam2-L とPVRの分子間相互作用が関わっていることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：CEA-related cell adhesion molecules (CEACAM) that belong to immunoglobulin superfamily play as a cell-to-cell adhesion molecules. We found that one CEACAM molecule, Ceacam2-L was highly expressed in the seminiferous epithelium in mouse testis. Immunohistochemical data showed that CEACAM2-L was present only at the plasma membrane of elongating spermatids with which extended cytoplasmic processes of Sertoli cells contact. Immunohistochemical analysis showed that CEACAM2-L expressed on elongated spermatids was in close contact with Poliovirus receptor (PVR)-positive cell processes of Sertoli cells. Immunoprecipitation experiments both in vivo and in vitro demonstrated direct heterophilic interaction between CEACAM2-L and PVR. In addition, we found that CEACAM2-L formed heterophilic trans-tetramers with PVR in transfected COS7 cells. From these data, we proposed that Sertoli cells recognize the excess cytoplasm of elongated spermatids through the PVR-CEACAM2-L interaction in mouse testis.

研究分野：動物学 動物発生学

キーワード：精子形成 精巣 CEACAM 細胞接着

1. 研究開始当初の背景

精子は雄の遺伝情報を卵まで運搬するとともに受精卵を活性化する重要な役割を担っている。精子は精祖細胞から2回の減数分裂をへて半数体の円形精子細胞となり、細胞質の消失、核の濃縮、鞭毛・先体形成を経て運動性を持った細長い細胞へと著しくその形態を変化させる。この複雑な精子形成という細胞分化の制御は、(1)生殖細胞において、どの時期にどの遺伝子を発現させるかという内因性の遺伝子発現制御機構、(2)ステロイドホルモン等の外因性因子による遺伝子発現調節機構、(3)生殖細胞と支持細胞であるセルトリ細胞との細胞間相互作用、などにより行なわれる。これらの調節機構に異常が生じた場合、正常な精子形成が行われなくなる。

哺乳類精巣の精細管上皮(精上皮)には、セルトリ細胞間およびセルトリ細胞-生殖細胞間に Ectoplasmic Specialization (ES) と呼ばれる特殊な細胞間接着装置が形成されている。セルトリ細胞間の ES (basal ES) は Blood Testis Barrier (BTB, 精巣-血液関門) を形成し、精上皮を apical 側と basal 側のコンパートメントに2分する。セルトリ-生殖細胞間の ES (apical ES) は精子細胞が伸長精子細胞へと形態変化する時期に出現し、成熟した精子になるまで精子細胞をセルトリ細胞にアンカリングする機能を担っている。Apical ES を構成する分子として、Junctional Adhesion Molecule (JAM)、Nectins、Nectin-like molecules (Necl)、Coxsackie and Adenovirus Receptor (CAR) がこれまでに報告されている。これらはそのタンパク質1次構造の解析から、イムノグロブリンスーパーファミリーに属することが判明している。KO マウス実験によって、JAM, Nectins, Necl 分子の欠損により精子形成不全や形成異常が起きることから、これら分子が精子の形態形成に必須であること

が判明している。

2. 研究の目的

申請者はディファレンシャルディスプレイ法を用いて、Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (Ceacam6) を単離するとともに、イントロンリテンション機構 (intron の保持) により生じる Ceacam6 新規アイソフォーム (Ceacam6-L と命名) をクローニングした。Ceacam6 と Ceacam6-L はともにイムノグロブリンスーパーファミリーに属する分子である。Ceacam6 はセルトリ細胞内の中間系フィラメント(ビメンチン)との結合能を有し、細胞内におけるビメンチン構築制御を行う役割を担うと思われる (Biol Reprod, 85, 924-933, 2011)。他方、Ceacam6-L は上記で述べた apical ES を構成する新規細胞接着分子で、伸長精子細胞とセルトリ細胞の接着部位に限局的に存在する分子であることを見出した (Biol Reprod, 79:1062-1073, 2008)。

さらに、哺乳類精巣には Ceacam ファミリー分子群として、Ceacam 1 および Ceacam 2 が発現していることが報告されているが、その分子局在は不明で、接着分子としての役割を担っているかどうか明らかにされていない。本研究の目的は、Ceacam 1 および Ceacam 2 について、(1)発現している分子の構造決定と(2)その局在の解明、(3)接着分子複合体の同定、(4)相互作用する分子の探索、を行うことによって、精上皮における Ceacam ファミリー分子群の発現と局在を俯瞰し、精子形成制御機構の研究に新たな展開をもたらすことである。

具体的な目的

(1) 発現している分子の構造解析
Ceacam 遺伝子は、スプライシングによって多彩なアイソフォームを作りだし、

それらが組織特異的に発現する傾向がある。精巣に発現している *Ceacam1,2* の構造を決定する。

(2) 分子局在の解明

Ceacam 1 および *Ceacam 2* の mRNA の発現細胞を in situ hybridization 法によって明らかにするとともに、抗体を作成し、精巣におけるタンパク質の分子局在を免疫組織化学的手法により解明する。

(3) 接着分子複合体の同定

Ceacam1,2 が接着分子として機能することが判明した場合、その分子複合体(ホモダイマー、ヘテロ2量体など)を明らかにする。

(4) 相互作用する分子の探索、

酵母 Two-Hybrid 法によって、*Ceacam1,2* と相互作用する候補分子をライブラリーから単離・同定する。

3. 研究の方法

(1) 発現している分子の構造解析

Ceacam 遺伝子群はスプライシングによって多彩なアイソフォームを作りだし、それらが組織特異的に発現する傾向がある。よって、*Ceacam 1, 2* 遺伝子の構成エクソンに対して、細かな PCR プライマーを設定し、発現する分子構造を DNA シークエンスにより決定する必要がある。*Ceacam 1* はユビキタスに発現するが、*Ceacam 2* は精巣特異的に発現することをすでに RT-PCR によって確認している。*Ceacam 2* 遺伝子は9個のエクソンからなり、その第2、第3エクソンがスキップするアイソフォームが精巣に発現していることをすでに確認しており、そのタンパク質1次構造(340 アミノ酸)は典型的なイムノグロブリンスーパーファミリー様構造をとると推定され、N末のシグナル配列および膜貫通部位(TM)を持つ事から、細胞膜に局在する可能性が高い。*Ceacam 1* に

ついては現在解析中である。

(2) 分子局在の解明

Ceacam 1 および *Ceacam 2* の mRNA の発現細胞を in situ hybridization 法によって明らかにする。また、構造を決定した *Ceacam 1, 2* に対して抗ペプチド抗体を作成し、抗体特異性を確認後、ウェスタンブロットおよび免疫組織化学的方法により、精巣における発現細胞と発現部位を調べる。*Ceacam 2* 抗体はすでに作成した。*Ceacam 1* 抗体は現在作成中である。高解像度が必要な場合には、精巣構成細胞を分離した後、免疫染色する。ラット精細管サンプルの超薄凍結切片とイムノゴールドを用いた免疫電子顕微鏡解析を行い、発現細胞と発現部位をさらに詳細に同定する。

(3) 接着分子複合体の同定

精細管に発現するイムノグロブリンスーパーファミリーに属する接着分子は、シス-ホモダイマーを形成するとともに、トランス的にホモあるいはヘテロ分子間結合することによって、細胞間接着分子としての機能を果たす可能性が高い。この分子複合体の構成を決定することは重要である。そのために、候補分子に Tag を付加し、トランスフェクションにより培養細胞に発現させ、クロスリンカーを用いて複合体を固定した後、免疫沈降/ウェスタンブロットにより、分子複合体を解析する。前述した *Ceacam6-L* の場合には、培養細胞に発現させると細胞辺縁部に分子が局在し、4分子がクロスリンクしている(4量体)ことが判明している。同様な方法で解析を行うことによって、*Ceacam1,2* の分子複合体を決定する。また、上記の解析がうまく行かない場合には、精細管の膜分画に対してクロスリンカー処理を施し、免疫沈降/ウェスタンブロットによって分子複合体を解析する。

(4) 相互作用する分子の探索

精上皮における接着分子として同定された Nectin 2 分子は、膜貫通ドメインの細胞質側の部位で、affadin 分子を介して、細胞骨格(アクチンフィラメント)と相互作用することが判明している。イムノグロブリンスーパーファミリー分子には、このような相互作用する分子が見いだされることが多く、Ceacam1,2 に関しても、その可能性があると思われる。

Ceacam1,2 をエサ(bait)とした酵母 Two-Hybrid 法を行い、Ceacam1,2 と相互作用する分子をライブラリーからスクリーニングし、得られた分子についてその発現・局在を調べる。既知の分子でその局在及び機能が同定されている場合、Ceacam1,2 の局在及び機能解明につながる。未解析分子であった場合、抗体を作成してその分子の発現・局在解析を行う。相互作用が認められた分子に関しては、Ceacam1,2 とともに培養細胞に共発現させ、免疫沈降法および蛍光抗体法によって、分子間相互作用の再確認を行う。必要な場合には、組換え蛋白質を大腸菌にて作成し、プルダウンアッセイによって分子間相互作用を確認する。

4. 研究成果

本研究は哺乳類の精上皮に発現するイムノグロブリンスーパーファミリー(IgS)に属するCeacam2 について、発現する分子構造、局在、分子複合体を明らかにすることを目的とした。Ceacam 2 遺伝子はスプライシングによって2種の分子が形成され、蛋白質の長さによりCeacam 2 -S(短分子)と Ceacam 2 -L(長分子)が存在する。Ceacam 2 -Lに対して特異的ペプチド抗体を作成した。ウェスタンブロットおよび免疫組織化学的方法により、Ceacam 2 -Lはマウス精上皮の伸長精子細胞の余剰細胞質を包む形質膜に限局して存在することが判明した。この余剰細胞質は、精子形

成の最終段階でセルトリ細胞に取り込まれ処理される部位であるため、Ceacam 2 -Lが精子細胞とセルトリ細胞の相互作用に関わる重要な分子である可能性が推測された。精細管に発現するIgS に属する接着分子はホモあるいはヘテロ分子間結合することによって、細胞間接着分子としての機能を果たす可能性が高い。Ceacam 2 -Lと分子複合体を形成する分子を同定する事を目的として研究を進めた。その結果、セルトリ細胞に発現するPoliovirus receptor (PVR) がCEACAM 2 -Lと複合体を形成することを見いだした。抗CEACAM 2 -L抗体を用いた免疫沈降により、マウス精上皮からCEACAM 2 -L とともにPVRが共沈した。また、COS 7 培養細胞に発現させたPVRもCeacam 2 -L と共沈した。相互作用する分子間に化学的結合を導入するクロスリンカーBS³処理をした試料を用いた免疫沈降によって、CEACAM 2 -L とPVR がヘテロ4量体の分子複合体を形成することを見いだした。また、もう一つのヴァリエーションであるCeacam2-Sを認識する抗体を作成し、免疫組織化学的方法によって精巢における分子局在解析を行った。Ceacam 2 -L と異なり、Ceacam 2 -Sは主に精母細胞の形質膜に発現していた。セルトリ細胞に発現するPVRとの分子複合体形成について調べるため、上述したようなCOS 7 培養細胞を用いて研究した結果、Ceacam2-SもPVR とヘテロ4量体の分子複合体を形成することが判明した。

Ceacam 2 ノックアウトマウスの解析を行うため、Dr. Sonia M, Najjar (Center for Diabetes and Endocrine Research , University of Toledo College of Medicine) から固定した精巢および精巢上体組織を供与してもらい、精巢形態や精子形成におよぼす Ceacam 2 ノックアウトの影響を形態学的に解析している。

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 9 件)

1. Minakami M, Kitagawa N, Iida H, Anan H, Inai T. p38 Mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal protein kinase regulate the accumulation of a tight junction protein, ZO-1, in cell-cell contacts in HaCaT cells. *Tissue Cell*. 47: 1-9, 2014. doi: 10.1016/j.tice.2014.10.001. 査読あり
2. Elsaid Salaheldeen, Ali Howida, Tomohiko Wakayama, Hiroshi Iida. CEACAM2-L on Spermatids Interacts with Poliovirus Receptor on Sertoli Cells in Mouse Seminiferous Epithelium. *Journal of Histochem Cytochem*. 62: 632-644, 2014. DOI: 10.1369/0022155414542653 査読あり
3. Kitagawa N, Inai Y, Higuchi Y, Iida H, Inai T. Inhibition of JNK in HaCaT cells induced tight junction formation with decreased expression of cytokeratin 5, cytokeratin 17 and desmoglein 3. *Histochem Cell Biol*. 142:389-99, 2014. DOI: 10.1007/s00418-014-1219-9 査読あり
4. A Yamaguchi, T Kaneko, T Inai, H Iida. Molecular Cloning and Subcellular Localization of Tektin2-Binding Protein1 (Ccdc 172) in Rat Spermatozoa. *J Histochem Cytochem*. 62: 286-297, 2014. DOI: 10.1369/0022155413520607 査読あり
5. Urmi Roy, Mohammad Riazul Islam, Jun-ichi Nagao, Hiroshi Iida, Abdullah-Al-Mahin, Takeshi Zendo, Jiro Nakayama, and Kenji Sonomoto. Bactericidal activity of nukacin ISK-1: an alternative mode of action". *Bioscience Biotech Biochem*. 78: 1270-1273, 2014. DOI:10.1080/09168451.2014.918485 査読あり
6. Sayoko Oiki, Erina Hiyama, Takafumi Gotoh, Hiroshi Iida. Localization of Tektin 1 at both Acrosome and Flagella of Mouse and Bull Spermatozoa. *Zool Sci* 31: 101-107, 2014. doi: 10.2108/zsj.31.101. 査読あり

7. Tetsuichiro Inai, Norio Kitagawa, Yuji Hatakeyama, Tetsuro Ikebe, Hiroshi Iida, Mamoru Fujita. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase downregulates claudin-2 expression and alters paracellular permeability in mouse rectum CMT93-II cells. *Tissue and Cell* 45: 175-182, 2013. doi: 10.1016/j.tice.2012.11.001. 査読あり
8. Hitoshi Kurio, Jae Man Lee, Takahiro Kusakabe, Hiroshi Iida. Testis-specific cell adhesion molecule, CEACAM6-L, forms homophilic interaction at the cell adhesion site in vitro. *Zool Sci* 29:786-793, 2012. doi: 10.2108/zsj.29.786. 査読あり
9. Elsaïdo Salaheldeen, Hitoshi Kurio, Ali Howaida, Hiroshi Iida. Molecular Cloning and Localization of a CEACAM2 Isoform, CEACAM2-L, Expressed in Spermatids in Mouse Testis. *Mol Reprod Dev*. 79:843-852, 2012. doi: 10.1002/mrd.22123. 査読あり

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/doubutsu/>

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

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：