

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890074

研究課題名(和文)細胞接着分子による精子形成調節の分子ネットワークの解明

研究課題名(英文) Study on the molecular networks in the regulation of mouse spermatogenesis by cell adhesion molecules.

研究代表者

仲田 浩規 (NAKATA, HIROKI)

金沢大学・医学系・特任助教

研究者番号：80638304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：細胞接着分子を介した造精細胞とセルトリ細胞の相互作用は精子形成に重要な役割を持つ。特に、造精細胞に発現する細胞接着分子 Cadm1は精子形成に必須である。最近我々は、Cadm1と結合するアダプター蛋白質としてMpp6を見いだした。ウエスタンブロット法および免疫組織化学により精巣におけるMpp6の発現と局在を明らかにした。また、免疫沈降によりCadm1とMpp6の相互作用を確認し、さらにMpp6と相互作用する新規分子を複数同定した。

研究成果の概要(英文)：The interaction of germ cells and sertoli cells through cell adhesion molecules is important in spermatogenesis. Cell adhesion molecule-1 (Cadm1), which is expressed in germ cells, is essential for spermatogenesis. Recently we found out Mpp6 as an adapter protein which binds Cadm1. Using Western blot analysis and immunohistochemistry, we revealed the expression and localization of Mpp6 in the mouse testis. Moreover, we confirmed the interaction of Cadm1 and Mpp6 by immunoprecipitation and also identified several new molecules which interact with Mpp6.

研究分野：生殖生物学

科研費の分科・細目：解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：精巣 精子形成 細胞接着分子 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 精子発生は精祖細胞の増殖と分化、精母細胞の減数分裂、精子細胞の形態変化の3つの過程からなる。この精子細胞の形態変化は精子形成とも呼ばれる。精子形成では先体の形成、核の濃縮、頸尾部の形成、細胞質の脱落が起こる。また精子形成中に精子細胞の頭部と尾側は伸長するので、精子形成後半の精子細胞は伸長精子細胞とも呼ばれる。近年、精子発生の調節因子として、内分泌因子と局所因子のほかに細胞接着分子も関与することが明らかになった。特に、造精細胞に発現する Cell adhesion molecule-1 (Cadm1)、Nectin-3 やセルトリ細胞に発現する Nectin-2 のノックアウト(KO)マウスは精子形成の障害により不妊を示す。これらの精子形成障害の表現型は KO マウスにより異なる。すなわち、Cadm1 KO マウスではセルトリ細胞から脱落した精子細胞が目立つ。また、精上皮に残った精子細胞には尾側の細胞質の形態異常が見られる。Nectin-3 KO マウスでは脱落する精子細胞の数は少ないが、先体を含めた頭部の形態異常が目立つ。一方、Nectin-2 KO マウスでは頭部の形態異常が見られるが Nectin-3 ほど著しくはなく、また精子細胞の脱落も少ない。したがって、細胞接着分子ごとに精子形成における役割が異なることが示唆された。

(2) Cadm1 は当研究室で発見した新規の細胞接着分子である。Cadm1 は、中間型精祖細胞からパキテン期早期の精母細胞と step7 以降の伸長精子細胞に発現する。しかし Cadm1 KO マウスの精母細胞には障害が少ない。そこで、DNA マイクロアレイと定量的 RT-PCR 法および in situ ハイブリダイゼーションを行い、精母細胞に発現する細胞接着分子 Myelin protein zero-like 2 の発現量が増加することにより、失われた Cadm1 の機能を代償することが示唆された。一方で Cadm1 の代償機構が伸長精子細胞には存在しないことに興味をもった。伸長精子細胞とセルトリ細胞間には KO マウスが精子形成障害を生じる複数の細胞接着分子が関与する。しかし、こうした細胞接着分子が伸長精子細胞においてどのような役割を行っているのか、その細胞内分子機構についてはほとんど分かっていない。培養細胞を用いた実験系では、細胞接着分子 Cadm1 を介して細胞接着を起こす細胞を用いて抗 Cadm1 抗体により免疫沈降すると、一緒に沈降される蛋白質にリン酸化された複数の蛋白質が含まれることが報告されていた。当教室では精巣において、抗 Cadm1 抗体による免疫沈降産物中にチロシンリン酸化蛋白質を検出していた。これらの結果は Cadm1 が細胞内シグナル伝達機構を活性化することを示唆している。

(3) Cadm1 の細胞内領域には、2つの機能モチーフ、Protein 4.1 結合モチーフと PDZ

結合モチーフがある。精巣において、Protein 4.1 結合モチーフには、Erythrocyte protein band 4.1-like 1 (Epb4.111)や Epb4.113 が結合するが、どちらの KO マウスも精子発生に異常を示さないことが報告されていた。一方、精巣において PDZ 結合モチーフに結合する蛋白質は同定されていなかったが、当教室では Yeast Two-hybrid 法を用いて membrane protein, palmitoylated 6 (Mpp6)を同定した。Mpp6 は Membrane-associated guanylate kinase ファミリーに属し、N 末から順に L27 ドメイン、PDZ ドメイン、Src homolog 3 (SH3) ドメイン、Guanosine monophosphate kinase (GMPK)ドメインからなる。Mpp6 は PDZ ドメインにより Cadm1 と結合するとともに、SH3 と GMPK というシグナル伝達関連モチーフを有するので、Cadm1 は Mpp6 を介して他のシグナル伝達分子と相互作用することが考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、Cadm1 と Mpp6 の造精細胞内での相互作用について Cadm1 を含む細胞接着分子の KO マウスを用いて解析するとともに、Cadm1-Mpp6 を介した細胞内分子のリン酸化を解析し、さらに Mpp6 と細胞内で相互作用する分子を同定して、Cadm1 によるシグナル伝達機構を明らかにする。これにより細胞接着分子による精子形成調節の分子ネットワークを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) アダプター蛋白質 Mpp6 の精子形成における機能解析を行うために、Mpp6 に対する特異抗体を用いて、ウエスタンブロット法および免疫組織化学により明らかにする。精子形成での Mpp6 の役割を検討するために、野生型 (WT) マウスだけでなく、Cadm1 KO、Nectin-3 KO マウス精巣での Mpp6 の発現と局在を比較する。

(2) 抗 Cadm1 抗体と抗 Mpp6 抗体を使い、免疫沈降とウエスタンブロット法により相互作用を確認する。抗 Mpp6 抗体による免疫沈降と GST 融合蛋白質による pull-down の2つの方法により、Mpp6 と相互作用する細胞内蛋白質の同定を行う。WT マウスの精巣の蛋白質を可溶化(可溶化分画)する。この可溶化分画と抗 Mpp6 抗体を反応させて免疫沈降を行う。対照として正常ラット IgG を用いる。抗 Mpp6 抗体でのみ免疫沈降される蛋白質のバンドを SDS-PAGE と銀染色で見いだす。また、Mpp6 の SH3 ドメインと GMPK ドメインについてそれぞれ GST 融合蛋白質(GST-Mpp6-SH3 と GST-Mpp6-GMPK)を作製する。WT マウス精巣の可溶性分画と GST 融合蛋白質を反応させ、GST ビーズを用いて pull-down を行う。対照として GST 蛋白質単独との反応を用いる。GST-Mpp6-SH3 と GST-Mpp6-GMPK でのみ pull-down される蛋白質のバンドを SDS-PAGE

と銀染色で見いだす。免疫沈降と pull-down により得られたバンドを比較検討し、選別されたバンドのペプチダーゼ消化と MALDI TOF/TOF による MS/MS 解析によりペプチドの配列を決め、蛋白質を同定する。Mpp6 と相互反応するこの分子の GST 融合蛋白質を抗原として、ラット footpad 法(当研究室で安価で迅速な抗体作成法として確立済、Acta Histochem Cytochem 39,79,2006)により抗体を作製する。この抗体および抗 Mpp6 抗体を用いた免疫沈降とウエスタンブロット法により相互作用を確認する。また WT マウス、Cadm1 KO マウスおよび他の細胞接着分子 KO マウスの精巣におけるこの分子の発現と局在を調べ、Cadm1 の有無によるこの分子の挙動の変化を解析する。

4. 研究成果

(1) Mpp6 の GST 融合蛋白質を抗原としてラット抗体作製法により抗体を作製し、ウエスタンブロット法により精巣における発現を明らかにした(図1)。MPP6 は約 62kDa の単一バンドとして検出された。MPP6 の発現量は Cadm1 KO マウスの精巣において WT と比較すると半分以下になっていた。

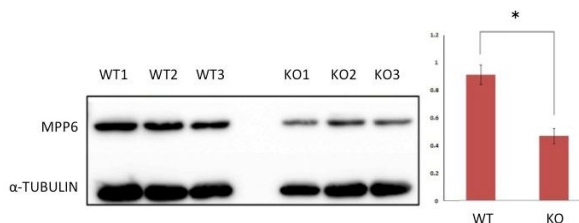


図1 精巣におけるMPP6の発現

免疫組織化学法により WT 精巣における MPP6 の発現と局在を明らかにした(図2)。MPP6 は step11 以降の伸長精子細胞の細胞質にのみ発現していた。発現量は段階的に増加し、step16 の伸長精子細胞で最もシグナルが強かった。

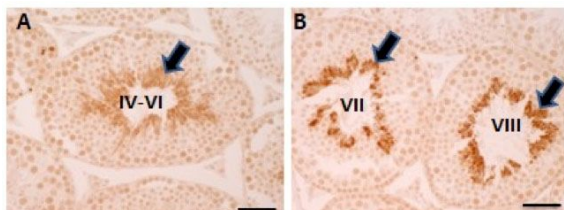


図2 WT精巣におけるMPP6の局在

また精子形成における Mpp6 の役割を検討するために、WT だけではなく Mpp6 と相互作用する Cadm1 KO マウスと Mpp6 と相互作用しない細胞接着分子 Nectin-3 KO マウスの精巣を用いて免疫組織化学法により発現と局在を解析した(図3)。Cadm1 KO マウスにおいて MPP6 の発現する細胞は WT と比較して変化が認められなかったが、細胞内局在が変則的だった。

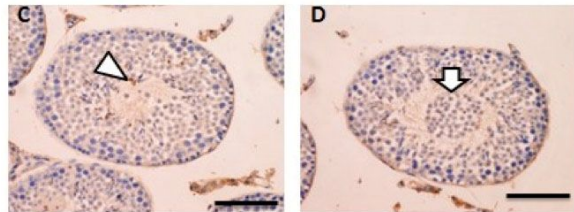


図3 Cadm1 KO 精巣におけるMPP6の局在

(2) 抗 Cadm1 抗体と抗 Mpp6 抗体を使い、免疫沈降により相互作用を確認し、さらに GST-Mpp6 融合蛋白質と抗 Mpp6 抗体を用いて相互作用する新規分子について質量分析により複数同定した。

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)

〔学会発表〕(計4件)

仲田浩規：精子形成の定量的評価法の検討、日本アンドロロジー学会第33回学術大会、2014年06月12-13日、軽井沢プリンスホテルウエスト(長野県)

仲田浩規：精子形成の定量的評価法の検討、第119回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014年03月27-29日、自治医科大学キャンパス(栃木県)

仲田浩規：精子形成の定量的評価法の検討、第73回日本解剖学会中部支部学術集会、2013年10月05-06日、山梨大学甲府キャンパス(山梨県)

仲田浩規：精子形成における肝細胞増殖因子の機能解析、第118回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013年03月28-30日、サンポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県)

〔その他〕

ホームページ等

金沢大学医薬保健研究域医学系組織発達構築学

<http://ana1.w3.kanazawa-u.ac.jp>

6 . 研究組織

研究代表者

仲田 浩規 (NAKATA HIROKI)

金沢大学・医学系・特任助教

研究者番号 : 80638304