

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：37303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840119

研究課題名(和文)精子形成細胞の分化研究を明らかにする免疫電顕クロマトイドミクス解析

研究課題名(英文)The Chromatoidmics analysis for clarification of spermatogenesis process

研究代表者

藤井 佑樹 (Fujii, Yuki)

長崎国際大学・薬学部・助教

研究者番号：80610063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：精子形成と配偶子細胞のRNA干渉に働くアルゴノート2タンパク質(Ago2)のラット精巣内の局在を、細胞生物学的に明らかにした。Ago2は、ラットの精巣で精母細胞が精子細胞へ分化するあいだ、生殖細胞特有小器官のヌアージュに局在した。その後、精子細胞の発生後期に現れるクロマトイドボディー(CB)近傍の小胞に含まれ、リソソーム膜タンパク質LAMP2と共存した。以上の結果から、Ago2は、ヌアージュ全域でRNAの転写を調節する一方、後期CBでは、リソソームにおいて、細胞成分の分解にも働く可能性が新たに示唆された。

研究成果の概要(英文)：The localization of spermatogenic protein, Argonaute 2 (Ago2) function to interfere the transcription was identified on the rat testis. Ago2 was localized germ cell specific organelle, "Nuage" during the development on spermatocyte to spermatid. Moreover, the co-localization of Ago2 and lysosome membrane protein, LAMP2 in the clear vesicles surrounded on the Chromatoid body was identified by the Immunoelectron microscopic analysis in the late stage of spermatid. These results suggest that not only Ago2 modulate transcription of RNA in nuage structure but also related on the lysosome pathway in the late CB.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：クロマトイドボディー Ago2 ヌアージュ 免疫電顕

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞特有に発現するオルガネラ「ヌアージュ」は、電子顕微鏡技術により特殊な形態を持つと明らかにされている。ヌアージュには RNA サイレンシングと DNA ヘリカーゼ酵素にみる遺伝子の発現調節作用が存在すると報告され、生殖細胞の分化で遺伝子発現に関わることが考えられた。ヌアージュの代表分子 Argonaute (以下 Ago)2 は、RNA のサイレンシングに働く。精子の発生とともに Ago2 の局在は未明で、精子形成とヌアージュの役割を知るためにその特定は重要であった。

2. 研究の目的

RNA サイレンシング作用を持つ Ago2 は、ラット精巣の配偶細胞の発生とともにどのように分布を変化するかを明らかにし、ヌアージュの新たな機能を記載する。

3. 研究の方法

ラット精巣の組織切片と抗 Ago2 抗体を作製し、蛍光顕微鏡、電子顕微鏡を用いた免疫組織化学により、Ago2 を発現している細胞、細胞内小器官と、発現する時期を特定した。

4. 研究成果

1) 抗 Ago2 抗体の作製

一次構造の明らかな Ago2 の C 末端側 14 アミノ酸配列を合成し、ウサギに免疫した。本抗 Ago2 抗血清は、ラット精巣細胞分画から得た細胞小器官のタンパク質の中に、Ago2 の分子量(97 kDa)を示すバンドを認め、精巣の全オルガネラに Ago2 は存在すると判明した。本反応は Ago2 ペプチドを共存させる吸収実験でバンドの染色が消失し、作製した抗

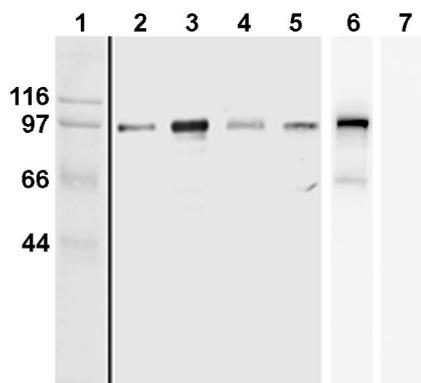


図1 ラット精巣オルガネラ内の Ago2 (97kDa)。1. 分子量マーカー、2. 精巣抽出液、3, 6, 7 ミトコンドリア画分、4. ミクロソーム画分、5. 細胞質画分。7. 抗体処理の際 Ago2 ペプチドを共存させると吸収された。

血清は Ago2 を特異的に検出すると判明した(図1)。

2) ラット精巣 Ago2 はパキテン期の精母細胞と発生初期の精子細胞に局在した。

Ago2 は減数分裂の第一分裂前期(パキテン期)の精母細胞に現れ、発生段階的に初期の球形の精子細胞に存在した。ラットの精細管内の発生を表すステージ(St)毎に、Ago2 のシグナルを比較すると、精母細胞内では St II から強いシグナルは観察され、St. XIV になるとシグナルが弱まった(図2)。精子細胞の球形のうち Ago2 は顆粒状に存在したが、分化が進み細胞が伸張すると内部に拡散して存在し、顆粒状のシグナルは消失した(図2)。

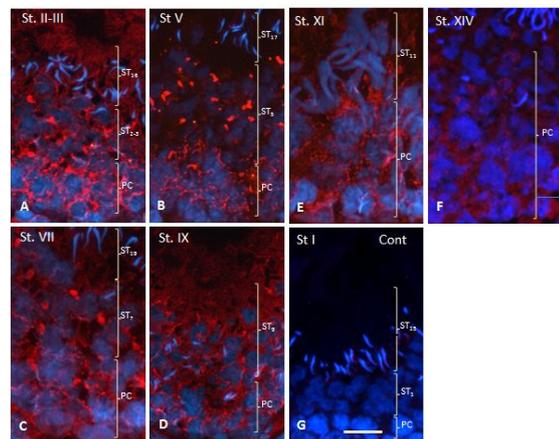


図2 精細管内の Ago2 の局在。
PC: パキテン期 精母細胞、ST: 精子細胞の発生ステージ。核は DAPI 染色。

3) Ago2 はパキテン期の精母細胞と伸長精子細胞内でヌアージュタンパク質 MAEL と共局在した。

精巣内を抗 Ago2 と抗 MAEL 抗体で染色すると、精母細胞では St IX-XI、精子細胞では step 9-11 の各段階の細胞質内に両者は共局して在していた(図3J-3L)。

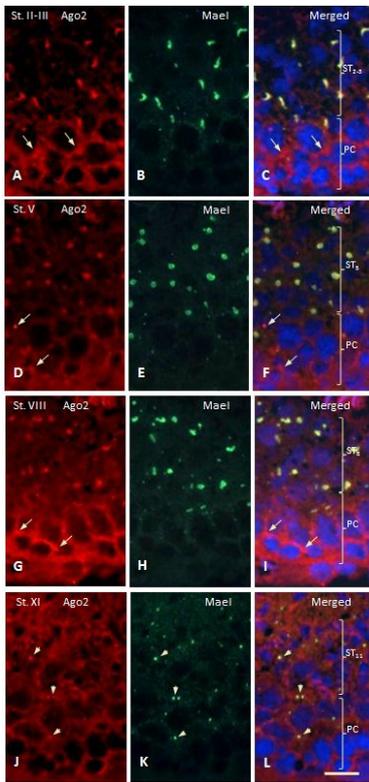


図3 精細管内の Ago と MAEL の共存(蛍光顕微鏡観察)。核は Hoechst33258 で染色。3D, F, G, I: Ago2 のみの観察(矢印)。3J, 3L: Ago2、MAEL の共存が観察(矢印)。

4) Ago2 は精母細胞や精子細胞に特異的に発現するヌアージュタンパク質。

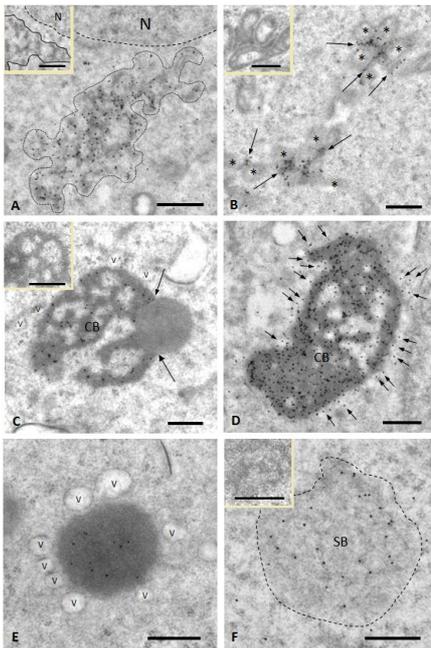


図4 免疫電顕のヌアージュ構造内。
A. ISPG(核周囲不定形顆粒), N: 核。B. IMC (ミトコンドリア間空隙)。C. 発生段階初期の丸形精子細胞 CB(クロマトイドボディー)。V: vesicle。D. 発生段階5精子細胞のCB。E. 発生段階9-11精子細胞のCB。F. SB

精巣内には ISPG(核周囲不定形顆粒)、IMC(ミトコンドリア間空隙)、SB(サテライトボディー)、CB(クロマトイドボディー)の四種類のヌアージュが存在し、Ago2 はパキテン期の精母細胞、球形精子細胞内の全てのヌアージュに存在することが免疫電子顕微鏡を用いた本研究から判明した(図4)。

5) Ago2 は精子細胞の後期の CB を囲む小胞でリソソームマーカータンパク質 LAMP2 と共に局在した。

球形の精子細胞で Ago2 は LAMP2 と共に顆粒状に存在した(図5)。しかし、パキテン期になると両者の共局在は消失し、役割を違えることを示唆した。

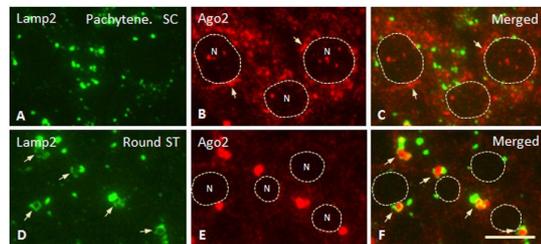


図5 精巣内の LAMP2 (緑) と Ago2 (赤) の局在解析(蛍光顕微鏡観察)。N: 核。SC: 精母細胞。ST: 精子細胞。

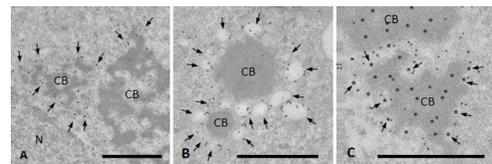


図6 精子細胞 CB 周辺小胞の Ago2 と LAMP2 との共存。A. step5 精子細胞のCB。B. step9 精子細胞。小胞に LAMP2 を観察した。

免疫電顕による超微形態学的な観察から、精子細胞の発生後期にはCBを囲む小胞にAgo2とLAMP2が共に局在し、それは発生の後期に分化する精子細胞でも観察され、従来報告されたヌアージュタンパク質と異なる局在を示すことを認めた。リソソームマーカーのLAMP2とも共同在した(図6)。

これらの結果から、パキテン期の精母細胞に発現するヌアージュ、ISPG、IMC、SBはタンパク質の発現調節のみに機能するのに対して、精子細胞のCBはリソソーム経路を介し分解していくことが示唆された。

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 12 件)

- 1) **Fujii Y.**, Onohara Y, Fujita H, Yokota S. Argonaute2 protein in rat spermatogenic cells is localized to nuage structures and LAMP2-positive vesicles surrounding chromatoid bodies. *J Histochem Cytochem* 64, 268-279 (2016) DOI: 10.1369/0022155416638840.
- 2) Terada D, Kawai F, Noguchi H, Unzai S, Hasan I, **Fujii Y.**, Park S-Y, Ozeki Y, Tame J.R.H. Crystal structure of MytiLec, a globotriose-binding anti-cancer lectin from the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Sci Rep* 6, (2016)
- 3) Hasan I, Gerdol M, **Fujii Y.**, Rajia S, Koide Y, Yamamoto D, Kawsar SM, Ozeki Y. cDNA and gene structure of MytiLec-1, a bacteriostatic R-type lectin from the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Mar Drugs*. 14, (2016) pii: E92. DOI: 10.3390/md14050092.
- 4) Hasan I, Sugawara S, **Fujii Y.**, Koide Y, Terada D, Imura N, Fujiwara T, Takahashi KG, Kojima N, Rajia S, Kawsar SMA, Kanaly RA, Uchiyama H, Hosono M, Ogawa Y, Fujita H, Hamako J, Matsui T, Ozeki Y. MytiLec, a mussel R-type lectin, interacts with surface glycan Gb3 on Burkitt's lymphoma cells to trigger apoptosis through multiple pathways. *Marine Drugs*, 13, 7377-7389 (2015) DOI: 10.3390/md13127071.
- 5) Kawsar SMA, Ara HA, Uddin SA, Hossain MK, Chowdhury SA, Sanaullah AFM Manchur MA, Hasan I, Ogawa Y, **Fujii Y.**, Koide Y, Ozeki Y. Chemically modified uridine molecules incorporating acyl residues to enhance antibacterial and cytotoxic activities. *International Journal of Organic Chemistry*, 5, 232-24. DOI: 10.4236/ijoc.2015.54023.
- 6) Kawsar SMA, Uddin S, Manchur MA, **Fujii Y.**, Ozeki Y. Acylation of D-glucose derivatives over C₅H₅N: spectral characterization and in vitro antibacterial activities. *Int J Biol Chem*, 9, 269-282 (2015) DOI: 10.3923/ijbc.2015.269.282.
- 7) Koide Y, Hasan I, Asanuma A, **Fujii Y.**, Ogawa Y, Kobayashi H, Rajia S, Kawsar SMA, Kanaly RA, Ozeki Y. Expression of various types of glycans in the lugworm (*Perinereis nuntia var. vallata*). *Annals of Marine Biology and Research*, 2, 1005 (2015)
- 8) Hasan I, Watanabe M, Ishizaki N, Sugita-Konishi Y, Kawakami Y, Suzuki J, Dogasaki C, Rajia S, Kawsar SMA, Koide Y, Kanaly RA, Sugawara S, Hosono M, Ogawa Y, **Fujii Y.**, Iriko H, Hamako J, Matsui T, Ozeki Y. A galactose-binding lectin isolated from *Aplysia kurodai* (sea hare) eggs inhibits streptolysin-induced hemolysis. *Molecules*, 19, 13990-14003 (2014) DOI: 10.3390/molecules190913990
- 9) Fujita H, Menezes JC, Santos SM, Yokota S, Kamat SP, Cavaleiro JA, Motokawa T, Kato T, Mochizuki M, Fujiwara T, **Fujii Y.**, Tanaka Y. Inulavosin and its benzo-derivatives, melanogenesis inhibitors, target the copper loading mechanism to the active site of tyrosinase. *Pigment Cell Melanoma Res*, 27, 376-386 (2014) DOI: 10.1111/pcmr.12225.
- 10) Ogawa Y, Sugawara S, Tatsuta T, Hosono M, Nitta K, **Fujii Y.**, Kobayashi H, Fujimura T, Taka H, Koide Y, Hasan I, Matsumoto R, Yasumitsu H, Kanaly RA, Kawsar SMA, Ozeki Y. Sialyl-glycoconjugates in cholesterol-rich microdomains of P388 cells are the triggers for apoptosis induced by *Rana catesbeiana* oocyte ribonuclease. *Glycoconj J*, 31, 171-184 (2014) DOI: 10.1007/s10719-013-9513-7.
- 11) Kawsar SMA, Faruk Md O. Rahman MS, **Fujii Y.**, Ozeki Y. Regioselective synthesis, characterization and antimicrobial activities of some new monosaccharide derivatives. *Sci. Pharm.*, 81, (2013) DOI: 10.3797/scipharm.1308-03.
- 12) Yasumitsu H, Tajima H, Isobe M, Kutsuna S, Kawsar SMA, **Fujii Y.**, Kanaly RA, Ozeki Y, Yokota E. Fine bubble mixing (FBM) culture of E. Coli: a highly cost-effective middle scale-size culture system. *Protein Peptide Letter*, 20, 213-217 DOI: 10.2174/0929866511320020014.

[学会発表] (計 8 件)

- 1) 下條俊介、山本要、小池徹、藤原俊幸、小川由起子、Kawsar S.M.Abe, Intiaj Hasan, 小出康裕、大関泰裕、**藤井佑樹**、藤田英明、新規海洋生物レクチンの生化学的分子特性と糖鎖依存的細胞死誘導の分子機構に関する研究、日本薬学会第 136 年会 (神奈川県、横浜市) 2016 年 3 月 26 - 29 日
- 2) **Fujii Y.**, Fujiwara T., Ogawa Y., Sugawara S., Hasan I., Koide Y., Kawsar S M A, Ozeki Y., Fujita H. A novel N-acetylhexosamine-binding lectin from slipper lobster caused apoptosis and endocytosis against cancer cells. 23rd International Symposium on

glycoconjugates, 第 23 回国際複合糖質シンポジウム(クロアチア共和国、スプリット) 2015 年 9 月 15 - 20 日

3) Hasan I., Koide Y., **Fujii Y.**, Ogawa Y., Sugawara S., Hosono M., Rajia S., Kawsar S.M.A., Kanaly R.A., Ozeki Y. (筆頭者による口頭発表) Mytilec, an R-type lectin from Mediterranean mussel regulates cancer cell growth through glycan-dependent signaling. 23rd International Symposium on glycoconjugates, 第 23 回国際複合糖質シンポジウム(クロアチア共和国、スプリット) 2015 年 9 月 15 - 20 日

4) Fujita H., Menezes J, Yokota S., Motokawa T., **Fujii Y.**, Fujiwara T. (授賞講演、筆頭者による口頭発表) Identification of a copper chaperon associated with tyrosinase, the target of melanogenesis inhibitor, inulavosin. 第 26 回日本色素細胞学会 (北海道、札幌市) 2015 年 11 月 14 - 15 日

4) **Fujii Y.**, Fujiwara T., Ogawa Y., Sugawara S., Hosono M., Hasan I., Koide Y., Kawsar S.M.A., Ozeki Y., Fujita H. The molecular morphology of the cytotoxic retrotranslocation by an N-acetylhexosamine-binding lectin isolated from slipper lobster in breast and ovarian cancer cells. Joint Meeting of the Society for Glycobiology (SFG) and the Japanese Society of Carbohydrate Research (JSCR), 米国糖鎖生物学会、日本糖質学会合同会議(米国、ハワイ州、ホノルル市) 2014 年 11 月 16 - 19 日

5) Ogawa Y., **Fujii Y.**, Sugawara S., Hosono M., Takeo T., Nitta K., Koide Y., Hasan I., Kawsar S.M.A., Kobayashi H., Ozeki Y. A sialic acid-binding lectin (SBL)-dependent apoptosis is triggered by sialylated-glycoconjugates in GEM of P388 cells. Joint Meeting of the Society for Glycobiology (SFG) and the Japanese Society of Carbohydrate Research (JSCR), 米国糖鎖生物学会、日本糖質学会合同会議(米国、ハワイ州、ホノルル市) 2014 年 11 月 16 - 19 日

6) Hasan I., **Fujii Y.**, Ogawa Y., Sugawara S., Hosono M., Koide Y., Rajia S., Kawsar S.M.A., Kanaly R.A., Fujiwara T., Fujita H., Ozeki Y. Intracellular trafficking of Mytilec, a Gb3-specific R-type mussel lectin with cytotoxic activity. Joint Meeting of the Society for Glycobiology (SFG) and the Japanese Society of Carbohydrate Research (JSCR), 米国糖鎖生物学会、日本糖質学会合同会議(米国、ハワイ州、ホノルル市) 2014 年 11 月 16 - 19 日

7) Fujita H., Menezes J, Santos S.M., Yokota S, Kamat S.P., Cavaleiro J.A.S, Motokawa T., Kato Tomomi, Mochizuki M., **Fujii Y.**, Fujiwara T. Inulavosin and its benzo-derivatives affect on copper-loading mechanism to tyrosinase, a key enzyme of melanin synthesis in melanocytes. XXII International Pigment Cell Conference (IPCC2014) 2014 年 9 月 4 - 7 日

8) Hasan I., Koide Y., Kawsar S.M.A., Matsumoto R., **Fujii Y.**, Ogawa Y., Sugawara S., Hosono M., Nitta K., Ozeki Y. Purification of novel a-galactoside-binding lectins from aquatic animals and their distinct cell regulatory activities. 22nd International Symposium on Glycoconjugates, 第 22 回国際複合糖質シンポジウム(中国 大連) 2013 年 6 月 23 - 28 日

〔図書〕(計 1 件)

1) Se-Kwon Kim 編 “Marine Proteins and Peptides” (2013) Wiley-Blackwell (Thomson Oxford, UK)出版 Chapter10: Ability of Diverse Marine Invertebrate Lectins to Regulate Cell Functions. Ozeki Y., Kawsar SMA., **Fujii Y.**, Ogawa Y., Sugawara S., Hasan I., Koide Y., Yasumitsu H., Kanaly RA.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井佑樹 (FUJII Yuki)

長崎国際大学

薬学部薬学科

助教

研究者番号：80610063