

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18390441

研究課題名 (和文) 精巣の抗菌性と精子産生能を制御するタンパク質の同定と機能解析

研究課題名 (英文) Identification and functional analyses of proteins which are involved in the sterility and sperm production in testis

研究代表者

原 孝彦 (HARA TAKAHIKO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・副参事研究員

研究者番号：80280949

研究成果の概要：精原細胞から分泌されたサイトカインは、隣接して存在するセルトリ細胞の NF- κ B 経路を活性化して、抗菌物質リポカリン 2 をコードする遺伝子の転写を高める。これが精巣を細菌感染から防御する仕組みであることを証明した。次に、精子数に影響を与える膜タンパク質 S76 の機能を解明するために、組織特異的な遺伝子破壊を可能とさせる S76-flxed マウス系統を新たに作出した。最後に、繊毛タンパク質 CMG-1、および RNA ヘリカーゼ DDX1 が精原細胞の増殖分化に働く遺伝子群の転写を正に調節する、という新事実を見出した。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2006年度 | 5,200,000 | 1,560,000 | 6,760,000 |
| 2007年度 | 4,800,000 | 1,440,000 | 6,240,000 |
| 2008年度 | 4,800,000 | 1,440,000 | 6,240,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,800,000 | 4,440,000 | 19,240,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：精巣、精子、精原細胞、セルトリ細胞、リポカリン 2、サイクリン D2

1. 研究開始当初の背景

精子形成の最初のステップである精原細胞の増殖と分化はそれを取り巻くセルトリ細胞から分泌されるサイトカインによってサポートされている。セルトリ細胞からの膜結合型 Stem cell factor (SCF) 産生、あるいは glial cell line-derived neurotrophic factor 産生を欠如する変異マウスは、いずれも無精子症を呈し雄不妊となる。ところがこの支持細胞から生殖細胞へのバイオシグナルとは別に、セルトリ細胞自身の機能も精原細胞によって制御されることを我々は 2002 年に発見した。SCF の受容体であ

る c-Kit を欠損する *W/W^o* 変異マウスでは、精原細胞と精細胞の大部分を欠失しているが、このマウスではセルトリ細胞で発現すべき種々の遺伝子群の mRNA もほぼ完全に消失していた。その中のひとつが細菌の繁殖を抑制する分泌性タンパク質リポカリン 2 をコードする遺伝子である。

リポカリン 2 は、インターロイキン 1 (IL-1) やリポポリサッカライド (LPS) 刺激を受けたマクロファージや上皮細胞から分泌され、細菌増殖に必須な鉄イオンと強力に結合することにより、個体を細菌感染から守る。我々は、セルトリ細胞と精原細胞との共培養系を用いて、セルトリ細胞のリポカリン

2 遺伝子が、精原細胞から分泌されるタンパク質性物質によって転写活性化されるという予備的な結果を得た。セルトリ細胞と精原細胞との相互作用によるリポカリン2の産生は成獣マウスの精巣で恒常的におこっていることから、ここでの抗菌物質産生は、細菌感染による配偶子の死滅を防ぐためと推察される。精巣におけるこのユニークな細菌感染防御機構を解明するための基盤研究は、泌尿器科学分野の発展に貢献する。

次に、我々はマウス精原細胞の増殖分化を制御する遺伝子を探索する過程で機能未知遺伝子 S76 を同定し、遺伝子欠損マウスを作出した。S76 遺伝子はレトロウイルスの外皮タンパク質と部分相同性を持つ膜タンパク質をコードしていた。S76 遺伝子ホモ欠損マウスは早期胎生致死となったが、S76 ヘテロ欠損マウスの精巣では S76 欠失型精子の含有比率が顕著に減少していた。この事実は、S76 タンパク質が精原細胞から精子形成にいたるどこかのステップに必須である可能性を示唆する。S76 タンパク質のさらなる機能解析は、精子形成メカニズムの理解を深めるのに役立つと期待される。

2. 研究の目的

(1) 我々は、一週齢マウスの精巣を出発材料として、セルトリ細胞と精原細胞との共培養系を確立した。そして、セルトリ細胞のリポカリン2 遺伝子が、精原細胞から分泌されるタンパク質性物質によって転写活性化されることを見出した。本研究では、この精原細胞依存的なセルトリ細胞のリポカリン2 発現高進の分子メカニズムをより詳細に解明することを第一の目的とした。

(2) 次に、我々は機能未知の膜タンパク質をコードする S76 遺伝子を同定し、S76 ヘテロ欠損マウスの精巣では S76 欠失型精子の含有比率が顕著に減少していることを見出した。S76 遺伝子は、胎生期生殖腺の前セルトリ細胞にも発現していた。そこで、本研究の2 番目のテーマとして、S76 タンパク質が精子形成にどのように関わっているのかを解明することを第二の目的とした。

(3) 最後に、本研究費申請後に我々が同定した、繊毛タンパク質 CMG-1 および RNA ヘリカーゼ DDX1 の精原細胞における機能

についても、本研究課題と密接に関連しているため、追加の研究テーマとした。これらの分子の作用機序を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) リポカリン2 遺伝子の転写調節機構については、以下の方法を用いた。まず、一週齢マウス精巣の精原細胞の初代培養上清を回収した。次に、リポカリン2 遺伝子の転写開始点上流配列を組換えたレポーター遺伝子を、我々が樹立した Sertoli-B 細胞にトランスフェクトした後、精原細胞培養上清で24 時間刺激してレポーター活性を測定した。このアッセイ系に、各種の変異配列レポーター、siRNA 発現ベクター、そして候補転写制御因子のドミナントネガティブ体 cDNA 等を添加して活性を比較した。転写制御因子の DNA 結合活性については、ゲルシフトアッセイおよびクロマチン免疫沈降法を用いた。また、精原細胞由来 cDNA 発現ライブラリーを作出し、サブプールを COS7 細胞にトランスフェクトすることによって、リポカリン2 誘導性サイトカインの発現クローニングを試みた。

(2) S76 ノックアウトマウスの精子解析は以下のように行った。まず、FACS に使える抗 S76 モノクローン抗体を新たに作出した。これを用いて、S76 ヘテロ欠損マウス精巣における S76(+)精子と S76(-)精子との含有比率を決定した。次に、S76 を精巣でのみ欠損させたマウスを作る目的で、S76-floxed アレルを組換えたターゲティングベクターを構築した。これを ES 細胞にトランスフェクトして、クローンを選択後、胚盤胞に顕微注入してキメラマウスを誕生させた。一方、精原細胞特異的な Stra8 遺伝子プロモーター下に Cre リコンビナーゼ遺伝子を配置したコンストラクトを調製した。本研究期間内に到達できなかったが、S76-floxed マウスを Stra8-Cre トランスジェニックマウスと交配させることにより、精原細胞特異的に S76 遺伝子を欠損するコンディショナルノックアウトマウスが出来上がる予定。

(3) CMG-1, DDX1 の解析には以下の方法を用いた。精巣切片を用いた *in situ* hybridization によって mRNA の発現場所を決めた。次に、siRNA を用いて、GC2 (精母細胞由来)あるいは GC1 (精原細胞由来)細胞株における CMG-1, DDX1 遺伝子の発現をそれぞれノックダウンさせ、発現量が低下する

遺伝子をマイクロアレイ解析によって網羅的に探索した。CMG-1, DDX1 の支配下にあることが判明した cyclin-D2 遺伝子の転写開始点上流配列を組換えたレポーター遺伝子を、GC1, GC2 細胞株にそれぞれトランスフェクトした後、レポーター活性を測定した。このとき、siRNA を用いて標的遺伝子をノックダウンさせた細胞株を用いて同様のアッセイを行い、活性を比較した。CMG-1, DDX1 の DNA 結合活性については、ゲルシフトアッセイおよびクロマチン免疫沈降法を用いた。

4. 研究成果

(1) リポカリン2 発現高進の分子メカニズム : Sertoli-B 細胞株に、リポカリン2 遺伝子転写開始点上流 3 kb のゲノム DNA を挿入したレポータープラスミドを導入し、精原細胞と共培養したところ、リポカリン2 遺伝子の転写活性が高進した。さらにこのアッセイ系を用いて転写活性化領域を徐々に短縮していき、精原細胞によるリポカリン2 遺伝子の転写活性化に必要な責任領域を同定した。ここには転写因子 NF- κ B のコンセンサス配列が存在していた。そこで、クロマチン免疫沈降実験を行ったところ、NF- κ B の p65 がリポカリン2 遺伝子プロモーター領域に特異的に結合し、精原細胞刺激依存的に核に移行することが判明した。さらにドミナントネガティブ I κ B α の強制発現、そして siRNA を用いた NF- κ B p65 および p50 のノックダウンにより、精原細胞によるリポカリン2 遺伝子の転写誘導は抑制された。リポカリン2 遺伝子の転写誘導活性は精原細胞の培養上清に存在し、この活性物質は熱処理により失活した。精原細胞の培養上清で Sertoli B 細胞株を刺激した時のリポカリン2 遺伝子レポーターの活性は、LPS や IL-1 β で刺激した時の値よりも高かった。

マクロファージを LPS や IL-1 β 刺激した時には、NF- κ B の別のコンポーネントである I κ B ζ が転写誘導され、これがリポカリン2 遺伝子の転写誘導を引き起こすことが2004年に報告された。そこでセルトリ細胞におけるリポカリン2 遺伝子の転写誘導も同様の仕組みによるかどうかを決定するために、I κ B ζ ノックアウトマウスを解析した。その結果、精巣におけるリポカリン2 遺伝子の発現レベルは I κ B ζ の有無にかかわらず一定であった。以上の一連の実験結果は、セルトリ細胞では精原細胞から分泌されるサイトカインにより NF- κ B 経路が

活性化されてリポカリン2 遺伝子の転写活性化が引き起こされていること、しかしそのシグナル伝達様式は細菌感染時の免疫系細胞のそれとは異なっていること、を示唆する(図1)。

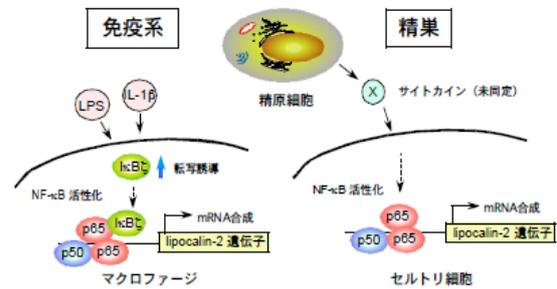


図1 リポカリン2遺伝子の転写活性化様式の比較

精原細胞から分泌されるリポカリン2 誘導性のサイトカインは、精巣の抗菌性を維持する上で重要な働きをしているものと推察される。そこで、次に精原細胞から分泌されるリポカリン2 誘導性サイトカインの発現クローニングを試みた。新生マウス精巣由来の精原細胞から cDNA ライブラリーを構築し、そのサブプールを COS7 細胞にトランスフェクトした。レポーターアッセイによって、培養上清中にリポカリン2 遺伝子の転写誘導活性があるかどうか解析した。しかし、一次スクリーニングで活性が検出されたサブプールを、さらに分割していても活性は上昇しなかった。したがって、標的とするサイトカインは複数の遺伝子産物から成る可能性がある。

次に、このリポカリン2 誘導性物質を生化学的に精製する目的で、ソースとなる7日齢マウス精原細胞の不活化を試みた。しかし、得られた細胞株では初代精原細胞の培養上清に存在した活性が再現されなかった。リポカリン2 誘導性物質の発現制御には長期培養によって損なわれる精原細胞独自の遺伝子プログラムが関わっているものと予想される。

(2) S76 の機能解析 : 我々は、マウス精原細胞の増殖分化を制御する分子の探索過程で、機能未知の膜タンパク質をコードする S76 遺伝子を同定し、そのノックアウトマウスを作出した。S76 ホモ欠損マウスは早期胎生致死となったが、S76 ヘテロ欠損マウスの精巣では S76 欠失型精子の含有比率が顕著に減少していた。また S76 遺伝子は、胎生期生殖腺の前セルトリ細胞にも発現していた。これらの事実は、S76 タンパク質が精原細胞の増

殖分化を制御している可能性を示唆する。

精子形成における S76 遺伝子産物の機能を明確にするために、まず S76 タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体の調製をおこなった。その結果、ウェスタンブロットティングとフローサイトメトリーに使用可能な抗体を得た。これらを用いて、精子の表面に S76 タンパク質が存在することを確認した。

上記の実験と並行して S76 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスの作出を試みた。最初のトライアルでは、S76 遺伝子の構造上の問題により、目的とした floxed allele の組換えが起こらなかった。そこでプロモーターを標的とした hypomorphic allele の導入に方針変更して実験を行なった結果、S76 遺伝子のプロモーター領域と第一エクソンとを loxP で挟み込んだ floxed allele を相同的組換えにより導入した ES 細胞の作出に成功した。現在、キメラマウスを交配中である。また、共沈実験により S76 遺伝子産物が小胞体シャペロンタンパク質と強く結合することを見出した。S76 タンパク質は精子タンパク質の細胞内輸送を制御している可能性がある。

(3) CMG-1, DDX1 の機能について : 我々は精原細胞に発現し ES 細胞に発現していないマウス遺伝子群の中から、当初機能未知であった CMG-1 遺伝子を選び、その発現と機能を解析した。まず *in situ* hybridization と精巣細胞分画の RT-PCR 解析によって、CMG-1 mRNA が成獣マウス精巣の精原細胞と精母細胞とに発現していることを確認した。CMG-1 の mRNA 発現量は、精巣以外では、肺、脾臓、子宮で高かった。

次に、GC2 細胞の CMG-1 mRNA 発現を siRNA によってノックダウンしてみたところ、細胞増殖速度に変化は観られなかったが、コンフルエント状態での細胞形態が紡錘形に変化し、さらに cyclin-D2 の発現が mRNA・タンパク質ともに消失した。このとき、cyclin-D1, cyclin-D3 など他の細胞増殖関連遺伝子の mRNA 発現レベルは変動しなかったことから、CMG-1 ノックダウンによる cyclin-D2 の発現消失は非特異的な転写抑制ではない。続いて、GC-2 細胞を用いてマウス cyclin-D2 遺伝子プロモーター領域のレポーターアッセイをおこない、CMG-1 ノックダウンによる cyclin-D2 の発現消失が転写レベルでおこ

っていることを証明した。最後に、Flag タグを付けた CMG-1 cDNA のトランスフェクション実験を行った結果、CMG-1 タンパク質は核に局在することが判明した。以上の実験結果を総合して、CMG-1 は cyclin-D2 の転写を制御する核内タンパク質であると我々は結論した (図 2)。

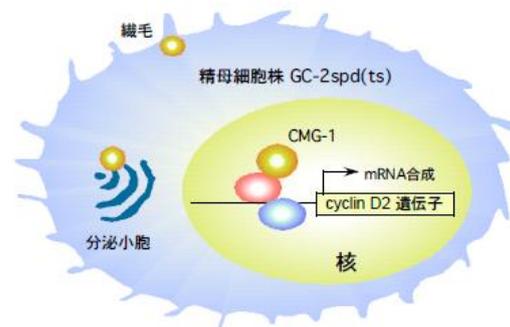


図2 CMG-1タンパク質の新しい機能

ただし、CMG-1 による cyclin-D2 遺伝子の転写活性化が、プロモーター領域 DNA へ直接結合することによるのか、それとも他の転写調節タンパク質を介したのものなのかについては不明であり、現在解析を進めている。2004年、CMG-1 がクラミドモナスの繊毛タンパク質 IFT-71 のマウスオルソログであることが米国のグループにより発表された。この論文では CMG-1 タンパク質は血管内皮細胞の繊毛内に局在し、血管内の物質フローの調節に関与していると記載されている。しかし、我々の解析では CMG-1 遺伝子産物は核に局在しており、上述のようにそれをノックダウンすると少なくとも cyclin-D2 遺伝子の転写が抑制された。したがって、CMG-1 タンパク質は、血管内皮細胞では繊毛タンパク質として働くが、精原細胞や精母細胞ではまったく異なる役割を果たしている可能性がある。

次に、我々はマウス胎仔の始原生殖細胞に発現する遺伝子のひとつとして、DEAD box protein family に属する RNA ヘリケース DDX1 を同定した。DDX1 タンパク質は成獣マウス精巣の精原細胞に強く発現していた。GC1 細胞における DDX1 mRNA の発現を siRNA 導入によりノックダウンすると、cyclin-D2, CD9, GDF3 などの mRNA 発現が顕著に低下した。マウス cyclin-D2 遺伝子の転写開始点上流ゲノム DNA を用いたレポーターアッセイ、およびゲルシフトアッセイの結果から、DDX1 は cyclin-D2 遺伝子の -369 ~ -351 領域に直接結合し、転写活性を高める働きをしていた。

DDX1 により発現制御を受ける cyclin-D2,

CD9, GDF3 遺伝子はいずれもヒト精巣腫瘍の 70%でゲノム DNA 増幅がおこる染色体 12p13.3 領域に局在している。そこで、ヒト精巣腫瘍由来細胞株 NEC8 の DDX1 発現を siRNA 導入によりノックダウンしてみたところ、マウス GC1 細胞株のケースと同様に cyclin-D2, CD9, GDF3 遺伝子の mRNA 発現が低下した。さらに、やはり 12p13.3 領域に局在する Nanog 遺伝子の発現レベルも DDX1 ノックダウンによって低下した。DDX1 を発現抑制した NEC8 細胞株では、空ベクターを導入したコントロール細胞と比べて、軟寒天培地でのコロニー形成能が顕著に低下し、ヌードマウス皮下での造腫瘍活性が消失した。これらの実験結果は、DDX1 が 12p13.3 領域に局在する幹細胞遺伝子群の転写活性化因子として、精巣腫瘍の誘導に必須な役割を果たしていることを強く示唆する。

DDX1 が精原細胞の自己複製や精子形成に必須であるかどうかについても興味のあるところである。現在作出準備中の DDX1-floxed マウス系統を用いたコンディショナルノックアウトマウス、あるいは精原細胞トランスジェニックマウスの作出を通じて、上記の課題にアプローチしていく予定である。

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 7 件)

- ① K. Tanaka, S. Okamoto, Y. Ishikawa, H. Tamura, and T. Hara. DDX1 is required for testicular tumorigenesis, partially through the transcriptional activation of 12p stem cell genes. *Oncogene*, advance online publication, April 27, 2009; doi:10.1038/onc.2009.89 (査読有)
- ② S. Ohata, M. Nawa, T. Kasama, T. Yamasaki, K. Sawanoboria, S. Hata, T. Nakamura, Y. Asaoka, T. Watanabe, H. Okamoto, T. Hara, S. Terai, I. Sakaida, T. Katada, and H. Nishina. Hematopoiesis-dependent expression of CD44 in murine hepatic progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 379: 817-823, 2009. (査読有)
- ③ T. Hara, M. Schwieger, R. Kazama, S. Okamoto, K. Minehata, M. Ziegler, J. Löhler, and C. Stocking. Acceleration of chronic myeloproliferation by

enforced expression of Meis1 or Meis3 in Icsbp-deficient bone marrow cells. *Oncogene*, 27: 3865-3869, 2008. (査読有)

- ④ L. Cao, H. Shitara, T. Horii, Y. Nagao, H. Imai, K. Abe, T. Hara, J. Hayashi, and H. Yonekawa. Mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in mouse female germ cells. *Nat. Genet.*, 39: 386-390, 2007. (査読有)
- ⑤ T. Suzuki, Y. Kanai, T. Hara, J. Sasaki, T. Sasaki, M. Kohara, T. Maehama, C. Taya, H. Shitara, H. Yonekawa, M. A. Frohman, T. Yokozeki, and Y. Kanaho. Crucial role of the small GTPase ARF6 in hepatic cord formation during liver development. *Mol. Cell Biol.*, 26: 6149-6156, 2006.
- ⑥ R. Fujino, Y. Ishikawa, K. Tanaka, M. Kanatsu-Shinohara, K. Tamura, H. Kogo, T. Shinohara and T. Hara. Capillary morphogenesis gene (CMG)-1 is among the genes differentially expressed in mouse male germ line stem cells and embryonic stem cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 73: 955-966, 2006. (査読有)
- ⑦ R. Fujino, K. Tanaka, M. Morimatsu, K. Tamura, H. Kogo, and T. Hara. Spermatogonial cell-mediated activation of an I κ B ζ -independent NF- κ B pathway in Sertoli cells induces transcription of the lipocalin-2 gene. *Mol. Endocrinol.*, 20: 904-915, 2006. (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

- ① 田中貴代子, 原 孝彦: DDX1 遺伝子の過剰発現が精巣腫瘍形成を促進する. 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008. 10. 28-30, 名古屋
- ② 大林謙一郎, 田中貴代子, 藤野隆介, 田村和広, 原 孝彦: CMG-1 は精母細胞の Cyclin-D2 および接着関連遺伝子の転写を制御する. 第 6 回幹細胞シンポジウム, 2008. 5. 16-17, 東京
- ③ 田中貴代子, 原 孝彦: 精巣腫瘍形成における DDX1 の役割. 第 6 回幹細胞シンポジウム, 2008. 5. 16-17, 東京
- ④ 大林謙一郎, 田中貴代子, 藤野隆介, 田村和広, 向後博司, 原 孝彦: 精母細胞で発現している CMG-1 遺伝子の機能解析. 第 30 回日本分子生物学会年会 BMB2007, 2007, 12. 11-15, 横浜
- ⑤ 田中貴代子, 中山由紀, 原 孝彦: Ddx1 遺伝子の精巣形成過程における発現と機能解析. 第 30 回日本分子生物学会年会

- BMB2007、2007、12.11-15、横浜
- ⑥ T. Hara, M. Schwieger, R. Kazama, S. Okamoto, and C. Stocking.: Pre-leukemic amplification of granulocytes by enforced expression of Meis1 or Meis3 in hematopoietic stem cells of ICSBP-deficient mice. 5th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), 2007, 6.17-20, Cairns, Australia
- ⑦ 原 孝彦, Maike Schwieger, 風間律子, 岡本土毅, Carol Stocking: Meis1/3 遺伝子は ICSBP 欠損マウスの顆粒球分化を促進する. 第 5 回幹細胞シンポジウム、2007、5.17-19、淡路島
- ⑧ T. Hara, R. Fujino, K. Tanaka, M. Morimatsu, K. Tamura, and H. Kogo.: A spermatogonial stem cell-derived factor induces the transcription of *lipocalin-2/24p3* gene in Sertoli cells by an I κ B ζ -independent NF- κ B pathway. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006.6.18-23, Kyoto
- ⑨ T. Suzuki, Y. Kanai, Y. T. Hara, J. Sasaki, T. Sasaki, M. Kohara, T. Maehama, T. Yokozeki, and Y. Kanaho.: Physiological function of the small G protein ARF6 in hepatic cord formation and liver development. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006.6.18, Kyoto

[その他]

ホームページ等

<http://www.rinshoken.or.jp/org/TB/index-jp.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 孝彦 (HARA TAKAHIKO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・副参事研究員

研究者番号：80280949

(2) 研究分担者 (2006 年度)

清野 真理 (KIYONO MARI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・研究員

研究者番号：60376621

(3) 連携研究者