

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06834

研究課題名(和文)細胞接着分子が制御する細胞小器官の配置と鞭毛形成の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of organelle positioning and flagellar formation regulated by cell adhesion molecule

研究代表者

若山 友彦(Wakayama, Tomohiko)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：70305100

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):精子の核は頭部にあり、尾部にはミトコンドリアと鞭毛が配置される。細胞接着分子CADM1は、尾側の細胞膜に発現し、その遺伝子欠損マウスは、ミトコンドリアの配置と鞭毛形成に異常を生じ、受精できない。本研究では、CADM1とBSPRY、MPP6、Iba-1、SEPTEX-1との相互作用を検討した。その結果、CADM1と相互作用するのはMrapとTex22だけだった。しかし、MrapとTex22のノックアウトマウスは不妊を示さない。これらの結果から、細胞接着分子CADM1が存在することが重要で、ミトコンドリアの再配置や鞭毛形成が進行することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精子形成では、造精幹細胞を含む精祖細胞が増殖・分化をして次世代に遺伝情報を伝える精子が形成される。精子は、頭部に先体や核があり、ミトコンドリアを有する鞭毛を尾部にもつ高度に分化した細胞である。細胞接着分子CADM1のノックアウトマウスでは、ミトコンドリアの配置異常を伴う鞭毛形成異常を生じた。このミトコンドリア配置と鞭毛形成を制御するCADM1が相互作用する分子が明らかになり、本研究の成果は、男性不妊症の原因解明に寄与する。

研究成果の概要(英文):The nucleus and organelles are arranged in designated position. In sperm, the nucleus localizes at the head, centrosome does at the neck and mitochondria and flagella do at the tail. Cell adhesion molecules 1 (CADM1) is localized in the posterior portion of elongating spermatids. Knockout (KO) mice for CADM1 develop male infertility due to defective spermatogenesis showing disordered mitochondrial position and abnormal formation of flagella. It is unknown to regulate the mitochondrial localization and flagellar formation by CADM1. We examined which molecules interact with CADM1, its adaptor molecule BSPRY, Iba-1 MPP6 and sperm flagellar protein SEPTEX-1. Only Mrap and Tex22 could interact with CADM1, BSPRY, MPP6, Iba-1, SEPTEX-1. However, knockout mice for Mrap and Tex22 showed no infertility. These findings suggest that CADM1 is indispensable for normal positioning of mitochondria and flagellar formation.

研究分野：解剖学

キーワード：精子形成 細胞接着分子 ミトコンドリア 鞭毛形成 免疫沈降 質量分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

すべての細胞には、核と細胞小器官が存在し、核の周囲に細胞小器官は配置される。これは極性をもった上皮細胞や神経細胞でも同じで、核の周囲に細胞小器官は散在している。しかし、精子は、遺伝子を次世代に伝えることに特化した細胞で、いわば高度に極性化した細胞とも言える。すなわち、核と先体は頭部にあり、中心子は頸部に、尾部にはミトコンドリアと鞭毛が配置されている。この核と細胞小器官の細胞内極性化が精子機能に重要であり、極性化が起これないと受精ができない。研究代表者は、細胞接着分子に着目して、この極性化の分子機構について研究を行ってきた。そして、CAR, JAM-C, N-Cadherin, Nectin-3 など様々な細胞接着分子が頭部の細胞膜に存在するのに対し、細胞接着分子 Cell adhesion molecule-1(CADM1)だけが尾側の細胞膜に存在する細胞接着分子であることを発見した。そこで CADM1 遺伝子欠損マウスを解析したところ、ミトコンドリアの尾部への非局在化、鞭毛形成不全などの尾部の形成異常が認められた。しかし、細胞接着分子 CADM1 がどのように尾部のミトコンドリアの配置及び鞭毛形成を制御するのかについて、その分子機構は全く不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞接着分子 CADM1 が尾部のミトコンドリアの配置と鞭毛形成を制御する分子機構を明らかにすることである。研究代表者は、Yeast-Two-Hybrid システムにより、CADM1 と直接結合する 2 つのアダプター蛋白質 BSPRY と MPP6 を同定した。しかし、BSPRY 遺伝子欠損マウスの精巣は小さいが CADM1 に見られる精子形成障害はなく、MPP6 では精子形成に異常は見られない。そこで、BSPRY 抗体で免疫沈降をして質量分析で解析をしたところ、細胞内蛋白質 Iba-1 が沈降産物に含まれていた。また、CADM1 遺伝子欠損マウスの精巣で、Iba-1 と精子鞭毛蛋白質 SEPTIN-1 の発現が著しく減少していることを発見した。これらの結果から、CADM1 がアダプター蛋白質 BSPRY を介して Iba-1 や SEPTIN-1 を含んだ複合体を形成して、ミトコンドリアの再配置や鞭毛形成を制御するとの仮説を立てた。iPS 細胞や器官培養系において精子を作製できることは報告されているが、ミトコンドリアの配置と鞭毛形成が細胞集団全体で観察できないと解析には利用できない。そのため、遺伝子欠損マウスを作製し、その表現型を観察しなければならない。しかし、多くの分子の中から CADM1 と相互作用する分子群を見つけ出すことは難しい。そこで、抗体を用いた免疫沈降法により得られた沈降産物を質量分析して相互作用する候補分子を繰り返し同定する。同定した分子の機能解析を通じて、細胞接着分子 CADM1 と相互作用する分子群を明らかにするとともに、細胞接着分子 CADM1 による精子の尾部のミトコンドリアの配置と鞭毛形成の制御機構について明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、細胞接着分子 CADM1 の遺伝子欠損マウスで観察されたミトコンドリア配置と鞭毛形成の異常を引き起こす分子機構の解明を目指す。CADM1 遺伝子欠損マウスによる解析の結果、野生型マウスと比較して、発現に異常が認められ、かつ、CADM1 との相互作用する分子と相互作用する分子を網羅的に同定する。すなわち、その発現が抗体を用いた免疫沈降を行い、その沈降産物を質量分析により分子を同定する解析を繰り返し行った。抗体は、細胞接着分子 CADM1、そのアダプター蛋白質 BSPRY、MPP6、細胞内蛋白質 Iba-1、精子鞭毛蛋白質 SEPTIN-1 を用いた。得られたすべての分子に対して遺伝子欠損マウスを作製するにはコストがかかり過ぎるので、2 つの分子間の直接の相互作用を解析できる *in vitro* アッセイ実験系である VIP (Visible immunoprecipitation assay) アッセイを行った。VIP アッセイとは、蛍光タンパク質と GFP-Nanobody を用いた共免疫沈降法に蛍光顕微鏡を組み合わせたタンパク質間相互作用を蛍光観察により解析法である。VIP アッセイでは、ウェスタンブロッティングで共免疫沈降産物を解析するのではなく、免疫沈降産物をビーズに結合している蛍光蛋白質の蛍光シグナルとして直接検出する。そのため、多くの分子を簡単に、早く、その間相互作用を解析することができる。したがって、抗体を用いた免疫沈降産物の質量分析により同定した分子を、VIP アッセイにより直接の相互作用をする分子を同定する。

4. 研究成果

細胞接着分子 CADM1 が尾部のミトコンドリアの配置と鞭毛形成を制御する分子機構を明らかにするため、Yeast-Two-Hybrid システムにより、CADM1 と直接結合するアダプター蛋白質 BSPRY と MPP6 を同定した。しかし、MPP6 の遺伝子欠損マウスは報告されているが、精子形成障害を示さない。また、BSPRY 遺伝子欠損マウスを作製して解析したところ、BSPRY 遺伝子欠損マウスの精巣は小さいが、CADM1 で観察された様な精子形成障害は見られなかった。次に、BSPRY 抗体と

MPP6 抗体で免疫沈降をして質量分析で解析をしたところ、細胞内蛋白質 Iba-1 や SEPTX-1 等の多数の分子が沈降産物に含まれていた。Iba-1 と SEPTX-1 の発現は、CADM1 遺伝子欠損マウスの精巢で著しく減少していた。CADM1 についても、再度、免疫沈降と沈降産物の質量分析を行った。これらの実験の結果、相互作用する可能性のある 80 種類の分子を同定した。これらの分子に対して、in vitro のアッセイ実験系である VIP アッセイにより CADM1 と直接作用がある分子を同定したところ、13 種類の分子を明らかにした。さらに、CADM1 の遺伝子欠損マウスで発現が変化する分子として、APP、Atp5o、Cbr1、Ifnar2、Mrap、Pigp、Tex22 の 7 個の分子を選別できた。さらに、これらについて、BSPRY との相互作用を検討した。その結果、Mrap と Tex22 のみが相互作用が見られた。MPP6 と SEPTX-1 とはどれも相互作用が見られなかった。しかし、Mrap と Tex22 のノックアウトマウスは不妊を示さないことが既に報告されている。これらの結果から、細胞接着分子 CADM1 が存在することにより、相互作用する分子群が適切な局在を示すことが可能になり、ミトコンドリアの再配置や鞭毛形成が進行することが示唆された。また、代償機構が存在しており、相互作用する分子が欠損しても他の分子が代償することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Gewaily Mahmoud S., Kassab Mohamed, Farrag Foad A., Almadaly Essam A., Atta Mustafa S., Abd-Elmaksoud Ahmed, Wakayama Tomohiko	4. 巻 122
2. 論文標題 Comparative expression of cell adhesion molecule1 (CADM1) in the testes of experimental mice and some farm animals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Histochemica	6. 最初と最後の頁 151456 ~ 151456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.acthis.2019.151456	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 若山友彦、大野伸彦、犬丸諒子、齊藤成、Suthat Duangchit、Wanta Arunothai、野口和浩、河原崎達雄
2. 発表標題 細胞接着分子CADM1欠損マウス精巣における伸長精子細胞の分化異常の解析
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第38回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiko Wakayama, Nobuhiko Ohno
2. 発表標題 Cellular interaction between spermatogenic and Sertoli cells during spermatogenesis by cell adhesion molecules
3. 学会等名 ABiS Symposium Forefront and Future of Electron Microscopic Imaging（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 若山友彦
2. 発表標題 精子形成を制御する細胞接着分子の役割
3. 学会等名 第52回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	玉井 郁巳 (Tamai Ikumi) (20155237)	金沢大学・薬学系・教授 (13301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	大槻 純男 (Ohtsuki Sumio)		
研究協力者	大野 伸彦 (Ohno Nobuhiko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------