

平成 21 年 4 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19591912
 研究課題名（和文） 遺伝子導入を用いた生殖細胞特異抗原 TEX101 の
 性腺形成制御機構の解析
 研究課題名（英文） Analysis of gonad developmental mechanisms concerning of a germ cell-
 specific antigen, TEX101 through gene transfer
 研究代表者
 吉武 洋 (YOSHITAKE HIROSHI)
 順天堂大学・医学研究科・助教
 研究者番号：00396574

研究成果の概要:生殖細胞マーカー糖タンパク質 TEX101 は uPAR/Ly-6 スーパーファミリーに属する GPI アンカー型タンパク質である。本研究において我々は TEX101 が同じスーパーファミリーに属する Ly6k と共役していることを明らかにした。本スーパーファミリーには細胞の接着・遊走に関与する分子が多く、今後 TEX101 及び Ly6k 遺伝子を培養細胞に導入し、両分子の細胞接着・遊走への関与を解析する予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖細胞、TEX101、Ly6k

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の研究グループが発見した生殖細胞マーカー糖タンパク質 TEX101 は、ヒトを含めた哺乳動物に広く存在している。本分子は胎生期には前精原細胞と卵原細胞の双方に発現が認められる。しかし卵原細胞ではその発現は出生後急速に消失する。一方精原細胞では思春期になり、減数分裂が始まると発現が一時的に消失するが、精母細胞以降の分化の進んだ精細胞には再び強い発現が認められるようになる。このように TEX101 は雌雄生殖細胞の発生段階で発現パターン

が変化すること、また生殖細胞以外の正常組織には発現が認められないことなどから、配偶子形成過程に重要な役割を果たしていることが強く推測される。また本分子の一次構造は既知のタンパク質と全く相同性がないユニークな構造であるが、そのアミノ酸配列中にはシステインリッチドメインを有しており、また精細胞の形質膜上にはグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカー型タンパク質として存在していることが判明している。このことから TEX101 は uPAR/Ly-6 ファミリー関連分子の一つと考えられている。

このように本分子の形態学および生化学的特徴についてはかなりのことがわかってきているが、その生物学的機能の詳細については依然不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は本分子の機能を明らかにすることであるが、まず我々は uPAR/Ly-6 スーパーファミリーに属する分子には細胞接着・遊走制御能を持つものが多いことに着目し、TEX101 も同様の機能を有する可能性があるかと推測した。そこで TEX101 遺伝子を培養細胞株に導入し、この細胞の接着・遊走の変化について検討した。

3. 研究の方法

TEX101 発現細胞株樹立のため、成熟マウス精巣から作製した TEX101 cDNA 全長を pcDNA(-)ベクターにサブクローニングし、この発現ベクターを HEK293 細胞株にリポフェクティン法で導入した。TEX101 の発現はフローサイトメトリー及びウェスタンブロット法で確認した。

遺伝子導入後の細胞の変化は位相差顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 研究結果

①TEX101 遺伝子導入細胞株の形態学的変化

位相差顕微鏡による観察では、TEX101 遺伝子導入・非導入細胞株間で、生存率・増殖率・細胞形態に差が認められなかった。

この結果より TEX101 単独での遺伝子導入は細胞機能に影響しないことが推測された。そこで精巣における TEX101 との共役分子を同時に導入し、細胞接着・遊走に変化が生じるかを検討することとした。

既に我々は TEX101 の精巣内共役分子の探索をプロテオミクス的手法を用いて行い、その結果、annexin A2、cellubrevin、Ly6k の 3 分子を TEX101 共役候補分子として同定した。この中で、annexin A2 と cellubrevin は種々の細胞に広く発現していることが報

告されており、元来 HEK293 にも発現していることが知られている。一方 Ly6k は TEX101 と同様に uPAR/Ly-6 スーパーファミリーに属する GPI アンカー型タンパク質であり、遺伝子レベルでは精巣特異的に発現している。したがって TEX101 は Ly6k と共役して生物学的機能を発揮している可能性がある。

しかし Ly6k は特異抗体も作成されていないためその性状はほとんどわかっておらず、TEX101 との共役についてもいまだ確証を得られていない。そこでまず Ly6k の特異抗体作成を試み、それを用いてマウス精巣における Ly6k の分子性状の解析を行い、さらに TEX101 との共役の有無について検討した。

本検討は以下の方法を用いて行った。

- 1) 成熟マウス精巣から RNA を抽出し、Ly6k のアミノ酸配列 21-124 に対応する塩基配列を RT-PCR 法により増幅した。Ly6k₂₁₋₁₂₄ cDNA を ヒスチジンタグ配列を N 末端側に付加できる pEXP5-NT/TOPO TA ベクターにサブクローニング後、宿主大腸菌 BL21 (DE3) を用いてタンパク質を発現させた。大腸菌体は 8M 尿素で可溶化後、HisTrap FF crude kit[®] を用いてリコンビナント Ly6k₂₁₋₁₂₄ を回収し免疫原とした。免疫は 10 週齢の雌ウサギ (JW/CSK) に一週間毎に 3 回行った。最終免疫 4 日後に全血採血を行い、血清より IgG 分画を精製し抗 Ly6k 抗体として実験に供した。
- 2) 精巣抽出液を用いたウェスタンブロット法及びマウス精巣凍結切片を用いた蛍光免疫組織学的解析で抗体特異性を検討した。
- 3) 免疫沈降法を用いて両分子の共役の有無を検討した。さらに共焦点レーザー顕微鏡によりそれらの局在を解析した。

②抗 Ly6k 抗体の反応性

精巣タンパク質を細胞外面分 (EC)、細胞内水溶性画分 (WS)、Triton-X 100[®] 可溶性膜画分 (TS) に分画し、ウェスタンブロット法で抗 Ly6k 抗体の反応性を検討すると、WS には陰性であったが、EC 及び TS では Ly6k の予想分子質量 17 kDa の位置に単一の明瞭なバンドを認めた (図 1)。この抗体はパラホルムアルデヒド固定精巣凍結切片では精細管内の精細胞にのみ反応し、間質細胞ではその反応性は認められなかった (図 2)。

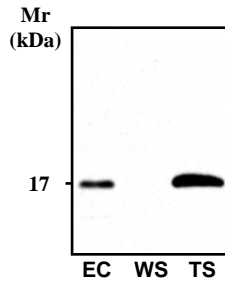


図 1。ウェスタンブロット解析によるマウス精巣に対する抗 Ly6k 抗体の反応性。

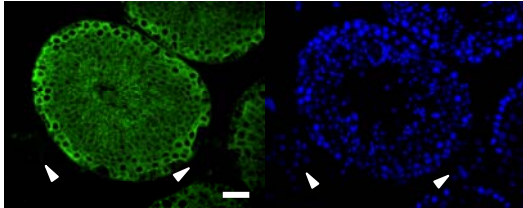


図 2。精巣凍結切片に対する抗 Ly6k 抗体の反応性。緑：Ly6k、青：核染色。矢印：間質。スケール：50 μ m。

③免疫沈降法による TEX101 と Ly6k の共役の確認

抗 Ly6k 及び抗 TEX101 抗体を用いて免疫沈降した TS には 38kDa (抗 TEX101 抗体反応)、17kDa (抗 Ly6k 抗体反応) バンドがそれぞれ検出され、TEX101 と Ly6k の精巣内での共役が示唆された (図 3)。

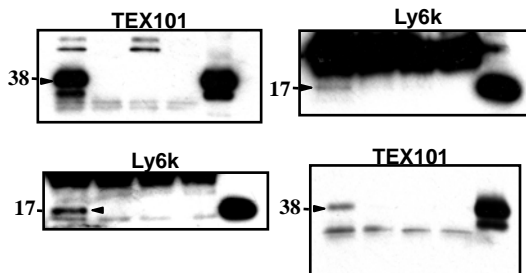


図 3。抗 TEX101 及び抗 Ly6k 抗体による免疫沈降。それぞれの免疫沈降産物中には TEX101 及び Ly6k が含まれている (矢印)。

③マウス精巣における TEX101 と Ly6k の局在

共焦点レーザー顕微鏡による観察では、両抗体の反応は精細管内の精細胞膜にのみ認められた (図 4)。またショ糖密度勾配法による膜タンパク質分画を用いた解析でも TEX101 と Ly6k の挙動は高い連関を示した (図 5)。

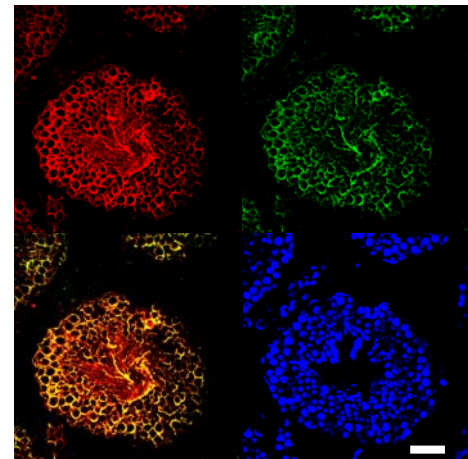


図 4。マウス精巣における TEX101 と Ly6k の局在。赤：TEX101、緑：Ly6k、黄：結合、青：核染色。スケール：50 μ m。

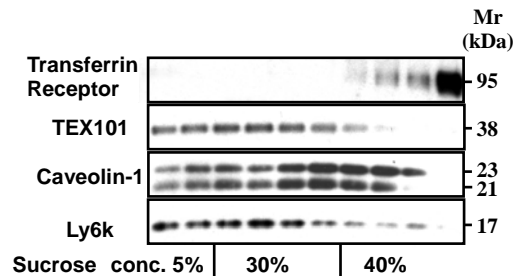


図 5。ショ糖密度勾配法による精巣内膜タンパク質の分離。Transferrin Receptor：非ラフトマーカ、Caveolin-1：ラフトマーカ。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけ

本研究で我々は TEX101 が Ly6k と精細胞の細胞膜上で共役していることを明らかにした。TEX101 と Ly6k は共に uPAR/Ly-6 スーパーファミリーに属している。本スーパーファミリーに属する分子の一部は細胞接着・遊走制御能を有することが報告されており、この二種類の分子は共同して細胞接着・遊走に関与している可能性があることを示している。

(3) 今後の展望

TEX101 と Ly6k の細胞接着・遊走への関与を明らかにする目的で、培養細胞株に両分子の遺伝子を導入して、細胞動態の変化の有無を確認する予定である。

またヒトにおいては TEX101 と Ly6k は癌・精巣抗原であることが既に知られており、癌細胞における両分子の機能についても検討する予定である。

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. Shirai Y*, Yoshitake H*, Maruyama M, Takamori K, Ogawa H, Hasegawa A, Araki Y. Distribution of molecular epitope for Ts4, an anti-sperm auto-monoclonal antibody in the fertilization process. *J Reprod Dev* 2009 (in press). *These authors contributed equally to this work.
2. Yoshitake H, Shirai Y, Mochizuki Y, Iwanari H, Tsubamoto H, Koyama K, Takamori K, Ogawa H, Hasegawa A, Kodama T, Hamakubo T, Araki Y. Molecular diversity of TEX101, a germ cell-specific glycoprotein monitored with monoclonal antibodies: Variety of the molecular characteristics according to subcellular localization within the mouse testis. *J Reprod Immunol* 2008;79:1-11.
3. Yoshitake H, Tsukamoto H, Maruyama M, Takamori K, Ogawa H, Araki Y. TEX101, a germ cell-marker glycoprotein, is associated with lymphocyte antigen 6 complex locus k within the mouse testis. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 372:277-82.
4. Yoshitake H, Takahashi M, Ishikawa H, Nojima M, Yoshida K, Ishi K, Takamori K, Ogawa H, Hamakubo T, Kodama T. Araki Y. Aldo-keto reductase family 1, member B10 in uterine carcinomas: a potential risk factor of recurrence after surgical therapy in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17: 1300-6.
5. Suzuki K, Yu X, Chaurand P, Araki Y, Lareyre JJ, Caprioli RM, Orgebin-Crist MC, Matusik RJ. Epididymis-specific lipocalin promoters. *Asian J Androl* 2007;9:515-21.
6. Nitto T, Takeda Y, Yoshitake H, Sando F, and Araki Y. Structural divergence of GPI-80 in activated human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 359:227-33.
7. Tsukamoto H, Takizawa T, Takamori K, Ogawa H, Araki Y. Genomic organization and structure of the 5'-flanking region

of the TEX101 gene: Alternative promoter usage and splicing generate transcript variants with distinct 5'-untranslated region. *Mol Reprod Dev* 2007;74:154-62.

以上すべて査読あり。

[学会発表] (計4件)

1. Yoshitake H, Kamo A, Yanagida M, Shirai Y, Takamori K, Ogawa H, Hasegawa A, Araki Y. The immunoreactivity of Ts4, an anti-TEX101 monoclonal antibody, derived from anti-mouse sperm autoantibodies. 41st Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction. May, 2008. Kona, Hawaii, USA.
2. 丸山真由子・吉武洋・高森建二・小川秀興・荒木慶彦：マウス精巣における生殖細胞特異マーカーTEX101とLy6kの共役。第23回日本生殖免疫学会総会、2008年12月、富山。
3. Yoshitake H, Shirai Y, Jin H, Iwanari H, Takamori K, Ogawa H, Hamakubo T, Araki Y. Molecular diversity of TEX101, a germ cell-specific glycoprotein in the process of spermatogenesis analyzed by monoclonal antibodies. 40th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction. July, 2007. San Antonio, Texas, USA.
4. 白井洋平・吉武洋・望月康弘・岩成宏子・鏑本浩志・香山浩二・高森建二・小川秀興・長谷川昭子・濱窪隆雄・荒木慶彦：生殖細胞特異的抗原TEX101の分子多様性：新規単クローン抗体を用いた解析。第26回日本アンドロロジー学会学術大会、2007年7月、浦安。(日本アンドロロジー学会会長特別賞受賞)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉武 洋 (YOSHITAKE HIROSHI)
順天堂大学・医学研究科・助教
研究者番号：00396574

(2) 研究分担者

荒木 慶彦 (ARAKI YOSHIHIKO)
順天堂大学・医学研究科・准教授
研究者番号：70250933