

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06440

研究課題名(和文) ダイナミックな精子形成能を持つ生殖細胞特異的結合因子KIAA1210の機能解析

研究課題名(英文) Function of KIAA1210, germ cell specific junction protein in dynamic spermatogenesis

研究代表者

岩森 督子 (Iwamori, Tokuko)

九州大学・農学研究院・特別研究員(RPD)

研究者番号：10711509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：精巣には生殖細胞間に生殖細胞間架橋Intercellular bridge(ICB)、セルトリ細胞間に血液精巣関門Blood-testis barrier(BTB)、セルトリ細胞間およびセルトリ細胞-伸長期精細胞間にEctoplasmic Specialization(ES)などの細胞間結合があり、いずれも欠損すると精子形成が破綻し雄性不妊になる。我々はこれら細胞間結合の連携の可能性を考え、最近同定したESやICBなど多様な局在を示すKIAA1210のノックアウトマウス解析により細胞間結合が生殖細胞の品質管理に機能することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖細胞間結合(ICB)を含む精巣特異的な細胞間結合は欠損すると不妊になる重要な構造体であるが、機能は未だに不明である。また、ダイナミックな精子形成を滞りなく実現するには異種の細胞間結合の連携が予想される。我々が同定した複数の細胞間結合に局在するKIAA1210は異種の細胞間結合の関連性を研究するのに適している。KIAA1210欠損により精子形成における細胞死の割合が増加したことから精巣特異的な細胞間結合は細胞の完全性を制御すると考えられる。成果は生殖生物学分野において重要な知見となるだけでなく、不妊原因の解明や診断など医療、畜産、養殖、野生動物保存など幅広い分野への応用的貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：In the testis, there are three important cellular connections, intercellular bridge (ICB) between germ cells, blood-testis barrier (BTB) between Sertoli cells, and ectoplasmic specialization (ES) between Sertoli cells and between Sertoli cells and elongate spermatids. If any of them is disrupted, spermatogenesis and male fertility are impaired. Considering the possibility of cooperation between these cellular connections, the mice deficient for KIAA1210, that is recently identified and shows multiple localizations such as ES and ICB, was analyzed. As a result, we identified that cellular connections play a role to control the quality and the integrity of germ cells.

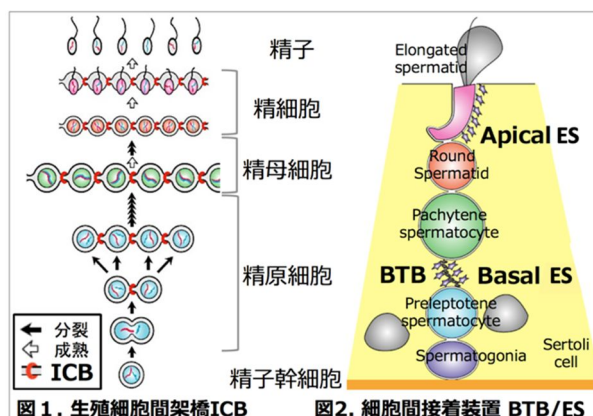
研究分野：生殖生物学

キーワード：精子形成 生殖細胞間架橋 KIAA1210

1. 研究開始当初の背景

精巣には精細管が幾重にも折りたたまれ収納されており、精細管基底膜上には増殖・成熟を繰り返し最終的に精子となる生殖細胞群とその間にセルトリ細胞が局在する。これらは精巣特異的細胞間結合、つまり、一精子幹細胞由来の全生殖細胞を結合する Intercellular bridge (ICB) (図1)、セルトリ細胞間に形成される血液精巣関門 Blood-testis barrier (BTB) (図2)、BTB 傍のセルトリ細胞間とセルトリ細胞-伸長期精細胞間の接着装置である Ectoplasmic specialization (ES) (図2) に支えられており、いずれも欠損すると雄性不妊になる。

BTBは免疫細胞の精細管内への侵入を阻害し半数体生殖細胞が非自己と見なされ攻撃されるのを防ぐ。ESは精子が遊離するステージ8で消失し、その際、一段階前の生殖細胞で再形成される。ICBは同じ成熟段階の生殖細胞をつないでおり、低分子輸送や細胞間情報伝達を担い同調化に機能すると予想されているが未明である。ICBで



連結しながら増殖・成熟していく膨大な数の生殖細胞が出現・消失を繰り返す BTB 及び ES に絶妙なタイミングで拘束・解放され、精子として排出されるという美しくダイナミックな精子形成を滞りなく実現するにはどのような分子メカニズムで各細胞間結合が連携しているのかという重要で純粋な「問い」が生じる。

我々はこれまで一貫して、重要にも関わらず詳細が不明であった ICB の研究を行ってきた。まず、精巣特異的遺伝子 TEX14 が ICB を形成維持する機構を解明した[1]。ICB の存在意義は生殖細胞の同調化と昔から予想されているが、憶測の域を越えない。ICB は欠損すると精子形成が阻害されることから、異常細胞を切断し淘汰する安全装置の可能性もある。ICB 機能性タンパク質探求のため、ICB 濃縮精製物のプロテオミクス解析を行い、新規 ICB タンパク質 RBM44 (RNA binding protein 44) を同定した。この RNA 結合タンパク質 RBM44 は減数分裂期前後特異的に ICB に局在したが、欠損させると精巣上体内の精子数が倍化した以外の異常は見られなかった[2]。このことから、RBM44 代替 RNA 結合タンパク質の存在が予測された。ICB は生殖細胞の成熟に伴い環状の直径が増し、局在する因子も変化したため、異なる週令マウスの精巣から ICB を回収することにより、生殖細胞ステージごとに ICB タンパク質を網羅的に同定した。その結果、新規精巣高発現タンパク質で ES、XY body、そして、アクロソームに局在する KIAA1210 を同定した[3]。同定 ICB タンパク質で、ICB 以外の細胞間結合に局在を示したのは KIAA1210 が初めてである。CRSPR/Cas9 システムを用いて、KIAA1210 ノックアウト(KO)マウスを作製したところ、雄マウス精巣では異常な脱落細胞が多く、精巣上体に含まれる精子数は有意に減少した(未発表)。KO 精細管内で見られた脱落細胞はアポトーシスによるものではなく、さらなる解析を要する。今後、KIAA1210 の機能、さらには相互作用するタンパク質・RNA が同定されることが期待される。我々の研究によって、ICB タンパク質の中には多様な局在を示す因子が存在すること、KIAA1210 は ICB だけでなく ES とも深く関連することが明らかと

なった[4]。個々の細胞間結合の機能とその関連性を構造的および機能的に解明することの必要性が本格的に見えてきた。

<参考文献>

[1] Iwamori T, Iwamori N, Ma L, Edson MA, Greenbaum MP, Matzuk MM. TEX14 interacts with CEP55 to block cell abscission. *Mol Cell Biol* 2010; 30:2280–2292.

[2] Iwamori T, Lin Y-N, Ma L, Iwamori N, Matzuk MM. Identification and characterization of RBM44 as a novel intercellular bridge protein. *PLoS ONE* 2011; 6:e17066.

[3] Iwamori T, Iwamori N, Matsumoto M, Ono E, Matzuk MM. Identification of KIAA1210 as a novel X-chromosome-linked protein that localizes to the acrosome and associates with the ectoplasmic specialization in testes. *Biol Reprod* 2017;96:469-477

[4] Iwamori T, Iwamori N, Matsumoto M, Imai H, Ono E. Novel localizations and interactions of intercellular bridge proteins revealed by proteomic profiling. *Biol Reprod* 2020; 102(5) : 1134-1144

2 . 研究の目的

いずれの細胞間結合も欠損すると不妊になることから精子形成においていかに重要な存在であるかは明白である。これまで各細胞間結合は個別に研究され、各構造体の関連性に関する報告はない。我々が同定した ES や ICB など複数の細胞間結合に局在するタンパク質 KIAA1210 は異種の細胞間結合の連携作用に関与しているのではないかと考えた。そこで、ICB を軸として、各細胞間結合の連携作用解明を目標に、KIAA1210 とその関連タンパク質の機能と動向を最新技術を駆使して最大限にダイナミックに解明することを目的とする。その成果は、構造体同士の関連性を介した秩序正しい精子形成を説明する重要な知見となり、医療への応用、家畜・養殖における良質生産、野生動物・絶滅危惧種保存など幅広い分野に貢献が期待できる。

3 . 研究の方法

研究 1 : KIAA1210 ノックアウト (KO) マウスを用いた機能解析

KIAA1210 ノックアウト (KO) マウスでは、アポトーシスではない細胞死が多く見られた。引き続き、KIAA1210 欠損による影響の詳細な解析を研究 1 とする。

(1) 細胞死の分類と発生時期を同定 : マーカータンパク質に特異的な抗体を用いた免疫組織化学的解析から異常細胞に局在するものを同定。

(2) ICB・BTB・ES 形成への影響解析 : 各マーカータンパク質に特異的な抗体を用いた免疫組織化学的解析から構造体の状態を解析。

(3) RNA シークエンス : 精巣タンパク質および ICB の次世代シークエンス解析。

研究 2 : KIAA1210 と関連遺伝子の関連性の解明

ICB 関連タンパク質 RBM44, MKLP1, KIAA1210 に対する抗体による免疫沈降プロテオミクス解析 (IP-Proteomics) で同定した ICB 関連因子をプロファイリングした[4]。こうして得られた KIAA1210 関連因子に蛍光タンパク質を融合発現するトランスジェニック (cTG) マウスを作製し、これら因子の関連性の可視化解析を研究 2 とする。KIAA1210

とその関連因子 (MKLP1, RBM44, Z01, TOP2B, TEX14) に蛍光タンパク質を融合発現するシングルカラートランスジェニック (single-cTG) マウスを作製するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて受精卵内で各因子の下流に蛍光タンパク質を導入した。single-cTG を作製完了し、交配によりマルチカラートランスジェニック (multi-cTG) マウスを作製し、全てのステージを網羅的に観察する。しかし、ノックインマウスの作製、精細管の長期同点撮影、解析可能な蛍光強度を得られるか、微細な構造体、難易度の高い培養、バックアップとして固定サンプルの静止画解析が可能であるかなど挑戦的な課題である。

4. 研究成果

研究1： KIAA1210 ノックアウト (KO) マウスを用いた機能解析

- (1) 細胞死の分類と発生時期: KIAA1210 欠損による細胞死の分類が明らかになった。さらに、精母細胞で異常が見られていることから細胞死の多くは精母細胞の段階であると結論付けた。
- (2) ICB・BTB・ES 形成への影響解析: マーカータンパク質に特異的な抗体を用いた免疫組織化学的解析から構造体の状態を解析したが、ICB・BTB・ES の形態形成に異常は見られなかった。また、KIAA1210 は ICB・BTB・ES に関連はするが形態形成には関係しないことがわかった。
- (3) RNA シークエンス: 精巣抽出液および ICB 濃縮精製物の次世代シークエンス解析を行い、Small RNA の解析を進めている。

研究1に関して、成果報告として学会発表および論文投稿を予定している。さらに、新たに KIAA1210 関連遺伝子を同定し、抗体とノックアウトマウスを作製し解析を継続している。新たな知見が得られることが期待される。

研究2： KIAA1210 と関連遺伝子の関連性の解明

異なる細胞間結合の関連性を可視化解析するために多重カラートランスジェニックマウス (multi-cTG) を用いた精細管内細胞間結合の動的解析を最終目的に、シングルカラーノックインマウスを作製している。CRISPR/Cas9 システムを受精卵に用いる方法を樹立し、遺伝子産物と蛍光タンパク質を融合発現するシングルカラーノックインマウスの作製に成功したが、発現量の問題で実際の解析材料として用いることはできなかった。今後も材料と方法を改良し目標の達成を目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Wang Youtao, Iwamori Tokuko, Kaneko Takane, Iida Hiroshi, Iwamori Naoki	4. 巻 16
2. 論文標題 Comparative distributions of RSBN1 and methylated histone H4 Lysine 20 in the mouse spermatogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0253897
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0253897	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ogata Honami, Tsukamoto Mariko, Yamashita Kenichi, Iwamori Tokuko, Takahashi Hideyuki, Kaneko Takane, Iwamori Naoki, Inai Tetsuichiro, Iida Hiroshi	4. 巻 38
2. 論文標題 Effects of Calyculin a on the Motility and Protein Phosphorylation in Frozen-Thawed Bull Spermatozoa	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 531-543
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/zs210046	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 -
1. 著者名 Imai Hiroyuki, Tsuda Soichiro, Iwamori Tokuko, Kano Kiyoshi, Kusakabe Ken Takeshi, Ono Etsuro	4. 巻 70
2. 論文標題 Establishment of a novel method for the production of chimeric mouse embryos using water-in-oil droplets	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 84～90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.20-0060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Imai Hiroyuki, Iwamori Tokuko, Kusakabe Ken Takeshi, Kiso Yasuo, Ono Etsuro, Kano Kiyoshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Hyper-polyploid embryos survive after implantation in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Zygote	6. 最初と最後の頁 247～249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/S0967199420000064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwamori Tokuko, Iwamori Naoki, Matsumoto Masaki, Imai Hiroyuki, Ono Etsuro	4. 巻 102
2. 論文標題 Novel localizations and interactions of intercellular bridge proteins revealed by proteomic profiling†	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 1134 ~ 1144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iaaa017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Yuzuru, Iwamori Tokuko, Ninomiya Youichirou, Kohda Takashi, Miyashita Jyunko, Sato Mikiko, Saga Yumiko	4. 巻 20
2. 論文標題 ELAVL2 directed RNA regulatory network drives the formation of quiescent primordial follicles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e48251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201948251	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 金子たかね、濱田大夢、餅田泉、藤沙織、田中宏光、岩森巨樹、岩森督子、飯田弘
2. 発表標題 精子のアクロゾーム形成に関わるTMC02とCYPT1の解析
3. 学会等名 第92回 日本動物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱田大夢、飯田弘、岩森巨樹、岩森督子、金子たかね
2. 発表標題 精子のアクロゾーム形成に関わるTMC02とCYPT1の解析
3. 学会等名 三学会合同福岡大会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野 愛里, 岩森 督子, 高島 誠司
2. 発表標題 生殖細胞特異的糖脂質セミノリピドによる血液精巢関門制御と合胞体形成への関与
3. 学会等名 日本生殖医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今井啓之, 津田宗一郎, 岩森督子, 松屋純人, 加納聖, 日下部健, 小野悦郎
2. 発表標題 ドロブレットジェネレーターを用いた新規キメラマウス胚作出法の確立
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩森督子, 加藤謙, 岩森巨樹, 今井啓之, 相賀裕美子, 小野悦郎
2. 発表標題 Intercellular bridge関連遺伝子K1AA1210の欠損が精子形成に及ぼす影響
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井啓之, 岩森督子, 小野悦郎, 加納聖
2. 発表標題 マウス胚性幹細胞との細胞融合による家畜および野生動物線維芽細胞の初期化
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Iwamori, Sakurako Shima, Tokuko Iwamori, Hiroshi Iida
2. 発表標題 The role of H3K27 demethylases in the aging of spermatogonial stem cells
3. 学会等名 ISSCR 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakurako Shima, Tokuko Iwamori, Hiroshi Iida, Naoki Iwamori
2. 発表標題 Regulation of spermatogonial stem cells by H3K27 demethylases
3. 学会等名 2019 SSR annual meeting (52nd)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩森督子、加藤謙、岩森巨樹、今井啓之、相賀裕美子、小野悦郎
2. 発表標題 ノックアウトマウスを用いたIntercellular bridge関連遺伝子KIAA1210の機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井啓之、藤井渉、日下部健、木曾康郎、岩森督子、小野悦郎、加納聖
2. 発表標題 マウス多倍体胚と多倍体胚性幹細胞の発生・幹細胞特性の解析
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会
4. 発表年 2019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	加納 聖 (Kano Kiyoshi) (40312516)	山口大学・共同獣医学部・教授 (15501)	
研究 分担者	岩森 巨樹 (Iwamori Naoki) (70647362)	九州大学・農学研究院・准教授 (17102)	

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
---------	---------