

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19263

研究課題名（和文）新規因子探索による分泌シグナル伝達ルミクリンの包括的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of lumicrine secretory signal transduction through novel factor exploration

研究代表者

浄住 大慈（Daiji, Kiyozumi）

名古屋大学・環境医学研究所・特任講師

研究者番号：70452430

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：多細胞生物では分泌シグナル伝達が重要な役割を担っている。本研究では新規分泌シグナル伝達機構「ルミクリン」について新規因子の探索も含めた包括的な解析を実施した。その結果以下のことが明らかになった。分泌蛋白質NICOLはNELL2と複合体を形成し、ルミクリンシグナル伝達のリガンドとして機能する。精巣上体頭部に発現するG蛋白質共役受容体ADGRG2は、NELL2/NICOL-ROS1を介する既存のルミクリンシグナル伝達経路には関与しない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのルミクリン研究は現象を観察するものにとどまりがちであったが、本研究の結果、ルミクリンシグナル伝達機構の分子レベルでの特性が明らかになった。また、生殖路におけるルミクリンの作用機序およびその下流での遺伝子発現機序を明らかにしたことによって、男性不妊の原因解明や不妊治療、ルミクリンシグナル伝達を基盤とした新しい男性避妊薬の開発の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In multicellular organisms, secretory signal transduction plays an important role. In this study, we conducted a comprehensive analysis of a novel secretory signal transduction mechanism lumicrine, including the search for new factors. The results revealed the following points: The secretory protein NICOL forms a complex with NELL2 and functions as a ligand in lumicrine signal transduction. The G protein-coupled receptor ADGRG2, expressed in the head of the epididymis, is not involved in the existing lumicrine signal transduction pathway mediated by NELL2/NICOL-ROS1.

研究分野：生化学

キーワード：ルミクリン 精巣上体 分泌シグナル伝達 モルフォジェン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

どんな細胞でも単独で生きているのではない。酵母や粘菌、原生生物などの微生物でも、フェロモン分子を分泌することで、遊離している細胞を集合させたり分化させたりしている。多細胞生物では、個体の中で細胞や組織の成長や分化を調節する様々な分泌シグナル伝達が重要な役割を担っている。

研究代表者もこれまでこのような細胞間相互作用を制御する分泌因子の機能を数多く検討してきた ([Kiyozumi et al., Science. 2020](#); [Kiyozumi et al., Life Sci. Alliance, 2018](#); [Kiyozumi et al., J Cell Biol. 2012](#); [Kiyozumi et al., PNAS 2006](#) など)。近年は哺乳動物の生殖器官に発現する分泌因子の機能を明らかにするため、CRISPR/CAS9 法によるゲノム編集を用いてスクリーニング的にノックアウトマウスを多数作製し個体レベルで解析してきた。その結果、腺様構造の管腔を通じて作用する全く新しい分泌シグナル伝達「ルミクリン」がマウス雄の生殖器官で機能していること、その分子実体が分泌蛋白質 NELL2 であることを明らかにした (図 1, [Kiyozumi et al., Science. 2020](#))。この発見によって、精巣と精巣上体という臓器をまたいだシグナル伝達という生殖研究 40 年来の謎 (Moniem et al., *Reproduction*. 1978) がようやく解明に至った。

ルミクリンは腺構造の管腔流に沿って上流から下流へとシグナルを送達し、場合によっては臓器をまたいで作用する。ルミクリン型シグナル伝達は腺様構造を持った器官での細胞間相互作用を説明するものであるが、そこから得られる知見は発生の理解の範囲にとどまらない。近年大きく進展を遂げている幹細胞由来オルガノイドはまさに腺構造を複雑化させながら成長するため、ルミクリン機構のオルガノイド培養への導入や、ルミクリン機構を前提とした機能的代替化などの技術応用がただちに期待される。このようにルミクリン研究は基礎・応用の両面で高い潜在的可能性を秘めている。

2. 研究の目的

ルミクリンシグナル伝達は腺様構造を持つ器官であればどこでも機能している可能性がある。われわれの体の中には、乳腺、汗腺、唾液腺、膵臓、前立腺、スキン腺など非常に多くの器官が、発生の一時期も含めて腺様構造を持っている。しかしルミクリンの概念が非常に新しいため、これらの器官でルミクリン因子が機能しているのかは全く調べられていない。そこで本研究では、性腺を含めた腺様構造を持つ器官で作用する新たなルミクリン因子の探索・同定することによって、ルミクリンの作用機序を分子レベルで明らかにすることを試みた。

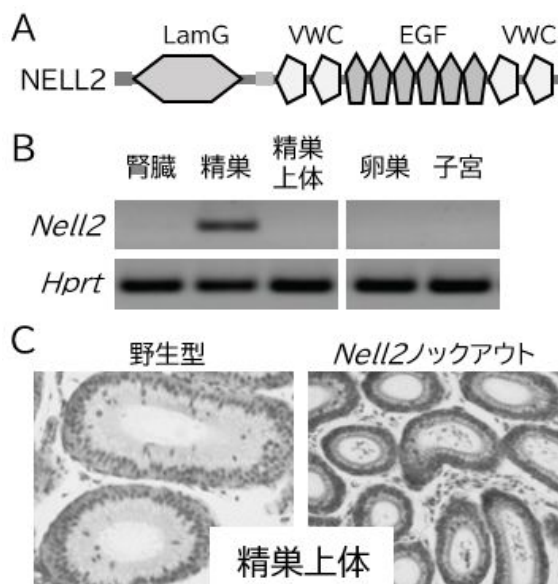


図 1 .A NELL2 は細胞外マトリックス様の分子であり、B 精巣に特異的に発現している。C NELL2 をノックアウトすると、精巣ではなく、腺構造の下流器官である精巣上体が委縮することから、NELL2 がルミクリン因子であることが世界で初めて明らかとなった。

3. 研究の方法

- (1) ルミクリン因子の探索 多くの器官で1細胞の解像度でのトランスクリプトーム情報が蓄積されてきており、これを活用することによって新規なルミクリン因子の候補をバイオインフォマティクに探索した。分泌因子をコードする遺伝子はタンパク質の構造・機能情報を網羅的に集積した UniProt ナレッジベース等を利用して抽出し、さらにミュータントマウス情報を網羅したデータベースであるマウスゲノムインフォマティクス(MGI)も活用し、これまでにノックアウトマウスが作製されていない機能未知な遺伝子を絞り込んだ。
- (2) ルミクリン機能の検証 CRISPR/CAS9によるゲノム編集により、(1)で選び出した、ルミクリンシグナル伝達に関わる候補因子のノックアウトマウスを作製した。このようにして作製された遺伝子改変マウスに対して、組織学、遺伝子発現、細胞動態、および生殖機能などの高次の生命機能を解析することによって、当該候補因子がルミクリンシグナル伝達に関与するかのスクリーニングを行った。

4. 研究成果

- (1) 新規なルミクリン因子 NICOL の同定 精巣で発現し分泌蛋白質をコードする新規な遺伝子 *Gm1673* (*Nicol*) を見出し、その機能を明らかにするためにノックアウトマウスを作製した。表現型を解析した結果 *Gm1673* のノックアウトマウスは精子が機能的に成熟出来ていないため不妊であることが分かった。精巣上体を組織学的に解析した結果、*Gm1673* のノックアウトマウス精巣上体は管腔上皮組織が分化していないことがわかった。すなわち *Gm1673* のノックアウトマウスは *Nell2* ノックアウトマウスの表現型模写であり、精巣上体の管腔上皮細胞が分化しておらず、その結果として精子が機能的に成熟しないため雄性不妊となる。

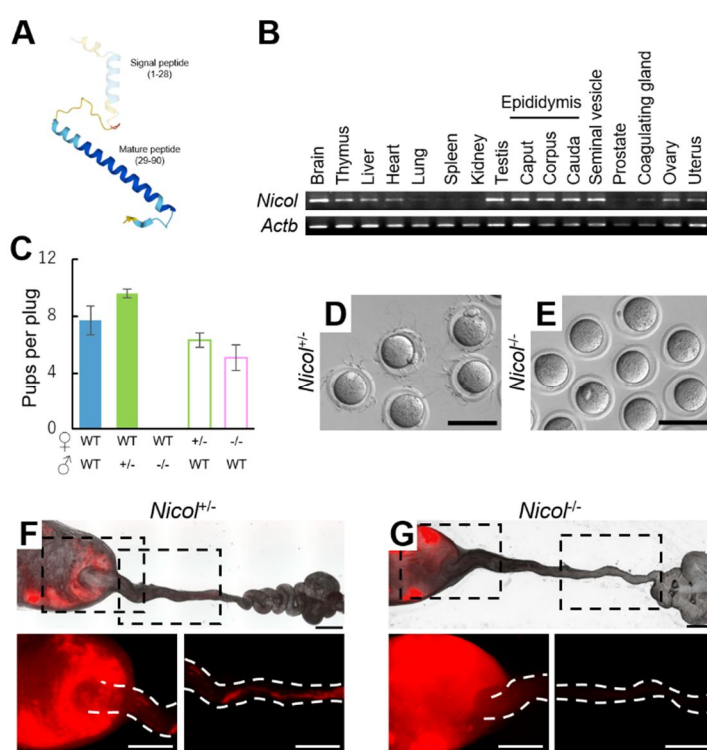


図2 . A *Gm1673*(*Nicol*)は分泌蛋白質をコードしている。B *Gm1673*(*Nicol*)は精巣をはじめいろいろな器官で発現している。C *Nicol* の KO マウスは雄性不妊である。D,E *Nicol* KO マウス精子は卵子の透明帯に結合することができない。D,E *Nicol* KO マウス精子は雌性生殖路に射出されたのち、卵管を上行することができない。

Gm1673 がコードする蛋白質は NELL2 と協同的に作用する可能性が示唆されたため NELL2 との相互作用を検討したところ、in vitro および in vivo で NELL2 と *Gm1673* 産物は複合体を形成することが明らかとなった。これらの結果から *Gm1673* 遺伝子産物は NELL2 と相互作用してルミクリンシグナルを伝えるコファクターであることが明らかとなり、これを NICOL (NELL2-interacting Cofactor for Lumicrine signaling)と命名した(図2, 3)。

(2) 精巣上位に発現するオーファン受容体 ADGRG2 の機能解析 精巣 - 精巣上位間にはルミクリンシグナル伝達が働いており、精巣から分泌されるリガンド分子を精巣上位の受容体を受容する。例えば上述の NELL2 や NICOL の場合は受容体型チロシンキナーゼ ROS1 が受容体である。ADGRG2 は精巣上位のアピカル表面に発現するリガンド未知の G 蛋白質共役受容体であり、これが生殖路のルミクリンシグナル伝達に寄与する可能性検討した。 *Adgrg2* ノックアウトマウスを作製し精巣上位のトランスクリプトームの比較解析の結果、ADGRG2 が NELL2, NICOL, ROS1 を介したルミクリンシグナル伝達に寄与する可能性は小さいと結論した (図 4)。

以上の研究成果をまとめると、雄性生殖路で機能するルミクリンの新たな構成因子を同定したことによって、ルミクリンのシグナル伝達機構の分子基盤を一層明らかにすることができた。

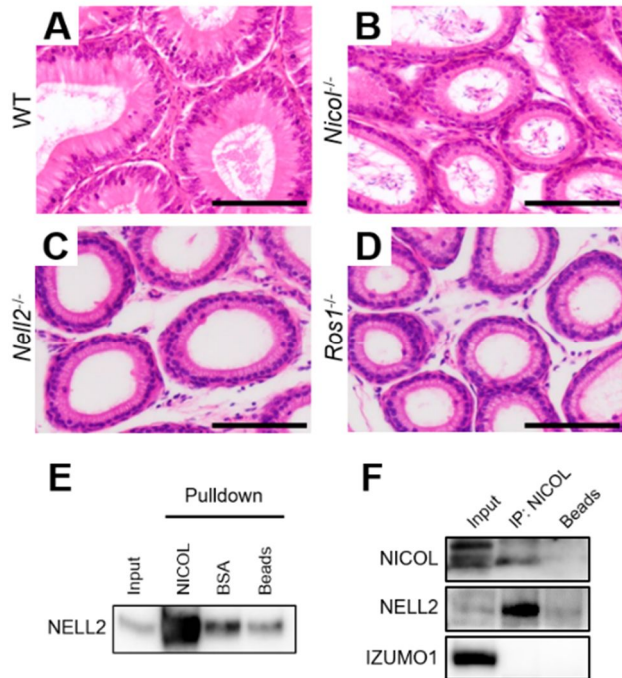


図 3 . A-D *Nicol* の KO マウスの精巣上位は上皮が分化しておらず、ルミクリン不全の *Nell2* KO マウスや *Ros1* KO マウスを再現している。E-F NICOL と NELL2 は in vitro および in vivo で複合体を形成する。

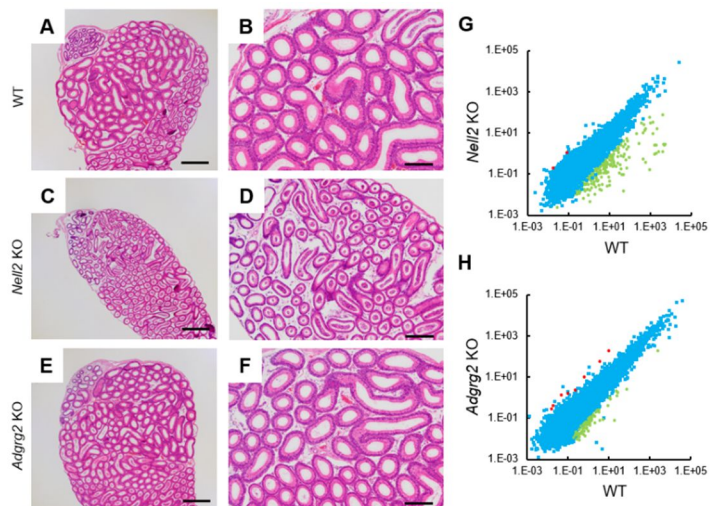


図 4 . A-F *Adgrg2* の KO マウスの精巣上位は、ルミクリン不全である *Nell2* KO マウスのような分化不全を示さなかった。G-H *Adgrg2* の KO マウスの精巣上位トランスクリプトームに見出される遺伝子発現の変化は、*Nell2* KO マウス精巣上位に見出される遺伝子発現変化をほとんど再現しなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Nguyen Tuyen Thi Thanh, Tokuhiko Keizo, Shimada Keisuke, Wang Haoting, Mashiko Daisuke, Tonai Shingo, Kiyozumi Daiji, Ikawa Masahito	4. 巻 12
2. 論文標題 Gene-deficient mouse model established by CRISPR/Cas9 system reveals 15 reproductive organ-enriched genes dispensable for male fertility	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1411162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2024.1411162	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 Kiyozumi Daiji	4. 巻 22
2. 論文標題 Distinct actions of testicular endocrine and lumicrine signaling on the proximal epididymal transcriptome	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Reproductive Biology and Endocrinology	6. 最初と最後の頁 40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12958-024-01213-x	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 KIYOZUMI Daiji	4. 巻 70
2. 論文標題 Busulfan administration replicated the characteristics of the epididymal initial segment observed in mice lacking testis-epididymis lumicrine signaling	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 104 ~ 114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2023-102	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 Kiyozumi Daiji	4. 巻 22
2. 論文標題 Expression of NELL2/NICOL-ROS1 lumicrine signaling-related molecules in the human male reproductive tract	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Reproductive Biology and Endocrinology	6. 最初と最後の頁 3 ~ 3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12958-023-01175-6	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 Ogawa Yo, Lu Yonggang, Kiyozumi Daiji, Chang Hsin Yi, Ikawa Masahito	4. 巻 -
2. 論文標題 CRISPR/Cas9 mediated genome editing reveals seven testis enriched transmembrane glycoproteins dispensable for male fertility in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.13564	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 Kiyozumi Daiji	4. 巻 28
2. 論文標題 Lumicrine signaling: Extracellular regulation of sperm maturation in the male reproductive tract lumen	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 757 ~ 763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13066	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 Kiyozumi Daiji, Ikawa Masahito	4. 巻 109
2. 論文標題 Adhesion G protein-coupled receptor G2 is dispensable for lumicrine signaling regulating epididymal initial segment differentiation and gene expression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 474 ~ 481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioad087	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 Kiyozumi Daiji, Shimada Kentaro, Chalick Michael, Emori Chihiro, Kodani Mayo, Oura Seiya, Noda Taichi, Endo Tsutomu, Matzuk Martin M., Wreschner Daniel H., Ikawa Masahito	4. 巻 14
2. 論文標題 A small secreted protein NICOL regulates lumicrine-mediated sperm maturation and male fertility	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-37984-x	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 該当する

1. 著者名 Kiyozumi Daiji, Ikawa Masahito	4. 巻 13
2. 論文標題 Proteolysis in Reproduction: Lessons From Gene-Modified Organism Studies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 876370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2022.876370	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 Kiyozumi Daiji	4. 巻 172
2. 論文標題 The molecular mechanisms of mammalian sperm maturation regulated by NELL2-ROS1 lumicrine signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 341 ~ 346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac071	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 浄住大慈
2. 発表標題 経管腔シグナル伝達ルミクリンによる精子成熟の制御
3. 学会等名 第4回有性生殖研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 浄住大慈
2. 発表標題 哺乳動物の雄性生殖路における分泌シグナル伝達ルミクリンの勾配形成
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浄住大慈
2. 発表標題 精巢分泌因子Ts-1はルミクリングナル伝達を介した雄の妊孕性制御に必須である
3. 学会等名 第37回日本生殖免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浄住大慈、島田健太郎、ダニエル・レシュナー、伊川正人
2. 発表標題 精巢分泌因子Ts-1はルミクリングナル伝達を介した雄の妊孕性制御に必須である
3. 学会等名 第53回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浄住大慈、伊川正人
2. 発表標題 哺乳動物の雄性生殖路における分泌シグナル伝達ルミクリンによる濃度勾配形成
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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