

令和元年5月29日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07128

研究課題名(和文)精子形成に関わる尾鞘(マンチェット)結合分子TMC05Aの解析

研究課題名(英文)Analysis of manchette-associated TMC05A involved in spermiogenesis

研究代表者

飯田 弘 (IIIDA, HIROSHI)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：70150399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はPCR-サブトラクション法を用いて、Tmco5A遺伝子をクローニングした。COS7細胞に発現させると、Tmco5Aは核膜と小胞体に局在し、膜貫通領域が欠損するTMC05A Cはmislocalizedして細胞質に拡散した。チューブリン抗体を用いた免疫染色によって、TMC05Aは発育過程のmanchette微小管と常に緊密な関係にあることが判明したが、manchette微小管とは完全に共存しない。一方で、ほとんどのTMC05AがSUN4(LINCタンパク質の一つ)と共存することが分かった。これらは、TMC05Aがmanchette微小管を必要とされる精子変態過程に関与することを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果に記載したTMC05Aは、我々の研究室において発見された新規の尾鞘構成分子である。尾鞘の生理的機能や形成・分解メカニズムはいまだ不明の点が多く、TMC05A分子の局在、動態、機能解析によって、精子形成における尾鞘の機能の一端が明らかにされ、精子形成機構の研究に新たな展開をもたらすことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We isolated Tmco5A gene using PCR-based subtraction technique. When expressed in COS7 cells, TMC05A was distributed to endoplasmic reticulum-nuclear membrane (ER-NM) as a membrane-associated protein in the cells, while TMC05A C lacking the transmembrane region (TM) mislocalized and diffused throughout the cytoplasm. Double immunolabeling of isolated spermatids with the anti-TMC05A and the anti-tubulin antibodies showed that TMC05A was always in close association with developing manchette microtubules, but not completely co-localized with them. On the other hand, we found that almost all TMC05A was co-localized with SUN4, a LINC (Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton) complex protein at the posterior part of nuclei in spermatids. These data suggested that TMC05A is more closely located to the nuclei than manchette microtubules. It is likely that TMC05A is involved in the process of spermiogenesis in which manchette microtubules are required.

研究分野：動物発生学

キーワード：精子形成 発生・分化、細胞組織、生体分子 微小管 マンチェッタ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類精巣の精細管上皮(精上皮)では、体細胞であるセルトリ細胞が車輪のホイール状に並ぶことによって上皮組織の骨格を形成しており、セルトリ細胞間の間隙を多数の生殖細胞が占めている。生殖細胞は、外側から内側に向けて、精祖細胞、精母細胞、円形精子細胞、伸長精子細胞へと分化するが、特に円形精子細胞から伸長精子細胞への形成過程は劇的な形態変化(細胞質の消失、核の伸長とゲノムDNAの濃縮、鞭毛・先体形成など)を伴う。この形態変化の過程は電子顕微鏡などによって形態学的には詳細に研究されているが、その分子メカニズムは非常に複雑で、解明されていない点が多々ある。伸長精子細胞には尾鞘(Manchette、マンシェット)とよばれる構造体がある。尾鞘は、伸長精子細胞のアクロゾム後部の核周辺環(perinuclear ring)から長軸方向へ並行に伸びる微小管を主体とした構造体であり、1000本以上の微小管が一つの核周辺環から伸びている。尾鞘は精子細胞が伸長する際に一時的に形成され、精子形成が完成に近づくと消失してゆく。尾鞘はその構造特性から、精子核の伸長や鞭毛形成に必要な分子の運搬に関わる構造体であると推測されているが、詳細は不明である。また、その形成メカニズムや分解メカニズムも不明である。近年尾鞘に結合するタンパク質が報告されている。Human IQ motif containing G (IQCG)はカルモジュリンとの親和性が高い分子で、哺乳類の精子形成時に尾鞘に結合し、精子鞭毛の軸系形成に関与する。この分子をロックアウトされたマウスは不妊となる。モータ分子KIF3Aは尾鞘微小管に沿う物質輸送に関わる分子で、KIF3AのKOマウス精子では鞭毛の形成不全が生じる。HOOK1は尾鞘に存在し、HOOK1を欠損する*azh* ミュータントマウスは、精子頭部と鞭毛に異常を生じる。これらのデータから、尾鞘が精子形成、特にSpermiogenesis(精子変態)期に重要な働きをすることが推測される。申請者は長年にわたり、精子変態に関わる多数の遺伝子をディファレンシャルディスプレイ法やサブトラクション法を用いてクローニングし解析してきた。近年では、伸長精子細胞とセルトリ細胞における細胞間接着の役割を果たすイムノグロブリンスーパーファミリーの新規分子であるCeacam2-LやCeacam6-Lを同定し解析した(Biol. Reprod, 79:1062-1073, 2008; Mol. Reprod. Dev. 79:843-852, 2012; J. Histochem. Cytochem. 62:632-644, 2014)。本研究はサブトラクション法でクローニングしたTMC05A分子に焦点をあて、その分子局在、生理的機能解析を行なうことを目的とする。すでにこの分子に対する特異的抗体を作成し、TMC05Aが尾鞘微小管領域に局在する新しい分子である可能性を見いだしている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) TMC05Aの詳細な局在部位の同定、(2) 培養細胞に発現させ、その分子動態を解析するとともに、膜貫通領域を欠損させた分子を作成し、その分子動態をあわせて解析する。(3) 核膜と微小管の結合を仲介するLINCファミリー分子との関連性の研究を行う。本研究成果に記載したTMC05Aは、我々の研究室において発見された新規の尾鞘構成分子である。尾鞘の生理的機能や形成・分解メカニズムはいまだ不明の点が多く、TMC05A分子の局在、動態、機能解析によって、精子形成における尾鞘の機能の一端が明らかにされ、精子形成機構の研究に新たな展開をもたらすことが期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) 分子局在の解明

*Tmco5a* はラット第3染色体q35に11個のエクソンを持つシングルコピー遺伝子として存在する。ラット精巣において4週齢以降に発現する精巣特異的な遺伝子で、303アミノ酸(分子量35.8 kDa)からなるタンパク質をコードする。2つのCoiled-coilドメインと1つの膜貫通

領域を持つ。TMC05A は膜タンパク質と予想されたが、精子細胞のマンシェッタ（尾鞘）に親和性をもつ分子であることが、免疫細胞化学実験によって判明した。TMC05Aに対して抗ペプチド抗体を作成し、抗体特異性をウェスタンブロットにて確認している。蛍光免疫組織化学的方法により、TMC05Aの分子局在をイムノゴールドを用いた免疫電子顕微鏡により詳細に解析する。特に精子細胞の分化ステップ各段階における局在を詳細に追跡する。

#### （２）培養細胞での分子動態の解明

TMC05A をCOS7培養細胞に発現させ、細胞骨格である微小管との関連・挙動を蛍光顕微鏡および超解像STEDレーザー顕微鏡で解析する。また、TMC05Aミュータント分子（膜貫通領域の欠損分子）を作成し、微小管への結合能に関わる分子構造解析を行なう。

#### （３）SUN4 との分子局在比較

LINCファミリー分子、SUN4（細胞質の細胞骨格と核を連結する分子として同定されているタンパク質）に対する抗体を作成し、TMC05Aとの局在比較を行う。これにより、伸長精子細胞の尾鞘におけるTMC05Aの役割を解析する。

### 4．研究成果

哺乳類の精子形成において、半数体円形精子細胞は、劇的な形態変化を伴う変態（Spermiogenesis 精子変態）を行いながら、伸長精子細胞から精子へと分化する。申請者は、伸長精子細胞に特異的に構築される構造体 Manchette（マンシェッタ）に局在する未解析分子 *Tmco5A* をコードする遺伝子をサブトラクション法によってクローニングした。TMC05A について、その分子局在と細胞内動態の研究を行うことが本研究の目的である。

平成27年度の研究において、TMC05Aが伸長精子細胞のManchette 部位に局在すること、つまりTMC05Aは Manchette 微小管の結合蛋白質である可能性が免疫蛍光抗体法によって示唆された。しかし、TMC05A をCOS7培養細胞に発現させたところ、細胞骨格である微小管と共存するのではなく、核膜・小胞体膜に局在することが判明し、TMC05Aの局在や挙動の再検討を行った。共焦点レーザー顕微鏡の解析により、TMC05Aは Manchette 微小管に近接して存在するものの、その局在は完全には一致せず、Manchette微小管よりも核膜側に局在することが明らかとなった。

平成29年度において、Nesprin1とTMC05A、PNA-lectinとTMC05Aによる二重染色を行うとともに、免疫電顕による検討を行った結果、TMC05Aは微小管と核膜の間に局在することを確認した。平成30年度において、核膜と微小管の結合を仲介するLINCファミリーに属するSUN4タンパク質 に対する抗体を作成し、この抗体を用いてTMC05A分子と核膜および Manchette 微小管の位置関係を詳細に分析した。その結果、TMC05AはSUN4分子と局在を同じくすることが判明した。すなわち、TMC05Aは常に伸長精子細胞のManchetteに沿って存在するが、Manchetteそのものではなく、Manchetteと核膜の境界部に局在することが明らかとなった。これらの結果から、TMC05AはManchetteと協働して、伸長精子細胞における核の伸長や鞭毛形成に関わる可能性が示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Takane Kaneko, Taisuke Minohara, Sakurako Shima, Kaori Yoshida, Atsuko Fukuda, Naoki Iwamori, Tetsuichiro Inai, Hiroshi Iida. A membrane protein, TMC05A, has a close relationship with manchette microtubules in rat spermatids during spermiogenesis. Mol. Reprod. Dev., 86(3): 330-341(2019), doi: org/10.1002/mrd.23108, 査読あり

Takane Kaneko, Kiyotaka Toshimori, Hiroshi Iida. Subcellular localization of MS4A13 isoform 2 in mouse spermatozoa. Reproduction, 154(6):843-857 (2017), doi:10.1530/REP-17-0477, 査読あり

Mariko Tsukamoto, Erina Hiyama, Karen Hirotani, Takafumi Gotoh, Tetsuichiro Inai, Hiroshi Iida. Translocation of Tektin 3 to the equatorial segment of heads in bull spermatozoa exposed to dibutyryl cAMP and calyculin A. Mol. Reprod. Dev., 84:30- 43 (2017), doi: 10.1002/mrd.22763, 査読あり

〔学会発表〕(計 8 件)

飯田弘、金子たかね、吉田香央里、餅田泉、岩森巨樹：膜蛋白質TMC02とTMC05A のラット精子細胞における局在と精子形成への関与.三学会合同宮崎大会. 2018年5月27日.

飯田弘、金子たかね、吉田香央里、餅田泉、岩森巨樹：膜蛋白質TMC02とTMC05A のラット精子細胞における局在と精子形成への関与. 日本顕微鏡学会 第74回学術講演会. 2018年5月30日

金子たかね、年森清隆、吉浦有祐、佐々木友徳、飯田弘:精子頭部に局在するMS4A13 の受精における機能解析. 日本顕微鏡学会 第74回学術講演会. 2018年5月30日

Kaori Yoshida and Hiroshi Iida: Characterization of Tmco5, a transmembrane and coiled-coil domains 5A, localizes at manchette during spermiogenesis of mammals. The 87th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan. Nov 11-17, 2017.

餅田泉、田中宏光、飯田弘: 精子アクロゾーム形成に関わる Tmco2 の解析. 第58回本顕微鏡学会 九州支部学術講演会. 2016年12月3日.

飯田弘、塚本 真梨子: 牛精子頭部におけるTEKT3の局在と移動. 第58回日本顕微鏡学会九州支部学術講演会 2016年、12月3日.

吉田香央里・飯田弘: 精子形成に関与する Tmco5 と相互作用する分子の探索.三学会合同大会. 2016年、5月28日(土)

島桜子、飯田弘:哺乳類生殖細胞に局在する分子Tmco5Aの解析.三学会合同大会. 2016年、5月28日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/doubutsu/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。