

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15396

研究課題名(和文)新規精巣特異的細胞間結合KIAA1210の欠損と蛍光タンパク質融合発現マウス解析

研究課題名(英文) Deficiency of novel testis-specific intercellular binding KIAA1210 and analysis of transgenic mice expressed fluorescent protein

研究代表者

岩森 督子 (Iwamori, Tokuko)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：10711509

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)：精子形成には細胞間結合が不可欠であり、欠損すると雄性不妊になる。これら細胞間結合にはIntercellular bridge(ICB)、Blood-testis barrier (BTB)、Ectoplasmic specialization (ES)などが含まれ機能は不明である。本研究では我々が同定した多様な局在を示す新規ESタンパク質KIAA1210を中心として、異種の細胞間結合の関連性解明を目指し、KIAA1210ノックアウトマウス解析および細胞間結合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マウスの作製・解析に関わる研究を行い、予備実験から得られた新たな知見を論文発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ICBを含む精巣特異的細胞間結合欠は損すると不妊になることから、精子形成において重要な存在であるかは明白である。各々の細胞間結合は低分子輸送など細胞間コミュニケーションを担っていると予想されるが、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が連携制御されていると予想される。我々が同定した新規ESタンパク質KIAA1210はICBタンパク質と複合体を形成し、異種の細胞間結合の関連性を研究するのに適している。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、医療、畜産、養殖、野生動物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)：Intercellular connections are essential for spermatogenesis, and deficiency of them leads to male infertility. These cell-cell junctions include the intercellular bridge (ICB) which formed between germ cells, the blood-testis barrier (BTB) which formed between Sertoli cells, and the Ectoplasmic specialization (ES) which formed between Sertoli cells and elongating spermatids. These cell-cell junctions are expected to have a role in cell-cell communication and germ cell synchronization, etc., but their functions still remain to be elucidated. Usually, these cell-cell junctions are studied individually, but in this study, we focused on KIAA1210 and structurally and functionally analyzed the relationship between cell-cell junctions in the spermatogenesis. Through analyses of KIAA1210 knockout mice as well as knock-in mice in which a fluorescent protein were fused with an intercellular bridge protein, we have published new findings obtained from the preparatory experiments.

研究分野：生殖生物学

キーワード：生殖細胞間架橋 精子形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

雄性不妊や精巣腫瘍などの病因は不明であり、その解明には正常な精子形成を知ることが不可欠である。しかし、精巣の器官培養や配偶子体外形成が容易でない為、実験方法が限定され、一遺伝子ずつ地道に研究されているのが現状である。精巣には一本の精細管が幾重にも折りたたまれ収納されており、精細管の基底膜上には支持細胞であるセルトリ細胞の間に生殖細胞が増殖と分化を繰り返しながら立体的な層を形成している。これらの立体構造を構築維持するため、また、機能性のため、精巣特異的な細胞間結合が存在している。生殖細胞は体細胞分裂とは異なり細胞分裂後も分裂を完了せず、Intercellular bridge(ICB, 生殖細胞間架橋)によって繋がれたまま分化する。また、精細管基底膜近くでは減数分裂以降の生殖細胞が非自己と見なされ攻撃を受けること阻止するためにセルトリ細胞同士の密着結合 Blood-testis barrier (BTB) が形成され、さらに生殖細胞の分化に伴った管腔方向への移動と共に出現と消失を繰り返すセルトリ細胞-セルトリ細胞間とセルトリ細胞-伸長期精細胞間には密着装置 Ectoplasmic specialization (ES) が形成されており、いずれも欠損すると不妊になる。このように各細胞間結合の存在意義は異なるものの、いずれも精子形成を秩序正しく維持するための構造体である。さらに、低分子輸送や細胞間情報伝達などの機能が昔から予想されているが詳細は未明であり、各構造体の関連性に関する報告もない。これまで岩森らは、ICB を中心として欠損すると不妊になる精巣特異的な細胞間結合の形成維持機構の同定と機能探求を行ってきた。ICB は 1950 年代に電子顕微鏡下において発見され、一精粗細胞由来の生殖細胞は ICB を介して結合している事が認識された[1]。2006 年に精巣特異的なタンパク質 TEX14 の ICB 局在が同定され、TEX14 の欠損により ICB が消失、雄性不妊になった。ICB は精子形成に必須であり、TEX14 は ICB に必要不可欠であることが判明したが、詳細な分子機構は不明であった[2]。

体細胞分裂では娘細胞の切断予定部位に Midbody と呼ばれるタンパク質集合体が形成される。Midbody の構成因子の一つ MKLP1 に細胞質から移行した二量体 CEP55 が結合し、さらに ALIX と TSG101 が各 CEP55 に結合することにより細胞質切断が誘導される。岩森らは TEX14 が骨格をなす MKLP1 と切断に働く CEP55 の両方をロックするように結合し、ALIX と TSG101 が CEP55 へ結合するのを阻害することによって ICB を形成維持することを明らかにした[3]。また、幼齢マウス精巣 ICB 濃縮画分プロテオミクス解析から新規 ICB タンパク質 RBM44(RNA binding motif 44)を同定した。RBM44 は TEX14 と結合し、減数分裂前後の精原細胞 ICB と細胞質に特異的に局在する。KO マウス精巣上体の精子数は WT オスの約二倍、一出産あたりの産子数が多いという傾向が見られた[4]。ICB は環状構造をしており、生殖細胞の成熟に伴い、その構成因子が変化し、直径が拡張する[5]。ICB は細胞同士を結合することで生殖細胞群を整理するだけでなく、RBM44 のように細胞質にも強く局在する ICB タンパク質が RNA と結合し、細胞質と ICB 間を移行し連結細胞間のシンクロナイゼーションなど、精子成熟サイクルの調整に働くと考えられる。一方、RBM44 欠損精子形成には異常が見られなかったことから、RBM44 の代替 RNA 結合タンパク質の存在が予測される。また、ICB を指標に全ステージの生殖細胞を含む成熟マウス精巣から濃縮した膜タンパク質のプロテオミクス解析を行い、ES に局在する新規タンパク質 KIAA1210 を同定した[6]。さらに、免疫沈降プロテオミクス解析により、KIAA1210 は ICB タンパク質と複合体を形成することが明らかとなった。

岩森らの研究によって、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、新規 ES タンパク質 KIAA1210 が ICB タンパク質と関連することが明らかとなり、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] Fawcett DW, Ito S, Slautterback D. The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. *J Biophys Biochem Cytol* 1959; 5: 453–460.
- [2] Greenbaum MP, Yan W, Wu M-H, Lin Y-N, Agno JE, Sharma M, Braun RE, Rajkovic A, Matzuk MM. TEX14 is essential for intercellular bridges and fertility in male mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:4982–4987.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Greenbaum MP, Ma L, Matzuk MM. Conversion of midbodies into germ cell intercellular bridges. *Dev Biol* 2007; 305:389–396.
- [6] 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

2 . 研究の目的

ICB を含む細胞間結合が欠損すると不妊になることから、精巢特異的細胞間結合が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。しかし、各々の細胞間結合は低分子輸送など細胞間コミュニケーションを担っていると予想されるが、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が連携制御を果たしていると予想される。我々が同定した新規 ES タンパク質 KIAA1210 は ICB タンパク質と複合体を形成することを見出した。このことから、ES と ICB の関連性探求を目的に、KIAA1210 のノックアウトマウスを作製し、その機能解析と関連遺伝子同定を行う。さらに、異種の細胞間結合の構成遺伝子に蛍光タンパク質を融合発現するマルチカラーノックインマウスを作製し、これら遺伝子の連携システムを動的に解明することを目指す。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、医療、畜産、養殖、野生動物など幅広い分野への応用的貢献が期待される。

3 . 研究の方法

(1) KIAA1210 欠損マウスの解析

我々は新規 ES 遺伝子 KIAA1210 は ICB タンパク質である RBM44、MKLP1 と関連することを見出した。また、KIAA1210 は二本鎖 DNA 切断酵素 Topoisomerase2 の結合タンパク質 PAT1 に類似したドメインを持ち、実際に免疫沈降により Topoisomerase2 と複合体を形成することを確認

した。これらの知見が何を意味するのかノックアウトマウスを用いて雄性妊孕性検査、組織学的解析、KIAA1210 関連遺伝子を解明する。

(2)蛍光タンパク質融合発現トランスジェニックマウス解析

精細管内に3次元的に広がる生殖細胞とその間に形成される細胞間結合を組織切片上で静止画解析することは必要な情報を得るのには不十分であると考え、異種の細胞間結合関連タンパク質と蛍光タンパク質を融合発現するマルチカラーノックインマウスを用いて動的に可視化する方法に挑戦することにした。これを解析し、異種の細胞間結合の相互関連性と精子形成における細胞間結合の意義を探求する。マルチカラーノックインマウスの作製、解析可能な蛍光強度を得られるか、精細管の短期培養状態での動画解析および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幾重にも不安点がある挑戦的な研究である。解析の可否を計るため、免疫組織科学染色を施した野生型精巣固定組織を用いて予備実験を行う。また、並行して、ES細胞ゲノムへのカラーノックインを実行する。

4. 研究成果

(1)KIAA1210 欠損マウスの解析

CRISPR/Cas9 システムを用いて、KIAA1210 の最大サイズの第6エクソンを含む4kbのゲノム欠損、KIAA1210 のタンパク質合成阻害に成功した(国立遺伝学研究所、相賀教授、加藤助教協力)。一年余りマウス系統の遺伝的統御のためにバッククロスを行った。KIAA1210 ノックアウト(K0)雄マウス精巣では異常な脱落細胞が多く見られた。組織切片解析において異常細胞を含む精細管を測定すると、50%以上の精細管断面が脱落細胞を含んでいた。K0の精巣上体に含まれる精子数は有意に減少していたが、K0もしくは野生型(WT)オスマウスとWTメスマウスの7ペアを半年間同居させ経過観察した結果、初産の遅れにより総産仔数は減少した。K0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、現在さらなる解析を行っている。また、K0精巣で局在が変化したタンパク質を見出した。現在、KIAA1210の欠損の結果、変動した遺伝子発現と局在の解析を詳細に行っている。今後、KIAA1210の機能、さらには相互作用するタンパク質が同定されることが期待される。

(2)蛍光タンパク質融合発現ノックインマウスの作製及び解析

ノックインマウスが作製された際に解析が可能であるかを検討するために、固定後に免疫組織化学的染色を施した精細管を顕微鏡下で解析したところ、精細管の半径分を立体的に静止画で観察することに成功した。その際、新しい知見を得ることができたため、論文発表に至った。

一方、ES細胞で蛍光タンパク質のノックインを試みたが、PCRによる選別の際に混乱が生じた点と生体化に移るリスクから受精卵において直接蛍光タンパク質をノックインする方法に変更し、研究を継続している。また、短期培養下での精細管のタイムラプス解析は顕微鏡の構造・機能上の問題で、まだ最適な方法が見つかっておらず、検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iwamori T, Iwamori N, Matsumoto M, Ono E, Matzuk MM.	4. 巻 96 (2)
2. 論文標題 Identification of KIAA1210 as a novel X-chromosome-linked protein that localizes to the acrosome and associates with the ectoplasmic specialization in testes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biol Reprod.	6. 最初と最後の頁 469-477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1095/biolreprod.116.145458	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 該当する

1. 著者名 Iwamori T, Iwamori N, Matsumoto M, Imai H, Ono E.	4. 巻 102(5)
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 Biol Reprod.	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岩森督子、岩森巨樹、松本雅記、今井啓之、小野悦郎
2. 発表標題 生殖細胞間架橋ICB関連タンパク質の網羅的同定と精子形成過程におけるタンパク質相互作用
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018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KIAA1210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総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩森督子、岩森巨樹、松本雅記、小野悦郎、Martin M. Matzuk
2. 発表標題 精巣特異的細胞間結合ICB, ES,BTBの連携作用に機能するタンパク質
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会大会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tokuko Iwamori , Yuzuru Kato, Naoki Iwamori, Masaki Matsumoto, Yumiko Saga, Etsuro Ono and Martin M. Matzuk
2. 発表標題 A novel X-chromosome-linked protein, KIAA1210, localizes to the acrosome and associates with the ectoplasmic specialization in testes.
3. 学会等名 4th World Congress of Reproductive Biology (第110回日本繁殖生物学会大会)(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩森督子、加藤譲、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年会
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
研究協力者	加藤 譲 (Kato Yuzuru)		

6. 研究組織（つづき）

	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	相賀 裕美子 (Saga Yumiko)		
研究協力者	岩森 巨樹 (Iwamori Naoki)		
研究協力者	松本 雅記 (Matsumoto Masaki)		