

機関番号： 32620

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592111

研究課題名 (和文)

遺伝子工学・細胞生物学的アプローチによる配偶子形成過程における分子基盤の解明

研究課題名 (英文)

Elucidation of the molecular basis on mammalian gametogenesis by genetic engineering and cell biological techniques

研究代表者 荒木慶彦 (ARAKI YOSHIHIKO)

順天堂大学・大学院医学研究科・先任准教授

研究者番号：70250933

研究成果の概要 (和文)：TEX101は、Ly6-like proretein superfamilyに属すGPIアンカー型タンパク質であり、生殖細胞特異抗原である。本研究ではこの分子と精巣内で共役するLy6k及びdipeptidase3の分子性状を詳細に検討した。その結果、Ly6kの精巣内における胎生期から性成熟期に至る詳細な発現動態、及びTEX101とdipeptidase 3が精巣内生殖細胞膜上で分子複合体を形成することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：TEX101, a unique GPI-anchored germ cell marker protein, belongs Ly6-like protein superfamily. In this study, we analyzed molecular characteristics of Ly6k and dipeptidase 3, associated molecules with TEX101 in the mouse testis. The experimental results have shown that precise molecular expression of Ly6k during testicular development, and dipeptidase 3 forms complexes with TEX101 on the surfaces of spermatocytes, spermatids, and testicular spermatozoa.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：産科婦人科学・生殖生理学

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、dipeptidase 3、GPIアンカー型タンパク質、精子形成、マウス、精巣

## 1. 研究開始当初の背景

配偶子形成は正常な受精・発生を保障する上で重要かつ本質的な過程である。その過程に関連する分子の機能不全は配偶子の機能不全に繋がり、結果として不妊症になる。配偶子形成の場である性腺には特異的な分子機構があると考えられるが、根本的理解に達する段階には程遠く、これら分子機構を解明

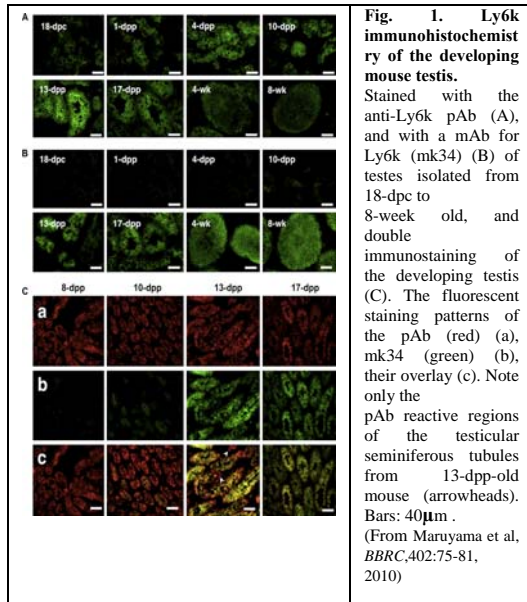
するための新たな基礎的・臨床的研究突破口が必要と考えられる。

本研究代表者は、これまで受精・配偶子形成過程の分子機構を研究してきたが、近年、生殖細胞特異抗原 TEX101 を同定し、本分子の特徴をこれまでの研究で明らかにしてきた。性腺に特異かつ特徴的な発現動態を示す本分子は、雌雄生殖細胞の新規マーカー分子として、また一部の癌細胞にも発現が認めら

れることから新たな Cancer-Testis 抗原としても近年注目されている。

## 2. 研究の目的

本研究は、これまでの文部科学省科学研究費補助金・基盤研究 C (18591813)「プロテオミクスを用いた配偶子形成過程における分子基盤の解析」、同 (19591912)「遺伝子導入を用いた生殖細胞特異抗原 TEX101 の



**Fig. 1. Ly6k immunohistochemistry of the developing mouse testis.** Stained with the anti-Ly6k pAb (A), and with a mAb for Ly6k (mk34) (B) of testes isolated from 18-dpc to 8-week old, and double immunostaining of the developing testis (C). The fluorescent staining patterns of the pAb (red) (a), mk34 (green) (b), their overlay (c). Note only the pAb reactive regions of the testicular seminiferous tubules from 13-dpp-old mouse (arrowheads). Bars: 40 $\mu$ m. (From Maruyama et al, *BBRC* 402:75-81, 2010)

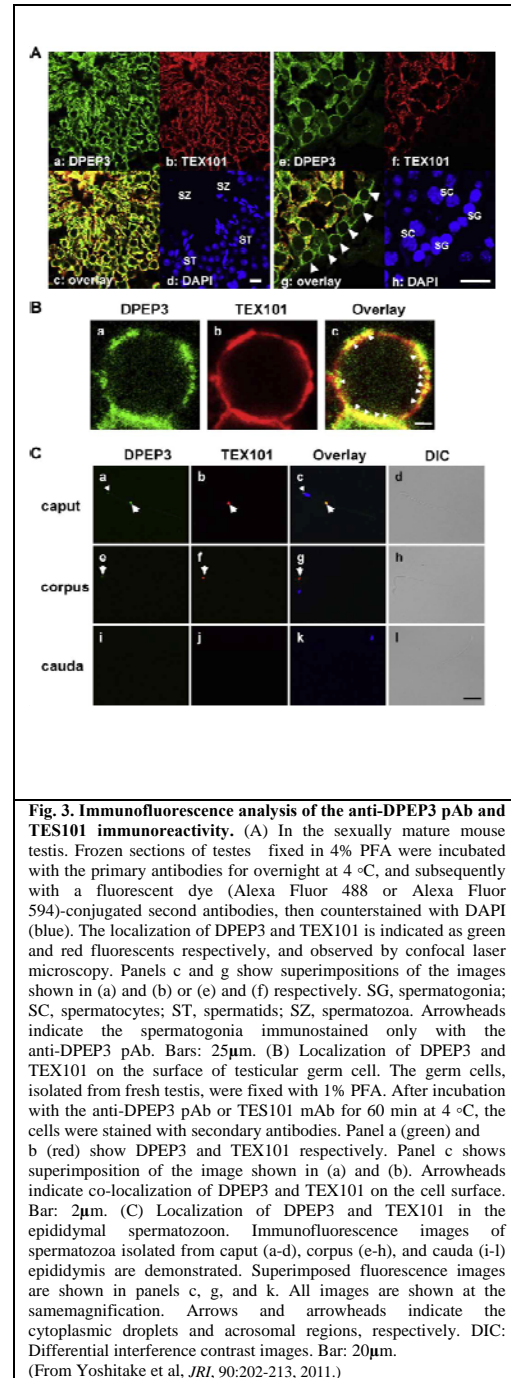
性腺形成制御機構の解析」の研究成果をふまえ、TEX101 及びその関連分子の生殖腺内の分子動態を更に明らかにし、配偶子・初期胚の機能不全が原因と推定される原因不明不妊症の病態の一端を分子動的に解明する一助とすることを最終目的として計画した。

## 3. 研究の方法

TEX101 に対する抗体は TES101(Kurita et al, *Biol.Reprod.* 64:935-945, 2001.), 6002, Ts4 (Yoshitake et al, *J.Reprod.Immunol.* 79:1-11, 2008) を用いた。これらの抗体を用いて、マウス精巣 TritonX-100®可溶分画に対して免疫沈降を行い、LC-MS を用いた質量分析は既報 (Tsukamoto et al, *BBRC* 345:229-238, 2006) に従って行った。同定した TEX101 関連分子は既報(Yoshitake et al, *BBRC* 372:277-282, 2008)に従い組換えタンパク質を作製し、それを免疫源としたウサギ多クローン抗体を樹立した。

## 4. 研究成果

TEX101 関連分子として Ly6k、dipeptidase 3、



**Fig. 3. Immunofluorescence analysis of the anti-DPEP3 pAb and TES101 immunoreactivity.** (A) In the sexually mature mouse testis. Frozen sections of testes fixed in 4% PFA were incubated with the primary antibodies for overnight at 4 °C, and subsequently with a fluorescent dye (Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594)-conjugated second antibodies, then counterstained with DAPI (blue). The localization of DPEP3 and TEX101 is indicated as green and red fluorescents respectively, and observed by confocal laser microscopy. Panels c and g show superimpositions of the images shown in (a) and (b) or (e) and (f) respectively. SG, spermatogonia; SC, spermatocytes; ST, spermatids; SZ, spermatozoa. Arrowheads indicate the spermatogonia immunostained only with the anti-DPEP3 pAb. Bars: 25 $\mu$ m. (B) Localization of DPEP3 and TEX101 on the surface of testicular germ cell. The germ cells, isolated from fresh testis, were fixed with 1% PFA. After incubation with the anti-DPEP3 pAb or TES101 mAb for 60 min at 4 °C, the cells were stained with secondary antibodies. Panel a (green) and b (red) show DPEP3 and TEX101 respectively. Panel c shows superimposition of the image shown in (a) and (b). Arrowheads indicate co-localization of DPEP3 and TEX101 on the cell surface. Bar: 2 $\mu$ m. (C) Localization of DPEP3 and TEX101 in the epididymal spermatozoon. Immunofluorescence images of spermatozoa isolated from caput (a-d), corpus (e-h), and cauda (i-l) epididymis are demonstrated. Superimposed fluorescence images are shown in panels c, g, and k. All images are shown at the same magnification. Arrows and arrowheads indicate the cytoplasmic droplets and acrosomal regions, respectively. DIC: Differential interference contrast images. Bar: 20 $\mu$ m. (From Yoshitake et al, *JRI* 90:202-213, 2011.)

を同定したこのうち Ly6k は：1) 精巣内における TEX101 との発現相互作用の解析を行い、胎生期から性成熟期に至る詳細な発現動態をあきらかにした(Fig.1) 2) 多クローン抗体と単クローン抗体の異反応性を詳細に検討した結果、膜結合型 Ly6k 17kDa form 及び可溶性 12kDa form の存在 の 2 点を生化学的・形態学的手法を用いて明らかにした。また dipeptidase 3 に関しては：3) 精巣内の Ts4 が認識する糖鎖を有す TEX101 分子と dipeptidase 3 が精巣内生殖細胞膜上で分子複

合体を形成すること 4) dipeptidase 3 の精巣内及び精巣上体内における発現過程を含めた発現動態 (Fig.2) を明らかにした。またこれらの研究と平行して *TEX101* プロモーターを利用した *Tex101-iCre* トランスジェニックマウスの作製を行い Cre recombinase の精巣内生殖細胞限局発現を確認した。

#### 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 13 件) (全て査読有り)

1. Shirai Y, Yoshitake H, Maruyama M, Takamori K, Ogawa H, Hasagawa A, Araki Y. Distribution of molecular epitope for Ts4, an anti-sperm auto-monoclonal antibody in the fertilization process. *J.Reprod.Dev.* 55:240-246, 2009.
2. Wakabayashi I, Araki Y. Associations of alcohol drinking with blood pressure and serum lipids in female smokers and nonsmokers. *Gender Med.* 6:290-299, 2009.
3. Fujiwara H, Araki Y, Toshimori K. Is the zona pellucida an intrinsic source of signals activating maternal recognition of the developing mammalian embryo? *J.Reprod.Immunol.* 81:1-8, 2009.
4. Yamatoya K, Yoshida K, Ito C, Maekawa M, Yanagida M, Takamori K, Ogawa H, Araki Y, Miyado K, Toyama Y, Toshimori K. Equatorin: identification and characterization of the epitope of the MN9 antibody in the mouse. *Biol.Reprod.* 81:889-897, 2009.
5. Fujiwara H, Ideta A, Araki Y, Takao Y, Sato Y, Tsunoda N, Aoyagi Y, Konishi I. Immune system cooperatively supports endocrine system-primed embryo implantation. *J.Mammal.Ova.Res.* 26:122- 128, 2009.
6. Fujiwara H, Ideta A, Araki Y, Takao Y, Sato Y, Horie A, Tsunoda N, Aoyagi Y, Konishi I. Possible contribution of circulating blood cells to embryo implantation. *Indian J.Physiol.Pharmacol.* 54, Suppl 1:51-60, 2010.
7. Wakabayashi I, Araki Y. Influences of gender and age on relationships between alcohol drinking and atherosclerotic risk factors. *Alcohol.Clin.Exp.Res.* 34:S54-60, 2010.
8. Maruyama M, Yoshitake H, Tsukamoto H, Takamori K, Araki Y. Molecular expression of Ly6k, a glycosylphosphatidyl-inositol anchored membrane protein on the mouse testicular germ cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 402:75-81, 2010.
9. Lei Z, Lin J, Li X, Li S, Zhou H, Araki Y, Lan Z-J. Postnatal male germ cell expression of the Cre recombinase in *Tex101-iCre* transgenic mice. *Genesis* 48: 717-722, 2010.
10. Honda M, Asai T, Umemoto T, Araki Y, Oku N, Tanaka M. Suppression of choroidal neovascularization by single intravitreal injection of APRPG-modified liposomes encapsulating SU5416. *Arch Ophthalmol* 129: 317-321, 2011.
11. Araki Y, Nonaka D, Tajima A, Maruyama M, Nitto T, Ishikawa H, Yoshitake H, Yoshida E, Kuronaka N, Asada K, Yanagida M, Nojima M, Yoshida K, Takamori K, Hashiguchi T, Maruyama I, Lee L-J, Tanaka K. Quantitative peptidomic analysis by a newly developed one-step direct transfer technology without depletion of major blood proteins: Its potential utility for monitoring of pathophysiological status in pregnancy-induced hypertension. *Proteomics* 11:2727-2737, 2011.
12. Yoshitake H, Yanagida M, Maruyama M, Takamori K, Hasegawa A, Araki Y. Molecular characterization and expression of dipeptidase 3, a testis-specific membrane bound dipeptidase related to an anti-sperm auto-monoclonal antibody epitope. *J.Reprod.Immunol.* 90:202-213, 2011.
13. Takizawa T, Ishikawa T, Kosuge T, Mizuguchi Y, Sato Y, Koji T, Araki Y, Takizawa T. Gene suppression of mouse testis in vivo using small interfering RNA derived from plasmid vectors. *Acta Histochem.Cytoc.* 2011, in press.

[学会発表] (計 7 件)

1. Yoshitake H, Maruyama M, Yanagida M, Takamori K, Ogawa H, Hasegawa A, Araki Y. Effects of Ts4, an anti-sperm auto-monoclonal antibody on fertilization in the mouse. 42th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, July

- 18-22, 2009, Pittsburgh, PA, USA  
Biol.Reprod. (2009) 61:Suppl 1, 223 (abst #326)
2. 吉武洋、丸山真由子、柳田光昭、高森建二、長谷川昭子、荒木慶彦 精子抗体 Ts4 関連分子 Di-peptidase 3 のマウス精巣における分子性状と発現に関する検討 第 24 回日本生殖免疫学会学術集会 2009 年 11 月 27-28 日 東京都新宿区・京王プラザホテル\_Reprod.Immunol.Biol. (2009) 24: 129.
  3. Maruyama M, Yoshitake H, Takamori K, Araki Y. Molecular expression of Ly6k, a putative glycosylphosphatidylinositol- anchored membrane protein on the mouse testicular germ cells. 43th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, July 30-August 2, 2010, Milwaukee, WI, USA
  4. Yoshitake H., Yanagida M., Maruyama M., Takamori K., Hasegawa A., Araki Y. Molecular characterization and expression of alpha-N-acetylglucosaminidase, a potential target molecule recognized with an anti-sperm auto-monoclonal antibody, Ts4. 43th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, July 30-August 2, 2010, Milwaukee, WI, USA
  5. Li S., Lin J., Li X., Araki Y., Lan ZJ, Lei Z. Germ Cell-Selective Ablation of *Fgfr-1* or *Fgfr-2* in mice does not affect male fertility. 43th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, July 30-August 2, 2010, Milwaukee, WI, USA
  6. Fujiwara H., Araki Y. Circulating immune cells can promote embryo implantation. 31<sup>st</sup> Annual Meeting of the American Society for Reproductive Immunology, May 19-22, 2011, Salt Lake City, UT, USA Am.J.Reprod.Immunol. (2011) 65:Suppl 1, 4 (abst #S9)
  7. 吉武洋、柳田光昭、遠藤周一郎、高森建二、長谷川昭子、藤原浩、荒木慶彦 抗精子自己抗体 Ts4 標的分子の受精における作用及び対応抗原の分子性状解析 第 26 回日本生殖免疫学会学術集会 2011 年 12 月 2-3 日 名古屋市中村区・ウィングあいち

[図書] (計 1 件)

1. Fujiwara H, Sato Y, Ideta A, Aoyagi Y, Araki Y, Imakawa K. Immune regulation of human embryo implantation by

circulating blood cells. In: The Human Embryo (Yamada S. ed), InTech Open Access Publisher, Rijeka, Croatia. 2011, in press.

[その他]

ホームページ等

[http://www.juntendo.ac.jp/english/department/gra/gender\\_specific\\_medicine/araki.html](http://www.juntendo.ac.jp/english/department/gra/gender_specific_medicine/araki.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荒木 慶彦 (ARAKI YOSHIHIKO)

順天堂大学・大学院医学研究科・先任准教授  
研究者番号：70250933