

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22247008

研究課題名(和文) レチノイン酸とニューレギュリンによる減数分裂開始機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the Mechanism of Meiotic Initiation by Retinoic Acid and Neuregulin

研究代表者

安部 眞一 (ABE, Shin-ichi)

熊本大学・事務局・理事・副学長

研究者番号：90109637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,300,000円、(間接経費) 10,290,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、マウス生殖巣における減数分裂の開始機構を調べるため、neuregulin (NRG)1やErbB4の変異体マウスの解析、精巣の器官培養や精原細胞の再凝集培養におけるレチノイン酸(RA)やNRG1の機能解析を行った。その結果、RAはセルトリ細胞に働いてNRGの発現を促進し、NRG1は精原細胞とセルトリ細胞のERBB4受容体に働き、増殖と精母細胞への分化を直接、間接に促進することを示唆する。

また、HeLa細胞において、ErbB4受容体から生じるp80は  $\alpha$ -enolaseと結合し、c-mycの遺伝子発現を阻害することによってNRG1による細胞増殖を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We studied the role of neuregulin (NRG) in the initiation of meiosis, using mutant mice and in vitro cultures. Tamoxifen (TM) injection into Nrg1<sup>Ser8211/8211</sup> mutant mice, as well as dominant-negative ErbB4 transgenic mice, decreased proliferation of spermatogonia and meiotic initiation. In cultures of testicular fragments and purified spermatogonia, NRG1 and RA promoted spermatogonial proliferation and meiotic initiation. These results indicate that in juvenile testes RA induces meiosis indirectly through Sertoli cells when NRGs are upregulated and the NRGs directly induce meiosis in spermatogonia through ErbB4 receptor. Collectively, these results indicate that NRGs are essential for the proliferation of spermatogonia and meiotic initiation.

The studies in HeLa cells suggested that p80, which is generated from ErbB4 and translocates to the nucleus, interacts with  $\alpha$ -enolase and inhibits NRG1-dependent cell proliferation by impairing the c-myc gene transcription.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：発生・分化 精巣 減数分裂開始 neuregulin ErbB

## 1. 研究開始当初の背景

古くから精子分化には vitamin A が必要である、ということが知られていた。2006 年頃、Koopman や Page の研究室において、マウス卵巣及び精巣においてレチノイン酸 (retinoic acid; RA) が減数分裂の開始因子であり、RA 分解酵素である Cyp26 が減数分裂阻害因子であることが報告された (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006)。胎児卵巣においては RA 分解酵素がないために RA が働いて胎生中に減数分裂を開始するが、胎児精巣では RA 分解酵素が存在するため胎生中は減数分裂を開始せず、生後分解酵素が減少することによって減数分裂を開始するという。しかし、RA がどのようにして減数分裂を開始させるのかについてはまだ明らかになっていなかった。

## 2. 研究の目的

我々は、イモリ精巣の器官培養系で FSH の単独処理によって精原細胞が増殖を促進され、減数分裂を開始することを明らかにした。イモリ精巣 cDNA library を用いたマイクロアレイにより、FSH によって発現が上昇する遺伝子として neuregulin (NRG)1 を同定し、イモリ NRG1 の組み換えタンパク質は精原細胞の増殖を直接的に促進することを示した (Oral et al., 2008)。

生後のマウス精巣において NRG の発現を調べたところ、NRG1 はセルトリ細胞のみに、NRG3 は精原細胞と体細胞に発現していることを見出したので、RA と NRG による精原細胞の増殖促進機構及び減数分裂開始機構を in vitro と in vivo の系を用いて解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) NRG1 の conditional knockout (KO) マウスの作成と解析

生後精巣における精原細胞の増殖、分化における NRG1 の機能を解析することを目的として、セルトリ細胞特異的に全ての NRG1 遺伝子 isoform に共通な exon6 を欠損させ得る Conditional KO マウス (NRG1-loxP) を作製した。これと別に、セルトリ細胞特異的に CreER<sup>TM</sup> タンパク質を発現する transgenic マウス (Tg)(MIS-CreER<sup>TM</sup>) を作成し、NRG1-loxP を交配させて得られた生後 2 週目の NRG1 Conditional KO マウスに tamoxifen (TM) を連続 5 日間投与し、1 ヶ月後 BrdU を投与して 3 時間後に精巣を回収した。固定、包埋後、切片を作成して免疫染色を行い、精原細胞の増殖や精母細胞への分化の程度を調べた。

### (2) erbB4 の dominant negative 変異体 (DN)

Tg マウスの作成と解析: NRG1 の受容体である erbB4 の精原細胞における役割を調べるため、erbB4 の DN Tg マウスを作成した。生殖細胞特異的な VASA promoter の下流に Cre-ER<sup>TM</sup> 遺伝子をつないだ遺伝子を発現する Tg マウス (VASA-Cre-ER<sup>TM</sup>) と、全身で発現する CAG promoter の下流に loxP 配列で挟まれた CAT 遺伝子をつなぎ、さらに loxP 配列の下流に DN ErbB4 (ErbB4-DN) を結合させた遺伝子が発現する Tg マウス (pCAG-loxP-ErbB4DN) を交配させたダブル Tg マウスを作製した。このダブル Tg マウスでは、Cre-ER<sup>TM</sup> が生殖細胞特異的に発現しているため、TM の投与により変異型 ErbB4 を生殖細胞に過剰発現させることができる。いろいろなステージのマウスに TM を投与し、生殖細胞の増殖に対する影響や表現型を調べた。

### (3) 精巣の器官培養、精原細胞の単離と再凝集培養

器官培養については、未分化精原細胞まで存在する生後 3 日目精巣や分化型精原細胞まで存在する生後 6 日目 (6-dpp) の精巣を細片化し、DMEM 培地に浮かべた nuclepore filter 上に乗せて 32°C で培養した。

精原細胞の再凝集培養については、6-dpp 精巣を collagenase、trypsin 処理後、Nycodentz を用いて精原細胞を分画し、再凝集させ、遠心して得られたペレットをコラーゲンに埋め込み、器官培養と同様にして培養した。

### (4) 免疫染色

培養した精巣断片や再凝集塊を固定、包埋後、切片を、減数分裂開始マーカーである STRA8 や精母細胞のマーカーである SYCP3 の抗体等を用いて免疫染色した。

## 4. 研究成果

### (1) NRG1 の conditional ノックアウト (KO) マウスの生後精巣における解析

生後精巣における精原細胞の増殖、分化における NRG1 の機能を解析するため、セルトリ細胞特異的に NRG1 遺伝子 を欠損させ得る Conditional KO マウス (生後 14 日目) に TM を投与したところ、1 ヶ月後に精巣のサイズ、重量の低下や精細管内に空洞が見られ、BrdU の取り込みの低下、STRA8 陽性細胞数の低下等が見られたことから、NRG1 は精原細胞の増殖と減数分裂開始に重要であることが示唆された。6-dpp の精巣の器官培養に、FSH、all-trans retinoic acid (ATRA)、NRG1 を添加すると精原

細胞の増殖や精母細胞への分化を促進した。NRG1はERBB受容体を介して働くことが知られている。器官培養でERBB阻害剤を添加すると、NRG1やATRAによる増殖促進効果は阻害されることから、NRGシグナルはRAシグナルの下流にあることが示唆された。また、単離した精原細胞の再凝集培養にATRAやNRGを加えたところ、精原細胞の増殖や精母細胞への分化を促進したことから、RAやNRGは精原細胞に直接作用することが示唆された (Zhang et al., 2011)。

## (2) 未分化精原細胞へのATRAとNRG1の影響

NRG1は分化型A-type精原細胞の増殖や減数分裂開始を促進することが分かった (Zhang et al., 2011)が、未分化精原細胞の増殖や分化を促進するかどうかは不明であった。そこで、NRG1の条件付きノックアウトマウスにTMを注射したところ、PLZF-positiveな未分化精原細胞の増殖が低下した。また、未分化精原細胞しか存在しない3-dppの精巣の器官培養にATRAやNRG1を加えたところ、c-kit-positiveな分化型A-type精原細胞やSYCP3-positiveな精母細胞が出現した。以上のことから、ATRAやNRG1は未分化精原細胞の増殖や分化にも働くことが示唆された。

## (3) ErbB4 の dominant negative 変異体(DN) Tgマウスの生後精巣における機能解析

マウス精巣におけるERBB2,ERBB4 タンパク質の発現を免疫染色やイムノプロットによって調べた。生後1~4週目の精巣のイムノプロットにおいて、ERBB2とERBB4のバンドが見られた。さらに、生後1~4週目の精巣を免疫染色したところ、ERBB2もERBB4もセルトリ細胞ではなく、生殖細胞に発現が見られた。

生後2,4週目のErbB4 domi-nega double-Tg (DT)とcontrolとしてのsingle Tg(ST)にTMを注射し、それぞれ2,4週目にBrdUを注射し、増殖活性を調べた。DTにおけるC-kit positiveな細胞の増殖活性は、STに比べて約3~4割減少していた。また、DTにおける精細管あたりのSTRA8の細胞数は、STに比べて約25%減少していた。これらの結果は、ErbB4が分化型精原細胞の増殖に関与していることを示唆する (Zhang et al., 論文準備中)。

## (4) Nrg1 transgenic mouse (Tg-NRG1)の解析

Mis promoter によってセルトリ細胞特異的にNrg1を発現させる transgenic mouse

を作製した。

日齢は3-dpp (計9匹)と6-dpp (計12匹)のTg-NRG1マウスを実験に用いた。その結果、ゲノムタイピングではTg-NRG1 遺伝子が確認されたが、Tg-NRG1マウス(6-dpp)とwildマウス精原細胞の増殖活性(BrdU&Tra98 Double staining)の測定を行い、顕著な有意差が見いだされなかった。また初期減数分裂のマーカーでありStra8の発現を確認したところ、著しい発現量の増加が認められなかった。これらのことから、解析したTg-NRG1マウスでは、過剰発現されたNRG1タンパクが精原細胞の増殖や減数分裂に機能する十分な発現量が足してではないかと考えられる。今後、NRG1の発現量や、未分化精原細胞の影響に及ぼすかどうかなどについてさらなる解析の必要があると考えられる。

## (5) HeLa 細胞の増殖における ERBB4 の細胞内ドメイン p80 とその結合タンパク質 $\alpha$ -enolase の機能解析

Neuregulin (NRG)1のチロシンキナーゼ型受容体ERBB4は、プロテアーゼでその細胞内ドメインp80が切り出され、核に移行し、転写因子として機能することが知られている。低濃度のNRG1をHeLa細胞に作用させると細胞増殖が促進されるのに対して、高濃度のNRG1を作用させると、細胞の増殖活性が抑制され、p80が核と細胞質の両方に蓄積された。p80による増殖阻害の理由を探るため、p80と結合するタンパク質を免疫沈降、プロテオミクスで単離、同定したところ、その一つとして、近年c-mycのプロモーター配列に結合して転写因子として働くことが報告されている

$\alpha$ -enolaseが見出された。p80と $\alpha$ -enolaseが共存するかを調べたところ、p80と $\alpha$ -enolaseがNRG1に依存して核に存在した。そこで、p80、 $\alpha$ -enolaseの機能を解析するために、p80の核移行シグナルを付与した変異型、チロシンキナーゼ活性を欠損させた変異型、及び $\alpha$ -enolaseのc-mycプロモーターとの結合に参与する領域を欠損させた変異型を作製し、細胞に過剰発現させる系を構築した。p80の $\alpha$ -enolaseとの結合がc-myc遺伝子の転写へ及ぼす効果を調べた結果、その結合がc-myc遺伝子の転写を阻害すること、また、その転写阻害は、核でのc-mycタンパク質の減少をもたらし、c-mycによる細胞増殖促進を抑制することを明らかにした。これらの結果から、p80は $\alpha$ -enolaseと結合し、核でのc-mycの転写阻害を通じて増殖抑制に機能していることが示唆された (Yamada et al., in press)。

## (6) 精子形成過程での減数分裂におけるノシセプチンの発現制御と機能の解明

減数分裂は、染色体どうしを結び付けているコヒーシスが、その構成因子の一つである Rec8 のリン酸化を契機に分解され、染色体が解離することで進行する。しかし、この染色体動態を誘導する分子機構は、解明されていなかった。精巣では、濾胞刺激ホルモン (FSH) がセルトリ細胞に作用し、減数分裂に重要な役割を果たしている。これは、セルトリ細胞で産生される分泌因子が生殖細胞に作用することによって考えられてきたが、その実体は不明であった。そこで、本研究は減数分裂における染色体動態を制御する分泌因子の同定を目的とした。まず、FSH がセルトリ細胞に作用すると、cAMP、タンパク質リン酸化酵素 PKA を介して転写因子 CREB が活性化され、プレプロノシセプチン遺伝子の転写が促進されることを示した。この遺伝子がコードするタンパク質からは、17 個のアミノ酸から成るノシセプチンが産生されるが、ノシセプチンの産生量も FSH の作用で増加することが示された。ノシセプチンは、疼痛作用を有する神経ペプチドとして古くから知られているが、その生殖細胞での機能については全く分かっていなかった。ノシセプチンの発現が減数分裂前期から精巣で亢進すること、ノシセプチンの受容体が生殖細胞、主に精母細胞に発現することなどから、ノシセプチンの減数分裂における染色体動態への関与が考えられた。ノシセプチンを精巣の器官培養やマウス個体に投与すると、Rec8 のリン酸化と染色体の解離が誘導され、減数分裂が正常に進行することが観察された。以上のように、ノシセプチンは、セルトリ細胞で FSH シグナル伝達系によって産生され、生殖細胞に作用して Rec8 のリン酸化を誘導することで、減数分裂を進行させることが示唆された (Eto et al., 2012, 2013)。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

Yamada, S., Marutsuka, M., Inoue, M., Zhang, J., Abe, S.-I., Ishibashi, K., Yamaguchi, N., Eto, K. 2014. The interaction of the ErbB4 intracellular domain p80 with a-enolase in the nuclei is associated with the inhibition of neuregulin1-dependent cell proliferation. **Int J Biochem Mol Biol**, in press. 査読有

Zhang, J., Hatakeyama, J., Eto, K. and Abe, S.-I. 2014. Reconstruction of a seminiferous

tubule-like structure in a 3 dimensional culture system of re-aggregated mouse neonatal testicular cells within a collagen matrix. **Gen Comp Endocrinol**, in press. DOI: 10.1016/j.ygcen.2014.03.030 査読有

Eto K., Shiotsuki M, Abe S.-I., 2013 Nociceptin induces Rec8 phosphorylation and meiosis in postnatal murine testes. **Endocrinology**, 154(8), 2891-2899. DOI: 10.1210/en.2012-1977 査読有

Eto K., Shiotsuki M, Sakai T, Abe S. 2012. Nociceptin is upregulated by FSH signaling in Sertoli cells in murine testes. **Biochem Biophys Res Commun**. 2012, 421(4):678-83. DOI: org/10.1016/j.bbrc.2012.04.061 査読有

Eto K., Goto S, Nakashima W, Ura Y, Abe S.I. 2012. Loss of programmed cell death 4 induces apoptosis by promoting the translation of procaspase-3 mRNA. **Cell Death Differ**. 2012, 19(4):573-81. DOI: 10.1038/cdd.2011.126 査読有

Zhang J, Eto K., Honmyou A, Nakao K, Kiyonari H, Abé S. 2011. Neuregulins are essential for spermatogonial proliferation and meiotic initiation in neonatal mouse testis. **Development**. 2011, 138(15):3159-68. DOI: 10.1242/dev.062380 査読有

Eto K., Hommyo A., Yonemitsu R., and Abe S.-I. (2010) ErbB4 signals Neuregulin1-stimulated cell proliferation and c-fos gene expression through phosphorylation of serum response factor by mitogen-activated protein kinase cascade. **Mol. Cell Biochem.**, 339, 119-125. (査読有)

他 6 件

〔学会発表〕(計 42 件)

Abe, S.-I. et al. (2013) “Reconstruction of seminiferous tubule-like structure in 3-D culture system of re-aggregated mouse testicular cells in vitro.” **Invited speech** in the symposium “Molecular mechanisms of sex determination and differentiation”, The 17th Int Cong Comp Endocrinol (ICCE), July 15–19, Barcelona, Spain.

Abe, S.-I. et al., (2012) Effect of NRG1 and ATRA on the proliferation and differentiation of undifferentiated spermatogonia in mouse. 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (Kobe), May 28-31.

Abe, S.-I. et al., (2011) “Neuregulins are essential in spermatogonial proliferation and

meiosis initiation in neonatal mouse testis” 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (Ginowan, Okinawa), May 18-21.

Abe S.-I. et al., (2010) Neuregulins as downstream factors of retinoic acid induce meiosis in neonatal mouse testes in vitro. **Invited speech** in 11th International Symposium on Spermatology OKINAWA, Jun 24-29.  
他 38 件

〔図書〕(計 1 件)

Abé, S.-I., Zhang, J., Eto, K. (2012) Roles of Neuregulins and Retinoic Acid in Spermatogonial Proliferation and Meiotic Initiation in Neonatal Mouse Testis. Sperm Cell Research in the 21st Century: Historical Discoveries to New Horizons (ed by Morisawa), Adthree Publishing Co., Ltd., Tokyo, Japan. Total pages, 256

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

安部 眞一 (ABE, Shin-ichi)  
熊本大学・事務局・理事・副学長  
研究者番号：9 0 1 0 9 6 3 7

### (2)研究分担者

江頭 恒 (ETO, Ko)  
熊本大学・自然科学研究科・准教授  
研究者番号：4 0 3 5 9 9 6 4

荒木 令江 (ARAKI, Norie)  
熊本大学・生命科学研究部(医)・准教授  
研究者番号：8 0 2 5 3 7 2 2