

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月16日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590172

研究課題名（和文） 精巣の生殖細胞分化における細胞接着分子の作用機序の分子基盤

研究課題名（英文） Molecular mechanism of cell adhesion molecules involved in testicular germ cell differentiation.

研究代表者

若山 友彦 (WAKAYAMA TOMOHIKO)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：70305100

研究成果の概要（和文）：造精細胞に発現する細胞接着分子 Cadm1 は、セルトリ細胞に発現するポリオウィルス受容体と相互作用することにより、精子形成に関与する。Cadm1 の KO マウスでは、造精細胞の形態異常やアポトーシスによる精子形成障害により不妊を生じる。本研究では、造精細胞の細胞内で Cadm1 と相互作用する2つのアダプター蛋白質 Bspry と Mpp6 を同定した。Bspry と Mpp6 は伸長精子細胞に局在することが分かった。

研究成果の概要（英文）：Cell adhesion molecule-1 (Cadm1) is expressed in only spermatogenic cells. It is involved in spermatogenesis by the interaction with poliovirus receptor expressed in Sertoli cells. Cadm1-deficient mice have male infertility due to defective spermatogenesis, in which abnormal spermatids and apoptotic cells are prominent. In the present study, we identified two adaptor molecules, Bspry and Mpp6, which interact with Cadm1. Both molecules localized in elongating spermatids of the testis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,900,000	570,000	2,470,000
23年度	900,000	270,000	1,170,000
24年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生殖生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：精巣、造精細胞、セルトリ細胞、ノックアウトマウス、Yeast Two-Hybrid 法、精子形成、細胞接着分子、アダプター蛋白質

1. 研究開始当初の背景

精子形成 (Spermatogenesis) は、精祖細胞の増殖と分化、精母細胞の減数分裂、精子細胞の形態変化の3つの過程からなる。造精細胞

に発現する細胞接着分子 Cell adhesion molecule-1 (Cadm1) は、セルトリ細胞に発現するポリオウィルス受容体 (PVR) と相互作用する。Cadm1 のノックアウト (KO) マウスでは、造精細胞がセルトリ細胞から脱落するだけ

でなく、造精細胞の分化異常も示すため雄性不妊を生じる。我々は、Spermatogenic immunoglobulin superfamily という名称でマウスの Cadml を初めて報告し、その精巣における発現や精子形成における役割について、世界に先駆けて明らかにした。Cadml は、精祖細胞から早期の精母細胞と伸長精子細胞の2つの時期の造精細胞に発現するが、中期以降の精母細胞から円形精子細胞には発現しない。野生型やヘテロマウスと比べて、KO マウスでは、精祖細胞や精母細胞にアポトーシスが増加するが、精母細胞は減数分裂を完了して精子細胞を形成する。KO マウスの精母細胞では細胞接着分子 Mpz12 の発現が代償的に増加するが、伸長精子細胞には Mpz12 が発現しなかった。さらに、KO マウスでは、造精細胞がセルトリ細胞から脱落するだけでなく、特に、伸長精子細胞の細胞内小器官の分布異常を含む分化異常が認められた。以上の結果から、精祖細胞から精母細胞と伸長精子細胞では、Cadml の役割が異なることが推測された。また、伸長精子細胞の分化異常は、細胞内において Cadml と相互作用するアダプター蛋白質が精子形成に関係していることを示唆する。Cadml の細胞内領域には、C 末端の PDZ 結合モチーフ (Φ -X- Φ 、 Φ は疎水性アミノ酸)と細胞膜直下の Protein 4.1 結合モチーフ (R-X-K-X₀₋₄-G-X-Y-X₃-E) が同定されている。精巣において、Protein 4.1 結合モチーフには、Protein 4.1B や Protein 4.1G が結合するが、どちらの KO マウスも精子形成障害を起こさないことが報告されている。一方、精巣において Cadml の PDZ 結合モチーフ、あるいは、他の部位と相互作用する分子は同定されていない。したがって、伸長精子細胞における Cadml の機能の分子基盤を明らかにするためには、Cadml と相互作用する分子を同定するという着想に至った。

2. 研究の目的

これまでの研究背景から、細胞接着分子 Cadml は細胞内のアダプター蛋白質を介して精子形成を調節し、そのため細胞内シグナル伝達機構を活性化することが示唆されている。したがって、精子形成において Cadml の細胞内領域と相互作用するアダプター蛋白質群を探索し、Cadml による精子形成の調節機構の分子基盤を明らかにすることを研究の目的とする。このために、まず、Yeast Two-Hybrid 法を用いて網羅的に探索を行う。精巣から抽出した RNA を用いて作製した cDNA ライブラリーに対して、Cadml の細胞内領域と相互作用する分子をスクリーニングすることで、精巣において Cadml と相互

作用するアダプター蛋白質分子を網羅的に探索することができる。次に、同定したアダプター蛋白質分子と Cadml との相互作用部位を決定する。相互作用部位の決定は、変異体の作製等により、その分子機構を明らかにすることが可能になる。また、同定した分子に対して作製した抗体を利用して、同定した分子の精巣における発現と局在を明らかにするため、野生型および Cadml の KO マウスを用いて解析し、精巣における Cadml と相互作用する分子の挙動を解析することを目指した。

3. 研究の方法

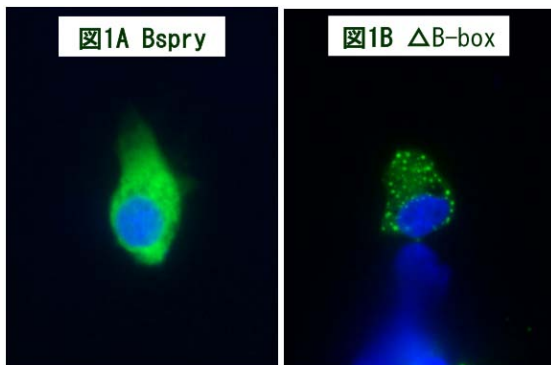
細胞接着分子 Cadml の細胞内領域には、PDZ 結合モチーフと Protein 4.1 結合モチーフがある。しかしながら、これら以外の細胞内領域において相互作用するアダプター蛋白質が存在する可能性もある。したがって、Cadml の細胞内領域すべてを含む Yeast Two-Hybrid 用の BD ベクターを作製した。この BD ベクターを用いて、精巣の cDNA ライブラリーを挿入した AD ベクター (獨協大学医学部、安西博士より供与) を網羅的にスクリーニングすることで、Cadml の細胞内領域と相互作用するアダプター蛋白質を探索した。同定した分子について、変異体を作製して、Cadml との相互作用を培養細胞において解析する。また、同定した分子の GST 融合組み換え蛋白質を合成して、同定したアダプター蛋白質に対する特異抗体をラットで作製する。さらに、野生型および Cadml の KO マウスを利用して、精巣における同定した分子の発現と局在を解析する。また、精巣のライゼートに対して作製した抗体を用いて免疫沈降を行い、沈降産物の質量分析を行う。

4. 研究成果

Yeast Two-Hybrid 法によるスクリーニングの結果、105 個の陽性クローンを得た。これらの陽性クローンをシーケンズすることにより、クローンの分子種を同定した。23 個の陽性クローンは PDZ 蛋白質の膜結合型グアニル酸キナーゼファミリー分子の Membrane protein, palmitoylated 6 (Mpp6) であり、7 個の陽性クローンは、B-box and SPRY domain containing (Bspry) であった。Bspry は、N 末から B-box ドメインと Spry ドメインからなり、Cadml と B-box ドメインが相互作用することが分かった。一方、Mpp6 は、N 末から L27 ドメイン、PDZ ドメイン、SH3 ドメイン、Guanylate kinase ドメインからなり、

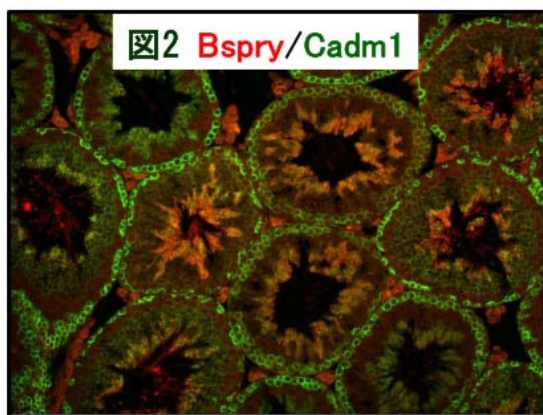
Cadml と PDZ ドメインで相互作用する。

次に、蛍光蛋白質EYFPをタグとして付加したBspryとMpp6融合蛋白質を遺伝子導入して培養細胞HEK293に強制発現させた。単独で遺伝子導入したBspryとMpp6は、ともに細胞質にびまん性に局在する(図1A)が、BspryではB-boxを欠損(ΔB-box; 図1B)した。また、Cadmlを同時に遺伝子導入するとCadmlが局在する細胞膜に共局在した。したがって、Cadmlのアダプター蛋白質としてBspryとMpp6が機能することがin vitroレベルで明らかになった。また、BspryとMpp6のC末部位のGST融合蛋白質



質を作製し、ラットを免疫することで、それぞれ特異抗体を作製した。野生型マウスにおいてBspryとMpp6はともに伸長精子細胞に発現し、Cadmlと共局在した(図2)。CadmlのKOマウスにおいて、BspryとMpp6、伸長精子細胞に発現するが、細胞質に顆粒状に局在する異常所見を得た。また、Mpp6はウェスタンブロットによる。野生型の約20%に発現量が減少した。

さらに、作製した抗体を用いて免疫沈降を



行い、沈降産物の解析によるCadmlと相互作用する分子の探索を行った。得られた沈降産物に対して質量分析を行ったところ、これらの免疫沈降産物には40種類の分子が含まれていることが分かった。

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1件)

- ① Nakata H, Wakayama T, Adthapanyawanich K, Nishiuchi T, Murakami Y, Takai Y, Iseki S. Compensatory upregulation of myelin protein Zero-like 2 expression in spermatogenic cells in cell adhesion molecule-1-deficient mice. *Acta Histochem Cytochem* 査読有, 45, 2012, 47-56
DOI:10.1267/ahc.11057

[学会発表] (計5件)

- ① 若山友彦、井関尚一 細胞間相互作用による精子形成の調節機構, 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013年3月28日, かがわ国際会議場(香川県)
- ② 若山友彦、仲田浩規、井関尚一 Cell adhesion molecule-1欠損マウスの造精細胞における細胞接着分子 Myelin protein zero-like 2の発現増加, 第27回日本生殖免疫学会総会・学術集会, 2012年12月9日, 大阪医科大学(大阪府)
- ③ 若山友彦、井関尚一 精子形成における細胞間相互作用の役割, 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2012年3月28日, 山梨大学(山梨県)
- ④ 若山友彦、井関尚一 生殖細胞の分化における細胞間相互作用の役割, 日本顕微鏡学会第67回学術講演会, 2011年5月16日, 福岡国際会議場(福岡県)
- ⑤ 若山友彦、井関尚一 精子形成における細胞接着分子とアダプター蛋白質, 第88回日本生理学会 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会, 2011年3月28日, パシフィコ横浜(神奈川県)

[その他]

ホームページ等

<http://web.kanazawa-u.ac.jp/~med01/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若山 友彦 (WAKAYAMA TOMOHIKO)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号: 70305100

(2) 研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

加藤 将夫 (KATO YUKIO)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号 : 30251440