

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460241

研究課題名(和文)細胞接着分子による造精細胞の分化調節機構の研究

研究課題名(英文)The study of regulatory mechanisms of spermatogenic cell differentiation by cell adhesion molecules

研究代表者

若山 友彦(Wakayama, Tomohiko)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：70305100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：精子形成の調節因子として、内分泌因子や精巣内局所因子がよく知られている。さらに、造精細胞とセルトリ細胞間の細胞接着分子による相互作用が必要である。その一つである造精細胞に発現する細胞接着分子Cell adhesion molecule-1(CADM1)の欠損は、伸長精子細胞の分化異常を示す。CADM1と相互作用する分子であるアダプター蛋白質のB-box and SPRY-domain containing protein (BSPRY)は、step11以降の精子細胞に発現し、CADM1欠損マウスでその発現は30%まで減少した。BSPRY欠損マウスのオスは、精子形成障害を示した。

研究成果の概要(英文)：The cell adhesion molecule-1 (CADM1) is expressed in only spermatogenic cells but not Sertoli or Leydig cells. CADM1 expressed in spermatogenic cells interacts with Poliovirus receptor on Sertoli cells. CADM1-deficient mice represent male infertility due to defective spermatogenesis, in which spermatids are detached and the remaining spermatids show abnormal morphology. We could identify B-box and SPRY-domain containing protein (BSPRY) as an adaptor protein of CADM1 by yeast-two hybrid method. To clarify the expression and cellular localization of BSPRY in testis of wild type and CADM1-deficient mice. Immunohistochemistry demonstrated that BSPRY is localized in the step 11 to 16 spermatids. The levels of BSPRY in CADM1-deficient mice decreased by 70% compared with wild type ones by western blot analysis. These results suggested that the deficiency of CADM1 caused that the expression of its adaptor protein BSPRY decreased in elongating spermatids.

研究分野：組織学 組織化学 生殖生物学

キーワード：精巣 精子形成 細胞接着分子 不妊症 精子完成 セルトリ細胞 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、半数体の精子細胞の形態変化 (精子完成: Spermogenesis) からなる。精子完成では、先体と鞭毛の形成、核の濃縮、細胞全体の伸長により円形精子細胞が伸長精子細胞になり、遺残小体として細胞質が脱落して精子が形成される。

精子形成は、内分泌因子や精巣内局所因子のほか細胞接着分子により調節される。細胞接着分子による調節の特徴は、細胞同士の直接作用を介することである。造精細胞に発現する Cell adhesion molecule-1 (CADM1)、Junctional adhesion molecule-C (Jam-C)、Nectin-3 は、それぞれセルトリ細胞に発現する Poliovirus receptor (Pvr)、Jam-B、Nectin-2 と相互作用をする。この中で、CADM1、Jam-C、Nectin-2、Nectin-3 のノックアウト (KO) マウスは精子形成障害により雄性不妊を示す。これらの細胞接着分子は、伸長精子細胞とセルトリ細胞間の相互作用、すなわち、精子完成に関与する。この相互作用は、部位と関与する細胞接着分子の違いにより2種類に分類できる。1つは、伸長精子細胞の頭部とセルトリ細胞間にある特殊な接着装置である apical ectoplasmic specialization を構成するもので、Nectin-2 と Nectin-3、Jam-B と Jam-C が相互作用する。もう1つは、伸長精子細胞の尾側とセルトリ細胞間で、CADM1 と Pvr が相互作用する。CADM1 の KO マウスで見られる精子形成障害は、他の KO マウスより精細管内腔に脱落する精子細胞が目立ち、脱落せずにセルトリ細胞上に残った伸長精子細胞は鞭毛周囲に配置されるミトコンドリアの減少を含めて尾側の細胞質の形態異常が著しい。したがって、CADM1 が単なる細胞間の接着として働くだけでなく、造精細胞の分化調節因子としても機能することが示唆された。

CADM1 の細胞内領域には Protein 4.1 結合モチーフと PDZ 結合モチーフがある。Protein 4.1 結合モチーフに結合する分子として Erythrocyte protein band 4.1-like 1 (Epb4.111) と Epb4.113 が同定されたが、どちらの KO マウスも精子形成障害を示さない。申請者らは Yeast Two-hybrid (Y2H) 法を用いて、精巣において CADM1 の細胞内領域と結合するアダプター蛋白質 B-box and SPRY-domain containing protein (BSPRY) を同定した。興味深いことに、BSPRY は、主に精巣で発現する遺伝子と報告されていたが、精巣における発現細胞の同定を含めて、その役割は全く不明であった。アミノ酸配列の一次構造をもとに推定すると、BSPRY は N 末側の B-box ドメインと C 末側の SPRY ドメインからなる。BSPRY は、神経系の培養細胞において 14-3-3 蛋白質ファミリーを介してシグナル伝達分子の PKC、PI3K 等と相互作用することが報告されている。これらの結果から、CADM1 は BSPRY を介して細胞内シグナル伝達機構を活性化することが示唆される。

2. 研究の目的

細胞接着分子 CADM1 と相互作用するアダプター蛋白質 BSPRY のマウス精巣における役割を明らかにする。特に、BSPRY KO マウスの精巣において、精子形成障害が生じるかどうかを明らかにする。さらに、CADM1 と BSPRY と相互作用する分子を探索し、細胞接着分子 CADM1 を中心とした精子形成の調節機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

全体を2つの実験項目、すなわち、精子形成におけるアダプター蛋白質 BSPRY の機能解析と精巣において BSPRY と相互作用する分子の探索に分けて実施する。BSPRY KO マウスを用いて、BSPRY 欠損の精子形成への影響を明らかにする。造精細胞において BSPRY と相互

作用する蛋白質分子を質量分析により同定する。

4. 研究成果

細胞接着分子 CADM1 と相互作用するアダプター蛋白質 BSPRY は、野生型マウスにおいて伸長精子細胞の尾側の細胞膜と細胞質に局在した。また、CADM1 KO マウスでは、精細管から脱落した精子細胞には BSPRY の発現を認めないが、精細管に残った伸長精子細胞の細胞質には点状の BSPRY の発現を認めた。CADM1 の欠損が BSPRY の機能にも影響することが示唆され、CADM1 の精子形成の調節因子としての機能を解析するために、細胞内領域で相互作用する BSPRY が鍵となる有力な分子と考えられた。

精子形成におけるアダプター蛋白質 BSPRY の機能解析および、精巣において BSPRY と相互作用する分子の探索を行った。個体レベルの機能解析を行うため、BSPRY の遺伝子ノックアウトマウスの解析を行った。BSPRY の遺伝子ノックアウトマウスは、個体レベルの解析はされていなかったが、既に作製されて凍結胚として European Mouse Mutant Archive (EMMA) のデータベースに記載されていた。そこで、この凍結胚を導入し、熊本大学において個体化を行った。BSPRY のノックアウトマウスは、メンデルの法則に従って、ホモマウスが得られたが、精巣重量が野生型やヘテロマウスに比べて約 30% 小さかった。このホモマウスのオスを野生型やヘテロマウスのメスと交配したところ、妊娠し産仔が得られたが約 40% でヘテロマウスのオスの半分であった。そこで、精巣の組織像を顕微鏡で観察したところ、精細管内で精子形成が認められたが、減数分裂後の精子細胞からなる多核の細胞をもつ精細管が 5 倍多く見られた。また、精巣上体内の成熟精子数が、野生型やヘテロマウスの約 2/3 であり、形態異常を示す精子が 3 倍多く見られた。

アダプター蛋白質 BSPRY と相互作用する分子の探索をするために、抗 BSPRY 抗体を用いて行った免疫沈降の沈降産物を SDS-PAGE で分離後、切り出したゲルを直接ペプチダーゼ消化と MALDI TOF/TOF による MS/MS 解析（質量分析）を行った。同定した分子に関して、精巣を含めて、精巣上体、卵巣、子宮、脳、肝臓、肺、腎臓、心臓における mRNA 発現量を検討したところ、精巣特異的な分子は認められなかった。

細胞接着分子 CADM1 のアダプター蛋白質 BSPRY は、半数体である精子細胞の形態形成過程に必要であることが分かった。BSPRY と直接相互作用する分子を同定することができなかったが、CADM1 と関係する分子が精子細胞の形態形成過程に必須であるので、CADM1 の KO マウスに加えて BSPRY の KO マウスは精子細胞の形態形成過程の有用なモデルとなることが分かった。

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4件)

Wakayama T, Nakata H, Kumchantuek T, Gewaily MS, Iseki S.

Identification of 5-bromo-2'-deoxyuridine-labeled cells during mouse spermatogenesis by heat-induced antigen retrieval in lectin staining and immunohistochemistry.

J Histochem Cytochem 査読有 63 巻、2015、190-205

doi: 10.1369/0022155414564870

Nakata H, Wakayama T, Takai Y, Iseki S.

Quantitative analysis of the cellular composition in seminiferous tubules

in normal and genetically modified infertile mice.

J Histochem Cytochem 査読有、63 巻、2015、99-113

doi: 10.1369/0022155414562045

Nakata H, Wakayama T, Sonomura T, Honma S, Hatta T, Iseki S.

Three-dimensional structure of seminiferous tubules in the adult mouse.

J Anat 査読有、227 巻、2015、686-694

doi: 10.1111/joa.12375.

Nakata H, Wakayama T, Asano T, Nishiuchi T, Iseki S.

Identification of sperm equatorial segment protein 1 in the acrosome as the primary binding target of peanut agglutinin (PNA) in the mouse testis.

Histochem Cell Biol 査読有、147 巻、2017、27-38

doi: 10.1007/s00418-016-1478-8

[学会発表](計4件)

若山友彦

細胞同士のコミュニケーションの方法～精子形成での細胞接着分子の新しい役割～

日本学会議・第8回形態科学シンポジウム「生命科学研究の魅力を語る高校生のための集い」、福岡市、2015年10月24日

若山友彦

精子形成における細胞接着分子の役割
第30回日本生殖免疫学会総会・学術集会、熊本市、2015年11月21日～22日

若山友彦

精子形成における細胞接着分子の役割
第47回精子研究会、秋田市、2016年6月4日

若山友彦

細胞接着分子による精子形成の調節機構

第24回 精子形成・精巣毒性研究会、文京区、2016年12月3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:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.medphas.kumamoto-u.ac.jp/research/bunya/2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若山 友彦 (WAKAYAMA Tomohiko)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 70305100

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

加藤 将夫 (KATO Yukio)

金沢大学・医薬保健研究域薬学系・教授

研究者番号： 30251440

(4)研究協力者

()