

平成22年 4月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19590172  
 研究課題名（和文） 精子形成における細胞接着分子を介するシグナル伝達機構の研究  
 研究課題名（英文） Research of signal transduction by cell adhesion molecules in spermatogenesis  
 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）：細胞接着分子 Cell adhesion molecule-1 (Cadm1) のノックアウト (KO) マウスは精子形成障害を生じる。DNA マイクロアレイと定量的 RT-PCR 法によって、KO マウスにおいて発現が増加する細胞接着分子 Myelin protein zero like-2 (Mpz12) を検出した。KO マウスでは、Mpz12 が代償性に機能することが示唆された。また、Cadm1 と相互作用する Poliovirus receptor の KO マウスでは精子形成障害は見られなかった。

研究成果の概要（英文）： Mice targeted disruption of cell adhesion molecule-1 (Cadm1) genes indicated abnormal spermatogenesis. DNA microarray and quantitative real time RT-PCR revealed overexpression of cell adhesion molecule, Myelin protein zero like-2 (Mpz12) in cadm1 disrupted mice. Mpz12 compensated partially the function of cadm1 in cadm1 disrupted mice. Also, mice targeted disruption of poliovirus receptor interacting with cadm1 showed no spermatogenic disorder.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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、精子形成、細胞接着分子、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

精子形成は、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つの過程からなり、内分泌因子や局所因子（液性因子）による調節を受けるが、造精細胞とセ

ルトリ細胞間で機能する細胞接着分子も必要であることが分かってきた。これらの細胞接着分子は、Junctional adhesion molecule-B (JAM-B)、JAM-C、Nectin-2、Nectin-3、Cell adhesion molecule-1 (Cadm1)、

Poliovirus receptor (PVR) であり、すべて免疫グロブリンスーパーファミリー (IGSF) に属する。造精細胞に発現する JAM-C、Nectin-3、Cadm1 とセルトリ細胞に発現する Nectin-2 のノックアウト (KO) マウスは、伸長精子細胞の頭部と鞭毛の形成障害と精細管上皮からの脱落のために雄性不妊を示す。研究代表者らが発見した Cadm1 は、伸長精子細胞だけでなく精祖細胞から精母細胞にも発現するが、Cadm1 の KO マウスでは、主に伸長精子細胞の精細管上皮からの脱落と伸長精子細胞の形態異常を示す。また、研究代表者らは、Cadm1 と相互作用するセルトリ細胞に発現する細胞接着分子が、PVR であることを発見した。Nectin-3 と結合するセルトリ細胞に発現する Nectin-2 の KO マウスにおいても精子形成障害が起こることから、PVR の KO マウスにおいても精子形成障害が生じることが推測された。したがって、精子形成における Cadm1 の機能を明らかにするためには、Cadm1 と PVR の KO マウスに生じる障害のメカニズムを解明すれば良いとの着想に至った。

## 2. 研究の目的

精子形成障害を示す KO マウスマイクロアレイを用いた論文では、10 週齢以上のマウスを用いて Cadm1 の KO と正常マウスとの比較が行なわれているため、個別に遺伝子発現を検討すると実際の遺伝子変化に一致しなかった。この原因は、DNA マイクロアレイの技術的な問題というよりはむしろ、10 週齢以上のマウスを用いたことにあった。10 週齢以上のマウスでは精子形成がランダムに同期せずに起こる上に、精祖細胞から精母細胞で生じる障害と伸長精子細胞で生じる障害が混在するため、遺伝子発現量の増減の相殺などが生じるのが原因と考えられた。この問題点

を解決するため、マウス精巣の生後発達過程の、いわゆる、“First wave” を利用した。“First wave” とは、生後初めて起こる精子形成のことで、精子形成がランダムに同期せずに起こる成獣とは異なり、精巣内のすべての部位で同期して精子形成が起こる。したがって、この “First wave” を利用して、マイクロアレイで網羅的に遺伝子発現の解析を行えば、遺伝子発現の変化と精子形成の時期を対応させることができる。

DNA マイクロアレイと定量的 RT-PCR 法を用いて、網羅的に遺伝子発現を解析する。精母細胞までの造精細胞しか存在しない 2 週齢の Cadm1 の KO と正常マウスの精巣における遺伝子変化を解析することにより、精祖細胞から精母細胞で起こる精子形成障害に対応した遺伝子変化を検出する。次に、伸長精子細胞が出現する 5 週齢の Cadm1 の KO と正常マウスを比較する。特に、細胞接着分子やシグナル伝達分子 (キナーゼ、ホスファターゼ、機能ドメインをもつ分子) に着目した。得られた遺伝子に対する抗体を作製して遺伝子発現だけでなく蛋白質レベルの発現を解析する。さらに、Cadm1 の KO マウスで解析を行った遺伝子について、PVR の KO マウスで解析を行い、精子形成における細胞接着分子を介するシグナル伝達機構を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

### 1) DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析

精祖細胞と精母細胞のみが存在する 2 週齢、伸長精子細胞が出現する 5 週齢、すべての造精細胞が存在する 10 週令以上のマウス精巣について、Cadm1 の KO と正常で比較する。それぞれの精巣より total RNA を抽出し、アジレント社の DNA マイクロアレイを行い、網羅

的に発現量に差が存在する遺伝子の検出を試みた。

#### 2) 定量的 RT-PCR 法を用いた遺伝子発現量の検討

DNA マイクロアレイで網羅的に検出した遺伝子の変化を、定量的 RT-PCR 法によって個別に評価する。定量的 RT-PCR 法の長所は、マイクロアレイとは逆に、一度に多数の試料に対して同一の遺伝子発現の変化を検討できることである。また、PCR による DNA の増幅により発現量の差を検出する定量的 RT-PCR 法は、ハイブリダイゼーションによるマイクロアレイとは原理が異なるので、結果のダブルチェックには最適な方法である。

#### 3) 抗体作製と免疫組織化学による精細管レベルでの蛋白質発現の解析

得られた遺伝子の特異的なアミノ酸配列を合成して抗原として用いて、雌ラットを免疫して抗体を作製する。作製した抗体を利用して、免疫組織化学により蛋白質レベルの発現量の変化と局在を解析した。

#### 4) PVR の KO マウスにおける精子形成異常の探索と遺伝子発現の変化の解析

PVR はセルトリ細胞に発現し、造精細胞に発現する Cadm1 と相互作用することから、精子形成障害の有無を検討した。

### 4. 研究成果

まず、細胞接着分子 Cadm1 の KO マウスを用いて、精子形成における細胞接着分子の機能解析を行った。精子形成がランダムに同期せずに起こる 10 週令以上だけでなく、精子形成が同期して起こる生後初めての精子形成過程である“First wave”を利用したて DNA マイクロアレイを行った。その結果、KO マウスの精母細胞において、細胞接着分子 Myelin protein zero like-2 (Mpz12) を検出した。さらに、定量的 RT-PCR により、Mpz12 の mRNA

の発現は、KO マウスで正常マウスの約 20 倍増加していた。

Mpz12 の特異抗体を作製し、免疫組織化学を行ったところ、細胞接着分子 Mpz12 は精母細胞から円形精子細胞に発現することが分かった。細胞接着分子 Cadm1 は精祖細胞から精母細胞と伸長精子細胞に発現している。Cadm1 KO マウスにおいて Mpz12 の発現が増加することにより、Cadm1 の精母細胞での機能を代償していることが示唆された。

造精細胞に発現する Cadm1 は、セルトリ細胞に発現する Poliovirus receptor (PVR) と相互作用する。共同研究により供与された PVR KO マウスの精巣における精子形成障害について解析をした。予想に反して PVR KO マウスは精子形成障害を生じなかったが、Cadm1 の KO マウスと同様のセルトリ細胞の異常が認められた。精子形成障害を生じる造精細胞に発現する Jam-C KO マウスに対して、セルトリ細胞に発現し Jam-C と相互作用する Jam-B が精子形成障害を示さないことと同様である。本研究により、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において、造精細胞に発現する分子の機能異常によって精子形成障害が起こりやすいことが明らかになった。また、PVR KO マウスのセルトリ細胞にも異常が認められたことから、セルトリ細胞における異常は、精子形成障害を起こすには至らない障害であることが分かった。

### 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 5 件)

- 1) Wakayama T, Iseki S. Role of the spermatogenic-Sertoli cell interaction through cell adhesion

- molecule-1 (CADM1) in spermatogenesis. Anat Sci Int. 2009; 84:112-21, 査読有.
- 2) Wakayama T, Nakata H, Iseki S. (他2名、1番目) Expression, localization and binding activity of the ezrin/radixin/moesin proteins in the mouse testis. J Histochem Cytochem, 2009, 57:351-62, 査読有.
- 3) 若山 友彦、井関 尚一 精子形成に必須の細胞接着分子 CADM1/IGSF4A/SgIGSF. 日本生殖免疫学会雑誌. 2008, 23:1-10, 査読有.
- 4) 若山 友彦、井関 尚一 精子形成に関与する新規接着分子 SgIGSF. 顕微鏡. 2007, 42: 41-4, 査読有.
- 5) Wakayama T, Sai Y, Kato Y. (他7名、1番目) Heterophilic Binding of the Adhesion Molecules Poliovirus Receptor and Immunoglobulin Superfamily 4A in the Interaction between Mouse Spermatogenic and Sertoli Cells. Biol Reprod, 2007, 76: 1081-1090, 査読有.

[学会発表] (計3件)

- (1) Wakayama T, Kurobo M, Iseki S. American Expression, localization and function of the ezrin/radixin/moesin (ERM) protein family in the mouse testis. Society for Reproductive Immunology 28th Annual Meeting, 2008.6.14, Congress Plaza Hotel and Convention Center, Chicago (USA).
- (2) 若山 友彦、井関 尚一. 生殖細胞・セルトリ細胞間の細胞接着因子と精子形成調節機構. シンポジウム「精子形成過程に於ける細胞動態制御の分子解剖学」第

113回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2008年3月29日, 大分大学医学部 (大分県)

- (3) Wakayama T, Iseki S. Role of SgIGSF/TSLC1/Necl-2 in the interaction between spermatogenic and Sertoli cells during mouse spermatogenesis. XIX North American Testis Workshop “Chromosome Structure and Gene Expression” 2007. 4. 19, Hyatt Regency, Tampa (USA).

[その他]

ホームページ等

<http://web.kanazawa-u.ac.jp/%7Emed01/>

## 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) 連携研究者

井関 尚一 (ISEKI SHOICHI)  
金沢大学・医学系・教授  
研究者番号：50167251  
(H19→H20：研究分担者)