

4400375

---

精巢をモデルとした細胞分化過程における細胞接着分子の機能解析

---

課題番号 16570047

平成 16～18 年度 科学研究費補助金（基盤研究（C））

研究成果報告書

平成 19 年 5 月

研究代表者  
旭川医科大学解剖学講座  
助手 春見達郎

## 研究組織

研究代表者 旭川医科大学 春見達郎

研究分担者 旭川医科大学 林要喜知

研究協力者 ハワイ大学 柳町隆造

## 交付決定額

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	2300000	0	2300000
平成 17 年度	700000	0	700000
平成 18 年度	700000	0	700000
総 計	3700000	0	3700000

## 研究発表

Chromatographic Analyses of Biogenic Melatonin and Its Related Indoleamines

T. Harumi, S. R. Pandi-Perumal, G. R. Martinez, P. Di Mascio, and Y. Hayashi

in "Melatonin: From Molecules to Therapy" edited by S. R. Pandi-Perumal and D. P.

Cardinali, Nova Science Publishers Inc., NY

脳精巣に発現する免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーBT-IgSF の発現  
と制御

林要喜知・春見達郎

平成 16 年 10 月 大阪大学蛋白研究所セミナー「神経系の特異機能を制御する  
蛋白質の細胞分子機構」

Expression and Distribution of BT-IgSF During Spermatogenesis and Sperm Maturation

T. Harumi, Y. Hayashi, T. Watanabe, N. Shimizu, T. Hayakawa, S. Suzu

44th Annual Meeting of The American Society for Cell Biology

2004 年 12 月 Washington D.C

Expression and function of brain- and testis-specific Immunoglobulin superfamily  
(BT-IgSF) in the central nervous system

Y. Hayashi, T. Harumi, T. Watanabe, S. Suzu

44th Annual Meeting of The American Society for Cell Biology

2004 年 12 月 Washington D.C

Expression of BT-IgSF During Spermatogenesis and Its Role in Fertilization

T. Harumi, Y. Hayashi, T. Watanabe, N. Shimizu, T. Hayakawa, S. Suzu

44th Annual Meeting of The American Society for Cell Biology

2006 年 12 月 San Diego

Neuronal Expression of BT-IgSF (IgSF11) That Functions through a Homophilic  
Interaction

Y. Hayashi, T. Harumi, Y. Hira, T. Watanabe, H. Matsui, S. Suzu

44th Annual Meeting of The American Society for Cell Biology

2006 年 12 月 San Diego

精子形成、および精子成熟に伴う細胞接着分子 BT-IgSF の発現と局在

春見達郎・渡部剛・鈴木伸也・林要喜知

2004年9月 日本動物学会第75回大会 神戸

脳精巣に特異的な免疫グロブリン BT-IgSF はニューロンの細胞接着に関わっている。

林要喜知・春見達郎・渡部剛・鈴木伸也・

2005年9月 日本動物学会第76回大会 筑波

硬骨魚類異体類マツカワおよびクロガレ. イの精子の運動と受精

春見 達郎、安藤 忠、松原 孝博、林 要喜知、柳町 隆造

2006年9月 日本動物学会第77回大会 松江

## 【序論】

細胞接着分子は単に細胞間の機械的な接着だけでなく細胞分化や、組織発生、免疫、細胞間情報伝達など、多くの現象に関与していることが知られている。細胞接着分子には多様な種類が存在し、大きく分けてインテグリン、カドヘリン、セレクチン、CD44、シアロムチン、そしてイムノグロブリンスーパーファミリー (IgSF) に分類される。筆者らは新規のマクロファージコロニー刺激因子受容体 (M-CSFR) をマウス EST データベースで検索する過程で新規の分子を発見した。この分子は1ヶ所の膜貫通領域、細胞外領域にV型、C2型の2ヶ所のイムノグロブリン様ドメインを保持していることから、IgSF 属する新たな分子であることが明らかになった (図1)。ノーザンドットブロッキングの解析結果から、脳 (特に海馬および脳梁) と精巣に特異的に発現していたためこの分子を BT-IgSF (Brain- and Testis-specific Immunogloblin Superfamily) と名付け、マウス、ラットおよびヒトからクローニングした。ヒト BT-IgSF は431個の、マウス、ラット BT-IgSF は428個のアミノ酸から構成され、coxsackie and adenovirus receptor や endothelial cell-selective adhesion molecule、および cortical thymocyte marker in *Xenopus* と相同性が認められた (図2、3)。IgSF は細胞接着分子の中で構造においても機能においても最も多様性に富んだグループである。共通点であるイムノグロブリン様ドメインにしても、1ヶ所を持つものから6ヶ所持つものまで、そしてそのドメインもV、C1、C2の3種類が知られている。IgSF は特に神経系で多くの種類が発現しており、神経発生や神経突起の伸長、および神経回路網の形成などに関わっている。その他、免疫系への関与が報告されている。精巣において、BT-IgSF 以外にも Basigin、SgIGSF の2種類の IgSF が精巣に存在することが報告されているがその機能は明らかではない。

一方、哺乳類精子は精巣内の曲精細管内壁に並ぶ精粗細胞が起源である。精祖細胞が対細胞分裂し、一次精母細胞となり内腔に向かって移動する。一次精母細胞は染色体が倍加し二次精母細胞となる。この二次精母細胞が減数分裂を行い、染色体が半量体の精子細胞に分裂する。精子細胞は始めは球形の円形精子細胞であるが、分化が進むにつれて尾部が形成され、最終的に鞭毛を持った精子に変化する。精巣中の精子はまだ受精する能力が無いことが知られている。精巣を出た精子は精巣上体の頭部、体部、および尾部を通過する間に精巣上体からの作用により「成熟」し、受精する能力を獲得する。

本研究では精子形成、および精子成熟における BT-IgSF 分子の役割を明らかにする目的で、*in situ hybridization* および免疫組織化学的手法を用いて BT-IgSF 発現細胞および精子におけるその局在を調べた。さらに、BT-IgSF 分子に対する抗体を作成し、精子における局在、受精における役割を調べてきた。

## 【方法】

ラットおよびマウスの BT-IgSF の相同配列を元に、DIG ラベルした cRNA プローブを作製し、ラットおよびマウス精巣凍結切片標本の *in situ hybridization* を行い、発現細胞、および発現時期の同定を行った。同時に、やはり精巣に発現することが報告されているやはりイムノグロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子、Basigin の *in situ hybridization* も行い、BT-IgSF 遺伝子との違いを調べた。発現細胞の同定においてはより詳細な発現時期を明らかにするために PAS 染色を併用した。発現時期の同定には3週齢、4週齢、および5週齢の幼若ラット精巣を用い、*in situ hybridization* を行った。また、BT-IgSF の細胞外領域、および細胞外領域に対する抗体を作製した。その抗体を用いて精子の免疫組織化学、および ECL を利用したウエスタンブロッティングを行い、

BT-IgSF 遺伝子の発現の解析を行った。また、受精におけるこの分子の関わりを調べるため、ラットの体外受精にこの分子が関わるか否かを調べた。

### 【結果と考察】

筆者らは既にノーザンドットブロット解析により BT-IgSF は脳梁、海馬、精巣に強く発現していることを見出している (図 3)。また RT-PCR の結果から、神経系においてこの分子は神経細胞にもグリア細胞にも両方発現していることを明らかにしている。ラット精巣を用いて BT-IgSF 遺伝子の *in situ* hybridization を行ったところ、曲精細管内の円形精子細胞にその遺伝子発現が認められた(図 4)。その発現時期を詳細に同定するために、PAS 染色を用いて精子細胞中の先体部位を染め、その大きさから精子細胞のステージを決定した。その結果、BT-IgSF 遺伝子はステージⅢ～Ⅶ (特にステージⅣ～Ⅵ) の円形精子細胞に強く発現していた(図 5)。この時期は円形精子細胞の核周囲部に先体が伸長しつつある時期である。一方、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する別の細胞接着分子、Basigin の *in situ* hybridization を行ったところこの遺伝子は BT-IgSF よりもより広い時期、すなわちステージⅧのパキテン期一次精母細胞からステージⅧの精子細胞にかけて発現していた(図 4、5)。すなわち、Basigin は精子形成細胞の染色体が 2 量体、半量体の両方のまたがる広い時期に発現しているのに対して、BT-IgSF は染色体が半量体の時期にのみ発現している。これまでに解析されている染色体が半量体の時期の精子形成細胞に発現する遺伝子の多くは核内タンパク質(Spergen-2, Rosbin)や細胞質タンパク質(Spetex-1)、ストレスタンパク質(Hsp70)などであり、膜貫通領域を持つ膜タンパク質の細胞接着分子は初めての発見である。精巣の発達に伴う BT-IgSF 遺伝子の発現を調べたところ、3 週齢ラット精巣には BT-IgSF 遺伝子はほとんど発

現しておらず、4週齢にその発現が認められた。一方、Basigin 遺伝子は BT-IgSF 遺伝子よりも早く、3週齢のラット精巣にも発現が認められた。ラット精巣の曲精細管内に精子が出現するのは5週齢以降なので、BT-IgSF も Basigin も精子が形成されるよりも早く曲精細管に発現している。

一方、BT-IgSF に対する抗体の作製において、初めに細胞外領域に対する抗体の作製を試みたが始めは力価の高い抗体は得られなかった。そこでまず細胞内領域に対する抗体の作製を行ったところ、免疫組織化学にも使える細胞外領域に対する力価の高い抗体が得られた。その抗体を用い、まずウエスタンブロッティングにより抗体の特異性と組織間の発現を調べた(図7)。その結果、精子に非常に多くの48kDaに現れるBT-IgSFが存在し、この分子は脳や腎臓にも発現が認められた。一方、精巣と脳にはBT-IgSFよりも低分子の28kDa付近にもこの抗体と交差するタンパク質が認められた。この低分子のタンパク質の解析はこれからの問題である。続いて、この抗体を用いて精巣から精巣上体に到る各成熟段階の精子の免疫組織化学を行なった。精巣は細かく細断した後、培養液中で洗いスライドグラスに塗布し固定した。精巣上体精子は精巣上体を切断し浸出してきた精子を培養液中で洗いスライドグラスに塗布し固定した。抗BT-IgSF抗体と蛍光標識した二次抗体を用いた免疫組織化学を行った結果、精巣から得た未成熟な精子では①精子中片と尾部②精子尾部が染まる2種類の精子が存在すること、精巣上体頭部から得た精子では精子尾部が、精巣上体尾部から得た成熟精子では精子頭部と尾部および中片基部が染まることが観察された(図8))。この結果はBT-IgSFが精子成熟に伴って精子内局在を変えていく可能性を示している。さらに、この細胞内領域に対する抗体と成熟精子を培養液中でインキュベーションした後、精子を固定して観察したところ、精子頭部のみにBT-IgSF抗体の結合が認められた(図8)。この結果は成熟精子頭部におい



て見られる BT-IgSF が他の部位とは異なって存在する、或いは、成熟過程で外部より結合するなどの可能性を示しているが、それらの解析は今後の課題である。興味深いことに、同時に行ったマウス神経芽細胞由来の培養細胞系において BT-IgSF の免疫組織化学を行ったところ、伸長しつつある神経突起にまだらにその分子の存在が確認された(図 4)。この結果は細胞間の接触のある場所に BT-IgSF が存在している可能性を示している。加えて、培養細胞系に BT-IgSF を強制発現させると培養細胞間の接着が低下する現象を観察している。これらの結果は、BT-IgSF が細胞間の単なる強固な接着というよりも、例えば一過性の細胞間接触や一種の一時的な足場として働いている可能性を示している。

以上の結果から BT-IgSF は染色体が半数体の時期に発現し、精子成熟に伴って精子上の局在を変えていく特異的な細胞接着分子であることが明らかになった。

さらに、細胞外領域に対する抗体が作成できたため、精子の免疫組織化学的染色を行ったところ、精巣上体尾部から得られた成熟精子では頭部が、精巣上体頭部から得られた未成熟精子では頭部と中片部に BT-IgSF の分布が認められた(図 9、10)。また、これらの精子をカルシウムイオノフォアで処理し、先体反応を引き起こしたところ、いずれの精子も、頭部の免疫反応が消失した(図 9、10)。この結果は BT-IgSF が精子頭部の先体胞外側部に存在することを示している。この抗体を、ラット人工授精培地に添加し、受精率に与える影響を調べた。その結果、抗 BT-IgSF 抗体はラット受精率を低下させた(図 11)。従って BT-IgSF はラットぬ受精において何らかの役割を担っていると考えられる。

精巣で合成された精子は精巣上体内部を通過する成熟過程に伴って遊泳能、および受精能を獲得し、最終的に卵と受精可能な成熟精子となる。BT-IgSF が精子成熟に必要な分子であるのか、あるいは卵とのコンタクトに必要な分子であるのかはさらに研究を進めなければならない。ジーンターゲットングを含

む分子生物学的手法や、合成 BT-IgSF 分子存在下で人工授精を行い受精率を測定する生物学的手法などを用いてこの分子の役割を解明していきたい。受精に関わる分子であることが明らかにできれば、将来、不妊治療、あるいは逆に避妊などへの臨床応用ができると期待される。一方、応用面だけでなく、この BT-IgSF の興味深い構造は 180 残基に及ぶ比較的長い細胞内領域である。多くの細胞接着分子が、単に細胞間の機械的な接着のための分子ではなく、細胞内情報伝達機構に関わっていることが知られている。現在のところ、BT-IgSF の細胞内領域に特有の機能を持つ配列との相同性は得られていないが、細胞内領域が単にアンカーとして存在するのではなく、細胞外領域の接着を細胞内に伝える、あるいは細胞外領域の接着に影響する、情報伝達系の役割を担っていないか検討中である。細胞内領域を種々の長さで欠損させた BT-IgSF 遺伝子を培養細胞系で発現させ、培養細胞同士の接着にどのように変化が生じるかを調べている。以上のように、BT-IgSF 分子の研究は緒についたばかりであるが、今後、研究の成果は発生学、および細胞生物学に多くの影響を与えることが期待される。

#### 【参考文献】

「新細胞接着分子の世界」 林昌男 羊土社 (2001)

Barclay A.N.

Membrane proteins with immunoglobulin-like domains--a master superfamily of interaction molecules.

Semin. Immunol. 15: 215-23 (2003).

Iida, H., Ichinose, J., Kaneko, T., Mori, T., Shibata, Y.

Complementary DNA cloning of rat spetex-1, a spermatid-expressing gene-1, encoding a 63 kDa cytoplasmic protein of elongate spermatids.

Mol. Reprod. Dev. 68: 385-393 (2004).

Hawke, N.A., Yoder, J.A., Litman, G.W..

Expanding our understanding of immunoglobulin, T-cell antigen receptor, and novel immune-type receptor genes: a subset of the immunoglobulin gene superfamily.

Immunogenetics. 150: 124-133 (1999).

Iida, H., Urasoko, A., Doiguchi, M., Mori, T., Toshimori, K., Shibata, Y.

Complementary DNA cloning and characterization of rat spergen-2, a spermatogenic cell-specific gene 2 encoding a 56-kilodalton nuclear protein bearing ankyrin repeat motifs.

Biol. Reprod. 69: 421-429 (2003).

Krawczyk, Z., Mali, P., Parvinen, M.

Expression of a testis-specific hsp70 gene-related RNA in defined stages of rat seminiferous epithelium.

J. Cell Biol. 107: 1317-23 (1998).

Maekawa, M, Suzuki-Toyota, F, Toyama, Y, Kadomatsu, K, Hagihara, M, Kuno, N, Muramatsu, T, Dohmae, K, Yuasa, S.

Stage-specific localization of basigin, a member of the immunoglobulin

superfamily, during mouse spermatogenesis.

Arch. Histol. Cytol. 61: 405-15 (1998).

Raschperger, E., Engstrom, U., Pettersson, R.F., Fuxe, J.

CLMP, a novel member of the CTX family and a new component of epithelial tight junctions.

J. Biol. Chem. 279: 796-804 (2004).

Rougon, G., Hobert, O.

New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules.

Ann. Rev. Neurosci. 26: 207-38 (2003).

Suzu, S., Hayashi, Y., Harumi, T., Nomaguchi, K., Yamada, M., Hayasawa, H, Motoyoshi,

Molecular cloning of a novel immunoglobulin superfamily gene preferentially expressed by brain and testis, Biochem. Biophys. Res. Commun. 296: 1215-1221 (2002).

Takahashi, T., Tanaka, H., Iguchi, N., Kitamura, K., Chen, Y., Maekawa, M., Nishimura, H., Ohta, H., Miyagawa, Y., Matsumiya, K., Okuyama, A., Nishimune, Y.

Rosbin: a novel homeobox-like protein gene expressed exclusively in round spermatids.

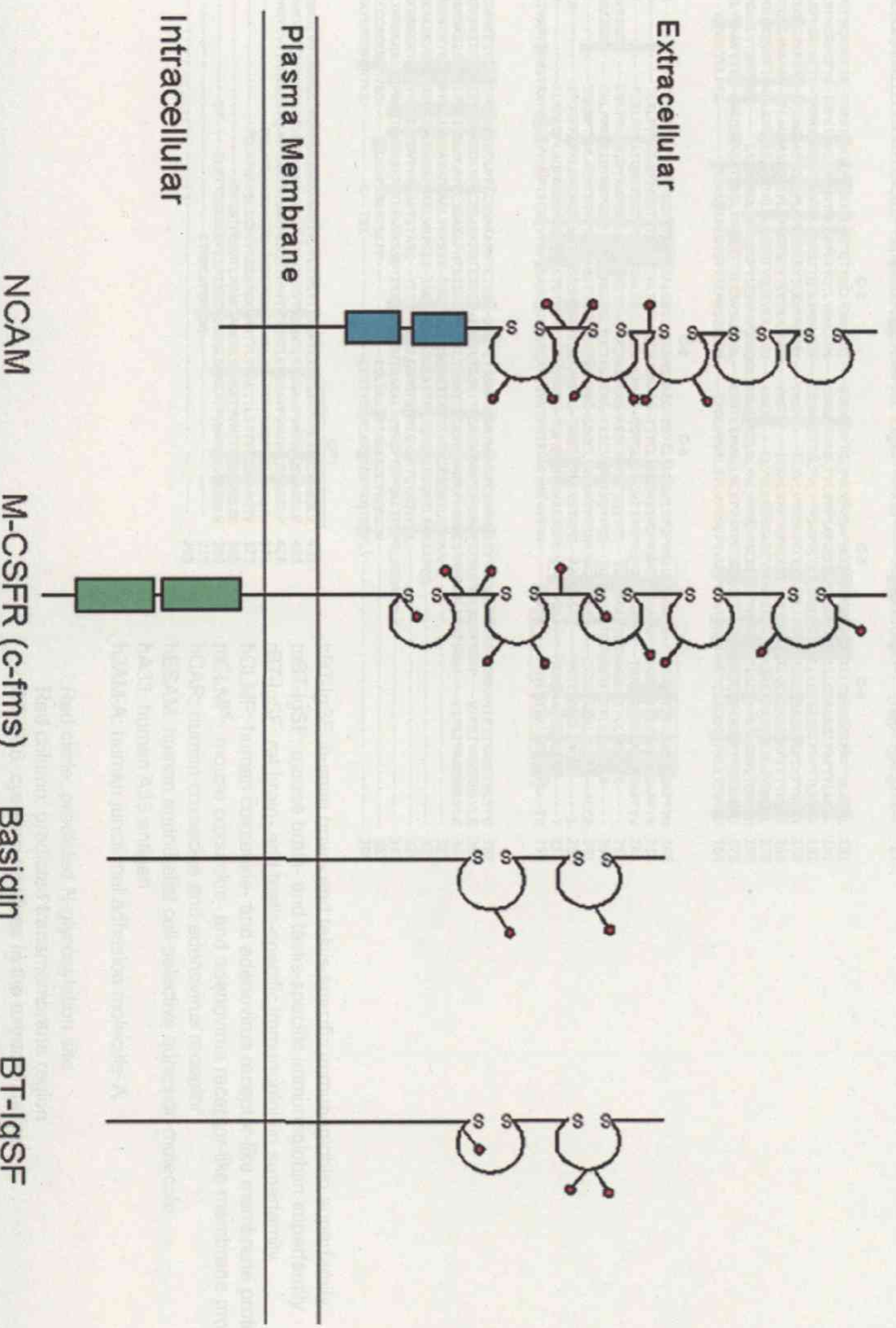
Biol. Reprod. 2004 70: 1485-92 (2004)

Wakayama, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Iseki, S.

Cloning and characterization of a novel mouse immunoglobulin superfamily gene expressed in early spermatogenic cells.

Mol. Reprod. Dev. 60: 158-164 (2001).

# Schematic Model of Immunoglobulin Superfamily Alignment



# Amino Acid Alignment of BT-IgSFs and Related Molecules

Accession	Species	Protein	Residue Range
hBT-IgSF	Human	hBT-IgSF	1-431
mBT-IgSF	Mouse	mBT-IgSF	1-428
rBT-IgSF	Rat	rBT-IgSF	1-428
mCLMP	Mouse	mCLMP	1-373
hCAR	Human	hCAR	1-365
hESAM	Human	hESAM	1-380
hA33	Human	hA33	1-319
hJAM-A	Human	hJAM-A	1-299

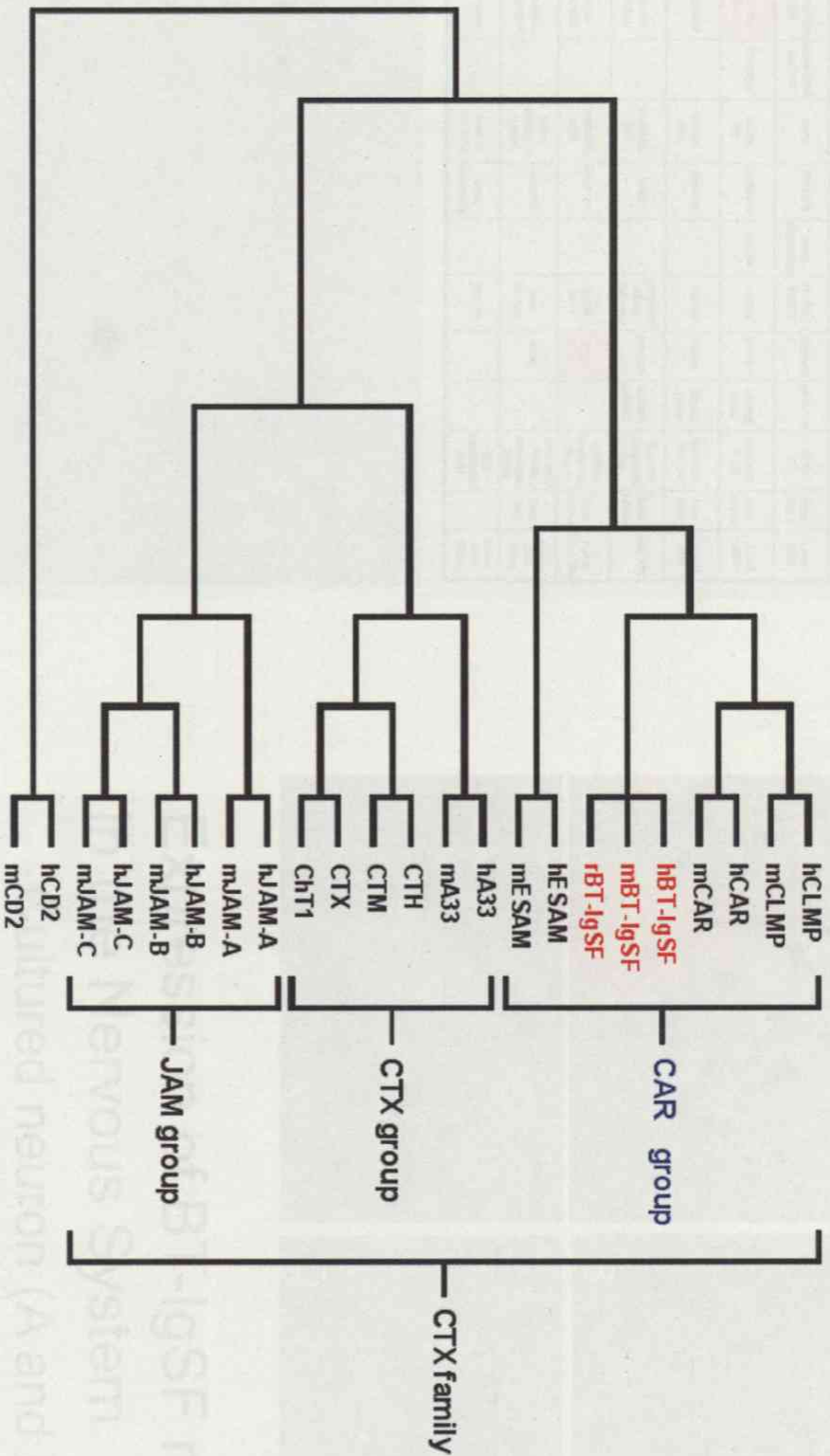
  

hBT-IgSF	mBT-IgSF	rBT-IgSF	mCLMP	hCAR	hESAM	hA33	hJAM-A
MTSGRSLAPLALLSLHGVA--	MTRRRSAPASMLLSLVLLVAT	MTRRRSALASMLLSLLVAA--	MSLLEMLVLSVYVGTG--	MALLLCVLLCGVDVFAAS--	MISLPGPLVNLRLFLFLGLSALAPPRAQLQLHLPAURLQAVEGGEVLPAMVTLHGVEVSSQWEPVFWVFWFKQEK	MVGMKMPVLTLCVRLVYDA--	MGTQAQYERKLLCFILAILLCSLAG--
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
SLEVSSEPSRQVARGRTAVLPCATSTSAALLN	SLEVSSEPSRQVARGRTAVLPCATSTSAALLN	SLEVSSEPSRQVARGRTAVLPCATSTSAALLN	THTEIKRAAEKATLPCHQQLGLPEKDT	ISTTPEEMTEKAKGTAVLPCKFTLSPEDQGG	ISVETPDVLRASQGSVTLPCCTHTSTSSRE	STVYHSESEPEKRTIENNPKKL	STVYHSESEPEKRTIENNPKKL
NP1	NP1	NP1	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
LNIMWVPLSNANQPEQVTLVGGQKFDG-A	LNIMWVPLSNANQPEQVTLVGGQKFDG-A	LNIMWVPLSNANQPEQVTLVGGQKFDG-A	LDPEMLLT--DNEGNKVVTVYSRRVYNDIT	LDPEMLLT--DNEGNKVVTVYSRRVYNDIT	LDPEMLLT--DNEGNKVVTVYSRRVYNDIT	LDPEMLLT--DNEGNKVVTVYSRRVYNDIT	LDPEMLLT--DNEGNKVVTVYSRRVYNDIT
85	85	85	75	84	95	82	82

hBT-IgSF: human brain- and testis-specific immunoglobulin superfamily  
 mBT-IgSF: mouse brain- and testis-specific immunoglobulin superfamily  
 rBT-IgSF: rat brain- and testis-specific immunoglobulin superfamily  
 mCLMP: human coxsackie- and adenovirus receptor-like membrane protein  
 hCAR: human coxsackie- and adenovirus receptor  
 hESAM: human endothelial cell-selective adhesion molecule  
 hA33: human A33 antigen  
 hJAM-A: human junctional adhesion molecule-A

Red circle: predicted N-glycosylation site  
 Red column: predicted transmembrane region  
 C1~C6: cysteine residues in the extracellular part

# Phylogenetic Tree of CTX Family



Northern Blot Hybridization  
of Human BT-IgSF mRNA

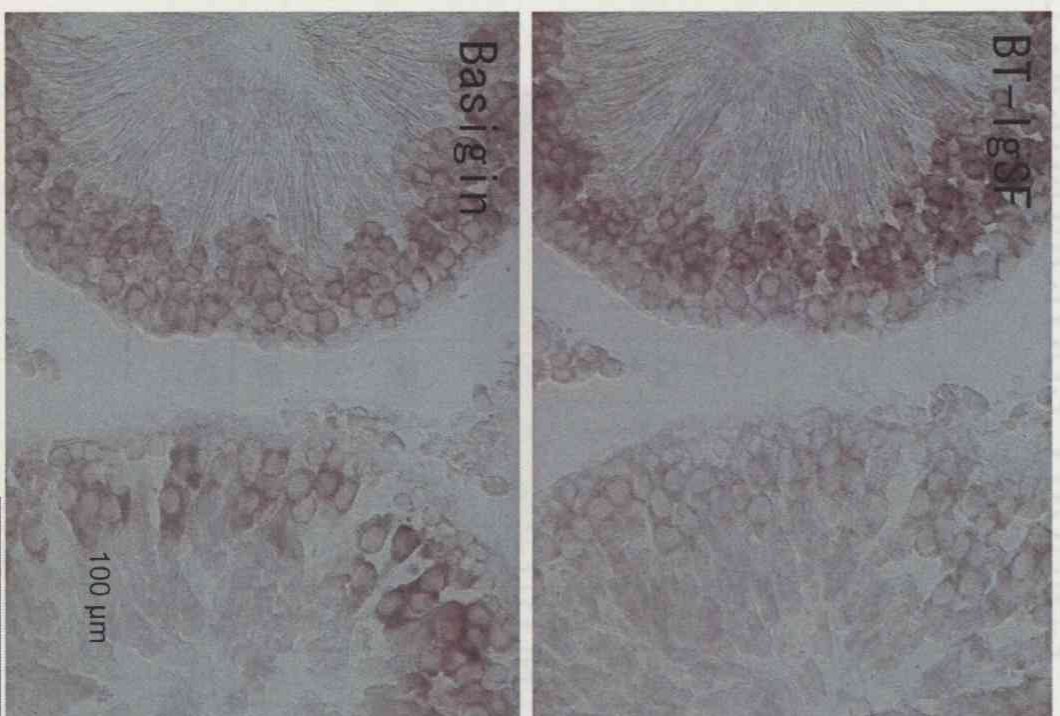
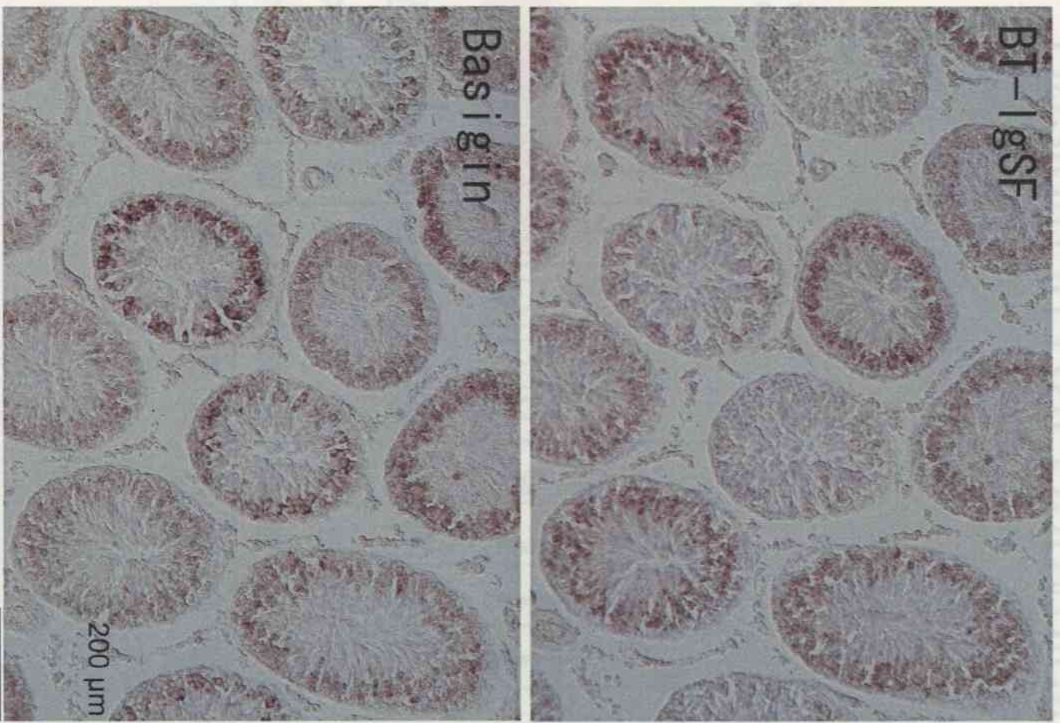
CTX:cortical thymocyte marker in Xenopus  
CAR:coxsackie and adenovirus receptor  
JAM:junction adhesion molecule

CLMP:CAR like protein  
ESAM:endothelial cell-selective molecules



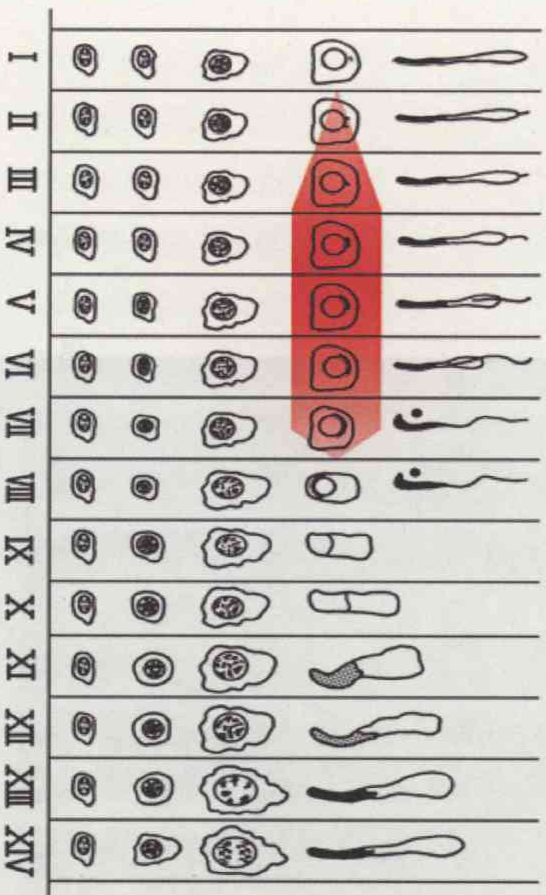


# Expression of BT-1gSF mRNA in the Adult Rat Testis

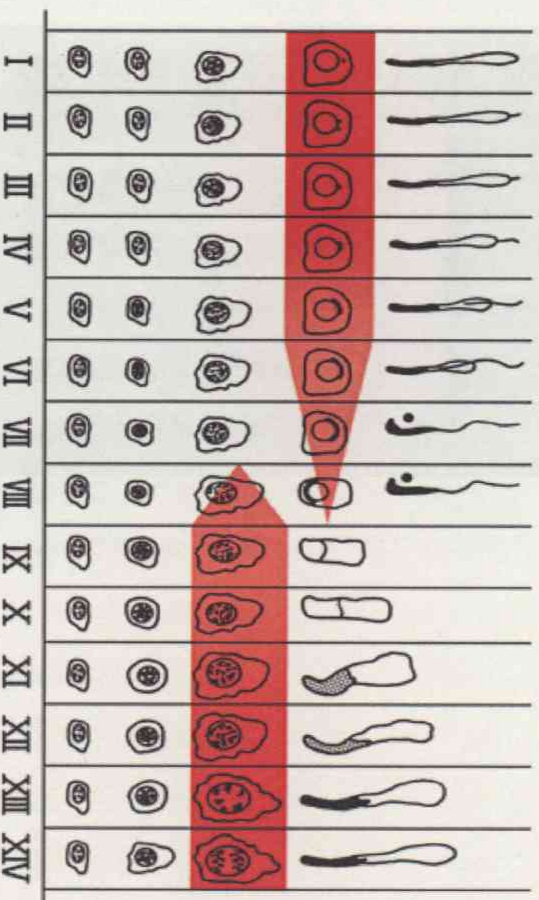


# SDS-PAGE and Western Blotting for BT-IgSF of Rat Testis Spermatogenic Cells Expressing BT-IgSF and Basigin in Rat Convoluted Seminiferous Tubules

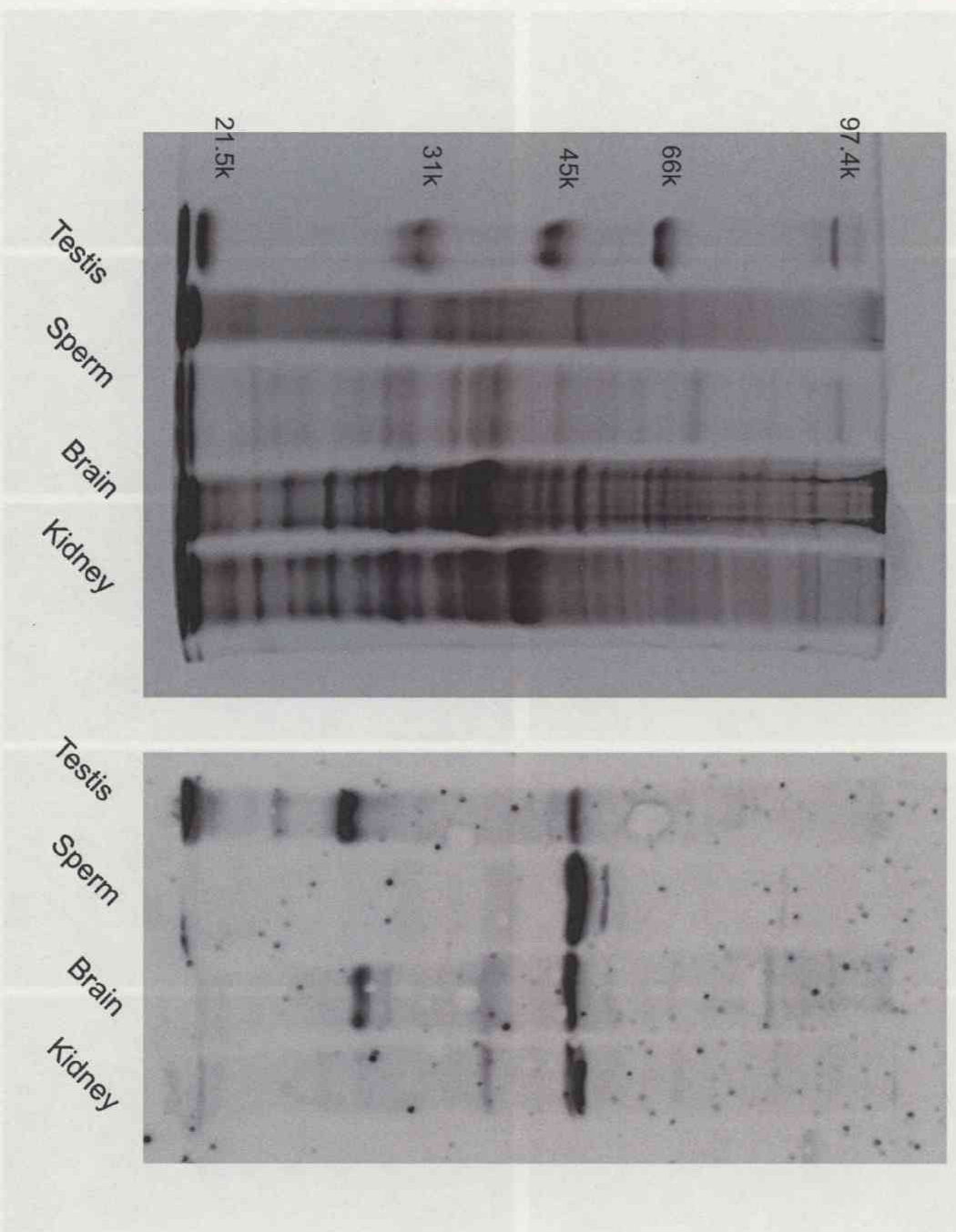
BT-IgSF



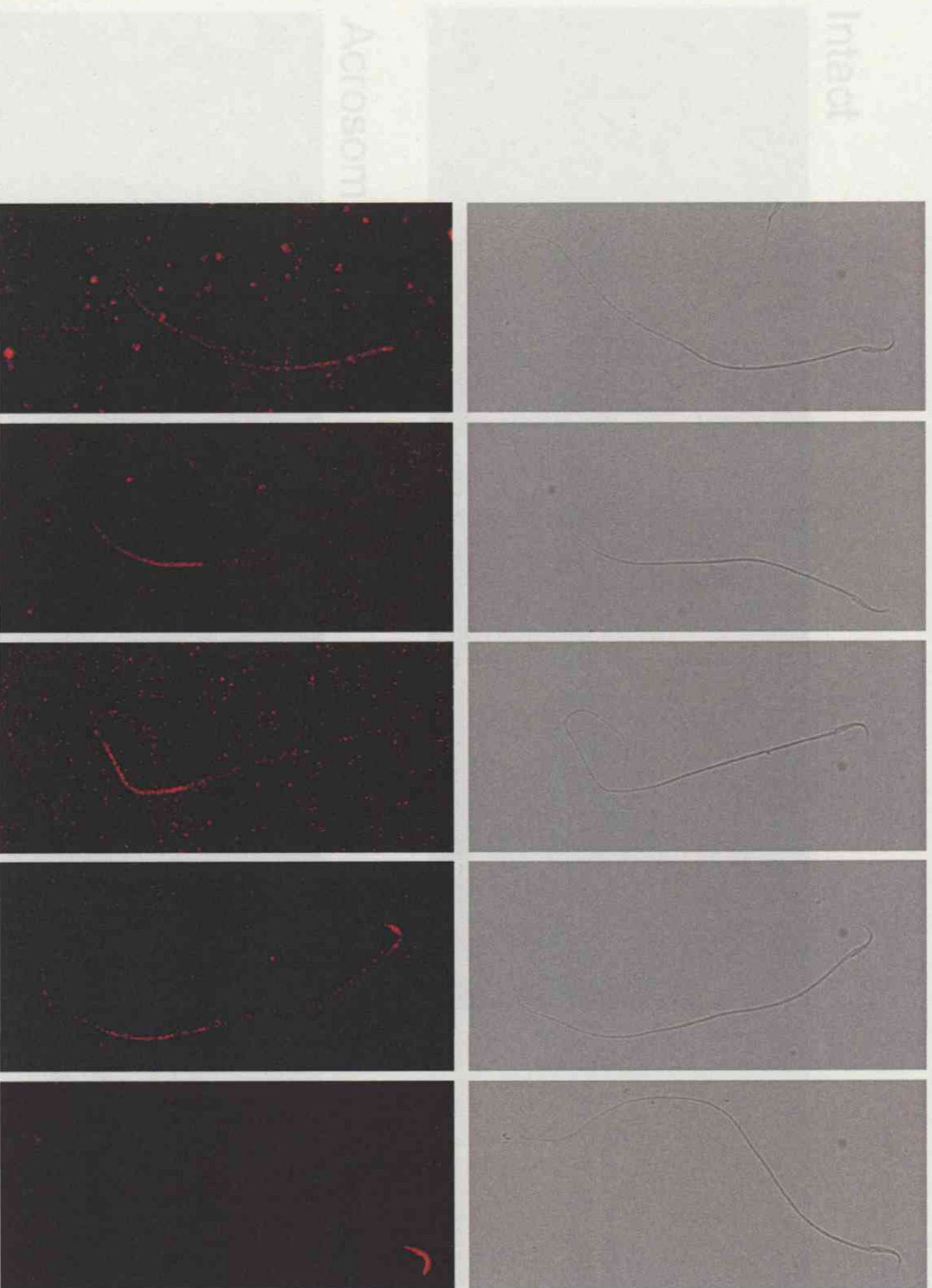
Basigin



# SDS-PAGE and Western Blotting for BT-IgSF of Rat Testis, Spermatozoa, Brain and Kidney



# Distribution of anti-BT-IgSF Immunoreactivity (intracellular domain) in Immatured and Matured Spermatozoa of Rat

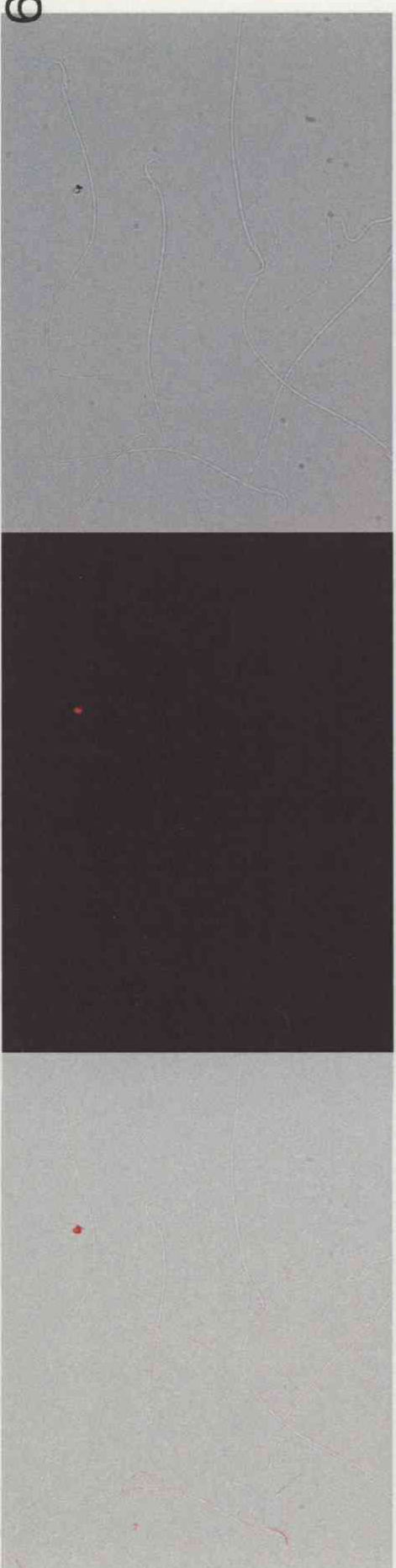


Distribution of BT-IgSF Immunoreactivity in Matured Spermatozoa  
Obtained from Rat Cauda (Tail) Epididymis

Intact



Acrosome reacted



9

Shown as LM (left), Immunofluorescence (center), and Merge (right)

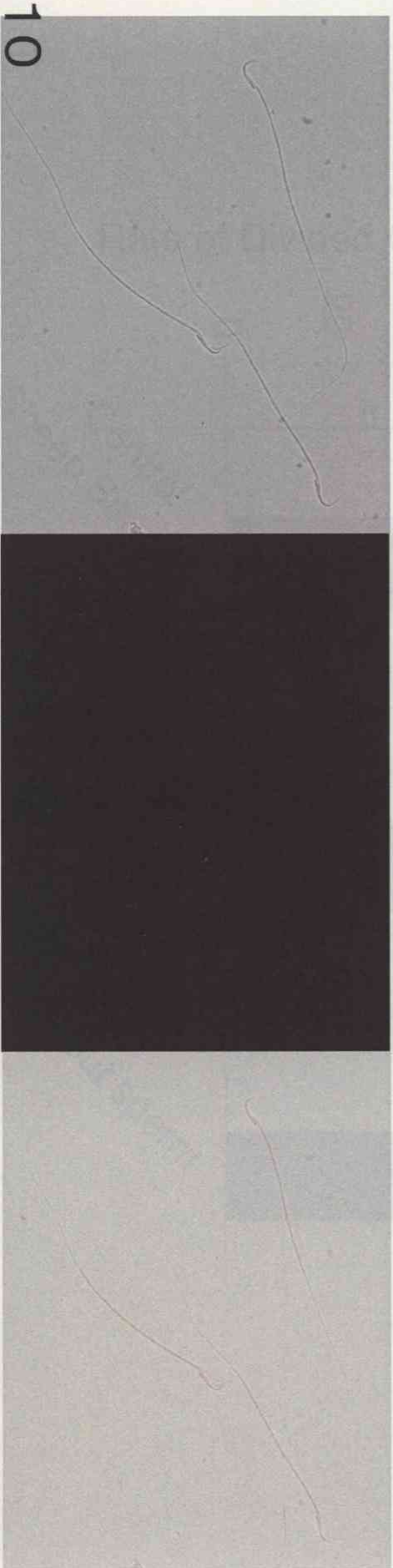
# Distribution of BT-IgSF Immunoreactivity in Immatured Spermatozoa Obtained from Rat Caput (Head) Epididymis

without Anti-BT-IgSF Antibody, or Incubated Alone

Intact



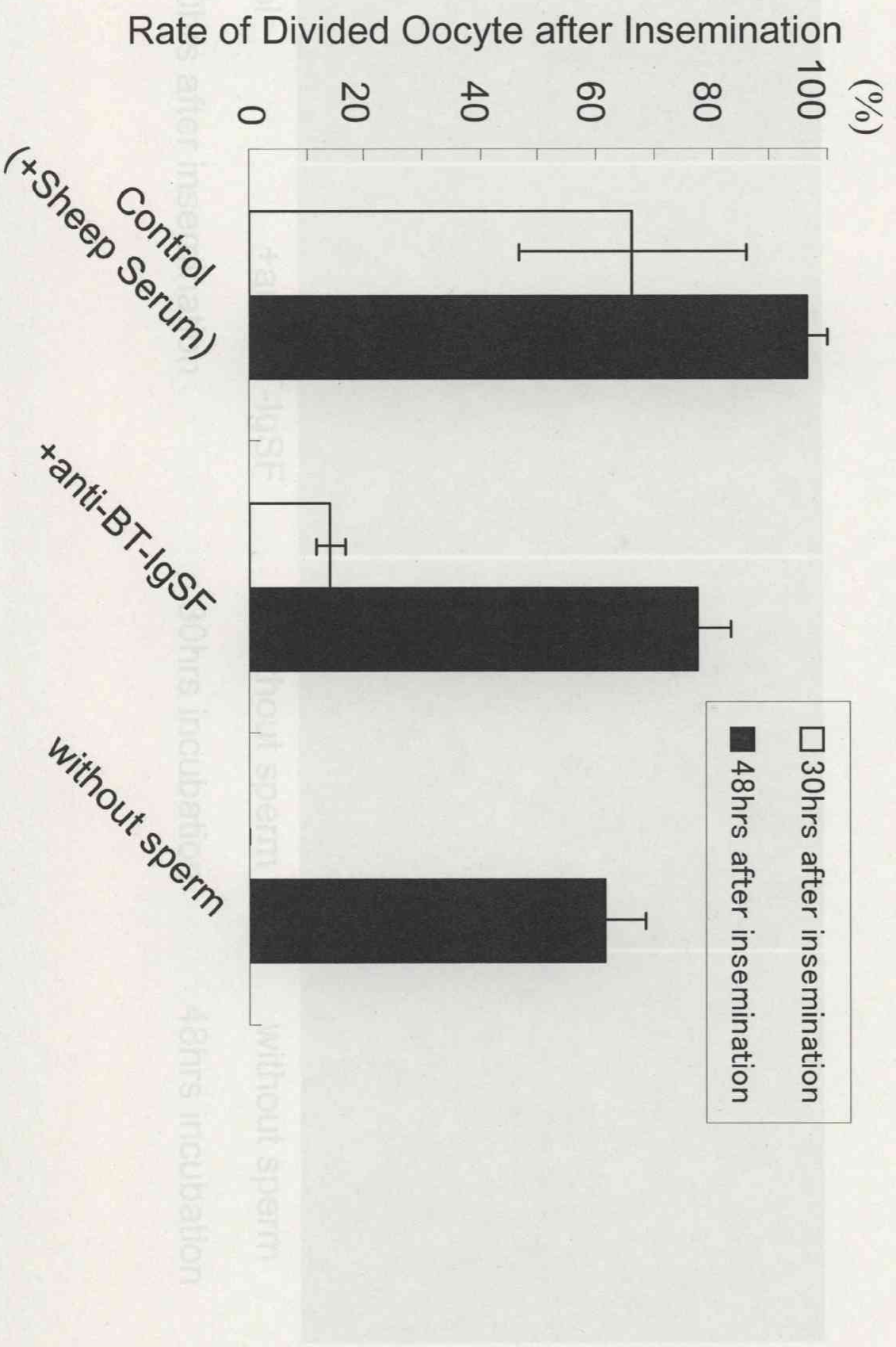
Acrosome reacted



10

Shown as LM (left), Immunofluorescence (center), and Merge (right)

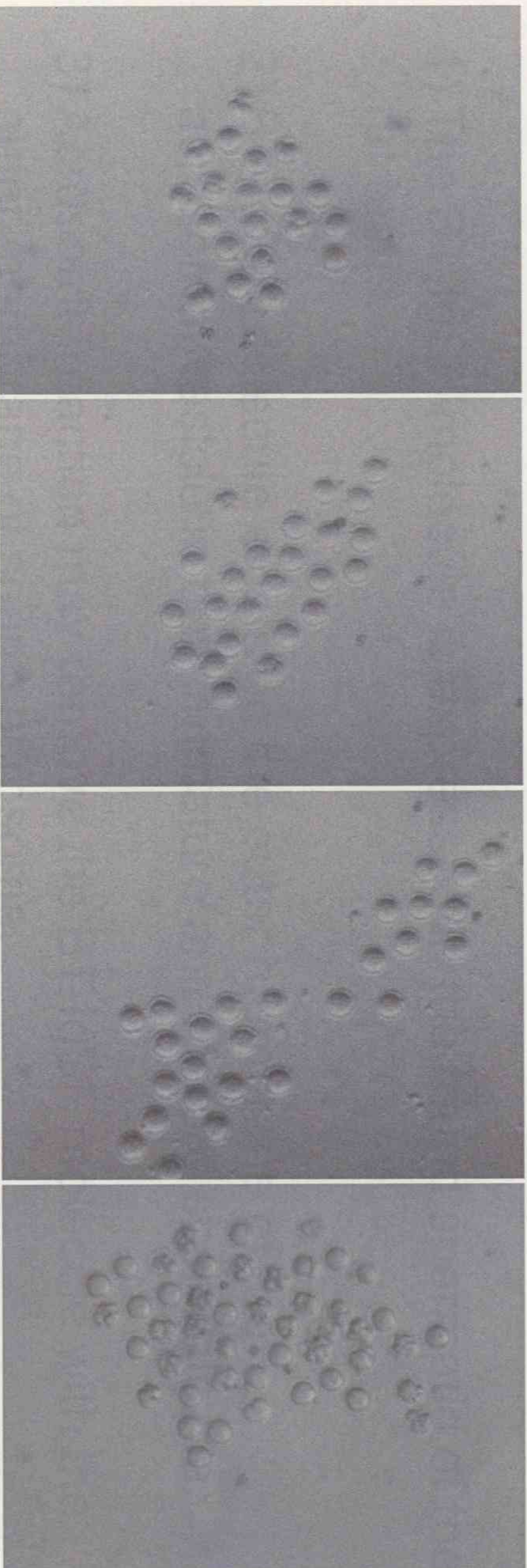
# Cell Division Rate of Rat Oocyte after Insemination with or without Anti-BT-IgSF Antibody, or Incubated Alone





# Rat Oocytes after Insemination with or without Anti-BT-IgSF Antibody, or Incubated Alone

## CONCLUSION



Control

+anti-BT-IgSF

without sperm

without sperm

30hrs after insemination  
30hrs incubation  
48hrs incubation

## CONCLUSION

- 1) The BT-IgSF molecule is expressed in the round spermatid of the rat testis.
- 2) BT-IgSF molecule exists on the outer membrane of the acrosomal vesicle in both immature and mature spermatozoa.
- 3) Acrosome reaction may remove the BT-IgSF molecule with the outer membrane of sperm acrosome.
- 4) BT-IgSF may be needed for sperm-egg interaction.