様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成　21 年　5 月　29 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：２００６～２００８
課題番号：１８３７００２５
研究課題名（和文）　精子分化における新規パラクリン因子ニューレギュリンの機能

研究課題名（英文）　Function of neuregulin, a new paracrine factor, in spermatogenesis

研究代表者　安部　眞一 (ABE SHIN-ICHI)
熊本大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号：９０１０９６３７

研究成果の概要:イモリ精巣と生後マウス精巣の培養系を用いて neuregulin(NRG)1 や retinoic acid (RA)の減数分裂開始に対する作用を解析した。NRG1 や RA はイモリやマウス精原細胞の増殖を直接促進する一方、セルトリ細胞を介して間接的に減数分裂を開始させること、NRG1 は RA の下流で働くことが分かった。またプロラクチンによるイモリ精原細胞のアポトーシス誘起機構は、RNA 結合タンパク質を介することによる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００６年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
２００７年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
２００８年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総　計	15,000,000	2,850,000	17,850,000

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：イモリ，マウス，FSH，neuregulin，retinoic acid，プロラクチン，アポトーシス，RNA 結合タンパク質

１．研究開始当初の背景

精原細胞が減数分裂を開始する機構には、精原細胞の分裂回数など intrinsic な機構と体細胞から分泌されるパラクリンな因子による extrinsic な機構の両方が関わっていると考えられるが、どちらについてもほとんど分っていない。

申請者らは、これまでにイモリ精巣の無血清培養系において、哺乳類の濾胞刺激ホルモン(follicle-stimulating hormone; FSH)単独処理で精原細胞の増殖を促進し第８世代において減数分裂開始を起こさせることに成功した。精原細胞は第７世代に減数分裂開始の decision ポイントが存在し、FSH/プロラクチン濃度比が高ければ第８世代において減数分裂を開始するが、濃度比が低ければ第７世代でアポトーシスを起こすと考えられた。

そこで、減数分裂開始因子を探索する目的で、イモリ精巣の EST library から cDNA のマイクロアレイを作成し、＋FSH で発現が促進される遺伝子を differential screening した結果、その１つとして neuregulin(NRG)を同定した。

２．研究の目的

脊椎動物における減数分裂開始のextrinsic な機構と intrinsic な機構を明らかにするために、イモリ精巣とマウス精巣でneuregulin (NRG)の機能とその受容体であるerbB の発現と機能を調べることを目的とした。また、本研究開始後、retinoic acid (RA)がマウス胎児卵巣で減数分裂開始因子であることが報告されたため、生後精巣に対するRA の効果も調べた。さらに、プロラクチンによるイモリ精原細胞に対するアポトーシス誘起機構についても調べた。

３．研究の方法

（１）イモリにおいて、種々の培養系を用いて精原細胞ステージの精巣に対する NRG1 の効果を調べた。

（２）マウスにおいて、種々の培養系を用いて生後 6 日目精巣（精原細胞ステージ）に対する NRG1 と RA の効果を調べた。

（３）erbB4 の dominant negative 変異体トランスジェニックマウスや NRG1 のセルトリ細胞特異的 conditional ノックアウトマウスを作成し、in vivo での機能を調べた。

（４）プロラクチン（prolactin; PRL）によるイモリ精原細胞に対するアポトーシス誘起機構を cell-free 系を用いて調べた。

４．研究成果

（１）イモリ精巣に対するNRG1 の効果

イモリ精巣に immunoglobulin(Ig)-type と cysteine-rich domain(CRD)-type の２種類の NRG1 が発現していることが分かった。どちらのクローンも精原細胞ステージに強く発現するが、CRD-type は精原細胞にも体細胞にも発現するのに対して Ig-type は体細胞に強く発現する。また、FSH 処理によって Ig-type は発現が著しく上昇するが、CRD-type はほとんど影響を受けない。

NRG1 の機能ドメインである EGF-like domain の組み換えタンパク質をイモリ精巣の器官培養や再凝集培養系や精原細胞のみの培養系に添加した結果、精原細胞の増殖を促進することが明らかになった。精原細胞のみの再凝集培養に加えても増殖を促進することから、NRG1 は精原細胞に直接作用することが明らかとなった。ただし、いずれにおいても精母細胞への分化は見られなかった。

器官培養に erbB1 阻害剤(AG1478), erbB2 阻害剤(AG879), erbB1, 4 阻害剤(PD153035)を添加した結果、いずれも FSH による精原細胞の増殖促進効果を阻害したが、PD153035 が最も効果が高かった。イモリ NRG-EGF domain の抗体を作成し、精巣の再凝集培養系に加えた結果、有意に阻害したことから、FSH のシグナルの下流に NRG が働いていることが強く示唆された。

（２）生後マウス精巣に対するNRG1 の効果

生後マウス精巣に NRG1 と NRG3 が発現していることが分かった。NRG1 はセルトリ細胞に、NRG3 は精原細胞にも体細胞にも発現している。受容体の erbB は erbB2 のみセルトリ細胞に、他の erbB1, 2/2, 4 はすべての細胞タイプに発現していた。

精原細胞ステージまでしか存在しない生後 6 日目精巣の器官培養に NRG1 の EGF-like domain の組み換えタンパク質を加え 3 日間培養すると、精原細胞の増殖と精母細胞への分化を促進した。精巣を解離し、精原細胞とセルトリ細胞を再凝集させた培養系でも同様の結果を得た。Retinoic acid receptor (RAR)・特異的な agonist である AM580 も同様な効果が見られた。しかし、精原細胞のみの再凝集培養系に NRG1 を加えると、精原細胞の増殖は促進するものの精母細胞への分化は見られなかった。AM580 は精原細胞増殖促進効果は見られなかったが、RAR にも retinoic X receptor (RXR)にも結合できる 9-cis-RA は精原細胞の増殖を促進した。

FSH と NRG1 と RA との関係を調べた。器官培養に FSH や RA を投与すると、セルトリ細胞で NRG1 の発現が上昇することから、NRG1 は FSH や RA の下流で作用することが示唆された。精巣器官培養に AM580 を加えると、RA の下流で働くことが知られている Stra8 mRNA が著しく発現するが、FSH や NRG1 を加えても Stra8 の発現を亢進しない。また、同様にして AM580 を加えると、Stra8 がまず発現し、遅れて NRG1 が発現する。さらに、erbB2 や erbB1+4 の阻害剤は AM580 による増殖促進効果を阻害する。これらの結果から、NRG1 は RA の下流で働くことが示唆された。また、NRG1 や 9-cis-RA は精原細胞に直接働いてその増殖を促進するとともに、NRG1 や AM580 はセルトリ細胞に働いて間接的に精原細胞から精母細胞への分化を促進すると考えられる。

（３）erbB4 のdominant negative変異体トランスジェニックマウスとNRG1 のセルトリ細胞特異的conditionalノックアウトマウスの作成

erbB4 のdominant negative変異体トランスジェニック(Tg)マウスについては、VASA promoterの下流にCre-ER™遺伝子をつないだ遺伝子を発現するTgマウス(VASA-Cre-ER™)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dominant negative変異型ErbB4 (ErbB4-DN)を結合させた遺伝子を発現するTgマウス (pCAG-loxP-ErbB4DN)を交配させたダブルTgマウスの作製を行った。現在その表現型を解析中である。

NRG1 のセルトリ細胞特異的conditionalノ

ックアウトマウスについては、ホモマウス(NRG1-loxP)を作出し、セルトリ細胞特異的にCreER™ タンパク質が発現するTgマウス(MIS-CreER™)と交配させ、生まれてきたNRG1 Conditional KOマウスにタモキシフェンを投与し、NRG1 遺伝子のexon6 を欠損させたマウスを作成し、現在解析中である。

（４）プロラクチンによるイモリ精原細胞に対するアポトーシス誘起機構

精原細胞は、体細胞と同じ有糸分裂を７回繰り返して第８世代になると精母細胞に分化して減数分裂を開始し、成熟精子を形成する。この精原細胞の増殖、分化は脳下垂体ホルモンである FSH とプロラクチンによって制御されている。イモリ血清中の FSH に対するプロラクチンの相対的濃度比が高くなる秋には６回の有糸分裂を終えた第７世代で精原細胞がアポトーシスを起こして死を選択し、精子が造られない。一方、相対的濃度比が低くなる春には精原細胞は第７世代を通り越して精子形成が進行する。このように、第７世代の精原細胞に細胞の生死を決めるキーファクターの存在が考えられた。そこで、我々はプロラクチンを注射したイモリの精巣で mRNA 発現が変化する遺伝子をマイクロアレイ解析で探索し、そのうちの一つをプロラクチンの作用で mRNA 発現が低下するクローンとして単離した。これは、アフリカツメガエル、メキシコサンショウウオのような両生類とマウス、ヒトのような哺乳類との間で高度に保存され、アミノ末端に２つの RNA 認識配列を有し、カルボキシル末端にグリシン残基に富む構造的特徴をもつことから、イモリにおけるグリシンリッチ RNA 結合タンパク質と考えられた（以下では nRBP と記す）。PRL によるアポトーシスの過程で nRBP の mRNA だけでなく第７世代の精原細胞の細胞質にだけ発現しているタンパク質も低下することを見出した。これは、nRBP タンパク質の低下がアポトーシスを誘導する引き金になっていることを示唆した。次に、この可能性を立証するために、プロラクチンを注射したイモリの精巣からの細胞質抽出液（nRBP タンパク質が消失している）を、何も注射していないイモリ精巣の生殖細胞から取り出した核と混合すると、エネルギー源の ATP に依存してゲノム DNA が断片化されアポトーシスを起こした。この無細胞系に nRBP の組み換えタンパク質を加えると、アポトーシスが抑制されたことから、プロラクチンによる nRBP の消失はアポトーシスを招くこと、nRBP はアポトーシス抑制因子であることが示唆された。

nRBP のアポトーシス抑制作用の分子機構を明らかにするために、何も注射していないイモリの精巣の抽出液から nRBP に対する抗体を用いて nRBP タンパク質と結合する RNA を共沈させたところ、programmed cell death protein 4（nPdcd４） mRNA を単離した。これは、アポトーシスの誘導で mRNA の発現が上昇する遺伝子としてもともと単離され、タンパク質合成の抑制因子として機能することが知られており、ガンの抑制との関係が大いに研究されてきた。また、nRBP は nPdcd4 mRNA の３'非翻訳領域に結合することも明らかにした。さらに、PRL によるアポトーシスの過程で nRBP の低下に伴い nPdcd４の mRNA は一過的に誘導されるが、そのタンパク質は減少することが示されたことから、nPdcd4 mRNA は転写後、あるいは翻訳制御を受けていると考えた。そこで、nRBP タンパク質、nPdcd4 mRNA を共発現させた細胞を用いて、nPdcd4 mRNA の安定性、及び翻訳における nRBP の機能を調べたところ、転写阻害剤アクチノマイシン D の存在下で nRBP タンパク質を発現する細胞に残存する nPdcd4 mRNA の安定性は nRBP を発現していない細胞に比べ高いことが分かった。また、nPdcd4 の翻訳も nRBP が発現していると活性化していることが分かった。以上の結果をまとめると（図１）、PRL の FSH に対する相対的濃度比が高いと、第７世代精原細胞における nRBP の発現が低下し、もはや nPdcd4 の安定性、翻訳に寄与できず、精原細胞にアポトーシスを誘導するのに対して、PRL の相対的濃度比が低いと、nRBP が発現しているので、nPdcd4 mRNA に結合して安定化し、その翻訳も促進することで第７世代精原細胞をアポトーシスから守っていると考えられた。このように、本研究経費の履行により、精原細胞の運命を決定するキーファクターとして nRBP を発見するに至った。

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　11 件）

① Li, Y., Oral, O., Abe, K., Eto, K., Abé, S.-I. (2008) The roles of pericystic cells and Sertoli cells in spermatogonial proliferation stimulated by some growth factors in organ culture of newt (*Cynops pyrrhogaster*) testis. Gen. Comp. Endocrinol., 159:80-87. 査読有

② Oral, O., Uchida, I., Eto, K., Nakayama, Y., Nishimura, O., Hirao, Y., Ueda, J., Tarui, H., Agata, K., Abe, S.-I. (2008) Promotion of spermatogonial proliferation by Neuregulin 1 in newt *(Cynops pyrrhogaster)* testis. Mech. Dev. 2008, 125: 906-917. 査読有

③ Nishiyama, K., Sugawara, K., Nouchi, T., Kawano, N., Soejima, K., Abe, S.-I.,

Mizokami, H. (2008) Purification and cDNA cloning of a novel protease inhibitor secreted into culture supernatant by MDCK cells. Biologicals 36; 122-133. 査読有

④ Abé, K., Eto, K., Abé, S.-I. (2008) Epidermal growth factor mediates spermatogonial proliferation in newt testis. Reproductive Biology and Endocrinology, 6, 7. 査読有

⑤ Shiraishi, E., Yoshinaga, N., Miura, T., Yokoi, H., Wakamatsu, Y., Abe, S.-I., Kitano, T. (2008) Müllerian inhibiting substance is required for germ cell proliferation during early gonadal differentiation in medaka (*Oryzias latipes*). Endocrinology, 149, 1813-1819. 査読有

⑥ Jin, Y., Uchida, I., Eto, K., Kitano, T., Abe, S.-I. (2008) Size-selective junctional barrier and Ca2+-independent cell adhesion in the testis *of Cynops pyrrhogaster*: expression and function of occludin. Mol. Reprod. Dev., 75,202-216. 査読有

⑦ Kitano, T., Yoshinaga, N., Shiraishi, E., Koyanagi, T., Abe, S.-I. (2007) Tamoxifen induces masculinization of genetic females and regulates P450 aromatase and Müllerian inhibiting substance mRNA expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Mol. Reprod. Dev. 74:1171-1177. 査読有

⑧ Kawasaki T., Imura, F., Nakada, A., Kubota, H., Sakamaki, K., Abe, S.-I., Takamune, K. (2006) Functional demonstration of the ability of a primary spermatogonium as a stem cell by tracing a single cell destiny in *Xenopus laevis*. Develop., Growth, Differ., 48, 525-535. 査読有

⑨ Eto, K., Eda, K., Kanemoto, S., Abe, S.-I. (2006) The immunoglobulin-like domain is involved in interaction of Neuregulin1 with ErbB. Biochem. Biophys. Res. Comm. 350, 263-271. 査読有

⑩ Saribek, B., Jin, Y., Saigo, M., Eto, K., Abe, S.-I. (2006) HSP90b is involved in signaling prolactin-induced apoptosis in newt testis. Biochem. Biophys. Res. Comm. 349, 1190-1197. 査読有

⑪ Kitano, T., Koyanagi, T., Adachi, R., Sakimura, N., Takamune, K. and Abe, S.-I.(2006) Assessment of estrogenic chemicals using an estrogen receptor α (ERα)- and ERβ-mediated reporter gene assay in fish. Marine Biology,149, 49-55. 査読有。

〔学会発表〕(計 34 件)

①本明あすか、マウス精原細胞の増殖における ErbB4 受容体を介した細胞間、及び細胞内シグナル伝達機構の解析、日本分子生物学会第 31 回大会、2008 年 12 月（神戸市）

②後藤翔太、イモリ精原細胞におけるアポトーシスのRNA結合タンパク質を介した制御機構。日本比較内分泌学会第33回大会、2008年12月（広島市）

③岩間智之、アフリカツメガエル変態過程におけるRNA結合タンパク質XCIRPの発現とアポトーシスの関係について、日本比較内分泌学会第33回大会、2008年12月（広島市）

④白濱陽一郎、イモリSertoli 細胞における減数分裂開始/アポトーシス誘導関連タンパク質の 2D-DIGE(2 Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis)法による網羅的解析、日本比較内分泌学会第33回大会、2008年12月（広島市）

⑤園田祥之、ErbB4の細胞内領域p8はカルパインで分解される、日本動物学会79回大会、2008年9月（福岡市）

⑥李ユブン、イモリ精巣器官培養において精原細胞の増殖や分化を誘導する増殖因子の標的細胞の解析、日本動物学会 79 回大会、2008 年 9 月（福岡市）

⑦衛藤豪克、マウス精巣における Nociceptin の発現制御と機能の解析。日本動物学会 79 回大会、2008 年 9 月（福岡市）

⑧Jidong Zhang, Effect of NRGs and RA on spermatogonial proliferation and meiosis initiation in culture of neonatal mouse testis.日本発生生物学会第 41 回大会、2008 年 5 月（徳島市）

⑨ Keisuke Abe, Epidermal growth factor mediates spermatogonial proliferation in newt testis、日本発生生物学会第 41 回大会 2008 年 5 月（徳島市）

⑩ Ko Eto, Reduced expression of a conserved RNA-binding protein by prolactin leads to apoptosis in newt spermatogonia、日本発生生物学会第 41 回大会、2008 年 5 月（徳島市）

⑪ Abe,S.-I. Binary Switch Mechanism toward Meiosis or Apoptosis in Late Spermatogonia in the Testes in Japanese Newt, *Cynops pyrrhogaster*.6th CONGRESS OF THE ASIA AND OCEANIA SOCIETY FOR COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY, 2007, Dec. Siliguri, India

⑫ Eto, K. Transcriptional repression of a conserved RNA binding protein by prolactin leads to apoptosis in newt spermatogonia。6th CONGRESS OF THE ASIA AND OCEANIA SOCIETY FOR COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY, 2007, Dec. Siliguri, India

⑬ Oral, O. Signaling Mechanism of

Neuregulin1-dependent proliferation in Newt(*Cynops pyrrhogaster*)Spermatogonia。6th CONGRESS OF THE ASIA AND OCEANIA SOCIETY FOR COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY, 2007, Dec. Siliguri, India

⑭ Zhang,J. Neuregulins Promote Mouse Spermatogonial Proliferation and Expression of Meiosis-Specific Genes in Vitro. 6th CONGRESS OF THE ASIA AND OCEANIA SOCIETY FOR COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY, 2007, Dec. Siliguri, India

⑮ Mostafa, G. Xtr protein,One of the key Molecules for Progression of Meiotic Cycle in Xenopus laevis. 6th CONGRESS OF THE ASIA AND OCEANIA SOCIETY FOR COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY, 2007, Dec. Siliguri, India

⑯ 深浦一幸、イモリ精原細胞のアポトーシスにおける HSP90 との結合タンパク質の単離、同定。日本比較内分泌学会第 32 回大会（日光）、2007 年 10 月

⑰ 安部恵祐、イモリ精巣器官培養における EGF の精原細胞増殖促進効果。日本動物学会第 78 回大会（弘前）2007 年 9 月

⑱ 安部眞一、イモリ精原細胞における減数分裂開始かアポトーシスかの運命決定。日本動物学会第 78 回大会（弘前）2007 年 9 月

⑲ Ko Eto, Protective role of a conserved RNA binding protein in spermatogonial apoptosis induced by prolactin during newt spermatogenesis. 日本発生生物学会第 40 回大会、2007 年 5 月（福岡）

⑳ 張継東、Neuregulins はマウス器官培養において減数分裂の開始を促進する。日本発生生物学会第 40 回大会、2007 年 5 月（福岡）

㉑ Toyooka,I. Protective role of a conserved RNA binding protein in spermatogonial apoptosis induced by prolactin during newt spermatogenesis. International Symposium on Amphibian and Reptile Endocrinology and Neurobiology. 2007, Mar., Berkeley, USA.

㉒ Nishi, H. The expression of prolactin receptor isoforms and the role of Sertoli cells in the apoptosis of spermatogonia in the testis of Japanese newt, *Cynops pyrrhogaster*. International Symposium on Amphibian and Reptile Endocrinology and Neurobiology. 2007, Mar., Berkeley, USA.

㉓ Uchida,I, The function of Stem Cell Factor and Neuregulin in the proliferation and differentiation of newt spermatogonia by using culture system. International Symposium on Amphibian and Reptile Endocrinology and Neurobiology. 2007, Mar., Berkeley, USA.

㉔ Abe, S.-I., Binary switch mechanism toward meiosis or apoptosis in late spermatogonia in the testes in Japanese newt, *Cynops pyrrhogaster*. International Symposium on Amphibian and Reptile Endocrinology and Neurobiology. 2007, Mar., Berkeley, USA.

㉕ 江頭恒、HSP90 is involved in signaling prolactin-induced apoptosis in newt testis。日本比較内分泌学会第３１回大会、2006 年 11 月

26. 内田一郎、イモリセルトリ細胞の培養。日本動物学会第 77 回大会（松江）, 2006 年 9 月

㉗ Ko Eto, Neuregulins promote spermatogonial proliferation and expression of meiosis-specific gene Spo11 during mouse spermatogenesis. 23rd CONFERENCE OF EUROPEAN COMPARATIVE ENDOCRINOLOGISTS, Manchester, UK, 2006, Aug.

㉘ Jidong Zhang, Neuregulins promote spermatogonial proliferation and expression of meiosis-specific gene Spo11 during mouse spermatogenesis. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, 2006, June

29. Buget SARIBEK, Role of the Hsp90b in Prolactin-Induced Germ Cell Apoptosis during Spermatogenesis of Japanese Red-Bellied Newt (*Cynops pyrrhogaster*). 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, 2006, June.

㉚ 内田一郎、イモリ精原細胞の減数分裂開始におけるイモリ stem cell factor と neuregulin の作用。日本発生生物学会第３９回大会、2006 年 6 月（広島）

㉛ 大神浩幹、アフリカツメガエルの生殖細胞と初期胚で特異的に発現する Xtr タンパク質の機能阻害による減数分裂抑制。日本発生生物学会第３９回大会、2006 年 6 月（広島）

㉜ 河崎敏広、雄性生殖細胞の純化の試み。日本発生生物学会第３９回大会、2006 年 6 月（広島）

㉝ 白石絵吏、メダカ性分化過程におけるミュラー管抑制物質受容体の発現・機能解析。日本発生生物学会第３９回大会、2006 年 6 月（広島）

㉞ 張継東、Neuregulin はマウス精子形成過程において精原細胞の増殖と減数分裂の開始に特異的な遺伝子の発現を促進する。日本発生生物学会第３９回大会、2006 年 6 月（広島）

〔図書〕（計 2 件）

①安部 眞一、第３章　精子の分化、新編精子学（毛利秀雄・星元紀　監修）。2006, pp.55-73。東京大学出版会

②安部眞一、第６章　脊椎動物の精子分化ーイモリ精巣をモデルにしてー、21 世紀の動物科学。第 4 巻「性と生殖」(安部眞一、星元紀　編)。2007, pp.169-201 全 243 頁、培風館。

６．研究組織

(1)研究代表者
安部　眞一 (ABE SHIN-ICHI)
熊本大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号：９０１０９６３７

(2)研究分担者
江頭　恒 (Eto Ko)
熊本大学・大学院自然科学研究科・助教
研究者番号：４０３５９９６４

(3)連携研究者
なし。