

# 新規細胞接着因子(BT-IgSF)の精子形成における役割の解明

春見 達郎 [旭川医科大学解剖学第2講座/助手]

渡部 剛 [旭川医科大学解剖学第2講座/教授]

林 要喜知 [旭川医科大学生命科学講座/教授]

鈴木 範男 [北海道大学大学院理学研究科/教授]

## 背景・目的

筆者らは脳(海馬および脳梁)と精巣に特異的に発現する新規細胞接着分子をマウス、ラットおよびヒトよりクローニングした。この分子は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する新たなメンバーであることからBT-IgSF(Brain-and Testis-specific Immunoglobulin Superfamily)と名付けた。本研究では精子形成における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局在を調べた。

## 内容・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イムノグロブリン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。また、BT-IgSFの細胞外領域、および細胞内領域に対する抗体を作製し、種々の成熟段階にある精子の免疫組織化学、およびウエスタンブロッティングに利用し、BT-IgSF遺伝子の発現の解析に用いた。

## 結果・成果

既にノーザンドットプロット解析により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。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。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。この時期は円形精子細胞の核周囲部に先体が伸張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。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)や細胞質タンパク質(spetex-1)、ストレスタンパク質(Hsp70)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。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はそれ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力価の高い抗体は得られなかった。そこで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力価の高い抗体が得られた。その抗体を用い、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ところ、精巣では①精子中片と尾部②精子尾部が染まる2種類の精子が、精巣上体頭部では精子尾部が、精巣上体尾部では精子頭部と尾部および中片基部が染まる精子が観察された。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。

## 今後の展望

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。精子は成熟に伴って遊泳能、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これからの問題である。ジーンターゲッティングを含む分子生物学的手法、合成BT-IgSF分子、あるいは抗BT-IgSF抗体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、不妊治療、あるいは逆に避妊に応用できると思われる。