

21. 新規な経管腔シグナル伝達「ルミクリン」の構造生物学的理解

立命館大学 総合科学技術研究機構 客員准教授 浄住 大慈

概要

ルミクリンとは、哺乳類雄の生殖能力を制御する新規のシグナル伝達機構である。研究代表者はこれまでに、精巣で発現・分泌されるルミクリンリガンドが精巣上体に発現する受容体に作用し、精巣上体上皮細胞の分化およびタンパク質分泌を制御することで、精子の機能的成熟を上位から制御していることを明らかにしてきた。

本研究では、このルミクリンシグナル伝達機構に着目し、シグナル伝達に参与するタンパク質の構造に基づき、その分子基盤を解明することを目的とした。主な成果として、ルミクリンリガンドを構成する分泌タンパク質の一つである NICOL について、化学合成による再構成に初めて成功した。さらに、合成 NICOL が組換えタンパク質と同一のジスルフィド結合パターンおよび二次構造を有することを確認し、構造生物学的解析に利用可能な分子基盤を確立した。

背景および目的

生物が種を維持するためには、生殖によって新たな個体を生み出す必要がある。人類においても生殖は重要な課題であり、現代においても子どもを望みながら妊娠に至らないカップルは少なくない。実際、ヒト不妊の原因については不明な点も多いものの、WHO による調査では、不妊の原因の 24% が「男性のみ」、さらに 24% が「男女双方」に起因すると報告されており(1)、男性側因子の重要性が示唆されている。

精子は精巣において形成されるが、精巣で形成された直後の精子は受精能力を有しておらず、その後、生殖路の一部である精巣上体を通過する過程で機能的成熟を獲得することが知られている。精巣上体管腔内の環境が精子成熟を誘導すると考えられているものの、精巣上体で起こる精子機能の変化を直接評価することは技術的に難しく、精巣上体で発現する分子がどのように作用して精子の生殖能力を制御するのかについては、長らく十分に理解されていなかった。

研究代表者の浄住は近年、生殖路管腔を介した分泌シグナル伝達機構である「ルミクリン」が雄の生殖能力を制御することを明らかにした(2,3)。ルミクリンシグナル伝達では、精巣から分泌されるリガンドタンパク質 NELL2 および NICOL が生殖路管腔を通じて精巣上体へ到達し、精巣上体上皮細胞に発現する受容体 ROS1 に結合することで、精子成熟を制御する分子機構が作動する。

これらの研究により、ルミクリンの分子実体とその生理的意義は明らかになったが、その作用を支える分子構造や分子間相互作用の機構については未解明の部分が多く残されている。そこで本研究では、構造生物学的解析を通じて、経管腔シグナル伝達「ルミクリン」の分子機構の理解を進めることを目的とした。

方法

NICOL タンパク質について、まず組換えタンパク質を発現・精製し、部分分解および質量分析を用いてジスルフィド (SS) 結合パターンを決定した。

次に、NICOL の化学合成経路を設計し、固相ペプチド合成法によりポリペプチドを合成した。組換えタンパク質で確認された SS 結合パターンの再現を目標として、合成ポリペプチドのフォールディング条件および SS 結合形成条件の最適化を行った。

さらに、化学合成した NICOL が NELL2 と複合体を形成するかを検証するため、表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance: SPR) アッセイを用い、NELL2 との結合に関する速度論的解析を行った。

結果および考察

結果

NELL2 に対する結合親和性を有する NICOL について化学合成を試み、完全長 NICOL の化学合成に初めて成功した。フォールディング条件および SS 結合形成条件を検討した結果、合成 NICOL は組換え NICOL と同一の SS 結合ペアリングを有することが質量分析によって確認された。

さらに、円二色性 (CD) スペクトル解析による二次構造解析においても、化学合成 NICOL は組換えタンパク質 NICOL と同様のスペクトル特性を示した。これらの結果から、化学合成 NICOL は組換えタンパク質 NICOL と同等の立体構造を再現していることが示された。

加えて、表面プラズモン共鳴 (SPR) アッセイによる速度論的解析の結果、化学合成 NICOL は組換え NICOL と同程度の NELL2 結合親和性を示した。これにより、化学合成 NICOL は構造的のみならず機能的にも組換えタンパク質と同等であることが確認された。

考察

これまで NICOL は組換えタンパク質としての発現効率が高くなく、そのことが機能解析の進展を制約していた。本研究により NICOL を化学合成によって安定的に供給できる基盤が確立されたことから、今後は NICOL の分子機能および生理機能について、化学構造に基づいた精密な解析が可能になると期待される。

一方で、NELL2 および NICOL の分子機能については、その受容体である ROS1 との複合体構造をクライオ電子顕微鏡トモグラフィーによって解析する研究が近年急速に進展しており、国際的な研究競争が激化している (4)。本研究課題においても当初は ROS1 を含む複合体構造の解析を計画していたが、研究環境および競争状況を踏まえ、研究期間中に研究計画の一部を修正した。

また、当初計画していた遺伝子改変動物を用いた機能解析については、研究代表者の所属機関の異動に伴う実験動物の移動により実施が遅延した。一方で、新たに画像解析用ワークステーションを導入し、生殖器官の三次元構造解析を行う研究体制を整備した。今後、NELL2 および NICOL の遺伝子改変マウスを用いた生殖器官構造の高精度三次元解析を進めることにより、これらの分子の構造と生理機能の関係がさらに明らかになることが期待される。

(完)

発表論文

- 1) Chemical Synthesis of NICOL, A Coligand Secreted Protein Mediating Mammalian Male Reproductive Tract Trans-luminal Signaling.
Nagahama K, Takei T, Ito S, Takao T, Hojo H, Kiyozumi D.
Chemistry. 2025 Aug 21;31(47):e01588.

引用文献

- 1) How should we evaluate infertility in men and in women
Comhaire FH, Rowe PJ, Farley TM.
Acta Clin Belg. 1988;43(1):78-85.
- 2) NELL2-mediated lumicrine signaling through OVCH2 is required for male fertility.

Kiyozumi D, Noda T, Yamaguchi R, Tobita T, Matsumura T, Shimada K, Kodani M, Kohda T, Fujihara Y, Ozawa M, Yu Z, Miklossy G, Bohren KM, Horie M, Okabe M, Matzuk MM, Ikawa M.
Science. 2020;368(6495):1132-1135.

- 3) A small secreted protein NICOL regulates lumicrine-mediated sperm maturation and male fertility.
Kiyozumi D, Shimada K, Chalick M, Emori C, Kodani M, Oura S, Noda T, Endo T, Matzuk MM, Wreschner DH, Ikawa M.
Nat Commun. 2023;14(1):2354.
- 4) Clustering and a conformational switch drive activation of the mammalian receptor tyrosine kinase ROS1.
Li H, Zhang J, Li T, Wang Y, Alarcón CR, Klein DE.
Nat Commun. 2026 Feb 17. doi: 10.1038/s41467-026-69630-7. Online ahead of print.