

**京都大学教育研究振興財団助成事業  
成 果 報 告 書**

平成30年4月9日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 辻 井 昭 雄 様

所属部局 霊長類研究所・生物科学専攻

職 名 教授

氏 名 平 井 啓 久

助成の種類	<b>平成 29年度 ・ 研究活動推進助成</b>			
申請時の科研費 研究課題名	マカク類の季節性精子形成の機序を探る分子細胞生物学的研究			
上記以外で助成金を 充当した 研究内容	なし			
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名)			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等)			
成果の概要	<b>研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)</b>			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円		
	使用した助成金額	1,000,000 円		
	返納すべき助成金額	円		
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		消耗品	337,810	
		国内旅費	85,540	
		招へい旅費	296,075	
謝金		273,575		
その他	7,000			
当財団の助成につ いて	<p>(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。)</p> <p>私は退職前1年間の助成をして頂き、22年間あためてきた研究構想を予定以上に高い成果とすることができて、大変助かりました。長年続けてきた研究内容を変更して、新たな研究計画を科研費に申請したため以前のように評価が得られず、科研費が採択されませんでした。本研究助成による支援が22年間蓄積した試料から将来に繋がる成果を生んでくれました。このケースに鑑みますと科研費に不採択だった研究をサポートすることに加えて、研究内容を大幅に変更するときの研究構想を支援することも検討して頂ければ、より充実した支援になるのではないかと思います。京大財団の支援によって1年間集中して新しい構想を進捗させることができれば、研究の新展開を推進する力になるに違いありません。</p>			

研究活動推進助成成果報告書：平井啓久（霊長類研究所）

マカク類の季節性精子形成の機序を探る分子細胞生物学的研究  
：霊長類の精子形成におけるセルトリ細胞の動態と基盤プロセス

## はじめに

本研究は季節性繁殖戦略をとるニホンザルとアカゲザルにおける、オスの精子形成開始のメカニズムを明らかにすることことを目的として開始した。精子形成に関わる研究計画は、実際には、22年前からスタートしたといえる。1995年から死亡した霊長類のオス個体から精巢を採取し、酢酸エタノール（1：1）固定液で保存することを進めてきた。今回は1995年から2017年の22年間で収集した10種32個体（表1）の精子形成プロセスを段階的に解析し、霊長類の精子形成における基盤的特性を把握した。具体的には、精子形成に深く関わるセルトリ細胞に焦点をあて、その動態と精子形成の開始と精子完成との関わりを推測した。

## 解析方法

### 精巢サンプルの固定と精子形成標本作製法：

死亡個体の精巢から一部を切り出し酢酸エタノール（1：1）に固定した。その精巢（a）から精細管（b）を摘出し、精細管の直径を計測後（c）スライドグラス上で精細管を展開（d）する（図1）。この方法で作成した標本はセルトリ細胞を含めた精子形成における細胞分化が、細胞群ごとに一望できることに特徴がある（図1e）。すなわち、この方法は個体や年齢ごとに各種細胞の動態がつぶさに観察できる。

### セルトリ細胞と核小体形成部位の同定：

上記の方法で展開した細胞標本からセルトリ細胞を特定するために、本細胞と親密な関係を有する細胞骨格タンパク質であるビメンチンの抗体を用いて免疫染色した（図2）。ビメンチンはセルトリ細胞と強い親和性を示すことが知られており、ビメンチン抗体を用いてセルトリ細胞を検出することが容易である。また、抗体免疫染色解析後銀染色をおこなうことで細胞内の核小体形成部位（NOR）の動態を解析した。例えば、図2はリスザルのセルトリ細胞（a）をビメンチン抗体で染色し（b）、セルトリ細胞を特定するとともにそのサイズをIPLabの解析ソフトで計測した。その後セルトリ細胞の核小体形成部位（NOR）のサイズを明らかにした（c）（図2）。

### セルトリ細胞のサイズ変化とDNA量の測定：

セルトリ細胞は年齢や種によって変化するので、そのサイズをIPLab（画像解析ソフト）で細

胞の2次元面積（ピクセル数）として測定した（図3）。さらに、セルトリ細胞のサイズ変化のメカニズムを検討するために、細胞ごとの核のDNA量をIPLabの機能を使ってDAPI（4',6-diamidino-2-phenylindole）の輝度として測定した。DNA量の測定値を特定するためにセルトリ細胞、精母細胞、ならびに精子細胞におけるDAPI輝度値を比較解析した（図4）。この測定値は細胞全体の平均輝度値として示している。

## 結果と議論

霊長類の精子形成の基礎的研究を推進するために実験等に利用された死亡個体から精巣を収集してきた。過去22年間で13種38個体の精巣を酢酸エタノール（1：1）に固定し冷凍保存した。その固定標本から精細管を摘出し、直径を計測後、細胞を湧出させ精子形成に関わる細胞を総合的に観察した。今回は10種（ニホンザル9個体、アカゲザル11個体、マントヒヒ2個体、スラベシマカク1個体、ボンネットザル1個体、カニクイザル1個体、ミドリザル1個体、リスザル1個体、コモンマーモセット1個体、ワタボウシタマリン3個体）32個体分のデータ（今回は具体的データは未提示）から概要を示す。

測定項目は年齢、季節（月）、精細管サイズ（直径）、セルトリ細胞のサイズ、セルトリ細胞のDNA量、および核小体形成部位（NOR）の6項目である。それに加えて各個体の精子形成の状況を無精子（N）、未成熟精子（I）、および完熟精子（M）の3段階で評価した。

- 1) **精細管サイズ**：種を問わず精細管の直径が110 $\mu\text{m}$ 以下の個体は精子の形成がなく、110 $\mu\text{m}$ ~200 $\mu\text{m}$ の個体は未成熟精子から成熟精子への移行帯期であり、200 $\mu\text{m}$ 以上の個体は完成精子（図1e）が優位を占める状況をしめした（表1）。
- 2) **セルトリ細胞の特定**：セルトリ細胞はビメンチン抗体で同定した。未成熟なセルトリ細胞は核内に散在的に抗体反応が見られ（データ未発表）、成熟セルトリ細胞は核上のみならず細胞質を含めた細胞全体に強い抗体反応がみられた（例えば図2b）。
- 3) **精子形成とセルトリ細胞の変化**：ニホンザルとアカゲザルの個体の成熟に伴う精子形成の変化は、5歳以下では無精子、5歳代が未成熟精子から完成精子への移行期、6歳以上が完成精子期になることが観察された（表1）。未成熟ならびに移行期の精細管内のセルトリ細胞はまだ未成熟状態（図3a, b）でビメンチン抗体は核内に一部に散在的に反応していた（データ未表示）。成熟精子を形成している精細管のセルトリ細胞（図3a', b'）は大きく成長していた。成熟精子を形成している個体のセルトリ細胞は未成熟のそれとは2倍以上増大していた（図3a, a', b, b'）。ビメンチン抗体の反応は強く大きくなっていた（図2b）。
- 4) **各種細胞のDNA量の比較**：セルトリ細胞、精母細胞、および精子細胞のDAPI輝度を、IPLab画像解析ソフトを用いて比較測定した。DAPI輝度は細胞全体の平均値として検出されるが、成熟したセルトリ細胞（図4a）は257.02ならびに2777.95を示した。一方、精子形

成が開始するステージである精母細胞は 1010.19~1334.15 を示し、精子完成の開始ステージである精子細胞は 608.84~671.3 を示した。精母細胞（図 4 a）は二倍体染色体（2n）からなる太糸期であり、精子細胞（図 4b）は減数分裂後に形成された一倍体染色体（n）を持つ。すなわち、前者と後者の細胞における DNA 量は 2 倍異なることになるが、測定した DAPI 輝度はほぼその相違と一致しており、DNA 量の相違を反映していることになる。したがって、セルトリ細胞（図 4a）は精子形成が進むにつれてサイズは増大しているが、DNA 量は増加していない。

- 5) 核小体形成部位（NOR）の変化：精子形成の進行にともなうセルトリ細胞の NOR（図 3 の細胞内に観察される円形の黒い部位）の大きさをピクセル数として測定したところ（具体的数値は未提示）、平均ピクセル数が 103 以下の個体は無精子期～未成熟精子期であり、それ以上 364 までは完成精子期を持つ個体であった。

以上のことを簡略的にまとめると、セルトリ細胞は個体の成長に伴ってサイズが増大し、それに並行してビメンチンの発現が強くなることが明らかになった。また、セルトリ細胞の増大に伴って細胞内の NOR も増大した。すなわち rRNA の発現増加が示された。加えてセルトリ細胞の動態は種によってまた繁殖期によって異なることも観察されており、精子形成の進化的機序ならびに季節性機序の解析にとっても重要な示唆となる。これらのセルトリ細胞／ビメンチン／NOR の動態は精子形成の開始と、その後の精子完成に深く関わっていることが推測される。これらの示唆的データを基に、今後より詳細な細胞生理生化学的解析を進めることで、精子形成のスイッチングの糸口を見つけられることが期待される。これは個体成熟に伴う精子形成や季節性繁殖に関わる精子形成のメカニズムの解明における基礎的情報としても重要であろう。さらに iPS 細胞から精子形成を誘導する機序の探索においても優れた基盤的知見となるに違いない。

表 1. 精巣を採取した個体の情報（個体名、期日、年齢）

個体	採取日	年齢	採取月
宮島Mff911	1999.12.16	24	12
嵐山2338	2017.3.29	8	3
嵐山Mff1526	2001.11.1	7	11
高浜Mff1574	2001.10.24	6	10
嵐山2431	2017.4.11	6	4
嵐山2433	2016.12.28	5	12
嵐山2447	2016.12.21	5	12
高浜2499	2017.9.20	5	9
Mfy1285	1995.12.11	6	12
Mm439	2001.6.7	>26	6
Mm955	2000.1.28	14	1
Mm1144	1998.12.9	8	12
Mm1376	2003.8.23	7	8
Mm1434	2002.11.29	6	11
Mm1478	2003.8.27	6	8
Mm1952	2017.8.28	6	8
Mm1362	2002.8.25	5	8
Mm1445	2002.12.2	5	12
Mm1172	1995.12.12	5	12
Mm2048	2017.8.24	4	8
Ph80	2002.1.31	6	1
Ph76	1998.12.2	5	12
スラベシ	1999.2.17	26	2
Mr57	1999.12.16	13	12
カニクイ293	1998.12.2	6	12
ミドリザル	2010.6.16	14	6
リスザル106	1998.7.3	>12	7
Cj111	2000.2.15	13	2
Cj145	2000.12.18	11	12
So105	2005.3.17	15	3
So134	2000.1.28	8	1
So164(96Q905)	1999.12.24	3	12

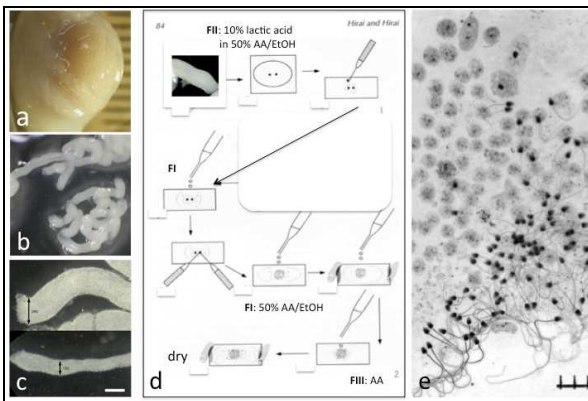


図 1. 精子形成の標本作製法。a) 精巣。b) 精細管。c) 精細管の計測。d) 細胞の展開法。e) 作製した精子形成の各種細胞。白スケールは 10  $\mu$ m。黒スケールは 20  $\mu$ m。

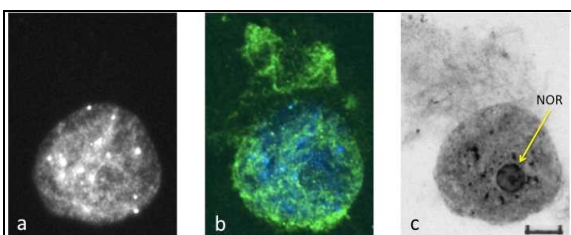


図 2. セルトリ細胞のビメンチン抗体免疫染色と銀染色の解析。a) 核を染めた DAPI 染色。b) ウサギで作製したビメンチン抗体を FITC で検出したもの。c) 硝酸銀で検出した銀染色像。NOR、核小体形成部位。スケールは 10  $\mu$ m。

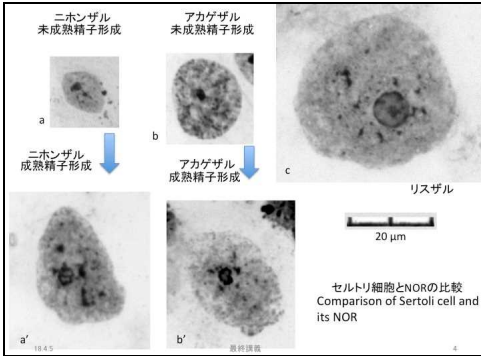


図 3. 年齢や種によるセルトリ細胞の相違

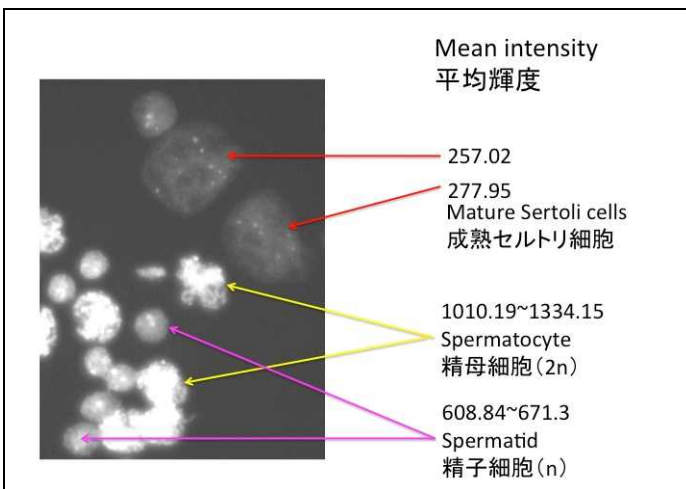


図 4. 細胞の DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 輝度の測定。数値は IPLab (画像解析ソフト) の細胞全体の平均値として提示される。