

**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5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

職 名 助教

氏 名 今 村 公 紀

助 成 の 種 類	平成29年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究課題名	霊長類の生後発育過程で一過的に認められる生殖細胞のプログラム細胞死			
上記以外で助成金を 充当した 研究内容				
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名) 京都大学霊長類研究所・大学院生・北島龍之介、黒木康太、岡田佐和子、仲井理沙子			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) International symposium on Genomics and Cell Biology of Primates(2018/3/23-24)、第7回超異分野学会(2018/3/2-3)、第62回プリマーテス研究会(2018/1/27-28)、2017年度生命科学系学会合同年次大会(2017/12/6-9)、Cryopreservation Conference 2017(2017/11/1-2)、Fourth World Congress of Reproductive Biology(2017/9/27-29)、日本進化学会第19回大会(2017/8/24-26)			
成果の概要	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」)			
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	
		備品費	399,600	
		消耗品費	481,384	
切片作製等		119,016		
当財団の助成につ いて	(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。) 昨年度は助成金を授与していただいたことにより、該当の研究を進展させることができました。主たる担当者であった大学院生も無事に修士号を獲得することができ、現在は論文投稿に向けて詰めの実験に取り組んでおります。応募させていただいたプロジェクトは社会実装や応用がすぐに見込める類の研究ではなく、完全な基礎研究となります。ヒトの生物学的・医学的理解のためには不可欠な研究であると自負しておりますが、昨今の風潮の中、研究費がつきにくいテーマであるとの自覚もあります。今回のご支援について多大なる感謝を申し上げますとともに、引き続き私どものような基礎研究へのご理解とご支援の程、何卒宜しくお願い申し上げます。			

成果の概要

研究課題名：霊長類の生後発育過程で一過的に認められる生殖細胞のプログラム細胞死

申請者：京都大学霊長類研究所・助教・今村公紀

ヒトを含む霊長類には、出生から性成熟に至る間に長期の性的未成熟な期間（子供期）が存在するという、独特の発育様式・生理的特徴が認められる。申請者は霊長類特有の生後発育過程における精子形成の発生動態と分子基盤を明らかにするために、小型霊長類であるコモンマーモセットに注目した分子・細胞・発生生物学的解析に取り組み、これまでにマーモセット精子形成細胞の分子プロファイル（DNA メチル化、mRNA・タンパク質発現、低分子 RNA 発現）や精原細胞の培養、生後発育動態の遺伝子発現アトラスについて報告してきた。その際、子供期の精巣においてのみ存在し、減数分裂様のイベントを介してプログラム細胞死を起こすユニークな生殖細胞を発見するに至った。申請者が研究してきたコモンマーモセットは、温和で多産である上、性成熟までの期間が早い（生後およそ1年程度で性成熟）という、霊長類実験動物としての有用性が極めて高い。しかし、生後1年での性成熟は霊長類の中では短期間であり、霊長類の生後発育をどの程度反映したモデルであるかについては不明である。そこで、コモンマーモセットとの比較対象として、より長期の生後発育期間をもつ中型霊長類のアカゲザルについても解析を行うこととした。アカゲザルは出生後およそ1年で離乳し、5-6年で性成熟を迎える。アカゲザルの新生児から性成熟に至る生後発育過程に注目し、精巣発達の発生・遺伝子発現動態の解析を実施した。

まず、生後発育における発達の指標として、組織サイズ（長軸、短軸）の計測と組織切片のHE染色による組織学的解析を行った。比較に用いた腎臓では、出生の時点で糸球体や尿細管などの主要構造は完成しており、生後発育に伴ってゆるやかなサイズの増大が認められた。一方、精巣のサイズは性成熟後の成体においては腎臓を同程度であるが、出生の時点では非常に小さく、0歳（infant）～2歳（juvenile）にかけて（第一フェーズ）と4歳（premature）～6歳（adult）にかけて（第二フェーズ）の二度の成長フェーズで急激にサイズが増大していた。第一フェーズでは精細管の断面積や細胞分布に大きな変化は認められない一方、同一視野内の精細管数が増加しており、精細管の伸長が示唆された。これに対し、第二フェーズでは構造形成が進行し、第二フェーズでは精細管断面積と生殖細胞数が顕著に増加しており、精子形成が観察された。これらのことから、腎臓は構造形成と機能成熟が基本的に完成された状態で出生するが、精巣においては生後発育の第一フェーズにおいて構造形成、第二フェーズにおいて機能成熟が起こることが示された。

続いて、アカゲザル精巣において生後発育を制御する遺伝子を特定するために、RT-PCRによる遺伝子発現解析を行った。まず、候補遺伝子のスクリーニングとして、第一フェーズ終了期（juvenile）と第二フェーズ終了期（adult）の精巣と腎臓を用い、組織形成への関与が知られている増殖因子や性ホルモン、細胞周期関連遺伝子やシグナル伝達因子の発現解析を行った。その結果、精巣の生後発育特有の遺伝子発現として細胞周期関連遺伝子の発現変動が多く認められたため、細胞周期の制御因子に焦点を絞って定量的解析を行った。一例を挙げると、細胞周期のG0→G1、G1→S進行を促進するサイクリンD2の発現は第一フェーズのinfant、

juvenile で高く adult で低下する一方、その抑制因子である Nurr1 や JARIPD2、CDK インヒビター (P16、P19) の発現は adult において増加しており、第一フェーズで活発な有糸分裂が第二フェーズには抑制されることが示唆された。反対に、adult の精巣では精子形成関連遺伝子 (DAZL、SCP1、SCP3 の発現増加と相関してサイクリン A1、E1、E2 の発現上昇が認められ、減数分裂に付随した細胞分裂制御機構への転換が示唆された。

以上のアカゲザル精巣の生後発育動態を踏まえ、コモンマーモセットで認められた子供期特有の精細管内腔に存在する生殖細胞 (Luminal Germ Cell: LGC) の有無について検証を行った。第一フェーズおよび第二フェーズ終了期 (adult) のアカゲザル精細管においては LGC 様の細胞は認められなかったが、第二フェーズの開始期 (premature) においてのみ LGC 様の細胞集団が観察された。しかし、アカゲザルとコモンマーモセットの LGC は全く同じ分子特性を示すわけではなく、コモンマーモセットの LGC が DAZL+VASA+の新生児ゴノサイト様の発現を示すのに対し、アカゲザルの LGC 様細胞は DAZL-VASA+であった。コモンマーモセットの精原細胞は DAZL+VASA-である一方、アカゲザルの精原細胞は DAZL+VASA-と DAZL-VASA+の集団が分かれて存在することを合わせて考えると、コモンマーモセットとアカゲザルでは大枠での精巣生後発育動態は類似しているものの、細胞の特性・運命決定の細部においては種差が存在することが示された。今後はアカゲザルの LGC について詳細な特性解析を行い、生後発育における発育動態とコモンマーモセットとの比較を試みる予定である。

