

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570225

研究課題名(和文) 微小管細胞骨格による精子オルガネラの形態形成機構の研究

研究課題名(英文) A study on organelle morphogenesis during sperm differentiation driven by microtubule based cytoskeleton.

研究代表者

野口 立彦 (Noguchi, Tatsuhiko)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科進学課程・助教)

研究者番号：30443005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：精子は卵に向かって遊泳し卵を受精するために精子の基本形とよばれる洗練されたデザインを持つ。しかしその形成過程において細胞内の機能部品が合目的に配置される分子メカニズムは未解決である。本研究は、ショウジョウバエ精子形成をモデル系とし、遺伝学と初代培養系を駆使して精子の形作りの共通メカニズム解明を目指した。

減数分裂後の精子核は伸長した後、染色体凝縮が起こり小型化して針のような形に変化する。精子核周囲の微小管構造の欠損を起こさせる変異体の解析より、精子核の伸長には核側面に出現する太い微小管構造が関わり、染色体の凝縮には別の性質の異なる核膜微小管が関わっていることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Sperm has an elegant functional design to perform a crucial role in reproduction, swimming towards target egg as a single cell, and carrying out cell-fusion to fertilize the egg. However, molecular mechanism to develop such intracellular architecture is remained uncovered. I took an approach to use *Drosophila* spermatogenesis as a model system to uncover general mechanism of sperm morphogenesis, taking advantage of *Drosophila* molecular genetics and primary culture system for differentiating sperm cell for live imaging. During late spermatogenesis after meiosis, sperm nucleus elongates and then undergoes extreme chromosome condensation, making it a needle shape. By examining a few fly mutants which lack microtubule based structures around the sperm nuclei, I found that 2 distinct microtubule populations are responsible for nuclear elongation and chromosome condensation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：精子 ショウジョウバエ オルガネラ 微小管

1. 研究開始当初の背景

精子は受精という重要な生命現象を担う細胞である。精子は卵に向かって単独の細胞で遊泳し卵と融合するという特殊能力を発揮するために洗練された機能的デザインを持つ。精子の頭部から、**先体** (卵との融合装置)、**核** (遺伝物質のカーゴ)、核後部に連結する **basal body** から**鞭毛軸糸** (モータースクリュー) が伸び、鞭毛の基部には**ミトコンドリア** (エネルギー供給装置) が位置している。このオルガネラ配置は広く種を越えて保存され「**精子の基本形**」とよばれる(図1)。

精子が形作られる過程では、細胞内で各機

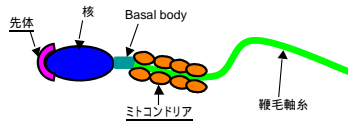


図1: 精子基本形のオルガネラの配置

能を担うオルガネラが合目的に配置されパッケージされて行くのだが、精子基本形が構築されるメカニズムの概要や、オルガネラの配置や形態形成の分子的理解は未だ進んでいない。

これまでの研究において、私は伝統的に遺伝学に優れたショウジョウバエに注目し、雄不妊変異体や精巣特異的RNAiを用いた遺伝子の機能阻害、精巣でのマーカー遺伝子発現等の分子遺伝学的手法の拡充を進めて来た。その上で、ショウジョウバエ精子細胞の初代培養を行い、培養シャーレ中で精子が形作られる様子をライブ観察することを可能にした。これまでにこの解析系を用いショウジョウバエの精子形態形成過程の部分的な解析の報告を続けている (Development 2003: Mol. Biol. Cell. 2006: Mol. Biol. Cell 2008, Mol. Biol. Cell 2009: Curr. Biol. 2011)。

2. 研究の目的

本研究は、遺伝学と初代培養を利用した、

この分野では新しいアプローチにより精子形成の分子メカニズム理解の大幅な伸展を図るため、以下の2つを主要な目的とする。
目的1: 精子基本形の形成メカニズムの解明
精子基本形ができあがるまでのプロセスの概要を、先体、核、basal body、ミトコンドリア、鞭毛軸糸といったオルガネラの配置や形態変化、オルガネラどうしの関係性、細胞の極性といった視点から明らかにする。

目的2: 精子形態形成の分子基盤の解明

上述の精子基本形に異常を示す突然変異体の原因遺伝子の同定を起点として、精子基本形とオルガネラの形作りに関わる分子群を明らかにする。

本研究ではショウジョウバエをモデル系として利用しているが、ここで得られた精子の形態形成に関する知見は、ヒト精子形成異常の病態理解に役立つ基盤情報として、男性不妊治療の改善に貢献することが期待される。

3. 研究の方法

精子基本形の構築メカニズムを明らかにするため、1) 精子形成の観察。GFP-マーカー遺伝子の発現により、先体、核、ミトコンドリア、basal body、微小管を生体染色し、初代培養中で精子形成過程での細胞形態変化、各オルガネラの動態、微小管の動態の概要を記述する。また、同時に電子顕微鏡による細胞内の微細形態観察を平衡して行う。
2) 各オルガネラが欠損、あるいは大幅に小型化する既存の変異体の観察から、精子基本形構築における各構造の働きと、オルガネラ間の相互作用を解析する。
3) 雄不妊変異体の原因遺伝子を同定し、機能解析をする。

4. 研究成果

(1) **精子核の変形と染色体凝縮に関わる2つの核膜微小管構造。**

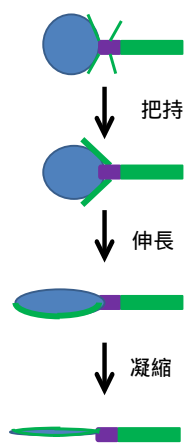


図 2：精子核の変形過程

緑：微小管、青：核、
紫：basal body

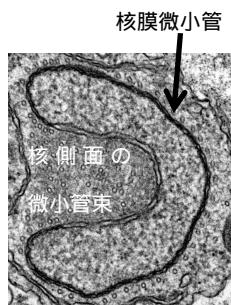


図 3：精子核横断面
の電子顕微鏡像

減数分裂後の精子核は、鞭毛軸系の基になる basal body と結合する。basal body からは細胞質微小管が伸び、Lis1/ダイニン複合体を介して核膜と結合することで核を把持する。その後、微小管の束が核側面に出現し、核を引き延ばして球形から細長い形へと変形

する。続いて染色体の凝縮が起こり精子核は更に小型化され遊泳に適した針の様な形状になる(図 2)。この一連の変化には性質と由来が異なる 2 種類の核周囲微小管構造が関わっていることが判明した。正常な状態では、

精子核が伸長時には核側面に際だって太い微小管束ができると同時にその他の核膜領域には一層の微小管が結合している(図 3)。basal body 自体を欠損する *Dsas4* 変異体と、核の保持ができない

Lis1 変異体では、核膜に basal body に由来する微小管が結合することはない。しかし、いずれの場合も太い微小管の束が核の片側面に形成され精子核は伸長した。つまり、この微小管束は basal body とは独立に核膜側面から生じ精子核を伸長させることを示唆する。一方、それ以外の核膜領域の微小管は失われていたことから basal body 由来であることが推察される。核の凝縮が始まるころに、太い微小管束は消失するが、一層の微小管は核周囲に残り、同じ位置で染色体の凝縮が起る(図 4)。この微小管を欠損する *Dsas4*、

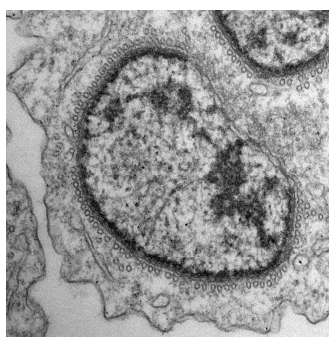


図 4：染色体凝縮中の核横断面。
染色体凝集(黒)領域が微小管に囲まれた核膜領域と一致。

Lis1 両変異体では決まった領域からの染色体凝縮は起こらず結果的に核凝縮は不完全に終わる。つまり一層の微小管が構造的足場として核凝縮を促進している可能性

性を強く示唆している。今後は、染色体凝集の足場としての核膜微小管の構造的役割を更に詳しく調べていく予定である。

(2)精子核変形が起こらない *halley* 変異体の

解析。精子核の伸長が起こらず、球形のままとどまるという異常を示す *halley* 変異体の解析を行ったところ、上述の核表面の微小管等には異常が無いが、減数分裂に異常を示すことが判明した。正常では、16 個の一次精細胞がひとかたまりで減数分裂(第一、第二分裂の 2 分裂が連続して起こる)を経て 64 個の精細胞の塊となる。ところが、*halley* 変異体は、第一減数分裂後に第二分裂が起こらずに 32 細胞の状態のまま精子形態形成が始まってしまう特異な表現型を示す。細胞表面には微小管ができ、多少の伸長や染色体凝集が見られるが核のサイズが大きすぎるのが原因で正常な変形が起こらないと考えられる。この変異体の減数分裂異常は大変興味深いので、今後更に詳細な表現型の解析とともに原因遺伝子をクローニングしてその機能解析を進めたい。

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 2 件)

1) 野口立彦、小泉美智子、林茂生、
Mitochondria-driven cell elongation

mechanism for competing sperms. Fly journal 誌、査読無 2012 vol.6 113-116
<http://dx.doi.org/10.4161/fly.19862>

2) 野口立彦、ショウジョウバエの巨大ミトコンドリアが促進する精子形態形成。顕微鏡誌、総説、査読無 2012 47 巻 191-195
<http://www.microscopy.or.jp/magazine/microscopy.html>

〔学会発表〕(計 4 件)

1) 野口立彦、小泉美智子、林茂生、Mitochondria-driven cell elongation mechanism for sperm morphogenesis. 2012 年 5 月 28~31 日、日本発生学会、日本細胞生物学会合同大会 神戸

2) 野口立彦、Giant mitochondria-driven sperm elongation mechanism, A potential promoter of reproductive isolation in diverse insect species. 2012 年 11 月 20~24 日 International Conference on soft computing and intelligent system, 神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口立彦 (NOGUCHI Tatsuhiko)

研究者番号：30443005