

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月30日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570228

研究課題名（和文） 精子形成細胞における mitosis から meiosis への分子スイッチ機構の  
解明研究課題名（英文） Analysis of the transition mechanism from mitosis to meiosis on  
spermatogenic cells by using cybrid model.

研究代表者

佐藤 陽子 (SATO YOKO)

山口大学・農学部・学術研究員

研究者番号：50398963

研究成果の概要（和文）：

体細胞分裂から減数分裂への移行機構を決定する減数分裂抑制及び開始因子の存在証明と同定を目的とし実験を行った。脱核した減数分裂移行可能な competent 精細胞の細胞質と減数分裂移行不可能な non competent 精原細胞を電気穿孔法により融合しサイブリッドを作製した結果、non competent 精原細胞で核の形態が変化し、減数分裂前期の形態を示すことを明らかにした。このことはドナーの細胞質に減数分裂を誘導する物質が含まれている可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：

Meiosis is the special option for germ line cells to determine the cell fate. The aim of this study is to know the factors, which are involved in the induction or inhibition of meiosis in the spermatogonia. In the beginning, we tried to establish the experimental condition to make hetero karyotic cell by electronic fusion technique using both the competent spermatogenic cells, which can show meiotic progression, and the non-competent spermatogenic cells. However, the competent spermatogenic cells could not induce meiosis in the non-competent spermatogenic cells under hetero karyotic cell condition. To remove the effects of the donor nuclei from the recipient cells, cytoplasts (enucleated cytoplasm) from the competent spermatogenic cells were electro-fused with non-competent spermatogenic cells. The nuclei of the produced cybrids (cytoplasmic hybrid) were analyzed morphologically. These cybrids showed morphological changes in the nuclei similar to zygotene spermatocytes immediately after fusion. These results suggested that the cytoplasm of the competent spermatogenic cells contain the factor, which can induce meiotic progression in the non-competent spermatogenic cells. Further analysis including the expression of the specific molecular marker of the meiosis will need to be taken.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：発生生物学・生殖生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：精子形成・減数分裂・細胞培養系・細胞融合

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞は、体細胞分裂(有糸分裂)で増殖すること、及び減数分裂により配偶子を形成することが可能である。雄性生殖細胞は、初め体細胞分裂により増殖し、その後細胞周期を逸脱し減数分裂を開始する。しかし通常、体細胞分裂により増殖する他の細胞で誤って減数分裂が誘導されることはなく、厳密な制御機構の存在が考えられる。生殖細胞において、減数分裂が阻害されると配偶子形成が異常になることから、減数分裂が途中で破綻する機構についての研究は多く見られ、Stra-8などいくつかの因子が減数分裂に関与することが報告されている(Mark *et al.*, PNAS: 2008, Soper *et al.*, Dev Cell: 2008)。しかしながら、哺乳類雄性生殖細胞において、体細胞分裂から減数分裂への移行を決定する機構については未だ詳細は不明である。

我々は、ほ乳類精子形成機構の解明のため、*in vitro* の精細胞培養系の開発を行い、精細胞に特徴的な細胞間橋によりつながった精細胞の分化、増殖過程を *in vitro* で再現可能にした(第49回日本組織細胞化学会総会2008)。培養下での観察により、精細胞の減数分裂開始はほぼ同調するものの、連結する精細胞において開始時期には一定方向に微妙な時間差があることから、減数分裂開始を制御する因子が細胞質に存在し、細胞間橋を介して精細胞間に伝達されているのではないかと考え、本課題を着想した。今までは適切な分化マーカーや培養系が存在しなかったため、減数分裂に移行できる competent 精原細胞と減数分裂に移行しない non competent 精原細胞を得ることは難しかった。しかし、我々が開発した精細胞培養系により人為的に体細胞分裂から減数分裂移行 competent、non competent 精原細胞を作成し、実験材料として両者を区別して使用することがはじめて可能になったため、減数分裂開始制御因子の解析ができるようになった。

## 2. 研究の目的

体細胞分裂から減数分裂への移行機構には、減数分裂抑制因子と減数分裂開始因子の両方が必要であると考えられる。減数分裂移行不能な non competent 精原細胞は、減数分裂抑制因子を持つが減数分裂開始因子を持たず、減数分裂移行可能な competent 精原細胞は、減数分裂抑制因子を持たないが減数分裂開始因子を持つと仮定し、それらの因子の存在を明らかにし減数分裂移行機構を解明するのが本課題の目的である。作成した

non competent 精原細胞と competent 精原細胞を細胞融合させ一定期間の培養後に non competent 精原細胞に減数分裂が誘導されれば、competent 精原細胞に減数分裂誘導因子があること、また competent 精原細胞の減数分裂がとまれば、non competent 精原細胞に減数分裂抑制因子が含まれていることが明らかとなる。また、細胞融合時に細胞質の量比を変えることにより、減数分裂誘導因子と抑制因子の量的勾配が減数分裂開始を決定するかを明らかにする。さらに、non competent と competent 精原細胞の細胞質蛋白を2次元電気泳動により differential screening を行い、減数分裂誘導因子と抑制因子の候補蛋白を探す。候補蛋白は、精原細胞へマイクロインジェクションにより導入し、蛋白機能のバイオアッセイを行い、最終的に因子の同定を行うことを目標とする。

## 3. 研究の方法

体細胞分裂から減数分裂への移行を決定する減数分裂抑制因子と減数分裂開始因子の存在証明と同定を行う。減数分裂移行不能な non competent 精原細胞と減数分裂移行可能な competent 精原細胞の細胞質共有による減数分裂の開始または抑制を検討することにより因子の存在を証明し、さらに、non competent 精原細胞と competent 精原細胞の細胞質蛋白のプロテオーム解析により因子蛋白を解析し、バイオアッセイにより因子の同定を行う。

### (1) 減数分裂移行可能な competent 精原細胞と減数分裂移行不能な精原細胞の細胞融合による減数分裂誘導因子と抑制因子の検討

体細胞分裂を行い自ら減数分裂へ移行しない non competent 精原細胞は、day5 の EGFP マウス (C57BL/6Tg (CAG-EGFP) C14-Y-01-FM1310sb) 精巣より磁気ビーズによる精原細胞単離後、STO feeder 上で培養し、GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) を添加することにより増殖を促し細胞集団を得る (Ryu *et al.* 2005, PNAS)。さらに、減数分裂を誘導できる我々の精細胞共培養系を用いて non competent 精原細胞より減数分裂に移行できる competent 精原細胞集団を day5 の C57BL/6 マウス精巣より作成する。それぞれの細胞を、feeder cell より酵素を用いて剥離し、遠心かけることにより個々の細胞に分離し回収する。その後、脱核した non competent 精原細胞と competent 精原細胞、

または non competent 精原細胞と脱核した competent 精原細胞を 1 : 1 で細胞融合させ ST0 feeder 上で培養を行う。細胞融合法としてポリエチレングリコール法及び電気穿孔法を試し、最適な方法を選択する。一定期間の培養後、融合した細胞を回収し、核染色を行い、形態的、又は減数分裂のマーカである SCP-1 抗体を用いて免疫組織学的に検討する。この実験により、non competent 精原細胞に減数分裂が誘導されれば competent 精原細胞の細胞質に減数分裂誘導因子があること、また competent 精原細胞の減数分裂が開始されなければ、non competent 精原細胞の細胞質に減数分裂抑制因子が含まれていることが明らかとなる。

### (2) 減数分裂移行可能な competent 精原細胞と減数分裂移行不能な non competent 精原細胞の細胞量比を変えた融合による減数分裂誘導及び抑制のしくみについての検討

(1) で non competent 精原細胞にも competent 精原細胞にも変化が見られなかった場合、減数分裂誘導因子と抑制因子の量が平衡であることが可能性として考えられる。そこで、脱核した non competent 精原細胞と脱核した competent 精原細胞の量比を変えて (1) と同様の方法で細胞融合し、培養後の細胞の検討を行う。この実験により、減数分裂誘導因子と阻害因子の量的勾配により、減数分裂開始が決定するのかが明らかとなる。

### (3) 減数分裂誘導及び抑制因子の探索

non competent 精原細胞と competent 精原細胞より脱核を行い、可溶化し、細胞質蛋白のサンプルを調整する。2次元電気泳動により蛋白質のスポットを分離し、non competent 精原細胞にあり competent 精原細胞にないスポット (減数分裂抑制因子候補群) と non competent 精原細胞になく competent 精原細胞にあるスポット (減数分裂誘導因子候補群) を確定する。これらの候補蛋白のスポットをゲルから切り出し酵素処理した後、LC-MS/MS にかけて、結果を Mascot search にて解析しスポットの蛋白を同定する。同定されたスポットの蛋白が減数分裂の誘導や抑制機能を所持しているかについて、各々の精原細胞に以下のものをマイクロインジェクションにより導入し、減数分裂の誘導及び抑制の現象を判断基準としてバイオアッセイを行い検討する。① 既知の蛋白 (精製品が手に入る場合) ② 抗体 (既知の蛋白であるが精製品が手に入らない場合)。③ native page で該当サイズのバンドより抽出した粗精製蛋白 (未知の蛋白で、サイズのみわかる場合)。この実験により減数分裂誘導及び抑制因子が明らかに

されることが考えられる。

## 4. 研究成果

はじめに、減数分裂誘導因子を解析する細胞融合を用いた実験系の確立を目指した。当初の予定では、EGFP マウス (C57BL/6Tg(CAG-EGFP)C14-Y-01-FM1310sb) を用いる予定であったが、研究実施場所の都合上難しかったため、ICR マウスの精細胞を標識して実験に用いた。細胞融合に用いるドナー細胞は、day5 の ICR mouse 精巣より単離した non competent 精原細胞を、レシピエント細胞は、non competent 精原細胞から精細胞共培養システム下で作製した competent 精原細胞を、また day12 の ICR mouse 精巣より単離した精母細胞を実験に用いた。はじめに、DiI で標識したレシピエントである non competent 細胞とドナーである mitotracker で標識した competent 細胞の細胞融合によるヘテロカリオン作製条件を、ポリエチレングリコール法と電気穿孔法を用いて検討し、最終的に電気穿孔法による融合条件を確立した。しかしながら、作製したヘテロカリオンを mouse embryonic cell feeder 上で培養したがレシピエント細胞核に減数分裂を誘導することはできなかった。

そこで、次に、ドナー側の核の影響を除くため、competent 精原細胞又は、減数分裂を行っている精母細胞からサイトカシン B 処理後遠心脱核することにより得た細胞質と non competent 精原細胞を電気穿孔法により融合し、サイブリッドを作製する条件を検討した。結果、成功率は低いが融合後、すぐに non competent 精原細胞で核の形態が変化し、減数分裂前期ザイゴテン期様の形態を示すことを明らかにした。このことは、ドナーの細胞質に減数分裂を誘導する物質が含まれている可能性を示唆している。現在、このレシピエント核の変化を免疫組織化学的手法を用いて、減数分裂のマーカ分子の発現について検討中である。

さらに、減数分裂誘導因子の分子的な解析を行うため、このサイブリッド作製による減数分裂誘導アッセイ系の確立を試みた。つまり、精母細胞及び competent 精原細胞より細胞質分画を回収し、因子の性質について検討する方法を探った。バイオアッセイの方法としては、non competent 細胞の細胞質領域が非常に狭いので、当初予定していたマイクロインジェクション法を変更し、蛋白分画は、人工膜中に変性処理または未処理の、蛋白分画が含まれるものを作成し (Funakoshi et al., Anal Chem: 2006)、non competent 精原細胞と融合させサイブリッドを作製し、減数分裂誘導が起こるかどうかを上記方法により検討した。しかし、サイブリッドの形成効率及び細胞質分画を含む人工膜作製効率

は未だ不十分であり、今後のさらなる検討が必要である。

本研究では、因子解析に必要な細胞融合によるサイブリッド形成実験系の作製に当初の計画よりも多くの時間を費やすこととなり、細胞質における減数分裂誘導因子の存在を示唆することはできたものの、予定していた因子探索の研究にまで至らなかった。しかしながら、今回確立した実験系は、今後、この誘導因子の解析に非常に有効であると考えられる。また、今後は精原細胞の細胞質とのサイブリッド作製により、融合後にレシピエント細胞に減数分裂を起こす条件、また、抑制する条件をさらに詳細に検討することにより、減数分裂誘導、抑制因子の検討をさらに進めて行く予定である。

#### 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 11 件)

- ① Y. Sato, M. Taniguchi, T. Otoi. Studying spermatogenesis by using *in vivo* and *in vitro* models: Advantages and disadvantages of these models for practical use. *J. Vet. Sci. Tech.* (in press) 査読あり
- ② M. Wittayarat, K. Taichi, R. Kodama, Z. Namula, K. Chatdarong, M. Techakumphu, Y. Sato, M. Tachiguchi, T. Otoi. (2012) Long-term preservation of chilled canine semen using vitamine C in combination with green tea polyphenol. *Cryo Letters* (in press). 査読あり
- ③ T. Isobe, Y. Ikebata, T. Onitsuka, M. Wittayarat, Y. Sato, M. Taniguchi and T. Otoi. (2012) Effect of sericin on preimplantation development of bovine embryos cultured individually. *Theiogenology* (in press). 査読あり
- ④ Y. Kaedei, M. Naito, H. Naoi, Y. Sato, M. Taniguchi, F. Tanihara, K. Kikuchi, T. Nagai, and T. Otoi. (2012) Effects of (-)-epigallocatechin gallate on the motility and penetrability of frozen-thawed boar spermatozoa incubated in the fertilization medium. *Reprod. Dom. Anim.* (in press) 査読あり
- ⑤ Y. Sato, S. Nozawa, M. Yoshiike, T. Otoi and T. Iwamoto. (2012) Glycoconjugates recognized by peanut agglutinin lectin in the inner acellular layer of the lamina propria of seminiferous tubules in human testes showing impaired spermatogenesis. *Hum. Reprod.* 27: 659-668. 査読あり

- ⑥ T. Takizawa, T. Ishikawa, T. Kosuge, Y. Mizuguchi, Y. Sato, T. Koji, Y. Araki and T. Takizawa. (2012) Gene suppression of mouse testis *in vivo* using small interfering RNA derived from plasmid vectors. *Acta Histochem. Cytochem.* 45: 77-81. 査読あり
- ⑦ N. Chojjookhuu, Y. Sato, T. Nishino, D. Endo, Y. Hishikawa and T. Koji. (2012) Estrogen-dependent regulation of sodium/hydrogen exchanger-3 (NHE3) expression via estrogen receptor B in proximal colon of pregnant mice. *Histochem. Cell Biol.* 137: 575-587. 査読あり
- ⑧ T. Terazono, Y. Kaedei, F. Tanihara, Z. Namura, V. L. Viet, M. Takagi, M. Inoue, Y. Sato, M. Taniguchi and T. Otoi (2012) Follicle formation in the canine ovary after autografting to a peripheral site. *Reprod. Domest. Anim.* 47: 16-21. 査読あり
- ⑨ M. Murakami, Y. J. Dong, T. Suzuki, M. Taniguchi, Y. Kaedei, Y. Sato, F. Tanihara and T. Otoi. (2011) Development and subsequent cryotolerance of domestic cat embryos cultured in serum-free and serum-containing media. *Cryobiology* 63:170-174. 査読あり
- ⑩ M. Taniguchi, R. Arikawa, Y. Kaedei, F. Tanihara, Z. Namula, V. L. Viet, Y. Sato and T. Otoi. (2011) Effects of cryoprotectant agents and equilibration methods on developmental competence of porcine oocytes. *Cryo Letters* 32:410-414. 査読あり
- ⑪ Y. Sato, S. Nozawa, M. Yoshiike, M. Arai, C. Sasaki and T. Iwamoto. (2010) Xenografting of testicular tissue from an infant human donor results in accelerated testicular maturation. *Human Reprod.* 25:1113-1122. 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

- ① Y. Sato  
Application of *in vitro* spermatogenesis model. JICA program for Southeast Asia (Yamaguchi University, Yamaguchi) (2011年10月11日)
- ② 佐藤陽子  
造精機能障害を示す精巣について 脂質栄養と性差に関するオープンリサーチセンター整備事業 講演会 (金城学院大学, 名古屋) (2011年8月19日)

- ③ N. Song, T. Nishino, Y. Sato, Y. Hishikawa, T. Koji. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) on epigenetic modifications in spermatogenic cells of mouse. 第51回日本組織細胞化学会総会(秋葉原コンベンションセンター, 東京)(2010年9月4日)
- ④ N. Song, Y. Hishitaka, Y. Sato, T. Koji. Differentiation stage-specific changes of DNA methylation and histone H3 modifications in mouse spermatogenesis. 第50回日本組織細胞化学会総会(ピアザ淡海, 大津)(2009年9月26日)
- ⑤ 瀧澤敬美・石川朋子・石橋宰・後藤忠・佐藤陽子・小路武彦 荒木慶彦・瀧澤俊広(2009年9月)生殖細胞に発現しているTex101に関するin vivo ノックダウン解析の試み 第50回日本組織細胞化学会総会(ピアザ淡海, 大津)(2009年9月26日)
- ⑥ 菱川善隆・安樹才・佐藤陽子・松田賢一・河田光博・小路武彦 マウス生殖細胞アポトーシス誘導におけるミトコンドリア動態とER $\beta$ 発現の関与 第114回日本解剖学会総会(岡山理科大学, 岡山)(2009年3月29日)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 陽子 (SATO YOKO)  
山口大学・農学部・学術研究員  
研究者番号：50398963

### (2) 研究分担者

小路 武彦 (KOJI TAKEHIKO)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：30170179