

細胞培養による精子分化の調節機構の研究

Study about regulatory mechanism in sperm differentiation by cell culture

代表研究者 熊本大学理学部助教授 安部 真一
Assoc. Prof., Dept. of Biology, Faculty of Sci., Kumamoto Univ.
Shin-ichi ABÉ

協同研究者 熊本大学自然科学研究科大学院院生 宇野 修正
Grad., Student, Grad. School of Natural Sci., Kumamoto Univ.
Shuhsei UNO

熊本大学理学系大学院院生 朝倉 省二
Grad., Student, Grad. School of Sci., Kumamoto Univ.
Shoiji ASAKURA

In order to study the mechanisms that are involved in sperm morphogenesis and how the species-specific shape and size of mature sperm are determined, it would be ideal to develop a culture system which could support spermatogenesis using several species. Such an *in vitro* system, in which the type of medium, temperature etc. are identical for some species, could be used to compare spermatogenesis at the cellular and molecular levels. Since mature sperm of the newt are very different in shape and size from those of *Xenopus*, it will be attractive to compare the spermatogenesis *in vitro* between these two species. We have recently established *in vitro* spermatogenesis from the primary spermatocyte stage to the early, mid-spermatid stage for the Japanese newt, *Cynops pyrrhogaster* and for *Xenopus laevis*. We have studied (1) the mechanism of acrosome formation in *Xenopus* spermatid which were fused by hypotonic treatment, (2) the mechanism of how the flagellar length of mature sperm is determined, in comparison between newt and *Xenopus* and (3) the inhibitory effect of xanthine derivatives which increase the intracellular concentration of cAMP.

(1) Cell fusion was induced in pairs of spermatids which were derived from single secondary spermatocytes, by simple treatment of hypotonic medium. In a fused spermatid, a single acrosome was eventually formed whenever the cell fusion was induced during the course of acrosome formation in each cell. Direct observation of the process of single acrosome formation after cell fusion that was induced in spermatids which had completed acrosome formation showed that single acrosome formation occur in two patterns; one is the fusion of two acrosomes and the other is that one acrosome enlarges while the other diminishes gradually. The single acrosome formation after cell fusion of spermatids each with a complete acrosome was inhibited neither by colchicine nor cytochalasin B. These results indicate that neither microtubules nor microfilaments seem to play a role in formation of a single acrosome in a fused spermatid. That early process of acrosome formation in fused spermatids was inhibited by cycloheximide indicates that acrosomal formation is mediated by some protein(s) which were synthesized during the earlier half period of acrosome formation and might be presumably located on the surface of acrosomes.

(2) The kinetics of flagellar growth in synchronous suspension culture of round spermatids were compared between *Xenopus* and newt *in vitro*, the latter of which has about 13 times longer flagella in mature sperm than the former. In *Xenopus* the average flagellar length increased to 36 μm by the 6th day and then stopped growth, while in the newt, flagellar growth did not stop until reaching 210 μm on the 9th day. Two major differences in kinetics of flagellar growth were found between the two species. First, the initial rate of growth in the newt was about double the rate in *Xenopus*. Second, the period of flagellar growth in the newt (9 days) was about double the period in *Xenopus* (5-6 days). Actinomycin D (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) had no inhibitory effect on flagellar growth in

either species, whereas cycloheximide ($10\text{ }\mu\text{M}$) inhibited flagellar growth by more than 80% in both species. These results indicate that translational control presumably of flagellar protein synthesis plays an important role in flagellar growth in both species and in the difference in flagellar length in spermatids between *Xenopus* and newt. Next, we examined how long tubulin synthesis continues in *Xenopus* spermatids because major constituent of flagella is tubulin. ^{35}S -methionine was incorporated for 3 hr by spermatids in synchronous culture of cell suspension and 2 dimensional SDS-PAGE was performed, followed by fluorography. The results showed that the intensity of tubulin spot decreased daily and could not be detected on the 6th day when the flagellar growth stopped. In order to examine the stability of tubulin mRNA, we constructed cDNA bank in $\lambda\text{gt}11$ from testes of *Xenopus* and isolated cDNA clone of α -tubulin. We extracted mRNA from suspension culture of spermatids of *Xenopus* and newt at a constant interval and are now performing Northern blotting, using the α -tubulin cDNA as a probe.

(3) The effect of phosphodiesterase inhibitors, theophylline and IBMX, on *in vitro* meiosis of *Xenopus* and differentiation of spermatids of *Xenopus* and newt was examined. 20 mM theophylline or 4 mM IBMX inhibited progression of meiosis at diplotene stage in primary spermatocytes and interphase in secondary spermatocytes and also inhibited flagellar growth in round spermatids. The effect was reversible. It was shown that the intracellular concentration of cAMP in the presence of the inhibitor was 3–5 times higher than that in the absence. These results indicate that increase of intracellular concentration of cAMP inhibits the progression of meiosis and flagellar growth in spermatids.

研究目的

我々の体は、構造も機能も特殊化したいわゆる分化した細胞から成り立っている。その分化した細胞の中でも精子の形は特に際だっている。精子は構造的に極性を持ち先端から順に頭部、中片部、尾部から成る。頭部は受精時に必要な酵素を含む先体と、クロマチンがコンパクトに詰まった核から成る。核のすぐ後側に位置する中心小体から、運動器官であるべん毛が伸びている。このべん毛の根元に近い部分には、精子の運動のエネルギー源であるミトコンドリアがべん毛の回りをらせん状に取りまいている。この部分を中片という。中片より後側の主としてべん毛より成る部分を尾部と呼ぶ。精子は、卵と受精するという目的のために合理的な形に作られている。

精子形成の過程は便宜的に三つの段階に分けられる(図1)。第1は精原細胞が増殖して、第一精母細胞(primary spermatocytes)に分化する段階、第2は第一精母細胞が長い前期を経た後、2回の減数分裂を経て丸い精細胞(round spermatids)になる段階、第3は丸い精細胞が成熟精子(mature sperms)に分化する段階でこの第3の過程を精子完成過程(spermiogenesis)ともいう。

精子完成過程を少し詳しく述べると、精細胞にはまずゴルジ体に由来する先体胞が核膜と接してまるで核が帽子をかぶるように形成され、またべん毛も1本形成される。やがて、核が伸長するとともにクロマチンも凝縮し(ヒストンが精子特有の塩基性タンパク質に置きかわり)つつ、細胞質も細長くなる。ミトコンドリアはべん毛の基部に近い部分に集合し、最終的にべん毛をらせん状にとり囲む。余分な細胞質は、残余小体(residual body)として細胞外へ捨てられる。先体胞も分化して最終的な形をとる。このような複雑な過程を経て成熟精子ができるのだが、いったいどういう仕組でこのような形ができるのだろうか。また、精子の形は種によってまさに千差万別である。つまり精子の形は遺伝的に決まっていると思われる。それでは、どのような遺伝子産物がどのようにして精子の形と大きさを決めているのだろうか。どうして種によってべん毛の長さ、核の形と大きさ、ミトコンドリアの数、先体の形などが異なるのだろうか。

このような疑問に答えるために、いろいろな人が培養によって精子を作ることを試みてきた。培養系を使うと、生体内の複雑な作用因子や細胞間

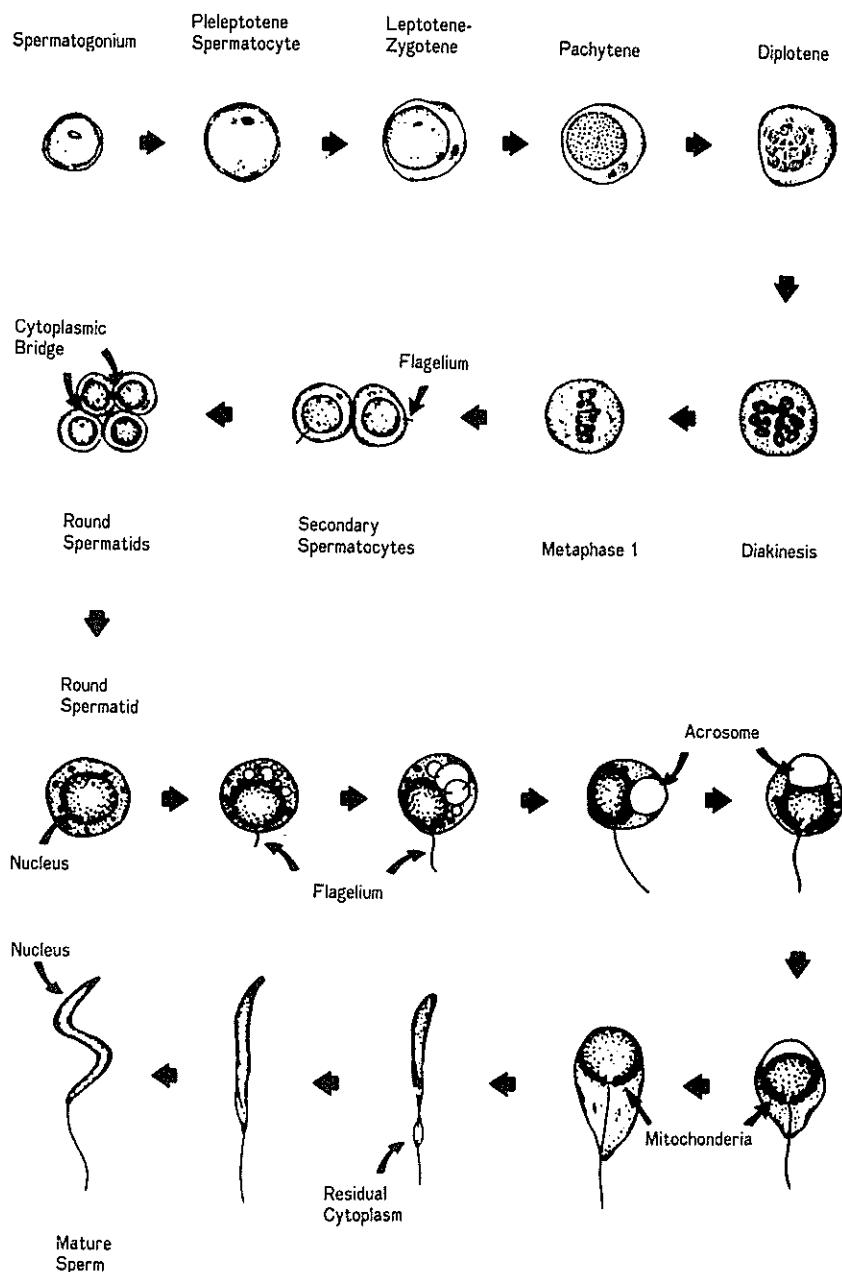


図1. アフリカツメガエル精子形成の模式図。

相互作用などから逃れて、細胞を取りまく環境を自由にコントロールできるからである。マウスやラットの精巣の器官培養を行なうと、精原細胞からパキテン期の第一精母細胞まで分化する。しか

し、その先までは進行しない。精細管を短く切って小片ごと培養するとパキテン、ディプロテニ期の精母細胞が2回の減数分裂を経て、丸い精細胞に先体が形成された。しかし、効率が悪い。精巣

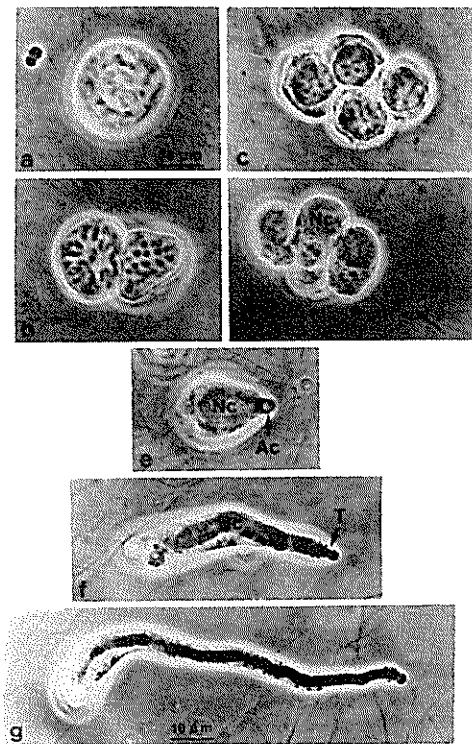


図2. 日本産アカハライモリの *in vitro* での減数分裂と精細胞でのべん毛形成、核伸長の位相差顕微鏡写真。a. 中期の第一精母細胞。b. 一対の中間期第二精母細胞。c. 4個の丸い精細胞。d. べん毛(Fl)が形成された精細胞。e-g. 先体胞(Ac)が形成され、核(Nc)が少し伸びた精細胞。

を解離して細胞培養を行なうと、ほとんど分化しない。現在のところ、最も進んだ細胞培養系は両生類である。

我々は、約10年前から日本産アカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) (以下イモリ) を材料にして、*in vitro* で精子形成の系を作ろうと試みてきた。解離した第一精母細胞を培養すると、二回の減数分裂を完了し、丸い精細胞にべん毛、先体胞、リング、ネックピースが形成されること (図2a-d)，また、解離した精細胞を培養すると、核が伸長すること (図2e-g) を直接的に証明した^{1)-3), 5), 8)}。また、最近アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) でも同様な系を確立した (図3)⁴⁾⁻⁸⁾。イモリとアフリカツメガエルは図4に示すよう

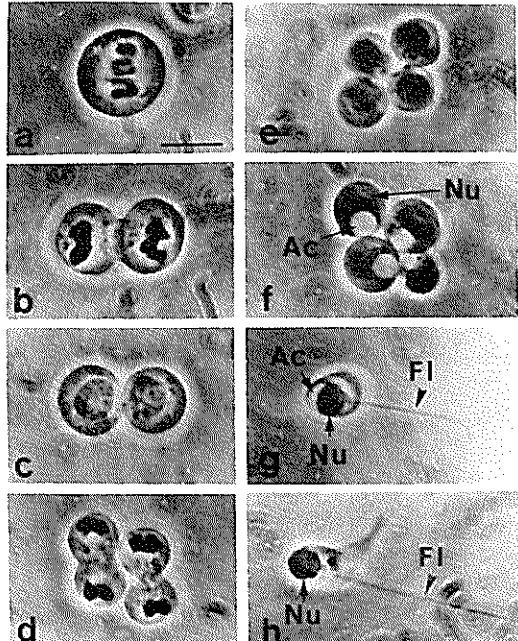


図3. アフリカツメガエル第一精母細胞の *in vitro* での減数分裂と初期、中期精子完成過程の位相差顕微鏡写真。barは10 μm。a. 中期の第一精母細胞。b. 第一終期。c. 一対の第二精母細胞の間期。d. 第二終期。e. 4個の丸い精細胞。f. 先体胞の完成した精細胞。Ac. 先体胞；Nu. 核。g. 先体胞が凝縮しつつある精細胞。Fl. べん毛。h. 丸い核が一方に極在し、細胞質が伸長した精細胞。

に精子の形も大きさも全く異なる。イモリの精子は巨大で全長約400 μmもある。頭部だけでも長さが約100 μmあり、その形は直線状である。尾部には波動膜という特徴的な構造を持つ。一方、アフリカツメガエルの精子は、全長約50 μm。頭部の長さは約20 μmで、その形はらせん状である。種を越えた普遍的な精子形態形成のメカニズムに関する問題と、種特異的な精子の形と大きさがどのようにして決まるのかという形態形成の制御に関する問題を同時に調べるには最も理想的な系であろう。

本研究は、これまでに確立したイモリとアフリカツメガエルの精母細胞の培養系を用いて精子形成の調節機構、特に精細胞におけるべん毛形成機構、先体胞形成機構や核伸長機構を解析すること

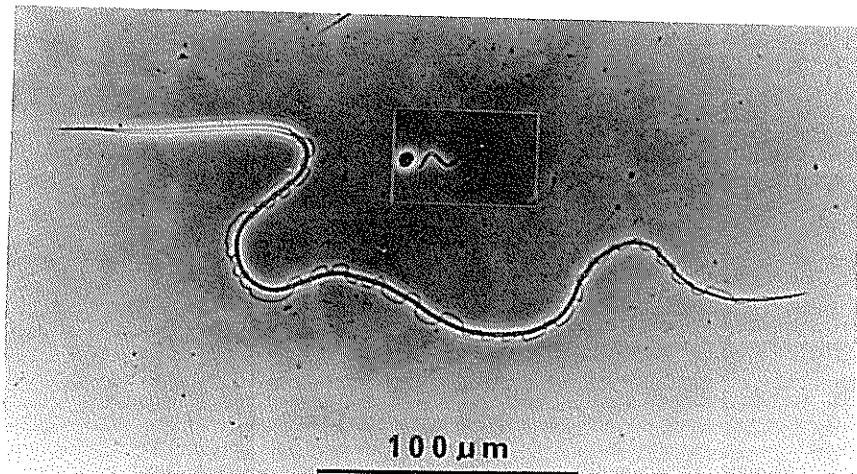


図4. 日本産アカハライモリ（下、大きい方）とアフリカツメガエル（上、小さい方）の精子の位相差顕微鏡写真。

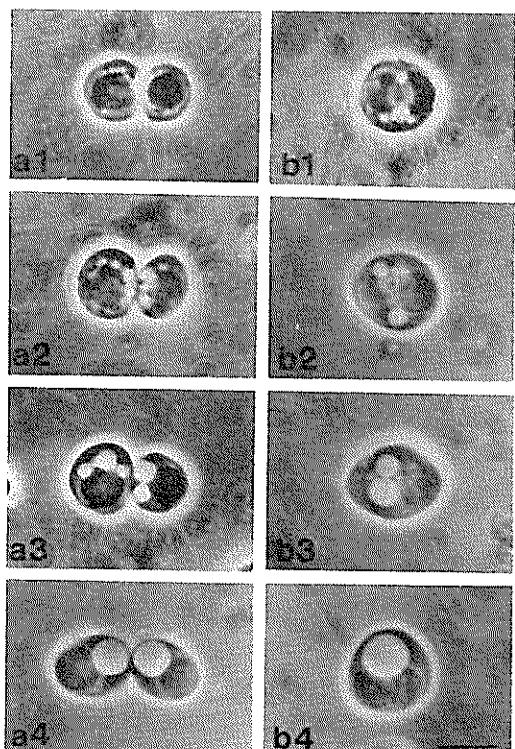


図5. アフリカツメガエルの一対の精細胞(a1-a4)と融合した精細胞(b1-b4)における先体胞形成。Barは10 μm。

を目的とする。

研究経過と成果

1. 細胞融合によるアフリカツメガエル精細胞の先体胞形成機構の解析^{9), 11)}

a. 単一の精細胞における先体胞形成過程

第一精母細胞を poly-L-lysine でコートした培養皿に接着させて 10% 牛胎児血清を含む L-15 培地で培養した（図 3）。中期の第一精母細胞（図 3a）は、2-3 時間以内に第一分裂を完了し、一対の第二精母細胞となる（図 3c）。約 1 日たつと第二分裂も完了し、4 個の精細胞となる（図 3e）。やがて短いべん毛が細胞当たり 1 本ずつ形成される。たくさんの小さな vesicle が細胞質中に現れる（図 5a1）。この vesicle は数が減少するとともに大きさが増し（図 5a2-3），第二分裂後 1-1.5 日で核とほぼ同じ大きさの先体胞が 1 個形成される（図 5a4）。1 週間もするとこの先体胞はだいに小さくなり（図 3g），やがて位相差顕微鏡では存在が識別できなくなってしまう（図 3h）。とともに細胞質は細長くなり、丸い核は細胞の片側に極在するようになる（図 3h）。

b. 低張培養液による精細胞の細胞融合

我々は、単一の第二精母細胞に由来する対になった精細胞は、培養液の浸透圧を落とすだけで簡単に細胞融合することを見いだした（図 6）。通常用いる 70% L-15 を 50-40% に変えると、細胞

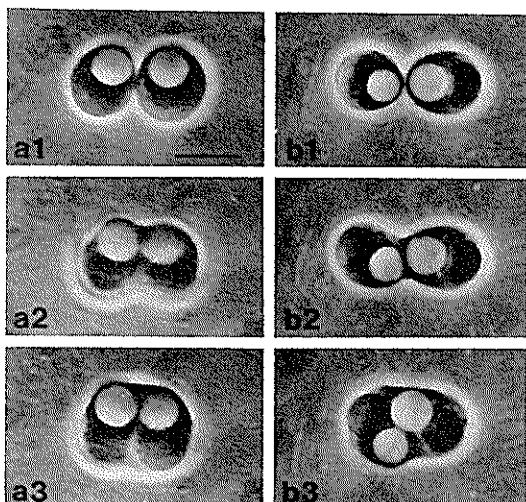


図6. 低張培養液によるアフリカツメガエル精細胞の細胞融合過程(a1-a3とb1-b3). Barは10 μm.

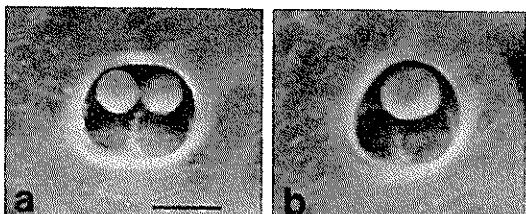


図7. アフリカツメガエル融合精細胞での単一先体胞の形成。a, 形成前; b, 形成後。Barは10 μm.

は直ちに直径が10-30%膨潤し、2-3分以内に90%の細胞が融合した(図6)。これは対の精細胞間に存在する細胞質連絡(cytoplasmic bridge)が低張処理によって破壊されたために起こるものと思われる。

c. 融合精細胞における単一先体胞の形成

融合した精細胞のほとんどにおいては、2-3日後観察すると2個あった先体胞が元より大きな1個の先体胞に変わっていた(図7)。そこで先体胞形成過程のいろいろな段階で融合させてその後の形成過程を調べた(図8)。第二分裂直後に融合させると、2日目に約50%の、3日目には90%以上の融合精細胞で单一の先体胞が形成された。各精細胞に中くらいの大きさのvesicleが2-3個形成

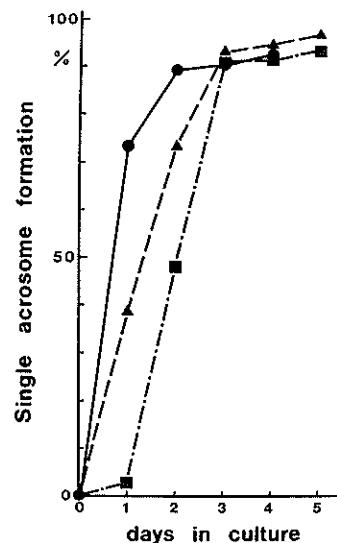


図8. いろいろな時期に細胞融合した精細胞での単一先体胞の形成率。

■: 第二分裂直後に融合; ▲: 中くらいのサイズの小胞ができる後、融合; ●: 各精細胞に完全な先体胞ができる後、融合。

されたところ融合させると1日目で40%、2日目で約75%、3日目で90%以上の融合精細胞で单一の精細胞が形成された。それぞれの精細胞に先体胞が完成した後に融合させると1日で70%以上の細胞に单一先体胞が形成された。このように細胞融合がいつ起こるかに関係なく最終的に单一の、元より大きな先体胞が形成された。

d. 連続観察による单一先体胞形成過程の観察

各々の先体胞が完成した精細胞対を融合させた後、单一先体胞が形成される過程をビデオレコーダーで7例記録した。5例は細胞融合して数時間後に、近接した二つの先体胞が融合を始め約5秒以内に完了した(図9上段)。しかし、残りの2例は、異なるプロセスをたどった。二つの先体胞のうち一つは徐々に小さくなり、他の一つは逆に徐々に大きくなり最終的に单一の先体胞になった(図9下段)。後者の場合が、ゆっくりとした先体胞の融合なのか、あるいは一方が他方を吸収してしまうのか、現在のところ明らかでない。

e. 先体胞形成に関する要因の解析

融合精細胞における单一の先体胞形成にマイク

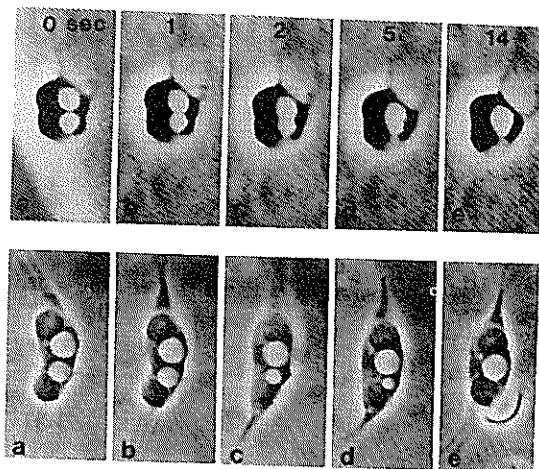


図9. 融合精細胞における単一先体胞の形成過程。
上段、2個の先体胞が融合する過程；下段、一方の先体胞だけが大きくなり他方は消失する過程。

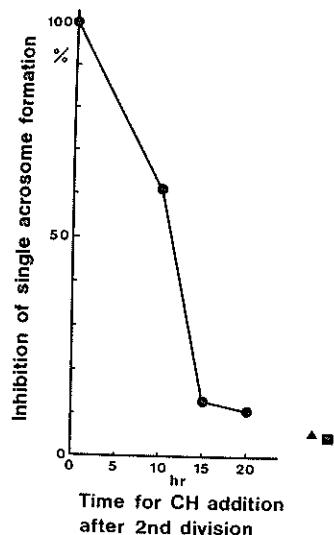


図10. 第二分裂直後に細胞融合をおこし、10, 15, 20 時間後に cycloheximide を与えた時の單一先体胞の形成阻害率。■、コントロール；▲、完全な先体胞ができた後、細胞融合をおこし cycloheximide を与えた時の阻害率。

ロフィラメントや微小管が関与しているかどうかを調べるために、各々の先体胞が完成した精細胞対を融合させた後、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のサイトカラシン B や $100 \mu\text{M}$ のコルヒチンを加えたが、阻害効果はみられなかった。この結果から、融合精細胞にお

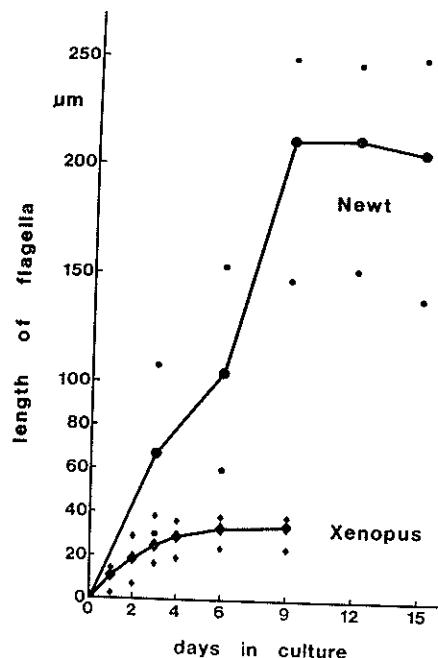


図11. 精細胞の同調培養におけるべん毛成長過程のイモリとアフリカツメガエルでの比較。第二分裂直後を 0 日にとどめてある。実線は平均値、小さい丸やひし形はその時点での最大値と最小値。

いて、単一先体胞の形成にマイクロフィラメントも微小管も関与していないことが示唆された。次にタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドの効果を調べた（図10）。第二分裂直後の精細胞対を融合させ、ただちに $10 \mu\text{M}$ のシクロヘキシミドを投与すると小さな vesicle はたくさんできるものの 3 日後でも先体胞はできなかった。シクロヘキシミドを投与する時刻を遅くしていくと单一先体胞形成の阻害率は急速に減少し、15 時間後では約 10% になった。この結果は、先体胞形成には、第二分裂後約 10 時間以内に合成されるタンパク質が必要であることを示唆している。

2. 精子のべん毛の長さの調節^{7), 10), 13)}

a. イモリとアフリカツメガエルの培養精細胞におけるべん毛成長の比較

イモリ精子のべん毛とアフリカツメガエル精子のべん毛は長さが 13 倍も異なるためべん毛の長さの調節機構を調べるのに良い系である。そこで

Table I. アクチノマイシン D とシクロヘキシミドによるイモリ、アフリカツメガエル精細胞のべん毛成長の阻害率。

	<i>Cynops p.</i>		<i>Xenopus l.</i>
	5 days	10 days	5 days
AcD (10 µg/ml)	16.4% (95 PCs)*	-4.1% (83)	4.5% (68)
CH (10 µM)	84.1% (92)	88.7% (76)	76.3% (72)

* total cell number of primary spermatocytes which underwent two meiotic divisions to give round spermatids in 3 separate experiments.

まず同じ温度、同じ培養液で両種の精細胞を培養したときべん毛成長に違いがみられるかどうかを調べた。

イモリ、アフリカツメガエルそれぞれの精巢をコラゲナーゼで解離し、10%のメトリザマイドに重層して遠心すると精母細胞、精細胞分画を得る。これを2-4%の BSA (bovine serum albumin) gradient にかけて精母細胞と精細胞を分けることができる。精母細胞を70% L-15 medium で2-3日培養すると減数分裂を完了した精細胞が出現する。そこでもう一度 BSA の gradient で精母細胞と精細胞を分離する。この同調した均一な精細胞を数日間培養し、細胞に生えたべん毛の長さを経時的に測定した。その結果(図11)、アフリカツメガエルではべん毛は6日までに平均36 µm 伸長して停止した。この長さはアフリカツメガエルの成熟精子のべん毛の長さとほぼ等しい。一方、イモリではべん毛は9日までに平均210 µm 伸長して停止した。これはイモリの成熟精子のべん毛の半分の長さである。イモリとアフリカツメガエルのべん毛伸長の kinetics を比べると二つの違いがみられる。一つは伸長速度の差であり、イモリが2-3倍速い。もう一つはべん毛の成長する期間であり、イモリが約2倍である。その結果としてべん毛の長さに約6倍の差が生じた。伸長速度の差はおそらく細胞内の翻訳装置の量的な違いによるものと思われる。成長期間の差はチューブリン遺伝子の転写の期間の差、チューブリン mRNA の安定性の差、翻訳の inhibitor が働く時期の差、などが考えられる。

b. 精細胞でのべん毛成長は転写レベルでの調節によるものか、あるいは翻訳レベルでの調節によるものか。^{7, 10}

イモリ、アフリカツメガエルの精細胞を培養し、転写阻害剤である10 µg/ml のアクチノマイシン D を加えてもべん毛成長の阻害はみられなかった(Table 1)。それに対し、翻訳阻害剤である10 µM のシクロヘキシミドを加えるとイモリもアフリカツメガエルも長さにして約80%以上の阻害がみられた。この結果からイモリもアフリカツメガエルも精細胞でのべん毛伸長は翻訳レベルで調節されているものと思われる。

c. 精細胞によるチューブリン合成の解析¹³⁾

そこで次に、べん毛伸長に必要なチューブリンの合成が何日まで起こっているのかを調べた(図12)。上に述べた方法で、同調した均一なアフリカツメガエルの精細胞を培養し、経時的に 500 µCi の ³⁵S-methionine を取り込ませた後、2次元電気泳動、フルオログラフィーを行なった。その結果、チューブリン合成は日を追って減少していく6日目には検出できなくなった。これは、べん毛成長が停止する時期と一致する。

d. アフリカツメガエル精巢の cDNA バンクの作成と α -チューブリン cDNA のクローニング (国立岡崎共同機構基礎生物学研究所江口研究室との共同研究)¹³⁾

アフリカツメガエル精巢から RNA を抽出し、mRNA 分画に対する cDNA バンクを λgt11 で 35 万クローニング作成し、 α -チューブリンに対する抗体を用いてスクリーニングした。15 個のポジ

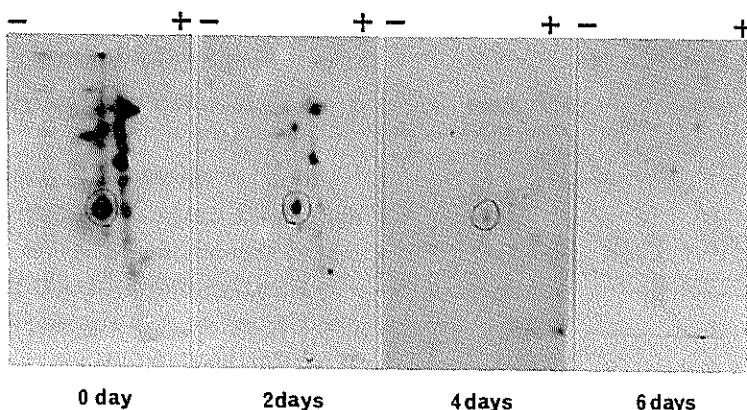


図12. アフリカツメガエル精細胞の同調培養でのタンパク質合成。500 μCi の 35 S-methionine を取り込ませた後、2次元電気泳動、フルオログラフィーを行った。黒丸で囲ったところがチューブリンのスポット。

10	20	30	40	50	60	70
XENOPUS	CAAAACCAACTTGGTGCATTCCACCGCATCCATTTCCTGTGTTCTATGCTCCAGTTATCTCCGCTGAG					
a.a.	GlnThrAsnLeuValProPheProArgLysIlePheProValSerTyrAlaProValIleSerAlaGlu					
CHICKEN		Tyr			LeuAlaThr	
RAT		Tyr			LeuAlaThr	
80	90	100	110	120	130	140
	AGAGCTTACCATGAGAACGTTTCCATAGCTGAGATAACAAATGCTTGCTTGGCCAGCTAACCCAGATGGTC					
	ArgAlaTyrHisGluIleLeuSerIleAlaGluIleThrAsnAlaCysPheGluProAlaAsnGlnMetVal					
Lys	Gln	Val				
Lys	Gln	Val				
150	160	170	180	190	200	210
	AAATGTAACCCCCAAATGGAATGATCATGGCTTGCTGTATGCTCTACCCGTGGTATGTTGCCAAACGGGTTT					
	LysCysAsnProArgLysGlyLysTyrMetAlaCysCysMetLeuTyrArgGlyAspValValProLysAsp					
	Ala		Leu			
	Nis		Leu			
220	230	240	250	260	270	280
	GTCATATGTTGCCATTGGCAAGCATCAAATCCAAGCCACTATCCAGTTTGCTGACTGGTGCCTAACGGGTTT					
	IleAlaAlaAlaAlaAlaSerIleLysSerLysArgThrIleGlnPheValAspTrpCysProThrGlyPhe					
	Ala	Thr	Thr			
	Ala	Thr	Thr			
300	310	320	330	340		
	###TTGGCTACTACT###CCGCCACTGTGGT####CTG###GACCAAGCCCAGATGCAAGCGTGTG					
	Lys###IleGlyTyrTyr###ProProThrValVal###Leu###AspGlnAlaGlnMetGlnArgAlaVal					
	ValGlyIleAsnTyrGln	ProGlyGly	Leu	LysVal		
	ValGlyIleAsnTyrGln	ProGlyGly	Leu	LysVal		
360	370	380	390	400	410	420
	TCGATGTTGAGCAACACCACGGCCATTGGCTGAGGCCCTGGCTCTGGATCACAAAGTTGACCTTATGAT					
	CysMetAlaSerAsnThrThrAlaIleAlaGluAlaTrpAlaArgLeuAspNisLysPheAspLeuMetTyr					
430	440	450	460	470	480	490
	GCTAACGCTGCCCTTGCGACTGGTATGTAAGGGAGGGAAATGGAGGAAGGGAGCTCTCCGAGGCCGTGAA					
	AlaLysArgAlaPheValNisTrpTyrValGlyGluGlyMetGluGlyGluPheSerGluAlaArgGlu					
500	510	520	530	540	550	
	GATATGGCTGCCCTGGAAAAAGATTATGATGAGATGGCTTGCTGACTATGCTG#####GAGGAGGAG					
	AspMetAlaAlaLeuLysAspTyrAspGluIleAlaCysAspTyrVal###GluGluGlu					
	Glu	ValGlyVal	Ser	GluGluGluGly		
	Glu	ValGlyVal	Ser	GluGluGluGly		
560	570	580	590	600	610	620
	GATGGAGAAGGCTTAATTCATGAAATGAAATAATATTATATACTACTAGTAATTGCTGGTTAGAGCA					
	AspGlyGluGluAla---					
	###	Tyr				
	###	Tyr				
630	640	650	660	670		
	ACATAGCAAGATTACTGGATACTGCAATTAGAATTCTCTATAG					

図13. アフリカツメガエル精巢のcDNA バンクより単離した α -チューブリン cDNA のクローン。

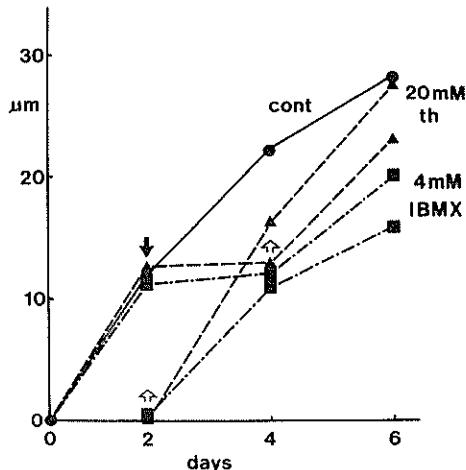


図14. アフリカツメガエル精細胞のべん毛成長に対する theophylline と IBMX の阻害効果。下向きの矢印はその時点で阻害剤を与えたことを、上向きの矢印は洗ったことを表す。

ティブクローネのうち、1個のクローネ(670 bp)の塩基配列を調べたところ、ラットやニワトリの α -チューブリンと相同であることが判明した(図13)。これをプローブとして現在、ノザンブロッティングによってチューブリン mRNA の安定性について解析中である。

3. 細胞内の cAMP 濃度の上昇による精子形成の阻害^{14), 15)}

a. アフリカツメガエルの *in vitro* 精子形成過程に及ぼす theophylline と IBMX の阻害効果¹⁴⁾

アフリカツメガエル精母細胞の *in vitro* での減数分裂に及ぼす cyclicAMP の効果を調べるために、phosphodiesterase の阻害剤の効果を調べた。いろいろなステージの細胞に 20 mM の theophylline と 4 mM の IBMX をそれぞれ加えた結果、第一精母細胞のディプロテン期以前と第二精母細胞間期の段階で阻害効果がみられた。その効果は可逆的であった。早稲田大学教育学部生物学教室石居研究室との共同研究により、第一精母細胞内の cAMP 濃度を測定すると 20 mM theophylline を加えた方が加えない場合より約 5 倍高いことが明らかになった。これらの結果より、精母細胞の段階で、細胞内 cAMP の上昇が阻

害効果をもつことが示唆された。

b. アフリカツメガエルとイモリの精細胞のべん毛伸長に及ぼす theophylline と IBMX の阻害効果¹⁵⁾

同様にして精細胞のべん毛伸長に対する theophylline と IBMX の効果を調べた(図14)。20 mM の theophylline と 4 mM の IBMX をそれぞれ第二減数分裂直後、および 2 日後の精細胞に投与したところ、いずれの場合もべん毛の伸長は長さにして 60~90% 阻害された。この効果は可逆的であった。早稲田大学石居研究室との共同研究により精細胞内の cAMP 濃度を測定すると 20 mM の theophylline を加えた方が加えない場合より約 3 倍高かった。これらの結果より、細胞内 cAMP 濃度の上昇が精細胞のべん毛伸長に対して阻害効果をもつことが示唆された。

今後の課題と発展

1. 精細胞における先体胞形成

光学顕微鏡及びビデオを用いた観察によって先体胞形成過程を直接的に調べ、そのプロセスには小胞同士の融合と一方の小胞のみの肥大化の 2 通りあることを明らかにした。後者の場合が緩慢なる融合なのかあるいは一方が他方を吸収するのか、現在のところ不明である。今後、より詳細な光学顕微鏡および電子顕微鏡による観察が必要である。

タンパク質合成阻害剤を投与した実験から先体胞形成は、2段階で進むものと思われる。第1の段階はゴルジ装置から小さな小胞が形成される過程で、これはシクロヘキシミドで阻害されない。したがって、タンパク質合成を必要としない段階である。これに対し、第2の段階は、小胞が一つの先体胞に合一されていく過程で、これは、シクロヘキシミドで阻害される。したがって、タンパク質の合成が必要な段階である。上に述べたように、先体胞は小胞の相互作用によって形成されると思われる所以、このタンパク質はおそらく合成された後、小胞の表面に移動し、そこに留まるものと考えられる。今後、このタンパク質を同定することが一つの課題である。現在、精細胞および成熟精子を抗原として先体胞のモノクローナル抗

体を作成中である。もし、抗原を同定することができれば、そのタンパク質をコードする mRNA の cDNA を単離し、先体胞形成に関わる遺伝子がいつごろ、どのように発現してくるのかを調べていく予定である。

2. 精細胞におけるべん毛成長の調節

精細胞におけるべん毛成長においては、イモリもアフリカツメガエルも培養系において平均長で約 6 倍の違いを示した。したがって、*in vitro* でべん毛成長の分子機構を調べる優れた系であることが明らかになった。その速度論をイモリとアフリカツメガエルで比較すると、成長速度でイモリがアフリカツメガエルの 2~3 倍、成長期間でイモリがアフリカツメガエルの約 2 倍を示した。成長速度の差はおそらくタンパク質合成装置の量的差によるものと考えられる。今後この点を調べるために、イモリとアフリカツメガエルの精細胞から RNA を抽出し、オリゴ dT カラムで流出した分画をアガロース電気泳動にかけ、rRNA プローブを用いて rRNA の量を比較する予定である。また、成長期間の差はべん毛成長に必要な遺伝子が転写され続ける期間に違いがあることがまず考えられるが、転写阻害剤であるアクチノマイシン D を与えてもべん毛成長に対する阻害効果がないため、その可能性は否定された。次の可能性として、べん毛成長に必要な mRNA の安定性の違いや翻訳装置が失活するかあるいは細胞から失われる時期の違いが考えられる。べん毛成長には多くのタンパク質の合成が必要であるが、まず最も多量に必要なチューブリンの合成を経時的に調べた。現在、アフリカツメガエルについての結果しか得られていないが、おもしろいことには、べん毛成長が停止する 6 日目には、チューブリンの合成もほとんど検出されなくなることが分かった。現在、イモリについてもチューブリンの合成が何日まで起こるかを調べているが、もしイモリではアフリカツメガエルより長い期間チューブリンの合成が続くことが明らかになれば、mRNA の安定性の違いや翻訳装置の失活の可能性がつよく示唆されるであろう。そこで次はイモリとアフリカツメガエルの精細胞におけるチューブリン mRNA の安

定性を調べるために、精細胞の同調培養から経時に RNA を抽出し、チューブリン cDNA によるノザンプロッティングを行なう必要がある。その準備として、基礎生物学研究所の江口研究室との共同研究によってアフリカツメガエル精巢の cDNA バンクを作成し、 α -チューブリン cDNA をクローニングした。現在これを用いて精細胞から抽出した RNA とのノザンプロッティングを行なっている最中である。もし、RNA の安定性に違いがみられるようであれば、次は cell-free 系でも差がみられるかどうかを調べたい。もし、RNA の安定性に差がみられなければ、翻訳装置の失活について調べることになるだろう。このようにべん毛成長の調節について、分子生物学を展開していく予定であり、必ず興味ぶかい結果が得られるものと確信している。

3. cAMP と精子形成

精子形成のいろいろな段階が phosphodiesterase の阻害剤によって阻害される事が明らかになった。早稲田大学の石居研究室との共同研究によって、阻害剤を投与したとき、細胞内の cAMP 濃度が上昇することも証明された。これまでいろいろな種において、*in vitro* の卵形成が cAMP によって阻害されることが知られているが精子形成が cAMP によって阻害されることとは新しい発見である。現在、細胞内 cAMP の上昇によってタンパク質合成に量的なあるいは質的な違いが生じるのかどうかをフルオログラフィーによって調べている最中である。cAMP 依存キナーゼによるタンパク質のリン酸化が起こっているのかどうか、起こっているとすればどのタンパク質に起こっているのか調べていくつもりである。

4. おわりに

1.~3. に述べてきたように、日産研究助成金のご援助のもとに主として精細胞における先体胞形成機構、べん毛成長機構と cAMP による精子形成の阻害について一定の成果を挙げたものと自己評価している。今後、さらに 1~3 の仕事を細胞レベルから cell-free 系へと押し進め、精子形成の調節機構を分子レベルで明らかにしたいと考えているが同時に別の二つのアプローチからも仕事

を進めたいと考えている。

その一つはハプロイドにおける遺伝子発現の問題である。哺乳類では培養系は進んでいないが、ハプロイドにおいて遺伝子発現が起こることが明らかにされている。ニワトリや魚においてもプロタミン遺伝子はハプロイドで発現することが報告されている。そこで、イモリやアフリカツメガエルにおいてもハプロイドにおける遺伝子発現が起こるかどうかを調べるためにハプロイドのcDNAバンクを作る予定である。ハプロイドcDNAバンクと精母細胞のmRNAとをハイブリダイズすることによりハプロイドのみで発現している遺伝子を単離することができるであろう。その遺伝子によってコードされているタンパク質を同定し、その抗体を作り、細胞内のどこにあるか、形態形成に伴って、どのように場所が変化するかを調べるというアプローチは、精子形成の調節機構を知る上で一つの有力なものであろう。将来、イモリとアフリカツメガエルの精細胞で発現するいろいろな遺伝子が明らかにされたならば、イモリとアフリカツメガエルのユニークな培養系を使ってその遺伝子を交換して注入し、精子の形態がどのように変わることかを調べることはたいへん興味深いことであろう。

もう一つのアプローチはMAPs(Microtubule-Associated Proteins)である。減数分裂後、精細胞においてはまず鞭毛が生えそれが最大長まで伸びた後、核の回りに微小管が配列して核が伸長し始める。つまり、これは微小管の時間的、空間的な重合、配列の制御ととらえることができる。このような制御を担う因子の候補としてはMAPsが有力であろう。そこで、精母細胞、丸い精細胞、核の伸長しつつある精細胞を分離し、牛脳の純化チューブリンをキャリアーとしてそれぞれのセルタイプからMAPsを分離する。セルタイプに特異的なMAPsがありそうだったらこれを純化し、抗体を作り、所在を調べる。その遺伝子発現や翻訳機構を調べていくことは、精子の形態形成の調節を明らかにする一つの有力な方向であろう。

謝 辞

本研究は日産科学振興財団からの研究助成を受けて行なわれたものである。ここに、同財団選考委員および本研究を推薦していただいた日本動物学会に深く感謝いたします。時期的にも培養系を確立し、分子レベルでの仕事を始めたいと思っていたころ、タイミング良く助成金をいただくことができてたいへん幸いであった。この助成金のお陰で研究を大きく発展させることができたと思うし、今後もさらに仕事を発展させるべく努力をするつもりである。本研究を進めるに当たり、基礎生物学研究所の江口吾朗教授と阿形清和博士、早稲田大学の石居進教授と窪川かおる博士の大いなるご協力を賜った。ここに深く感謝の意を表する次第である。

発表論文

- 1) 安部真一: 細胞培養による精子形成、一培養皿の中で精子をつくる、遺伝(裳華房), 41(7), 6-13 (1987).
- 2) Abé, S.-I.: *In Vitro Meiosis and Early, Mid-Spermiogenesis in Culture of Dissociated Primary Spermatocytes from Amphibians*. In "New Horizons in Sperm Cell Research" (ed. by H. Mohri), Japan Scientific Societies Press, pp. 47-53 (1987).
- 3) Abé, S.-I.: Differentiation of Spermatogenic Cells from Vertebrates *In Vitro*. *Int. Rev. Cytol.*, 109, 159-209 (1987).
- 4) Abé, S.-I. and S. Asakura: Progression of Meiotic Divisions and Early, Mid-Spermiogenesis in Primary Spermatocytes from *Xenopus laevis* *In Vitro*. *Zool. Sci.*, 4(5), 839-847 (1987).
- 5) 安部真一, 桑名貴, 藤本十四秋: 精巣, In "器官形成", 12章, pp76-90, 培風館(1988).
- 6) Abé, S.-I., S. Asakura and A. Ukedo: Flagellar Formation during Interphase of Secondary Spermatocytes from *Xenopus laevis* *In Vitro*. *J. Exp. Zool.*, 246(1), 65-70 (1988).
- 7) Uno, S. and S.-I. Abé: How is the Flagellar Length of Mature Sperm Determined? I. Comparison of Flagellar Growth in Spermatids between Newt and *Xenopus* *In Vitro*. *Exp. Cell Res.*, 176(1), 194-197 (1988).
- 8) Abé, S.-I.: Cell Culture of Spermatogenic Cells from Amphibians. *Dev. Growth & Differ.*, 30(3), 209-218 (1988).
- 9) Asakura, S. and S.-I. Abé: Synacrosomal Formation after Cell Fusion of Round Spermatids

of *Xenopus laevis*. Exp. Cell Res., (1989) in press.

口頭発表

- 10) 宇野修正, 安部眞一: 精子のべん毛の長さはどのように調節されているか。I. 一イモリとゼノパスの比較. 第58回日本動物学会大会(1987), 富山.
- 11) 朝倉省二, 安部眞一: 培養ゼノパス精細胞の先体胞形成に対する cycloheximide (CH) の効果. 第58回日本動物学会大会(1987), 富山.
- 12) Abé, S.-I.: In Vitro Meiosis and Early, Mid-Spermiogenesis in Culture of Dissociated Primary Spermatocytes of Amphibians. Gordon Research Conference on "Fertilization and Activation of Development", held at Holderness School, Plymouth, NH, during Aug. 17-21 (1987).
- 13) 宇野修正, 阿形清和, 江口吾朗, 安部眞一: 精子のべん毛の長さはどのように調節されているか。II. *Xenopus* 培養精細胞における tubulin 合成と tubulin mRNA の安定性. 第21回日本発生物学会大会(1988), 山形.
- 14) 朝倉省二, 嶽川かおる, 石居 進, 安部眞一: ゼノパスの *in vitro* 精子形成過程に及ぼす theophylline と IBMX の阻害効果. 第59回日本動物学会大会(1988) 札幌.
- 15) 宇野修正, 日吉裕展, 朝倉省二, 嶽川かおる, 石居 進, 安部眞一: ゼノパスとイモリの培養精細胞のべん毛伸長に及ぼす theophylline と IBMX の阻害効果. 第59回日本動物学会大会(1988) 札幌.