

- Doege, K. (1998) *Osteoarthritis Cartilage*, 6, 245-251.
- 10) Sugahara, K., Mikami, T., Uyama, T., Mizuguchi, S., Nomura, K., & Kitagawa, H. (2003) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 13, 612-620.
- 11) 渡辺秀人, 木全弘治 (2005) 未来を拓く糖鎖科学 (永井克孝監修, 川壽敏祐編), 金芳堂, 京都.
- 12) Izumikawa, T., Uyama, T., Okuura, Y., Sugahara, K., & Kitagawa, H. (2006) *Biochem. J.*, 403, 545-552.
- 13) Kluppel, M., Wight, T.N., Chan, C., Hinek, A., & Wrana, J.L., (2005) *Development*, 132, 3989-4003.
- 14) Uyama, T., Ishida, M., Izumikawa, T., Trybala, E., Tufaro, F., Bergstrom, T., Sugahara, K., & Kitagawa, H. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 38668-38674.
- 15) Sakai, K., Kimata, K., Sato, T., Gotoh, M., Narimatsu, H., Shinomiya, K., & Watanabe, H. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 4152-4161.

渡辺 秀人

(愛知医科大学分子医科学研究所)

Aggrecan and its chondroitin sulfate in cartilage

Hideto Watanabe (Institute for Molecular Science of Medicine, Aichi Medical University, Karimata 21, Yazako Nakakute, Aichi, 480-1195, Japan)

ほ乳類精子形成幹細胞研究の展開と展望

1. はじめに

ほ乳類の精子形成幹細胞研究は近年注目を浴びている。本稿では、組織形態学・精子形成幹細胞の移植・*in vitro*での幹細胞培養・*in vivo*での幹細胞の運命追跡・*in vivo*でのイメージングと、主に実験・観察技術の観点からこの分野の研究を概観する。原則としてマウスを用いた研究を紹介する。

2. 精巣の形態学的観察と幹細胞システムのモデル

ほ乳類の精子形成は、精巣のなかで複雑に折れ曲がる直径約 200 μ m の精細管の中で進行する。精細管の基本構造は、基底膜とその内側を覆うセルトリ細胞および外側の筋様細胞 (ともに体細胞) であり、生殖細胞はセルトリ細胞の間に埋まっている。幹細胞を含む精原細胞 (体細胞分裂の段階) は基底膜上に位置し、精母細胞 (減数分裂期)、精子細胞 (半数体) の順に内腔側に向かって配列する (図 1)。成熟精子は精細管内腔に放出され、精巣網、精巣上

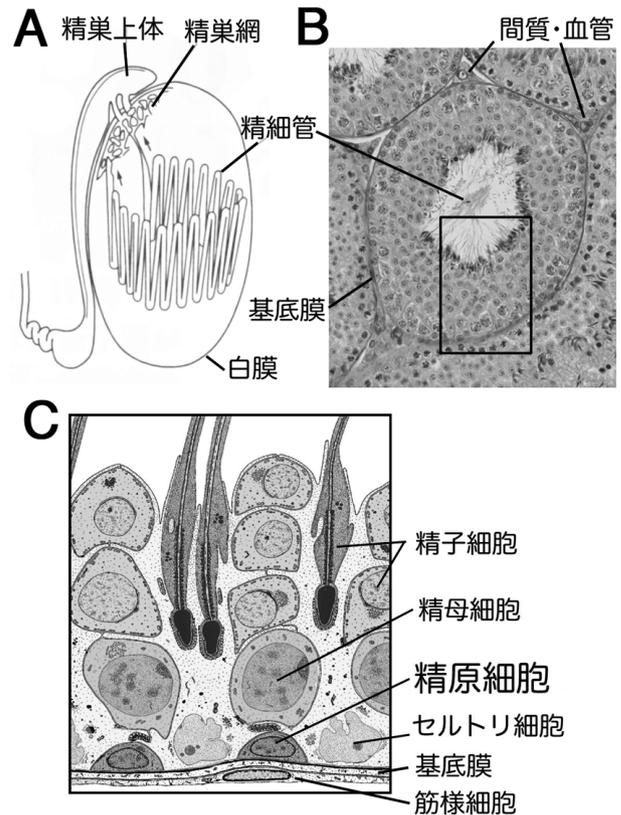


図 1 マウス精巣の構造と精子形成

(A) 精巣の全体像。文献 18 より改変。(B) 切片のヘマトキシリン-エオジン染色像。(C) 精細管上皮の模式図。B の四角部分に対応する。文献 1 より改変。精細管の中で基底膜に接して存在する精原細胞の一部が未分化型精原細胞であり、その更に一部が幹細胞である。

体、輸精管を経て体外へ射出される。精子形成幹細胞は、基底膜を埋め尽くしている精原細胞の中のごく少数を占めるに過ぎない。精細管の外側は血管とライディッヒ細胞 (男性ホルモン産生細胞) をはじめとする間質が埋めている¹⁾。

1950 から 70 年代にかけて、切片やホルマウント精細管標本の形態 (主に染色した核形態) の詳細な観察から精子形成の大筋が明らかにされ¹⁾、精細管上皮の周期性が記載された²⁾。このころ、どの細胞が幹細胞で、どのように機能するのかについていくつかの説が提出された。現在、「未分化型精原細胞」と総称される少数の (精巣全体の 1% 以下) 未熟な核形態を示す細胞の中に幹細胞が含まれることが分かっている。未分化型精原細胞は、単独で存在する細胞 A_{single} (A_s)、二つの娘細胞が不完全細胞質分裂により連結した A_{paired} (A_{pr}) および 4, 8 あるいは 16 の細胞が連結

した鎖の $A_{aligned}$ (A_{al}) からなる。この中の幹細胞の正体についてもいくつかの説が出された³⁾が、現在は A_s が幹細胞であるという「 A_s モデル」が主流となっている⁴⁾。しかし、「長期間にわたり自分自身を維持しつつ分化細胞を産み出す、未分化な細胞集団」である幹細胞を正しく評価・同定することは固定標本の観察からは原理的に不可能であり、時間を越えて細胞の挙動を追う実験系が不可欠であった。

3. 精細管内移植法による幹細胞の検出

ブレイクスルーは、1994年 Brinster らによって開発された精細管内移植による精子形成再構成コロニー形成アッセイであった(文献5, 図2A)。この系は、機能にもとづいた幹細胞の検出を可能とした。現在にいたるまで、精子形成は、移植後のコロニー形成によって幹細胞とその分化能

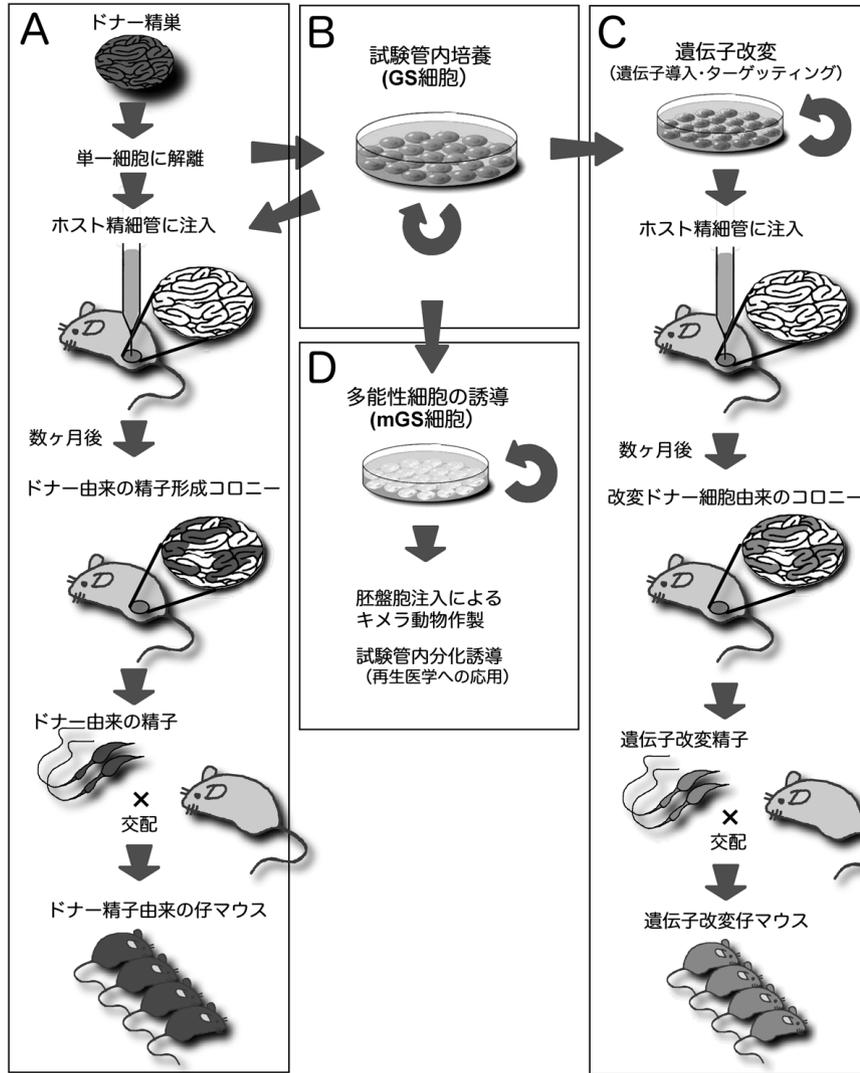


図2 精子形成幹細胞の移植, *in vitro* 培養と発生工学的応用

(A) 移植による精子形成の再構成。ドナー精巣を単一細胞に解離して生殖細胞を除去したホスト精細管内に注入すると、精子形成コロニーを形成する幹細胞が検出できる。コロニーではドナー由来の精子が作られ、メスと交配すればドナー精子由来の個体が得られる⁵⁾。(B) 精巣を単一細胞に解離した後、コロニー形成能を維持したまま長期間培養することが可能となっている(GS細胞:文献7)。(C) GS細胞培養条件下で遺伝子改変を行った後にホスト精細管に移植することにより、遺伝子改変精子を介して遺伝子改変動物を作製できる¹⁰⁾。(D) GS細胞のなかから、多分化能を持つmGS細胞が得られる。胚盤胞注入によりキメラ動物に寄与するとともに、*in vitro* で種々の細胞に分化することから再生医学への応用が期待される¹¹⁾。

を定量的に解析できる造血系以外た一つの系である。造血系でそうであったように、移植後のコロニー形成を指標にした、いくつかのマーカーを用いて幹細胞を濃縮・純化する研究が進んだ。幹細胞活性が未分化型精原細胞に濃縮することが分かり、形態学的観察を裏付けた⁶⁾。しかし未分化型精原細胞を更に分画すること(例えばA₁だけを集めるなど)は実現しておらず、今のところは、未分化型精原細胞が「実験的に幹細胞能を持つことが示された最小の集団」ということになる。精細管内移植法は、幹細胞についての多くの知見を明らかにしたほか、異種動物の精子の生産への応用が期待されている。

精細管内移植は、原則として生殖細胞を除去した宿主を用いており、細胞の自己複製能を最大限発揮できるようにデザインする。即ち、幹細胞としての能力を持つ細胞を検出する系ということが出来る。

4. 幹細胞の試験管内培養

次の大きなブレイクスルーは、幹細胞能を維持したままの長期間培養が可能となったことである。これは、基礎応用を問わず精子研究の長年の夢であった。2003年篠原らは、新生仔マウス精巣から採取した生殖細胞から、少なくとも数年にわたってコロニー形成能を失わずに増殖し続ける細胞を樹立したことを報告し、germline stem cells (GS細胞)と名付けた⁷⁾(図2B)。このときには、2000年⁸⁾に個体レベルで精子形成幹細胞の維持に必須であることが明らかになったglial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)を培地中に加えることが必須であった。続いてBrinsterらも類似の培養系を報告した⁹⁾。篠原らは改良を進め、当初は必要とされたフィーダー細胞や血清に依存しない培養を実現している。更にGS細胞を用いた外来遺伝子導入個体や遺伝子破壊個体を得ることに成功している¹⁰⁾(図2C)。「細胞培養—遺伝子改変—移植による精子への分化」という一連の実験系は、精子形成を分子細胞生物学的に解析する上での極めて有用なツールであるとともに、発生工学の観点からも、胚性幹細胞(ES細胞)と並ぶあるいはそれを越える新たな系として期待されている。

今ひとつ注目すべきは、本来精子にしか分化しないGS細胞から、多分化能を持つ細胞が生じる場合があるという発見である¹¹⁾(図2D)。multipotent GS cells(多能性GS細胞, mGS細胞)と名付けられたこの細胞は、胚盤胞に注入するとキメラを形成する。更なる検討は必要だが、単能性のGS細胞のあるものが、ある頻度で多能性を獲得するだろうと考えられており、このメカニズムの解明が楽しみ

である。他のグループからも精巣から多分化能を持つ細胞が得られたとの報告があり¹²⁾、これらを比較検討して詳細が明らかになることが期待される。この系は再生医療の観点からも注目されている。

5. パルスラベルによる幹細胞の検出と運命追跡

精細管内移植法は、幹細胞活性を持つ細胞を検出できる一方で、組織構築を保った精巣での通常の精子形成を支えている幹細胞(長期間組織の中に存在し、分化細胞を生み出し続ける細胞)を検出している訳ではない。組織中の細胞の挙動を調べる方法として、パルスラベル法がある。これは、ある時点である細胞(集団)を標識し、ある時間の後に子孫細胞の運命を調べるものである。われわれのグループは、Ngn3(neurogenin3)遺伝子が未分化型精原細胞に特異的に発現する¹³⁾ことを利用して、Ngn3発現細胞をタモキシフェン投与によって不可逆的にラベルする系を作成した¹⁴⁾。正常の精巣組織で機能する幹細胞を標識することに成功し、移植で検出されるコロニー形成性幹細胞と比較した。詳細は原著論文など^{14,15)}にゆずるが、この実験から以下のことが示唆された。

まず、パルスラベルで検出される「実際に幹細胞として機能する細胞(actual stem cells)」と、移植で検出される「コロニーを形成する能力を持つ幹細胞」は異なる細胞集団であることが明らかとなった。後者は通常の精子形成で速やかに入れ替わることから、その多くが自己複製はせずに分化していく細胞(transit amplifying細胞)である可能性が示された。われわれは、最も仮定が少ないものとして、「定常状態の精子形成では、幹細胞として働くactual stem cellsに加えて、幹細胞としての潜在能力を持つものの自己複製しないpotential stem cellsが存在する。この集団は普段はtransit amplifying cellsとして働くが、actual stem cellsが機能を失うと、自己複製モードに転換してその穴を埋めることができる。」という考えを提唱している¹⁴⁾。実際に長期間にわたる精子形成のなかで時にactual stem cellsが失われること、それは隣のactual stem cellsの子孫から新たなactual stem cellsが生じて補充されることを観察している¹⁴⁾。われわれは、この時にもpotential stem cellsが働いているのではないかと考えている。

6. 未分化型精原細胞のイメージングと精巣内ニッチ

最後に未分化型精原細胞の精巣内ライブイメージングを紹介する¹⁶⁾。蛍光タンパク質を用いたイメージングは生(なま)の組織中の細胞の局在や挙動を視覚的にとらえる

ことを可能とし、生命現象の見方を劇的に変える力を持つ。精子形成幹細胞研究のほとんどが、細胞の精巣内での位置やその変化（動き）を考えに入れてこなかった。しかし、幹細胞が特殊な微小環境（ニッチ）と切っても切れない関係にあることは、多くの例が示している¹⁷⁾。精子形成においても、移植実験などからニッチが存在することが機能的に示唆されていたが、その解剖学的実体はほとんど明らかにされていなかった。

したがって、精子形成幹細胞ニッチの実体を知ることは非常に重要である。しかし、前述のように現状では真の幹細胞を精巣内で同定できない。そこでわれわれは、未分化型精原細胞のニッチを明らかにすることを現段階の目的とした。ngn3発現未分化型精原細胞をGFP標識したトランスジェニックマウス¹³⁾を利用して、ラベル精原細胞を精巣構造を破壊せずに観察、さらに精巣中の挙動を数日間連続観察する方法を開発した¹⁶⁾。その結果、未分化型精原細胞は精細管の基底膜上でも血管やライディッヒ細胞など間質

細胞に近い領域に好んで局在しており、分化型精原細胞に転換するとともにそこから離れて、精細管全体にダイナミックに遊走する様子が明らかとなった（図3）。これは固定標本の三次元再構築法（動かないイメージング）によっても支持された。そこでわれわれは、精細管の中の血管や間質に接する部分が、未分化型精原細胞のニッチであると提唱した¹⁶⁾。更に、周囲の血管や間質細胞のパターンが変化する時、未分化型精原細胞も局在を変えることが示唆された¹⁶⁾。ニッチが、周囲の血管や間質細胞との位置関係に従って柔軟に再編成され得ることが考えられる。ショウジョウバエや線虫の生殖幹細胞ニッチが発生過程で厳密に形成され、失われたら二度と再生しないと対照的である。ほ乳類は寿命が長く、一度組織が完成した後も成長する。ニッチの柔軟性はこういったほ乳類の特性に適しているように見える。

7. おわりに

マウスの精子形成幹細胞研究の流れを、主に方法論の観点から概観してみた。「幹細胞」というひとつの言葉を使うと、ともすると同じ細胞だと考えがちである。しかし、違った実験系はそれぞれ異なった性質を検出するわけであり、必ずしも同じ細胞を見ているとは限らない。精子形成とその幹細胞システムの複雑さをありのままに捉えた上で、簡単なものとして理解していきたいものだ。末筆になりましたが、研究グループ、共同研究者の方々に感謝の意を表します。

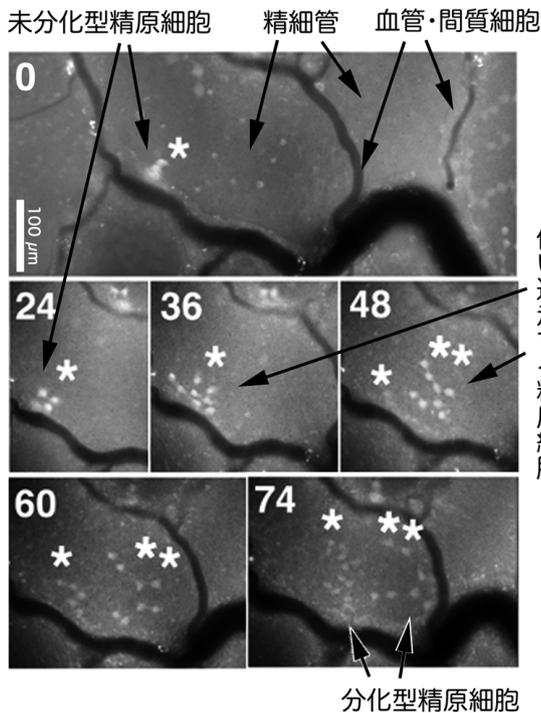


図3 イメージングで明らかになった未分化型精原細胞の精巣内ニッチと分化に伴う移動¹⁶⁾

GFPで蛍光ラベルしたNgn3陽性未分化型精原細胞は、精細管のなかでも血管や間質に近い部分に局在し、この部分がニッチとして機能することが示唆される。分化型精原細胞への転換に伴ってこの領域から離れ、精細管の基底領域全体に広がっていく。数字は観察時間（時）。

- 1) Russell, L., Ettl, R., Sinha Hikim, A., & Clegg, E. (1990) *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, Cache River Press, Clearwater, FL.
- 2) Leblond, C.P. & Clermont, Y. (1952) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 55, 548-573.
- 3) Meistrich, M.L. & van Beek, M.E. (1993) in *Cell and Molecular Biology of the Testis* (Desjardins, C. & Ewing, L.L., eds.), pp. 266-295 (Oxford University Press, New York, NY).
- 4) de Rooij, D.G. & Russell, L.D. (2000) *J. Androl.*, 21, 776-798.
- 5) Brinster, R.L. (2002) *Science*, 296, 2174-2176.
- 6) Shinohara, T., Orwig, K.E., Avarbock, M.R., & Brinster, R.L. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 8346-8351.
- 7) Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S., & Shinohara, T. (2003) *Biol. Reprod.*, 69, 612-616.
- 8) Meng, X., Lindahl, M., Hyvonen, M.E., Parvonen, M., de Rooij, D.G., Hess, M.W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., Pichel, J.G., Westphal, H., Saarma, M., & Sariola, H. (2000) *Science*, 287, 1489-1493.
- 9) Kubota, H., Avarbock, M.R., & Brinster, R.L. (2004) *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 16489–16494.
- 10) Kanatsu-Shinohara, M., Ikawa, M., Takehashi, M., Ogonuki, N., Miki, H., Inoue, K., Kazuki, Y., Lee, J., Toyokuni, S., Oshimura, M., Ogura, A., & Shinohara, T. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 8018–8023.
 - 11) Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Lee, J., Yoshimoto, M., Ogonuki, N., Miki, H., Baba, S., Kato, T., Kazuki, Y., Toyokuni, S., Toyoshima, M., Niwa, O., Oshimura, M., Heike, T., Nakahata, T., Ishino, F., Ogura, A., & Shinohara, T. (2004) *Cell*, 119, 1001–1012.
 - 12) Guan, K., Nayernia, K., Maier, L.S., Wagner, S., Dressel, R., Lee, J.H., Nolte, J., Wolf, F., Li, M., Engel, W., & Hasenfuss, G. (2006) *Nature*, 440, 1199–1203.
 - 13) Yoshida, S., Takakura, A., Ohbo, K., Abe, K., Wakabayashi, J., Yamamoto, M., Suda, T., & Nabeshima, Y. (2004) *Dev. Biol.*, 269, 447–458.
 - 14) Nakagawa, T., Nabeshima, Y., & Yoshida, S. (2007) *Developmental Cell*, 12, 195–206.
 - 15) Yoshida, S. (2007) *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1120, 47–58.
 - 16) Yoshida, S., Sukeno, M., & Nabeshima, Y. (2007) *Science*, 317, 1722–1726.
 - 17) Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., & Kai, T. (2001) *Nature*, 414, 98–104.
 - 18) 毛利秀雄, 星 元紀 監修, 森沢正昭, 星 和彦, 岡部 勝 編 (2006) 新編精子学, 東京大学出版会, 東京.

吉田 松生

(京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座)

Progress in mammalian spermatogenic stem cell research
 Shosei Yoshida (Department of Pathology and Tumor Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida-Konoe, Sakyo, Kyoto 606-8501, Japan)

大腸菌におけるタンパク質の細胞内局在とそのメカニズム

1. はじめに

生命現象の主要な役割を担うタンパク質は細胞内での個々の役割を適切に果たすためにその存在すべき場所が時間的、空間的に、厳密に制御されていなければならない。これは大きさがわずかに数ミクロンという細菌細胞においても例外ではない。Bi と Lutkenhaus によって大腸菌の細胞分裂に関与するチューブリンホモログ FtsZ が分裂面でリング状の構造を作ることが1991年に見いだされて以来¹⁾, 細菌が FtsZ 以外にも真核細胞の細胞骨格のホモログ (アクチンや中間径フィラメントのホモログ) を持つことや、それらが細菌の形の形成・維持に重要であることが示されてき

た²⁾。また細胞骨格以外のタンパク質もある特定の場所(極や分裂面)に局在していることが明らかになってきている。その例として, Maddock と Shapiro によって, 大腸菌走化性複合体が極に局在することが1993年に示された³⁾。この極局在が走化性シグナル伝達やシグナルの増幅, 刺激に対する適応に重要であると考えられている (図 1A)。では, これらのタンパク質の局在はどのように決められているのだろうか。

2. 走化性受容体 Tar の極局在のメカニズム

タンパク質の極局在のメカニズムには2通りあることがすでに報告されている^{4,5)}。極 (付近) で合成されて膜に挿入される場合 (*direct* モデル) と, 細胞膜にランダムに挿入された後, 極に局在する (*indirect* モデル) という二つのモデルである (図 1B)。細菌あるいはタンパク質の種類によってこれらのメカニズムが使い分けられているようである。

では, 走化性受容体の極局在はどのように決められているのだろうか。我々は膜貫通型走化性受容体の一つであるアスパラギン酸受容体 (Tar) に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合し (Tar-GFP), これを用いてその極局在のメカニズムを探ることとした。Tar-GFP の発現を時間 0 で誘導開始し, その後の Tar-GFP の局在の様子を観察した。Tar-GFP はまず極ではなく, 菌体側面の細胞膜で蛍光が観察された (図 1C) (*indirect* モデル)。しかし, 細胞膜に挿入された Tar の極への移動 (別のタンパク質に運ばれるか, あるいは拡散していくか) は, 残念ながら現在までのところ, 直接観察することはできていない⁶⁾。

3. Tar のらせん状配置

図 1C の写真をよく見てみると, とくに 40 分, 60 分の写真では, Tar-GFP が両方の側面部で等間隔に並んでいるように見える (図中の矢尻)。そこで, 我々はその局在を三次元的に解析した。Z 軸に沿った Tar-GFP の蛍光像をデコンボリューション法によって三次元再構成した結果, Tar-GFP がらせん状に配置されることが明らかになった (図 1D, E)。このらせんは何を反映しているのだろうか?

4. Sec 複合体のらせん状配置

走化性受容体は, 普遍的なタンパク質膜輸送・挿入装置 (Sec) によって細胞膜に挿入される⁷⁾。筆者らは, Tar のらせん構造が Sec の細胞内局在を反映しているのではない