

抗DNA抗体による精子核の標識

Labeling of rat spermatid nuclei by anti-DNA antibody:
postembedding immunoelectron microscopy

西川 純雄

Sumio NISHIKAWA

「鶴見大学紀要」第49号 第4部

人文・社会・自然科学編（平成24年3月）別刷

抗DNA抗体による精子核の標識

Labeling of rat spermatid nuclei by anti-DNA antibody:
postembedding immunoelectron microscopy

西川純雄

Sumio NISHIKAWA

要旨

ラットの精子細胞の成熟過程における核内DNA密度の変化を電子顕微鏡免疫組織化学により検討した。コロイド金と包埋後染色法を用い、単位面積当たりの核内の金粒子数を計測することにより相対的なDNA密度を比較した。間期の上皮細胞核のヘテロクロマチン、ユークロマチン、分裂期の染色体上の金粒子の密度を比較し、精子細胞のDNAの凝縮について考察し、この方法の有用性を述べた。

はじめに

ラットの精巣中には精子形成の種々の段階のものが見られる。精原細胞（精祖細胞）は一次精母細胞（精母細胞）となり減数分裂を行い二次精母細胞（精娘細胞）を経て精子細胞となる（藤田、藤田、1992, Dym、1988）。精子細胞は分裂することなく、特殊な変態を行い精子となる。このとき、精子核は体積を減少させ、それに合わせて、電子顕微鏡的には精子核の電子密度が上昇する（毛利 等、1992, Dym、1988）。この核の凝縮過程では、塩基性タンパク質のヒストンが別な塩基性タンパク質であるプロタミンに置き換わることと関係が深いことがわかっている（毛利 等、1992）。精子細胞が変態して精子になる際、1倍体の精子核のDNA量には変動がないと考えられるので。精子核の単位体積当たりのDNA量は、精子全体の体積の減少に応じて増加すると考えられる。

DNAの検出には蛍光色素であるHoechst色素、DAPIやpropidium iodideが広く用いられている。またアポトーシスの際のDNAの断片化を検出するTUNEL法は広く用いられている（Nishikawa and Sasaki, 1995; Negoescu et al., 1996）。電子顕微鏡的には、アポトーシス核のDNAを抗DNA抗体を用いて検出した報告がある（Nishikawa and Sasaki, 1995）。包埋後染色法を用いて、感度良くDNAが検出されることがわかっているので、この方法を用いて、精子細胞中の核DNAをその凝縮の起きていない時期と起きている時期を比較して検討を行った。

この結果、凝縮の進んでいない核と凝縮の進んでいる核の抗DNA抗体の標識率には差が認められた。

材料と方法

Wistar系成熟ラット（300-400 g）を用いた。動物は4%パラフォルムアルデヒド、0.5%グルタルアルデヒド、0.1Mカコジル酸緩衝液を用いて、灌流固定した。ネンブタール麻酔下に、左心室より固定液を15分間室温で灌流し、上下顎の切歯と雄の精巣を切り出し、同じ固定液に4℃、2時間浸漬した。切歯は5% EDTA、0.1Mカコジル酸緩衝液（pH 7.3）を用い、低温室で脱灰した。試料はエタノール脱水した後、LR White樹脂で53℃、24時間で包埋した。超薄切片を作製し、ニッケルグリッドに回収した。1%牛血清アルブミン（BSA-PBS）で5分間ブロッキングを行い、モノクローナル抗DNA抗体（clone AC30-10, Boeringer, Mannheim, Germany）を2.5 μg/mLの濃度で60分間反応させた。0.1%BSA-PBSで洗浄した後、金コロイド標識抗マウスIgM抗体（10 nm, Amersham, Poole, UK, 40倍希釈、室温、30分間）を反応させた。超薄切片は2%グルタルアルデヒド水溶液で処理し、洗浄したのち、3.3%酢酸ウラニル水溶液とクエン酸鉛で電子染色を行った。カーボンコーティングをしたのち透過型電子顕微鏡（JEM1200EXII, Jeol, Tokyo, Japan）で観察をした。

結果と考察

分裂期の細胞の染色体を観察すると、電子密度の中間程度の曲がりくねった棒状の構造として観察された。この上に抗DNA抗体に由来する多数の金粒子が認められた（図1A、Chr、矢印）。一方、精子細胞中では、若干の細胞膜の破壊が認められた（図1B、C）。これは4%パラフォルムアルデヒド、0.5%グルタルアルデヒドといった比較的弱い固定のためと考えられるが、細胞

抗DNA抗体による精子核の標識

内の構造は比較的よく保たれていた。まだ凝縮進んでいない精子細胞核 (図1B、Nu) は中程度の電子密度、顆粒状もしくは細い紐状であった。この上に多くの金粒子がみられた。その前方には均質な先体 (図1B、Ac) がみられた。後方には微小管でできたmanchetteと呼ばれる構造があり (図1B、Ma)、中央には中心子も残っている (図1B、Cent)。一方、凝縮が進み細長くなった精子細胞核は電子密度が上昇し、そこには多数の金粒子が認められる (図1C、Nu)。ところどころに見られる白い泡状の構造は人工産物と考えられる。

上顎あるいは下顎の切歯の増殖期に見られるエナメル器の上皮細胞の分裂期の染色体上の抗DNA抗体に由来する金粒子密度を計測すると約95 grains/ μm^2 (n=50) であった (図2、分裂期染色体)。これを過去の同じ抗体を同じ条件で使った結果 (Nishikawa and Sasaki, 1995) を引用して比較すると、エナメル芽細胞核のヘテロクロマチンで約85 grains/ μm^2 (n=113)、ユークロマチンで約10 grains/ μm^2 (n=112) (図2、正常核ヘテロクロマチンと正常核ユークロマチン) であり、分裂期の凝縮した染色体クロマチンと核のヘテロクロマチンが匹敵するDNA密度であることがわかる。一方、精子細胞では、楕円形で、分散した比較的電子密度の低い状態の核で抗DNA抗体に由来する金粒子の密度は約60 grains/ μm^2 (図2、凝縮前精子細胞核) で、一方細長く、電子密度の高い精子細胞核で約150 grains/ μm^2 (n=50) であった (図2、凝縮精子細胞核)。ラットの精子形成の過程では最終段階で、核タンパク質がヒストンから小型の塩基性タンパク質であるプロタミンに代わることが知られている (Poccia, 1986)。電子密度の高い細長い精子細胞核が凝縮度の高い核で、DNAと関わる塩基性タンパク質がヒストンからプロタミンに代わったことが想像された。このようにDNAの免疫組織化学から精子の成熟過程を分析することができることが示された。

本研究の結果、精子形成の過程でのDNAの凝縮率と核の形態との関係を詳細に検討する手段が提供されたと考えている。さらなる研究が必要であろう。

文献

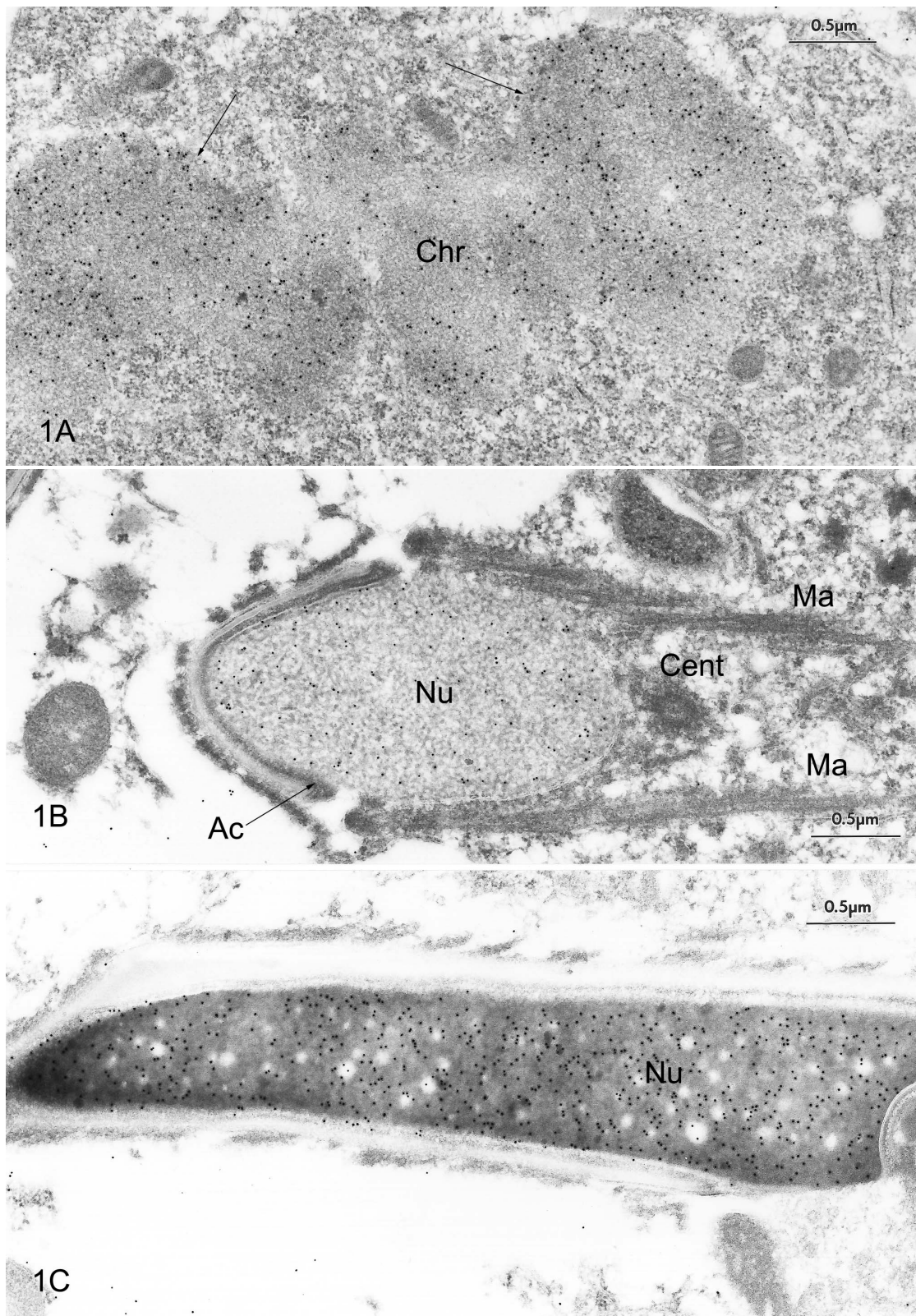
Dym M (1988) The male reproductive system. In: Weiss L (ed), Cell and Tissue Biology. A Textbook of Histology, 6th ed., Urban & Schwarzenberg, Baltimore, pp.929-972.

藤田尚男、藤田恒夫 (1992) 標準組織学各論、医学書院、東京

毛利秀雄 監修、森澤正昭・星元紀 編 (1992) 精子学、東京大学出版会、東京

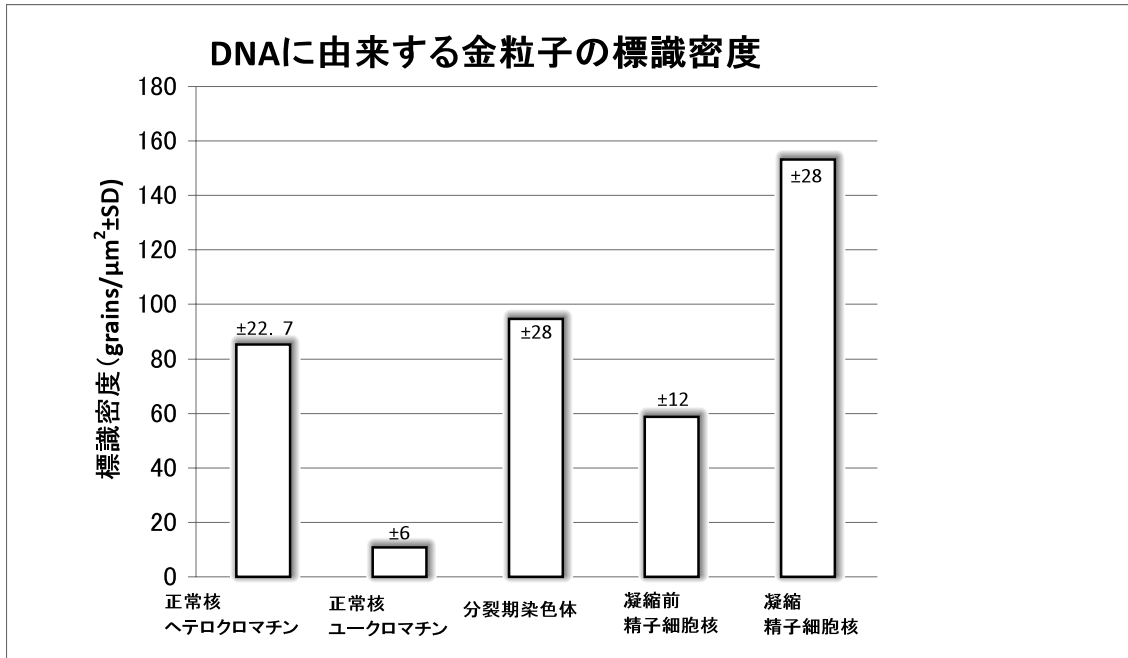
Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E (1996) In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. J Histochem Cytochem, 44:959-968.

Nishikawa S, Sasaki F (1995) DNA localization in nuclear fragments of apoptotic ameloblasts using anti-DNA immunoelectron microscopy: programmed cell death of ameloblasts. Histochem Cell Biol, 104:151-159.



図の説明

- 図1. A. ラット切歯の増殖期のエナメル上皮細胞核。分裂期の染色体 (Chr、矢印)。
B. 凝縮中の精子細胞。顆粒状に見える核 (Nu)、先体 (Ac)、中心小体 (Cent)、manchette (Ma) が見える。核 (Nu) には多くの金粒子が見える。
C. 凝縮の進んだ精子細胞核。細長い棒状に核が均質に凝縮している (Nu)。多くの金粒子が核に見られる。



図の説明

図2. 細胞核や染色体DNAに由来する金粒子の標識密度。正常エナメル芽細胞核ヘテロクロマチンと正常エナメル芽細胞核ユークロマチンのデータは (Nishikawa & Sasaki, 1995) より得た。凝縮した精子核には高密度にDNAに由来する金粒子がみられる。棒グラフの数字は標準偏差を示す。

西川純雄
〒230-8501
横浜市鶴見区鶴見2-1-3
鶴見大学歯学部生物学研究室

Sumio Nishikawa
Department of Biology
Tsurumi University School of Dental Medicine
2-1-3 Tsurumi, Tsurumi-ku, Yokohama 230-8501
E-mail: nishikawa-s@tsurumi-u.ac.jp