

セルトリ細胞皮質下アクチン線維 ナノアーキテクチャーの超解像イメージング

独特の形状をもつ精子は精巣の精細管内で小球形の精子細胞から生成されることが知られている。これまでの研究により、正常な精子の形態形成には精子細胞と精細管内に存在している支持細胞であるセルトリ細胞との密接な相互作用が重要であることが分かっている。精子細胞とセルトリ細胞の細胞間接着は、細胞間接着分子と細胞骨格アクチンから構成されているが(図1)、このアクチン線維の構造や、形成・維持のメカニズムはほとんど不明であり、その生理学的な意義も明らかではなかった。本アプリケーションノートでは、京都大学医学研究科 創薬医学講座のタムケオ・ディーン先生により、セルトリ細胞皮質下のアクチン線維のナノスケール3次元ネットワーク構築を、超解像顕微鏡により鮮明に捉えた例を紹介する。

実験の概要

タムケオ先生は、まずmDia1/3 二重欠損マウスが雄性不妊であることを見出した。次に精子と精細管を組織学的に観察し、雄性不妊の原因が精子形成不全にあることを突き止めた。さらに、mDia1とmDia3が両方ともセルトリ細胞に高レベルで発現していることを確認した。これによりmDia1/3 欠損マウスの精子形成不全の原因は、精子細胞側ではなくセルトリ細胞側にあることが判明した。本研究では、セルトリ細胞内のmDia1/3 の動きを明らかにするために、超解像顕微鏡N-STORMを用いて、初代培養セルトリ細胞のアクチン線維を、約20 ナノメートルのXY 軸解像度および約50 ナノメートルのZ 軸解像度で観察した(図2)。

得られた画像から網目状アクチン構造とアクチン線維束を分離してセグメントし、網目状アクチン構造の占有率を計算した。

また、網目状アクチンの動態を観察するため、初代培養セルトリ細胞内のアクチン線維を蛍光標識し、スピニングディスク共焦点顕微鏡で高速かつ高解像度のライブイメージングを行い、網目状アクチン構造を構成するアクチン線維の重合速度を測定した。

これらにより、mDia1とmDia3がアクチン細胞骨格とダイナミクスおよび精子形成にどのように寄与するかを調べた。

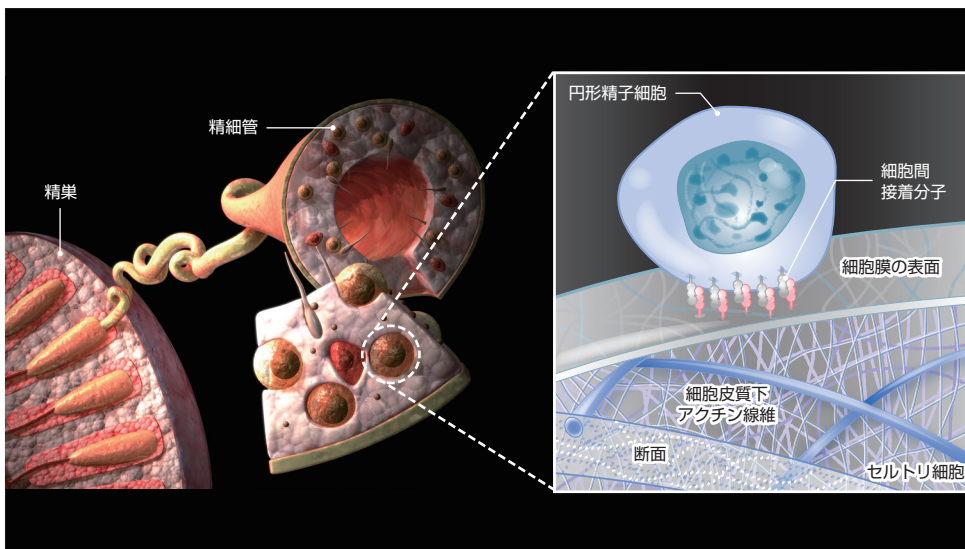


図1.
mDia1/3 が作るセルトリ細胞皮質下アクチン線維は、セルトリ細胞と小球形の精子細胞の正常な細胞間接着に必要であり、精子の形態形成に不可欠である。

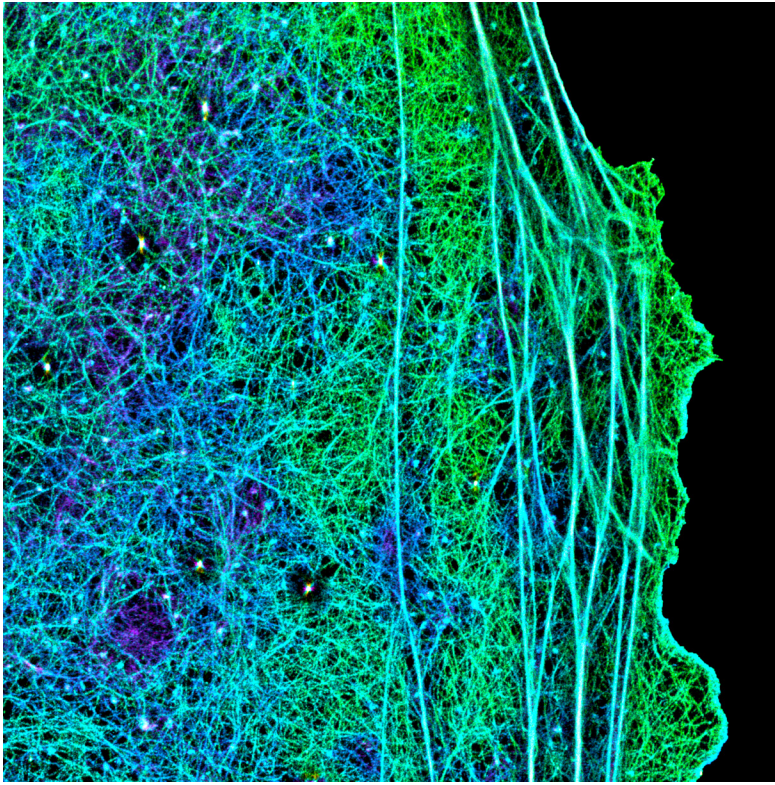


図2. マウス精巣由来のセルトリ細胞の初代培養細胞を Glutaraldehyde で固定し、TritonX を含んだ緩衝液で permeabilization させ、Alexa Fluor 647-Phalloidin で染色した。

Z軸方向：-300 ~ 300 nm を疑似カラー表示。

対物レンズ：CFI アポクロマート TIRF 100XC Oil

結果

超解像顕微鏡を用いた TIRF 3D-N-STORM イメージングにより、セルトリ細胞膜直下にメッシュ孔サイズが約 100 ナノメートルの網目状アクチン構造が存在し、このアクチン構造の密度が mDia1/3 の二重欠損により著しく減少することが分かった。また、共焦点観察により、mDia1/3 欠損細胞では $1.3 \mu\text{m/s}$ の重合速度を示すアクチン線維が特異的に消失していることを見出した。これは、mDia3 の一分子イメージングから計算した mDia3 のアクチン重合速度とほぼ同じである。これらのことから、mDia1/3 は網目状アクチン構造の形成・維持に寄与していると考えられる。

また、これまでの培養細胞を用いた研究では、収縮性のあるアクトミオシン線維束は細胞間接着の形成・維持に重要であることが知られていた。本研究では、超解像顕微鏡 N-STORM を用いた解析により、初代培養セルトリ細胞において、網目状アクチン構造を構成するアクチン線維は、収縮性のあるアクトミオシン線維束とつながっていることを見出した。しかし、mDia1/3 二重欠損セルトリ細胞では、この収縮性のあるアクトミオシン線維束が有意に減少し、代わりに非収縮性の Espin 結合アクチン線維束が増加していることを突き止めた。これらのことから、mDia1/3 二重欠損は、セルトリ細胞と精子細胞の接着形成・維持に障害をきたすと考えられる。

まとめ

本研究は、mDia1/3 がセルトリ細胞内で網目状アクチンを重合させ、それに連続する収縮性アクトミオシン線維束を作り出し、セルトリ細胞～精子細胞間接着を形成・維持することで、正常な精子の形態形成に寄与していることを明らかにした。このことは、セルトリ細胞内のアクチン細胞骨格系の異常が男性不妊の原因の一つとなりうることを示唆している。

男性不妊の原因の多くを占める精子形成障害のうち、約半数は原因不明である。男性不妊の原因の一端を解明した本研究は、男性不妊の新しい治療法開発の糸口になるものと期待される。

参考文献

mDia1/3 generate cortical F-actin meshwork in Sertoli cells that is continuous with contractile F-actin bundles and indispensable for spermatogenesis and male fertility. Sakamoto S*, Thumkeo D*#, Ohta H, Zhang Z, Huang S, Kanchanawong P, Fuu T, Watanabe S, Shimada K, Fujihara Y, Yoshida M, Ikawa M, Watanabe N, Saitou M, Narumiya S# *Equal Contribution, #Corresponding Author *PLoS Biology* 2018, 16(9), doi: 10.1371/journal.pbio.2004874

製品情報

超解像顕微鏡 N-STORM

ローカリゼーション法の一つである STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy) を採用し、従来の光学顕微鏡の約 10 倍の解像度を実現した。細胞内小器官の構造を 1 分子レベルで観察することが可能。

水平解像度：約 20 nm

Z 軸方向解像度：約 50 nm

