

雌雄両配偶子形成の共通原理の解明



三浦 猛
愛媛大学農学部

1. 私が知りたかったこと

精子形成と卵形成は、動物の生命の連続性を保障するために必須な過程である。この根本原理を明らかにすることは、基礎科学の分野のみならず、農水産学等の応用分野に関しても画期的な生物生産システムの構築を行う上で大変重要である。私は本研究で、減数分裂等、雌雄両配偶子形成で共通に認められる制御機構の解明を目指した。

2. 結果

(1) 生体外実験系の開発

雌雄両配偶子形成の共通原理を解析するためには、その解析に適した実験系が必要となる。精子形成に関しては、これまで私たちが開発した生体外で精子形成の全過程を再現することが可能な精巣器官培養をはじめとするニホンウナギの各種培養系があるが、卵形成、特に卵原細胞の増殖から減数分裂開始期（初期卵形成期）を生体外で再現する系は存在しない。そこで初期卵形成過程を生体外で再現する系の開発を行った。コイを用いて卵巣の培養系の開発を試みた。コイの卵巣には卵原細胞、卵黄形成前の卵母細胞、卵黄形成中の卵母細胞など様々なステージの生殖細胞が存在する。卵原細胞の増殖から減数分裂の開始の過程を解析するために、解析に必要な無い減数分裂開始期以降の大型の細胞をコラゲナーゼ/ディスペラーゼ消化により取り去り、残った卵原細胞を卵巣壁ごと培養した。2週間から4週間基本培地で培養を行ったところ、培養卵巣壁中に多数の卵原細胞が認められ、減数分裂期以降の生殖細胞はほとんど認められなかったことから、本培養系は、初期卵形成過程の制御機構の解析に適しているものと考えられた。また、この培養方法は、ニジマスおよびウナギの卵巣でも利用可能であることが確かめられ、汎用性の高い方法であることが明らかとなった。

(2) 黄体ホルモン：DHP の雌雄両配偶子形成への作用機構の解析

雌の卵成熟過程と雄の精子成熟過程の制御に黄体ホルモンが関わっていることが魚類を中心に明らかとなっているが、同ホルモンの配偶子形成の初期過程への作用は全く知られていない。そこで本項目では、生体外での生殖腺の各種培養系を用い黄体ホルモンの精子形成および卵形成初期に与える影響を解析した。

ウナギの精子形成の進行と黄体ホルモンの関係を調べたところ、精子形成の初期過程、特に減数分裂開始期に魚類の主要な黄体ホルモンである $17\alpha, 20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン (DHP) とそのレセプターが存在し、精子形成の初期過程と黄体ホルモンの間に何らかの関係があることが明らかとなった。そこで、DHP の精子形成への直接的な作用を調べるため、DHP をウナギの未熟精巣を用いた器官培養系に添加し6日間培養し、その影響を調べたところ、DHP の刺激により精原細胞での DNA 合成が誘導された。DHP の添加は、減数分裂マーカー *Dmc1* および *Spo11* の発現を誘導すること、DHP 処理した精巣片には減数分裂時の相同染色体の対合時に認められるシナプトネマ構造を持つ生殖細胞が認められることより、DHP の刺激による生殖細胞での DNA 合成は、精原細胞の増殖によるものではなく、減数分裂の前期過程に由来するものであることが示唆された。このことは、DHP の刺激が精子形成で行われる精原細胞の増殖をスキップさせ、精原細胞に減数分裂を誘導させたことを示している。また、11-KT により誘導された精子形成のうち、減数分裂開始の過程を、抗 DHP 抗体で DHP の作用を低下させることにより抑制することができることから、DHP は精子形成の過程で減数分裂の開始に必須の因子であることが明らかとなった。

卵形成過程に関しては、イトウおよびコイの卵巣培養系を用いて黄体ホルモンの作用を解析した。各培養系に雌性ホルモンエストラジオール- 17β (E2) または黄体ホルモン DHP を培養液に添加し卵巣を培養したところ、E2 および DHP のどちらを添加した場合でも、生殖細胞の DNA 合成を促進した。これらの培養卵巣片を電子顕微鏡により観察したところ、DHP 処理した卵巣片には、減数分裂時の染色体の対合像を示すシナプトネマ構造を持つ生殖細胞が多数観察されたのに対し E2 処理卵巣ではシナプトネマ構造を持つ生殖細胞がほとんど観察されなかった。以上の結果から、E2 は卵原細胞の増殖、DHP は減数分裂の開始に作用することが明らかとなった。精子形成に関しても E2 は精原幹細胞の再生分裂を制御していることを私たちは明らかにしており、また上述のように DHP は雄に関しても減数分裂の開始の引き金を引くことが明らかになっている。このように、本研究により、雌性ホルモンおよび黄体ホルモンは雌雄両配偶子形成共通の制御因子であることが明らかとなった。

(3) DHP によって精巢で発現が変化する遺伝子のクローニング

上述のように、DHP で減数分裂開始の引き金が引かれることが明らかとなったので、DHP の下流で作用する因子を得るために、DHP の刺激によって、生殖腺での発現が変化する遺伝子のクローニングをウナギの精巢を材料に行った。DHP100ng/ml の濃度で添加して6日間培養したウナギ精巢と DHP を添加せずに培養した精巢片からそれぞれ mRNA を抽出し、2種の RNA を用いて遺伝子発現差解析を行ったところ、DHP の刺激により精巢での発現が誘導される独立した cDNA クローンを25種類得ることに成功した。本研究では、これらのクローンのうち、 11β -HSD およびトリプシンについてその精子形成に対する作用を調べた。

(4) 11β -HSD の精子形成への作用

ステロイド代謝酵素の1種である 11β -HSD は、副腎皮質系ステロイドであるコルチゾールからコルチゾンの転換に関わる重要な酵素である。ウナギ精巢に DHP を添加するとコルチゾンが産生されることから、DHP によって精巢での発現が誘導される 11β -HSD は、精巢でのコルチゾン産生に関係するものと考えられた。精子形成での副腎皮質系ステロイドの作用は、何れの動物でも明らかとなっていない。そこでコルチゾールおよびコルチゾンの精子形成への作用をウナギの精巢器官培養系により調べた。その結果、コルチゾールは1ng/ml の濃度で雄性ホルモン:11-ケトテストステロンによって誘導される精原細胞の増殖をさらに促進させるが、100ng/ml の高濃度では、精子形成の進行を抑制することが示された。一方、コルチゾールの代謝物であるコルチゾンは、低濃度でも高濃度でも精子形成に対しての作用は認められなかった。これらの結果より、コルチゾールは比較的低濃度(1ng/ml)では、精子形成に対し促進的に作用し、100ng/ml という高濃度では抑制的に作用することが明らかとなった。上述のように DHP の刺激により精巢中の 11β -HSD が活性化することが明らかとなったが、これは、ストレス存在下で血中量が著しく増加するコルチゾールを無害なコルチゾンへ代謝し、高濃度のコルチゾールから精子形成の進行を守る一種の生体防御機構であると考えられた。

(5) トリプシンの精子形成への作用

トリプシンは、膵臓で産生分泌される消化酵素の一種である。このトリプシンの前駆物質であるトリプシノーゲンの cDNA クローンが DHP により精巢で発現が誘導される cDNA の中に含まれていた。トリプシノーゲンの精巢での発現部位を調べるために、その特異抗体を作製し、免疫組織化学を行ったところ、その発現部位は、増殖型の精原細胞を取り囲むセルトリ細胞と精細胞および精子であった。トリプシンの精子形成への直

接的な作用を調べるため、精原細胞とセルトリ細胞の共存培養系にトリプシンを添加して3日間培養したところ、精原細胞が増加するとともに、増加した精原細胞に減数分裂のマーカートンパクである Spo11 の発現が認められた。さらに、精原幹細胞の単独細胞培養系にトリプシンを添加して培養したところ、前述の精原細胞とセルトリ細胞との共存培養系の結果と同様、精原幹細胞の数の増加が認められるとともに、培養6日目にチューブリン分子を含む鞭毛様構造を持ち細胞表面にアクチン分子が局在化し細胞体が伸長した精子様細胞が多数出現した。これらの結果より、トリプシンはDHPによる制御の下、精原細胞の増殖と減数分裂の誘導、さらには精子変態の制御に深く関わっていることが明らかとなった。

3. 考 察

本研究によって得られた結果を右図に示す。本研究によって、精子形成および卵形成のどちらに対しても減数分裂開始の引き金を黄体ホルモンが引くことが初めて明らかとなった。以前から知られているように、黄体ホルモンは雌では卵成熟、雄では精子成熟の制御に関与することが知られていたが、本研究により、黄体ホルモンは成熟後期にのみ作用するのではなく、減数分裂開始という配偶子形成の初期過程に対しても雌雄とも、重要な役割を果たすことが明確となった。また精子形成に関しては、これまで全く精子形成への関与が示されていなかった副腎皮質系ステロイドや消化酵素であるトリプシンが黄体ホルモンの制御により作用することが明らかとなった。特にトリプシンに関しては、古くから一般に知られている消化酵素が、これまで全く知られておらず、予想もされていなかった新規の、しかも配偶子形成に対し極めて重要な機能を持っていたことが明らかとなった。

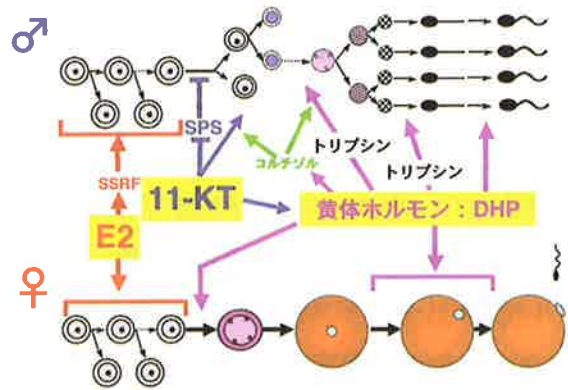


図. 本研究で得られた魚類雌雄両配偶子形成共通の制御機構

文献

Miura, T. , Ohta, T., Miura, C., and Yamauchi, K.: Complementary Deoxyribonucleic acid cloning of spermatogonial stem cell renewal factor. *Endocrinology* 144: 5504-5510. (2003).

Miura, C. Kuwahara, R. and Miura T.: Transfer of spermatogenesis-related cDNA into eel testis germ-somatic cell coculture pellets by electroporation: methods for analysis of gene function. *Mol. Reprod. Dev.* (印刷中)

Ozaki, Y., Miura, C. and Miura, T.: Molecular cloning and gene expression of Spo11 and Dmc1 during spermatogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Comp. Biochem. Phys.* (印刷中)