

## 研究課題別評価

1 研究課題名:雌雄両配偶子形成の共通原理の解明

2 研究者氏名:三浦 猛

研究員: 三浦 智恵美 (研究期間 H.15.1~H.18.3)

尾崎 雄一 (研究期間 H.15.4~H.18.3)

3 研究のねらい:

生物は、生殖を行うことにより、そのたびに若返りながら生命の連続性を保ち続けてきた。生物の生殖の基本原則を解明することは、少子・高齢化への方策に大きく貢献するものと考えられる。生殖の主役である配偶子形成過程は、有性生殖を保障するために必須な減数分裂の過程を含んでいる。減数分裂は、生殖細胞のみで起こる分裂様式であり、遺伝子の多様性を保つのに中心的な役割を担う機構である。この過程を人為的に操作することができれば、全く新しい概念の生物生産技術を確立することも可能である。そこで本研究は、精子形成および卵形成での減数分裂開始の制御機構を、実験モデルとして数種の硬骨魚類を用いて解明し、将来減数分裂の人為制御を伴う新しい生物生産技術確立への布石とすることを目的として行った。

4 研究成果:

黄体ホルモン:DHP の精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、ウナギ精巣の各種培養系を用い、黄体ホルモンの精子形成初期に与える影響を解析した。

黄体ホルモンレセプターI型およびII型のウナギ精巣での発現を観察したところ、どちらの型も精子形成開始前の精巣で発現することが明らかとなった。また、魚類の主要な黄体ホルモンである17,20-ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン(DHP)の精子形成に伴う精巣での含有量の変化を調べたところ、精子形成開始後直ちに認められる精子形成誘起雄性ホルモンである11-ケトテストステロン(11-KT)の上昇の後、精巣での産生が開始することが明らかとなった。DHPの精巣での産生機構を解析したところ、DHPは11-KTの刺激によりP450-c17等のステロイド合成酵素の発現量が増加し、その結果として精巣での産生量が増加することが明らかとなった。以上よりDHPは、11-KTの下流で精子形成の初期過程に作用する可能性が示された。

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。

#### DHPによって精巣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の刺激によって、精巣での発現が変化する遺伝子のクローニングを試みた。DHP100ng/mlの濃度で添加して6日間培養したウナギ精巣とDHPを添加せずに培養した精巣片からそれぞれ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の刺激により精巣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、11 $\beta$ -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。

#### 11 $\beta$ -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11 $\beta$ -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。ウナギ精巣にDHPを添加するとコルチゾンが産生されることから、DHPによって精巣での発現が誘導される11 $\beta$ -HSDは、精巣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巣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の刺激により精巣中の11 $\beta$ -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。

### 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 により精巣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巣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。

### 生体外卵巣培養系の開発

初期卵形成の制御機構を生体外で解析するための卵巣培養系の開発を、数種の魚類の卵巣を用いて試みた。まず、フグやサケ科魚類のイトウなど卵形成の進行が比較的遅い魚種に注目し、卵巣器官培養系の確立を試みた。これらの魚種を使って、雌性ホルモンや黄体ホルモンに対して反応する培養系の開発に成功した。しかしながら、これらの魚種は、入手や飼育が難しいこと、卵巣の発達段階の問題から培養を行うことができる期間が1年のうち1ヶ月程度と短いことから、必ずしも優れた解析系とは言えなかった。そこで、比較的入手し易い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/ディスパ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。

### 生体外卵巣培養系を用いた初期卵形成過程の解析

イトウおよびコイの卵巣培養系を用いて、初期卵形成過程での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 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、本項目により、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。

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、しかも生理学的に極めて重要な機能を持っていたことが明らかとなった。

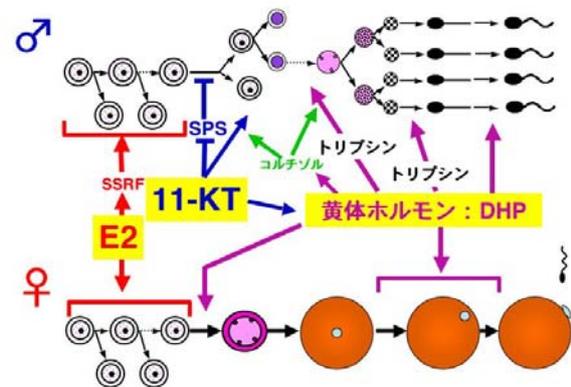


図. 本研究で得られた魚類雌雄両配偶子形成共通の制御機構

##### 5 自己評価:

当初の本研究の目標は、雌雄両配偶子形成に存在する共通の制御機構を明らかにし、配偶子形成過程でのみ認められる減数分裂を生殖原細胞や生殖細胞系列以外の幹細胞で起こさせる方法を開発することであった。雌雄両配偶子形成の共通制御機構の解明に関しては、解析に適した卵巣の培養系の開発に成功するとともに、雌雄ともに雌性ホルモンが精原幹細胞あるいは卵原細胞の増殖分裂に関係すること、黄体ホルモンが雌雄の減数分裂開始の引き金を引く因子であることを初めて明らかにすることができたことから、当初の目標を概ね達成できたものと考えて

いる。減数分裂の人為誘導に関しては、DHP の操作により、本来減数分裂が起こる時期ではない精原幹細胞に対し、減数分裂過程の一部を誘導させることに成功した。しかし、実験計画が遅延したために、生殖細胞系列以外の細胞での減数分裂の誘導に関しては試すことができなかった。この項目に関しては、目標の一部が達成されるにとどまった。

当初の予想を超えた成果としては、本来消化酵素として知られているトリプシンが、精子形成の制御のうち体細胞分裂、減数分裂、精子変態の3つの過程に対し重要な役割を果たす可能性が示されたことである。本成果については、さらに慎重な追加実験を行う必要があると思われるが、今後、配偶子形成研究の方向性を大きく変え、大きく発展する可能性のある「さきがけ研究」にふさわしい成果であるといえることができる。

成果の公表に関しては、研究の進行が予定より遅れ、さらに意外な方向へ研究が展開してしまったことを受けて、期間中に公表できなかった内容が多数あった。これに関しては、できるだけ早期に公表できるよう努力したいと考えている。

## 6 研究総括の見解:

本研究者の目指すところは二つである。第一は、ゲノムの多様性を保つ中心機構である減数分裂機構の分子レベルでの解明であり、第二は、その機構の人為的制御技術の開発と、その生物生産技術の確立である。研究は硬骨魚類を材料として実施されてきた。途中、実験の場を北海道から四国に移すという出来事があったが、その困難を乗り越えて、現在多くの注目すべき成果を挙げているのは高く評価し得る。トリプシンの精子形成の制御における意外な役割の発見は、当該研究者も云っているように、配偶子形成研究の方向を大きく変換させるものであるとともに、応用面でも波及効果の高い技術開発につながる可能性が高く、今後の展開を期待する。

## 7 主な論文等:

### 論文

1. Miura, T., Ohta, T., Miura, C. I., and Yamauchi, K.: Complementary Deoxyribonucleic acid cloning of spermatogonial stem cell renewal factor. *Endocrinology* 144: 5504–5510. (2003).
2. Miura, T. and Miura, I. C.: Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 181–186 (2004)
3. 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)
4. Miura, T., Higuchi, M., Ozaki, Y., Ohta, T. and Miura, C.: Progesterin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenic cells of the eel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (改定稿)

投稿中)

5. 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.* (改定稿投稿中)

招待講演3件

1. Miura, T.: Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. In “7<sup>th</sup> International symposium on Reproductive Physiology of Fish” 2003 年5月三重.
2. Miura, T.: The control mechanisms of spermatogenesis and early oogenesis in fish. In “37<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction.” 2004 年 8 月バンクーバー, カナダ
3. Miura, T.: The analysis of fish gametogenesis using in vitro culture systems. In “The 4<sup>th</sup> International Symposium “Reproductive, Genetic and Disease Management in Aquaculture and Ocean Ranching.” 2004 年 10 月函館.