

学位論文題名

硬骨魚類の卵成熟誘起ホルモンの同定と
生成機構に関する研究

学位論文内容の要旨

魚類も他の脊椎動物同様、多くは有性生殖を行なうが、人為的環境下では、産卵および受精が困難な魚種も少なくない。こうした問題を解決するためには、魚類を生物学的によく理解することが必要である。特に、配偶子形成機構、すなわち、卵と精子が作られるしくみを理解することは魚類の成熟、産卵および受精を人為的に統御する上で極めて重要なことである。

一般に、魚類の卵巣中では、卵のもとになる卵原細胞が体細胞分裂による増殖の後、卵母細胞となり、卵黄などを蓄積して著しく大きさを増す。十分に成長した卵母細胞は、脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン（GTH）の作用により卵濾胞組織で生成された卵成熟誘起ホルモンの刺激により卵成熟を完了し、排卵されて受精可能な卵となる。魚類では、プロゲステロン系ステロイドが強い卵成熟誘起活性を有することが知られていたことから、卵成熟誘起ホルモンはステロイドホルモンであると予想されていた。しかし、その化学的同定は行なわれていなかった。そこで、本研究では、魚類の卵成熟誘起ホルモンの同定を行なうとともにその生成機構を詳細に調べた。

本研究では、まず、アマゴ、ヒラメ、マダイおよびニホンウナギを材料にして、生体内および生体外の卵成熟に伴う形態変化を調べた。その結果、アマゴの卵成熟は他のサケ科魚類同様、成熟途中卵門付近に移動してきた核が明瞭に観察されことと黄色不透明な細胞質が黄色透明になることで外観から容易に確認することができた。また、卵母細胞を生体外に取り出し、リンガー中でホルモン処

理により卵成熟を誘導することも容易であった。ヒラメおよびマダイの生体内での卵成熟過程は、両種とも卵成熟開始後約3-4時間で油球および卵黄球の融合と核移動が始まり、約15-16時間後には核崩壊が起こり、約18-20時間後には卵黄が完全に融合して透明化するとともに、吸水により卵径が急増した。生体外での卵成熟過程も生体内とほぼ同様に進行した。ニホンウナギの生体外での卵成熟過程は、形態変化などヒラメやマダイといいくつかの点で異なっていたが、卵成熟の判定は容易であった。以上のように、魚類の卵成熟は核崩壊や細胞質の透明化を指標にすることにより、その判定が容易にできることが示された。

次に、卵成熟期のアマゴの濾胞組織付きの卵母細胞をGTHとともに培養し、その培養液中から卵成熟誘起ホルモンの精製と同定を行なった。培養液を抽出後、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより20画分に分離精製した。これらの画分の卵成熟誘起活性を調べ、唯一活性があった第10画分を薄層クロマトグラフィー (TLC) により純品であることを確認した。この第10画分と $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnene-3-one (DHP) の合成品を質量分析した結果、全く同様の質量スペクトルを示した。また、様々な合成ステロイドの卵成熟誘起活性を調べた結果、DHPが最も高い卵成熟誘起活性を示した。以上の結果から、アマゴの卵成熟誘起ホルモンは、プロゲステロン系ステロイドのDHPであることを脊椎動物で初めて化学的に同定した。さらに、ニホンウナギについても、卵濾胞をステロイド合成の最も上位の前駆体であるプレグネノロンとともに培養し、その培養液中から卵成熟誘起ホルモンの精製および同定を行なった。培養液を抽出後、TLCにより分離精製した後、15種の代謝物の中で最も卵成熟誘起活性があった第9代謝物を再結晶法により同定した。標準品のDHPと第9代謝物の混合物の放射比活性は異なる溶媒系による再結晶を繰り返してもほぼ一定値を保った。また、様々な合成ステロイドの卵成熟誘起活性を調べた結果、DHPが最も高い卵成熟誘起活性を示した。以上の結果から、ニホンウナギの卵成熟誘起ホルモンもDHPであると同定された。ヒラメおよびマダイについては、まず、卵母細胞のホルモン感受性の日周変化を調べ、卵成熟実験を行なうための最も適切な時刻を明らかにした。次に、この時刻の卵母細胞を用いて、卵成

熟に及ぼす各種合成ステロイドの効果について調べた。その結果、アマゴやニホンウナギとほぼ同様な結果が得られたことから、これら両種の卵成熟誘起ホルモンもDHPである可能性が示唆された。

その後、サケ科魚類の卵濾胞組織が外側の莢膜および内側の顆粒膜細胞層に分離できることに着目して、DHP生成機構が複数の研究者により詳細に調べられた。その結果、GTH刺激により莢膜細胞は 17α -hydroxyprogesterone (17α OHP) を生成し、この 17α OHP が顆粒膜細胞でDHPに変換されること、さらに、GTHは顆粒膜細胞にも作用してステロイド 20β -水酸基脱水素酵素 (20β -HSD) を活性化することが明らかにされた。また、GTHの作用には、主にサイクリックAMP (cAMP) 系が関与していることが明らかにされた。しかし、その他の系の関与についてはほとんど調べられていなかった。そこで、本研究では、ニジマスを材料として、卵成熟誘起ホルモン生成に関わる細胞内情報伝達系に細胞内カルシウム (Ca) やpHも関与しているか否か調べた。その結果、GTH刺激による莢膜細胞での 17α OHP 生成にはCa-カルモジュリン系および細胞内pHが関与しており、そのCaはベラパミール感受性Caチャネルにより細胞外から流入すること、CaおよびpH依存性ステップはcAMP生成以降、プレグネノロン生成以前であること、さらに、Ca・ジアシルグリセロール依存性蛋白質磷酸化酵素 (Caキナーゼ) は不活性化状態にある方がよいことが示唆された。また、GTH刺激による顆粒膜細胞での 20β -HSD活性化にもCa-カルモジュリン系および細胞内pHが関与しており、そのCaは細胞内および細胞外の両者に由来すること、Caの細胞外からの流入はニフェジピン感受性Caチャネル依存であること、Caキナーゼが適度に活性化されていることが必要であること、さらに、それらの依存性ステップはcAMP生成以降であり、 20β -HSD活性自身には影響しないことが示唆された。このように、GTHの作用も細胞により異なるとともに、細胞内の情報伝達系も極めて複雑であることが明らかになった。

莢膜細胞は、GTHの作用により卵黄形成期にはエストロゲンの前駆体である testosterone (T) を、卵成熟期には 17α OHP を生成する。これは莢膜細胞にお

けるステロイド生成系がT生成系から 17α OHP 生成系に転換することを示しているが、この転換機構は全くわかっていない。本研究では、ニジマスの卵黄形成後期および卵成熟期の莢膜細胞層を用いて、 17α OHP 生成能獲得機構を推定するため、カルシウムアンタゴニストのニフェジピンおよびCキナーゼ阻害剤のH7と活性化剤のSC-9の効果を調べた。その結果、以下のことが示唆された。卵黄形成期の莢膜細胞では、ニフェジピン感受性カルシウムチャンネルから流入するカルシウムイオンに依存性のCキナーゼによりC₁₇₋₂₀リアーゼ活性が高く維持されているため、 17α OHP はほとんど生成されず、その代謝物のTが生成される。しかし、卵成熟期の莢膜細胞では、Cキナーゼが低下することにより C₁₇₋₂₀リアーゼ活性が低下するため、 17α OHP が生成されるようになる。莢膜細胞で生成された 17α OHP は顆粒膜細胞に局在する 20β -HSDにより卵成熟誘起ホルモンであるDHPへ変換される。すなわち、卵濾胞組織における卵成熟誘起ホルモン生成能は、莢膜細胞におけるCキナーゼ活性の低下に起因する 17α OHP 生成能の出現および顆粒膜細胞における 20β -HSD活性化により獲得されるものと推察された。

学位論文審査の要旨

主査 教授 山内皓平
副査 教授 原彰彦
副査 助教授 上田宏

学位論文題名

硬骨魚類の卵成熟誘起ホルモンの同定と 生成機構に関する研究

魚類も他の脊椎動物同様、多くは有性生殖を行なうが、人為的環境下では、産卵および受精が困難な魚種も少なくない。こうした問題を解決するためには、魚類を生物学的によく理解することが必要である。特に、配偶子形成機構、すなわち、卵と精子が作られるしくみを理解することは魚類の成熟、産卵および受精を人為的に統御する上で極めて重要なことである。

一般に、魚類の卵巣中では、卵のもととなる卵原細胞が体細胞分裂による増殖の後、卵母細胞となり、卵黄などを蓄積して著しく大きさを増す。十分に成長した卵母細胞は、脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン (GTH) の作用により卵巣組織で生成された卵成熟誘起ホルモンの刺激により卵成熟を完了し、排卵されて受精可能な卵となる。魚類では、卵成熟誘起ホルモンはステロイドホルモンであると予想されていたが、その化学的同定は行なわれていなかった。そこで、本研究では、魚類の卵成熟誘起ホルモンの同定を行なうとともにその生成機構を詳細に調べた。

本研究では、まず、アマゴ、ヒラメ、マダイおよびニホンウナギを材料にして、卵成熟に伴う形態変化を調べた。その結果、アマゴの卵成熟は他のサケ科魚類同様成熟途中卵門付近に移動してきた核が明瞭に観察されることと黄色不透明な細胞質が黄色透明になることで外観から容易に確認することができた。ヒラメおよびマダイでは、両種とも卵成熟開始後約3-4時間で油球および卵黄球の融合と核移動が始まり、約15-16時間後には核崩壊が起り、約18-20時間後には卵黄が完全に融合して透明化するとともに、吸水により卵径が急増した。ニホンウナギの卵成熟過程は、形態変化などヒラメやマダイといくつかの点で異なっていたが、卵成熟の判定は容易であった。以上のように、魚類の卵成熟は核崩壊や細胞質の透明化を指標にすることにより、その判定が容易にできることを示した。

次に、卵成熟期のアマゴの卵巣組織付きの卵母細胞をGTHとともに培養し、その培養液中から卵成熟誘起ホルモンの精製と同定を行なった。培養液を抽出後、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより20画分に分離精製した。これらの画分の卵成熟誘起活性を調べ、唯一活性があった第10画分を薄層クロマトグラフィーにより純品であることを確認した。この第10画分と $17\alpha, 20\beta$

dihydroxy-4-pregn-3-one (DHP) の合成品を質量分析した結果、全く同様の質量スペクトルを示した。また、様々な合成ステロイドの卵成熟誘起活性を調べた結果、DHP が最も高い卵成熟誘起活性を示した。以上の結果から、アマゴの卵成熟誘起ホルモンは、DHP であることを脊椎動物では世界で初めて化学的に同定した。さらに、ニホンウナギについても、同様な実験を行ない、ニホンウナギの卵成熟誘起ホルモンも DHP であることを同定した。

次に、本研究では、ニジマスの卵濾胞組織が外側の莢膜および内側の顆粒膜細胞層に分離できることを利用して、卵成熟誘起ホルモン生成に関わる細胞内情報伝達系の詳細を調べた。その結果、GTH 刺激による莢膜細胞での 17α -hydroxyprogesterone (17α OHP) 生成にはカルシウム (Ca) -カルモジュリン系および細胞内 pH が関与しており、Ca・ジアシルグリセロール依存性蛋白質磷酸化酵素 (Cキナーゼ) は不活性化状態にある方がよいことを示唆した。さらに、GTH 刺激による顆粒膜細胞でのステロイド 20β -水酸基脱水素酵素 (20β -HSD) 活性化にも Ca -カルモジュリン系および細胞内 pH が関与しており、Cキナーゼは適度に活性化されていることが必要であることを示唆した。このように、GTH の作用も細胞により異なるとともに、細胞内の情報伝達系も極めて複雑であることが明らかになった。

莢膜細胞は、GTH の作用により卵黄形成期にはエストロゲンの前駆体である testosterone (T) を、卵成熟期には 17α OHP を生成する。これは莢膜細胞におけるステロイド生成系が T 生成系から 17α OHP 生成系に転換することを示しているが、この転換機構は全くわかつていない。本研究では、ニジマスの卵黄形成後期および卵成熟期の莢膜細胞層を用いて、 17α OHP 生成能獲得機構を推定するため、Cキナーゼ阻害剤と活性化剤の効果を調べた。その結果、以下のことが示唆された。卵黄形成期の莢膜細胞では、Cキナーゼにより C_{17-20} リアーゼ活性が高く維持されているため、 17α OHP はほとんど生成されず、さらに代謝された T が生成される。しかし、卵成熟期の莢膜細胞では、Cキナーゼが低下することにより C_{17-20} リアーゼ活性が低下するため、 17α OHP が生成されるようになる。莢膜細胞で生成された 17α OHP は顆粒膜細胞に局在する 20β -HSD により卵成熟誘起ホルモンである DHP へ変換される。すなわち、卵濾胞組織における卵成熟誘起ホルモン生成能は、莢膜細胞における Cキナーゼ活性の低下に起因する 17α OHP 生成能の出現および顆粒膜細胞における 20β -HSD 活性化により獲得されるものと推察された。

上述のように、本研究では、魚類の卵成熟誘起ホルモンを脊椎動物では世界で初めて化学的に同定し、その生成機構を詳細に調べた。これらの結果は、魚類の成熟および産卵を人為的に統御するための極めて重要な知見を提供したものとして高く評価され、本論文が博士（水産学）の学位請求論文として相当の業績であると認定した。