

学位論文題名

Studies on the effects of growth factors  
on the spermatogenetic cycle of the Japanese eel,  
*Anguilla japonica*

(ニホンウナギの精子形成におよぼす増殖因子の作用に関する研究)

学位論文内容の要旨

配偶子形成の制御機構の詳細を調べることは、有用生物資源の人工種苗生産技術を開発、あるいは改良する上で、非常に重要である。しかしながら、雄の配偶子形成である精子形成は、脊椎動物および無脊椎動物に共通の現象であるにもかかわらず、その制御機構は現在のところ不明な点が多い。

養殖環境下のニホンウナギ (*Anguilla japonica*) の精巣には、増殖開始前の精原細胞のみが存在し、それ以上に発達した生殖細胞は全く認められない。これらのウナギに対し、ヒト絨毛性生殖線刺激ホルモン (HCG) を投与することにより、精原細胞の増殖から減数分裂、精子変態にいたる一連の精子形成を誘導することができる。またウナギは、すでに開発されている生体外精巣器官培養を用い、ホルモンの制御により生体外で全精子形成を誘導することができる唯一の動物であり、精子形成を解析する上で優れた実験動物である。これまでの研究により、ウナギの精子形成は、HCGの刺激により、精巣中のステロイドホルモンである11-ケトテストステロン (11-KT) が、増殖因子を含む多くのタンパク性の因子を増減させることにより、進行するものと推察されている。そこで本研究は、ニホンウナギの器官培養を用いた組織学的手法および分子生物学的手法を用い、生殖細胞の増殖、分化に関与すると考えられるいくつかの増殖因子の精子形成への作用機構を解析した。

(1) インスリン様増殖因子 (IGF)

まず、IGF の精子形成への作用を精巣器官培養系を用いて解析した。これまでの研究により、インスリンを含む培養液中に 11-KT を添加すると精子形成は誘起されるが、インスリンを含んでいない培養液に 11-KT を添加しても、精子形成は全く進行しないことが解っている。培養系でのこのインシュリンの作用は、生体内ではIGFの働きを示している可能性が高い。そこで、A 型および初期 B 型精原細胞のみを有する精子形成開始前の精巣片を 11-KT 10 ng/ml の存在、非存在下の培養液中に、ヒトリコンビナント (rh) IGF- I 及び II をさまざまな濃度で添加し、15日間培養した。11-KT の非存在下に rhIGF- I、II を添加しても、精原細胞は増殖しなかったが、11-KT の存在下で rhIGF- I、II をそれぞれ 100 ng/ml を添加した群では、精原細胞が増殖し、後期 B 型精原細胞が認められた。また、11-KT の存在下、rhIGF- I、100 ng/ml の実験群では、培養開始45日目の精巣片中に変態した精子が多数認められた。

次に、ウナギ精巣 IGF- I 及び II cDNA のクローニングを行い、それらの一次構造を調べた。他の動物種で明らかにされている IGF- I 及び IGF- II の保存領域を基にプライマーを合成し、IGF- I は HCG 未投与魚の精巣 cDNA を、IGF- II は HCG 投与6日目の精巣 cDNA を鋳型に PCR 反応を行い、それぞれの cDNA 断片を得た。ウナギ精巣 (et) IGF- I の cDNA 断片は、212塩基対であり、それより予想されるアミノ酸配列は、ニジマスおよびキンギョと96%、ゼノパスと89%の相同性を示した。また etIGF- II の cDNA 断片は、448塩基対であり、そのアミノ酸配列は、ヨーロッパヘダイ及びティラピアとそれぞれ73%、71%の相同性を示し、ニジマスとは67%の相同性を示した。次に、これら etIGF- I、II の精巣での発現を調べた。HCG 投与により精子形成を誘起させたウナギの精巣から経時的に mRNA を抽出し、それらを逆転写した cDNA を用い、RT-PCR 解析を行った。その結果、etIGF- I、etIGF- II 両方の mRNA の発現が全ての精子形成過程に認められた。これらのことより、IGF- I 及び II は、精巣で産生され、11-KT によって誘起される精子形成に対し、必要不可欠な役割を果たしていることが明らかとなった。

## (2) 血小板由来増殖因子 (PDGF)

2つ目の増殖因子として、PDGFの精子形成への作用を調べた。PDGFは、血清中に存在する細胞分裂促進物質であり、2つのポリペプチド鎖A、BがPDGF-AA、AB、BBの3つのアイソフォームを形成する。そのレセプターも $\alpha$ 及び $\beta$ のサブユニットから構成されている。そこで、精子形成開始前の精巣片をインスリン1  $\mu\text{g/ml}$ の存在、非存在下の培養液中に、rhPDGF-AA及びBBをさまざまな濃度で添加し、9日間培養した。精原細胞の増殖は、DNAの複製時に取り込まれる5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU)をサンプリング24時間前に培養液中に添加し、免疫組織化学的に検出した。rhPDGF-AA、BB添加群ともに低濃度添加群に比べ、高濃度添加群でBrdUの取り込み率が有意に高かった。インスリンの影響は、rhPDGF-AAでは認められなかったが、rhPDGF-BBでは、インスリン非存在下に比べインスリン存在下のrhPDGF-BB 1、10  $\text{ng/ml}$ 添加群で、BrdUの取り込み率が有意に増加した。

次に、ウナギ精巣より、PDGF-R  $\alpha$ 及び $\beta$  cDNAのクローニングを行った。PDGF-Rのクローニングにあたって、まず他の動物種で明らかにされているPDGF-Rの保存領域を基にプライマーを合成し、ウナギ脾臓cDNAを鋳型にPCR反応を行い、cDNA断片を得た。その後、脾臓で得られたcDNAのシーケンスをもとに、再度プライマーを合成し、HCG未投与魚の精巣cDNA鋳型にPCRを行った。その結果、etPDGF-RのcDNA断片のアミノ酸配列はフグ $\beta$ 型と77%の相同性を示し、チキン $\alpha$ 型と57%の相同性を示したことから、etPDGF-R  $\beta$ 型であると予想された。以上より、PDGFは、ヒトリコンビナントが精原細胞の増殖を誘導すること、そのレセプターが精巣に存在することより、精子形成の制御に関わっており、その作用には、精子形成誘起ホルモン：11-KTの存在を必ずしも必要としないものと考えられた。また、rhPDGF-AAとBBのインスリンとの関係の違いから、それぞれのサブタイプは異なる機能を持つ可能性が示唆された。

一方、細胞増殖の制御に関わる増殖因子であるTGF $\alpha$ 、EGF及びIGFの発現

機構に関与すると考えられる成長ホルモンは、ウナギ精巣器官培養系では効果が認められなかった。

以上本研究により、生殖細胞の増殖、分化に関わると考えられる増殖因子のうち IGF-I、II 及び rhPDGF-AA、BB がニホンウナギの精子形成の制御に関与することが明らかとなった。

# 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	教授	荒井	克俊
副査	助教授	上田	宏
副査	助教授	足立	伸次

学位論文題名

## Studies on the effects of growth factors on the spermatogenetic cycle of the Japanese eel, *Anguilla japonica*

(ニホンウナギの精子形成におよぼす増殖因子の作用に関する研究)

配偶子形成の制御機構の詳細を調べることは、有用生物資源の人工種苗生産技術を開発、あるいは改良する上で、非常に重要である。しかしながら、雄の配偶子形成である精子形成は、脊椎動物および無脊椎動物に共通の現象であるにもかかわらず、その制御機構は現在のところ不明な点が多い。

養殖環境下のニホンウナギ (*Anguilla japonica*) の精巣には、増殖開始前の精原細胞のみが存在し、それ以上に発達した生殖細胞は全く認められない。これらのウナギに対し、ヒト絨毛性生殖線刺激ホルモン (HCG) を投与することにより、精原細胞の増殖から減数分裂、精子変態にいたる一連の精子形成を誘導することができる。またウナギは、すでに開発されている生体外精巣器官培養を用い、ホルモンの制御により生体外で全精子形成を誘導することができる唯一の動物であり、精子形成を解析する上で優れた実験動物である。これまでの研究により、ウナギの精子形成は、HCG の刺激により、精巣中のステロイドホルモンである 11-ケトテストステロン (11-KT) が、増殖因子を含む多くのタンパク性の因子を増減させることにより、進行するものと推察されている。そこで本研究は、ニホンウナギの器官培養を用いた組織学的手法および分子生物学的手法を用い、生殖細胞の増殖、分化に関与すると考えられるいくつかの増殖因子の精子形成への作用機構を解析した。

まず、インシュリン様成長因子 (IGF) の精子形成への作用を精巣器官培養系を用いて解析した。これまでの研究により、インスリンを含む培養液中に 11-KT を添加すると精子形成は誘起されるが、インスリンを含んでいない培養液に 11-KT を添加しても、精子形成は全く進行しないことが解っている。培養系でのこのインシュリンの作用は、生体内では IGF の働きを示している可能性が高い。そこで、A 型および初期 B 型精原細胞のみを有する精子形成開始前の精巣片を 11-KT 10 ng/ml の存在、非存在下の培養液中に、ヒトリコンビナント (rh) IGF-I 及び II をさまざまな濃度で添加し、15 日間培養した。11-

KT の非存在下に rhIGF- I、 II を添加しても、精原細胞は増殖しなかったが、11-KT の存在下で rhIGF- I、 II をそれぞれ 100 ng/ml を添加した群では、精原細胞が増殖し、後期 B 型精原細胞が認められた。また、11-KT の存在下、rhIGF- I、 100 ng/ml の実験群では、培養開始 4 5 日目の精巣片中に変態した精子が多数認められた。

次に、ウナギ精巣 IGF- I 及び II cDNA のクローニングを行い、それらの一次構造を調べた。他の動物種で明らかにされている IGF- I 及び IGF- II の保存領域を基にプライマーを合成し、IGF- I は HCG 未投与魚の精巣 cDNA を、IGF- II は HCG 投与 6 日目の精巣 cDNA を鋳型に PCR 反応を行い、それぞれの cDNA 断片を得た。ウナギ精巣 (et) IGF- I の cDNA 断片は、2 1 2 塩基対であり、それより予想されるアミノ酸配列は、ニジマスおよびキンギョと 9 6 %、ゼノバスと 8 9 % の相同性を示した。また etIGF- II の cDNA 断片は、4 4 8 塩基対であり、そのアミノ酸配列は、ヨーロッパヘダイ およびティラピアとそれぞれ 7 3 %、7 1 % の相同性を示し、ニジマスとは 6 7 % の相同性を示した。次に、etIGF- I の精巣での発現を調べた。HCG 投与により精子形成を誘起させたウナギの精巣から経時的に mRNA を抽出し、それらを逆転写した cDNA を用い、RT-PCR 解析を行ったところ、etIGF- I mRNA の発現は全ての精子形成過程に認められた。これらのことより、IGF- I 及び II は、精巣で産生され、11-KT によって誘起される精子形成に対し、必要不可欠な役割を果たしていることが明らかとなった。

2 つ目の増殖因子として、血小板由来増殖因子 (PDGF) の精子形成への作用を調べた。PDGF は、血清中に存在する細胞分裂促進物質であり、2 つのポリペプチド鎖 A、B が PDGF-AA、AB、BB の 3 つのアイソフォームを形成する。そのレセプターも a 及び b のサブユニットから構成されている。そこで、精子形成開始前の精巣片をインスリン 1 mg/ml の存在、非存在下の培養液中に、rhPDGF-AA 及び BB をさまざまな濃度で添加し、9 日間培養した。精原細胞の増殖は、DNA の複製時に取り込まれる 5-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU) をサンプリング 2 4 時間前に培養液中に添加し、免疫組織化学的に検出した。rhPDGF-AA、BB 添加群ともに低濃度添加群に比べ、高濃度添加群で BrdU の取り込み率が有意に高かった。インスリンの影響は、rhPDGF-AA では認められなかったが、rhPDGF-BB では、インスリン非存在下に比べインスリン存在下の rhPDGF-BB 1、10 ng/ml 添加群で、BrdU の取り込み率が有意に増加した。

次に、ウナギ精巣より、PDGF-R $\alpha$  及び  $\beta$  cDNA のクローニングを行った。PDGF-R のクローニングにあたって、まず他の動物種で明らかにされている PDGF-R の保存領域を基にプライマーを合成し、ウナギ脾臓 cDNA を鋳型に PCR 反応を行い、cDNA 断片を得た。その後、脾臓で得られた cDNA のシークエンスをもとに、再度プライマーを合成し、HCG 未投与魚の精巣 cDNA 鋳型に PCR を行った。その結果、etPDGF-R の cDNA 断片のアミノ酸配列はフグ  $\beta$  型と 7 7 % の相同性を示し、チキン  $\alpha$  型と 5 7 % の相同性を示したことから、etPDGF-R  $\beta$  型であると予想された。以上より、PDGF は、ヒトリコンピナントが精原細胞の増殖を誘導すること、そのレセプターが精巣に存在することより、精子形成の制御に関わっており、その作用には、精子形成誘起ホルモン：11-KT の存在を必ずしも必要としないものと考えられた。また、rhPDGF-AA と BB のインスリンとの関係の違いから、それぞれのサブタイプは異なる機能を持つ可能性が示唆された。

一方、細胞増殖の制御に関わる増殖因子である TGF $\alpha$ 、EGF 及び IGF の発現機構に関与すると考えられる成長ホルモンは、ウナギ精巣器官培養系では効果が認められなかった。

上記のように、本研究では、ニホンウナギの生体外器官培養系を用い、精子形成の制御に関与すると考えられる増殖因子に関する詳細な知見が数多く得られた。これらの結果は、今後、精子形成をより詳細に解析する上で極めて重要な知見を提供したの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。