

学 位 論 文 題 名

Studies on the cDNA cloning
of spermatogenesis-related substances and the analysis
of their functions in the Japanese eel (*Anguilla japonica*)

（ニホンウナギの精子形成関連因子の cDNA クローニングと
その機能解析に関する研究）

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、有用水産生物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。雄の配偶子形成である精子形成は、精原幹細胞の再生分裂、精原細胞の増殖、減数分裂、精子変態、精子成熟の過程を経て、受精能をもつ精子となる過程であり、様々な内分泌因子や成長因子が関与している。本研究では、この精子形成制御の分子機構を解析する目的で、養殖ニホンウナギを用いて、精子形成に伴い精巣でユニークな発現変化を示す cDNA のクローニングを行い、それらがコードする因子の発現解析及び機能解析を行った。

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、ヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン (HCG) を投与することにより、精子形成が誘起され、精子を得ることができるまでに成熟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、試験管内で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も可能である。この様に精子形成を生体外で人為的に誘導できるという他の生物には見られない特徴を持つウナギは、精子形成を解析する上で優れた実験生物と判断できる。

これまでの研究により、ウナギの精子形成過程は、精原幹細胞の再生分裂には雌性ホルモンであるエストロゲンが関与し、精原細胞の増殖から精子変態までの過程には、生殖腺刺激ホルモンの刺激により産生分泌される魚類の雄性ホルモン

である 11-ケトテストステロン (11-KT) が関与していることが明らかとなっている。この 11-KT が関与する精原細胞の増殖から精子変態までの過程には、精原細胞の増殖前（体細胞分裂開始の引き金）と精原細胞の 4 回または 5 回目の分裂前後の時期（減数分裂開始の引き金）の 2 つの時期に制御機構が存在し、精子形成が進行するものと考えられている。また、精子変態を終了した精子が運動能をもつ成熟した精子になる過程は、黄体ホルモンの一種である $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17\alpha, 20\beta$ -DP) により制御されていることが明らかとなっている。

ウナギの精子形成制御に関与する因子は、これらの制御機構時に変化するものと考えられる。そこで、これらの制御機構時に特異的に消長する cDNA のクローニングを HCG 投与前及び減数分裂の引き金が引かれると予想される投与 9 日目の精巣の mRNA を用いて、cDNA サブトラクション法により行った。その結果、HCG 処理によって発現が誘起される 13 種類の独立したウナギ精子形成関連因子 (eel spermatogenesis-related substance: eSRS) を得ることができた。得られた eSRS の塩基配列を決定し、予想されるアミノ酸配列をデータベースにより相同性の検索を行ったところ、チミジル酸シンセターゼ、Polo 相同キナーゼなど細胞増殖に関与する酵素、ヒストン H2A、チューブリン、HMG2 などの構造タンパク、炭酸脱水酵素 (CA) II、イクタカルシンなどイオン調節に関与する酵素、水チャンネルであるアクアポリン 4、脂肪酸結合タンパクなどと高い相同性を示した。

次に、これら 13 種類の eSRS が精子形成の進行に伴い、実際にどのような発現変化を示しているかを調べた。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、得られた eSRS をプローブとして、ノーザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、体細胞分裂が開始する HCG 投与後 3 日目 (eSRS26)、減数分裂開始の引き金の引かれる 9 日目 (eSRS17, 23)、減数分裂が開始する 12 日目 (eSRS19, 20, 25, 27, 28)、精子変態が開始する 15 日目 (eSRS15, 16, 18, 22, 24) にそれぞれピークを示す 4 つのグループに分けられ、それぞれ精子形成の制御機構時に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。またさらに、精子形成を誘起する 11-KT によって精巣での発現が変化する遺伝子は、精子形成に関与している可能性が高いと考えられる。そこで、生体外器官培養を用い、11-KT の刺激により発現が誘導されるかどうかをノーザンハイ

ブリダイゼーションにより調べたところ、7種類のeSRS(eSRS15, 16, 17, 19, 20, 22, 24)が11-KTにより発現が誘導されることが明らかとなった。

11-KTにより発現が誘導されるeSRSのうち、精子変態期に発現のピークを示すeSRS22は、CAと高い相同性を示した。CAは、二酸化炭素と水から水素イオンと重炭酸イオンへと可逆的に触媒する酵素であり、体内のpHを保つための重炭酸緩衝系に重要な因子である。ウナギやサケ科魚類では、精子成熟期に 17α , 20β -DPが輸精管内の精漿のpHを上昇させ、このpHの上昇が精子に運動能を与えているものと推察されている。これより、eSRS22は、精子形成過程のうち、特に精子成熟に関与している可能性が高いものと考えられた。

eSRS22の詳細な発現解析を行うため、精巣での転写レベルでの発現部位を調べた。ジゴキシゲニンでラベルしたcRNAプローブを用いて、*in situ*ハイブリダイゼーションを行ったところ、eSRS22 mRNAは、ウナギの10回の体細胞分裂のうち、8回から9回の体細胞分裂を行った後期B型精原細胞から発現が認められ、精母細胞、精細胞に最も強い発現が認められた。

次に、eSRS22の特異抗体を作成し、eSRS22タンパクの精子形成の進行に伴う精巣での発現変化を調べた。ウェスタンブロット解析を行ったところ、精細胞が見られるHCG投与後15日目、精子が出現する18日目にかけて強くなる29 kDaのバンドが認められた。また、eSRS22タンパクの精巣での局在を免疫組織化学的に調べたところ、精細胞から精子にかけて免疫陽性反応が認められ、特に精子に強い反応が認められた。これより、eSRS22タンパクは精子に局在することが明らかとなった。さらに、可溶化精子膜タンパク画分を用いたウェスタンブロット解析においてもeSRS22タンパクは、精巣と同様の分子量のバンドが認められ、抗ウシCA抗体とも反応したことから、eSRS22は、ウナギのCAの一つであること、精子成熟に関与する可能性が強く示唆された。

ウナギの精子成熟には 17α , 20β -DPが関与しており、さらに、魚類では黄体ホルモン受容体が精子に存在する可能性が示唆されている。しかしながら、 17α , 20β -DPがどのように精漿のpHを上昇させるかは明らかではない。もし、精子に存在するeSRS22/CAが精漿のpHの上昇に関与し、精子の運動能の獲得に関与しているのであれば、eSRS22/CAと 17α , 20β -DPとの間に何らかの相関があるものと予測される。そこで、 17α , 20β -DPとeSRS22/CAの活性の関係を生体外で調べた。まず、精巣から単離したウナギの精子を人工精漿に懸濁し、これに

17 α , 20 β -DP を添加して培養し、人工精漿中の pH の変化を測定した。その結果、17 α , 20 β -DP の添加により人工精漿中の pH は有意に上昇した。この 17 α , 20 β -DP による pH の上昇は、CA の活性抑制物質であるアセタゾルアミドによって抑えられた。また、抗 eSRS22 抗体と反応させた精子を用い、同様の実験を行ったところ、17 α , 20 β -DP による人工精漿中の pH の上昇は抑えられる傾向が認められた。さらに、他魚種でも精子に局在する CA が精漿の pH を上昇させるかどうかを検証するために、成熟前のサクラマス精子を用いて、同様の実験を行ったところ、17 α , 20 β -DP による pH の上昇とアセタゾルアミドによる抑制が認められ、eSRS22/CA が精子成熟に関わる酵素であることが強く示唆された。これらの結果より、17 α , 20 β -DP が直接精子に作用し、精子に存在する CA が重炭酸イオンを精漿に放出することによって精漿中の pH が上昇し、精子成熟が進行することが明らかとなった。

以上、本研究では、精子形成に関連する数多くの因子が明らかとなり、精子形成制御機構に複雑に関与する可能性が示唆された。さらに、eSRS22 が得られ、解析されたことにより、これまで不明であった 17 α , 20 β -DP 以降の制御機構の詳細が明らかとなり、新しい精子成熟の制御機構を提唱できた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山内	皓平
副査	教授	麦谷	泰雄
副査	教授	原	彰彦
副査	助教授	足立	伸次
副査	助教授	三浦	猛

学位論文題名

Studies on the cDNA cloning of spermatogenesis-related substances and the analysis of their functions in the Japanese eel (*Anguilla japonica*)

(ニホンウナギの精子形成関連因子の cDNA クローニングと
その機能解析に関する研究)

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、不明な点が多く存在する。

養殖環境下のニホンウナギの精巣には、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、ヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン (HCG) を投与することにより、精原細胞の増殖から減数分裂、精子変態に至る一連の精子形成過程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生物であり、精子形成を解析する上で優れた実験生物である。本研究では、この精子形成制御の分子機構を解析する目的で、養殖ニホンウナギを用いて、精子形成に伴い精巣でユニークな発現変化を示す cDNA クローニングを行い、それらがコードする因子の発現解析及び機能解析を行った。

精子形成制御に関わる因子の cDNA をクローニングするために、精子形成開始前と減数分裂の開始の引き金が引かれる時期の精巣の mRNA を用いて、cDNA サブトラクション法を行ったところ、13種類の独立したウナギ精子形成関連因子 cSRS (eel spermatogenesis-related substance) を得ることができた。次に、これらの精子形成に伴う

発現変化を調べたところ、体細胞分裂開始期、減数分裂開始の制御機構時、減数分裂開始期、精子変態期にピークを示す4つのグループに分類されることが明らかとなった。また、13種類のeSRSのうち、7種類のeSRSが精子形成誘起ステロイド：11-ケトテストステロン(11-KT)により発現が誘導されたことより、精子形成に関与している可能性が考えられた。

今回得られた因子のうち、精子変態期に発現のピークを示すeSRS22は体内のpH調節に関わる酵素である炭酸脱水酵素(CA)と高い相同性を持ち、11-KTによりその発現が誘導された。CAは体内のpHを保つための重炭酸緩衝系に重要な因子である。精子形成のうち、pHが関与する過程は、精子成熟である。そこで、eSRS22に関して詳細な発現解析を行った。eSRS22 mRNAの精巣での局在を*in situ* ハイブリダイゼーションにより調べたところ、ウナギの10回の体細胞分裂のうち、8回から9回の体細胞分裂を行った後期B型精原細胞から発現が認められ、精母細胞、精細胞に最も強い発現が認められた。次に、eSRS22特異抗体を作成し、eSRS22タンパクの精子形成の進行に伴う精巣での発現変化をウェスタンブロット解析で調べたところ、精細胞が見られるHCG投与後15日目、精子が出現する18日目にかけて強くなる29 kDaのバンドが認められた。また、eSRS22タンパクの精巣での局在を免疫組織化学的に調べたところ、精細胞から精子にかけて免疫陽性反応が認められ、特に精子に強い反応が認められた。これより、eSRS22タンパクは精子に局在することが明らかとなった。さらに、可溶化精子膜タンパク画分を用いたウェスタンブロット解析においてもeSRS22タンパクは、精巣と同様の分子量のバンドが認められ、抗ウシCA抗体とも反応したことから、eSRS22は、ウナギのCAの一つであること、精子成熟に関与する可能性が強く示唆された。

最後にeSRS22の機能解析を行った。ウナギの精子成熟には精子成熟誘起ステロイドである17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one(17 α , 20 β -DP)が関与している。17 α , 20 β -DPが精漿中のpHを上昇させ、この上昇が精子に運動能を与えているものと推察されている。もし、精子に存在するeSRS22/CAが精漿中のpHの上昇に関与し、精子の運動能の獲得に関わっているのであれば、eSRS22/CAと17 α , 20 β -DPとの間に何らかの相関があるものと予測される。そこで、eSRS22/CAと17 α , 20 β -DPとの関係を調べるため、精子の培養実験を行った。その結果、17 α , 20 β -DPを人工精漿に添加することにより、人工精漿中のpHが上昇し、そのpHの上昇は、CAの活性抑制物質であるアセタゾルアミドにより抑えられた。また、eSRS22抗体処理を行った精子を用いて培養を行ったところ、17 α , 20 β -DPによる人工精漿のpHの上昇は抑えられる傾向が認められた。以上より、17 α , 20 β -DPが直接精子に作用し、精子に存在するCAが重炭酸イオンを精漿に放出することによって精漿中のpHが上昇し、精子成熟が進行することが明らかとなった。

上記のように、本研究では、ニホンウナギを用い、精子形成制御に関与すると考え

られる因子に関する詳細な知見が数多く得られ、さらに新しい精子成熟の制御機構を提唱できた。これらの結果は、今後、精子形成を解析する上で極めて重要な知見を提供したものであるとして高く評価され、本論文が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。