

学 位 論 文 題 名

Control Mechanism of Spermatogenesis in Teleost Fishes:
Involvement of Sex Steroid Hormones

（性ステロイドホルモンによる魚類精子形成制御機構に関する研究）

学位論文内容の要旨

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維持している。この生殖を担う主役が卵および精子といった生殖細胞であり、生殖細胞を作る過程が配偶子形成である。配偶子形成の制御機構の詳細を明らかにすることは、有用魚種の種苗生産技術を確立あるいは改良する上で非常に重要である。

雄の配偶子：精子を作る精子形成過程は、生殖腺刺激ホルモン（GTH）および GTH によって産生が誘導されている性ステロイドホルモンによって制御されている。魚類では、ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) の精巣および生殖細胞の培養系の確立以来、GTH および性ステロイドホルモンによる制御機構の詳細が、分子レベルで明らかになりつつある。しかし、ウナギ以外の魚類では、精子形成の解析に適した実験系が存在しないため、魚類共通の制御機構を解明することは困難であった。そこで本研究は、魚類共通の精子形成の制御機構を解析することを目的として、ウナギ以外の魚種として、サケ科魚類のイトウ (*Hucho perryi*) を用いて精子形成の制御機構解析系を作製し、これを用いて内分泌因子、特に性ステロイドホルモンによる精子形成の制御機構を解析した。

生体外精巣器官培養系の確立に先立ち、イトウの精子形成過程とそれに伴う血中性ステロイドホルモン量の変化を調べた。イトウの

精子形成の開始は他魚種と比較して遅い。3 年魚の 2 月（受精後 44 ヶ月）までは、精巣中に生殖細胞として精原幹細胞である A 型あるいは初期 B 型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存在しない。3 月になると精子形成が開始し、増殖型の後期 B 型精原細胞が出現し、さらに 4 年魚の 6 月には減数分裂を開始した精母細胞と精細胞、8 月には精子変態を終了した精子がそれぞれ出現した。その後、精子形成は更に進行し、翌年の 2 月には、産卵期（5 月）とほぼ同様の精巣の状態であった。

性成熟に関わると予想される 3 種類の性ステロイドホルモン；11-ケトテストステロン（11-KT）、エストラジオール- 17β （E2）および $17\alpha,20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン（ $17\alpha,20\beta$ -DP）の精子形成の進行に伴う血中量の変化を、ラジオイムノアッセイ法により測定した。ウナギの精子形成誘起ホルモンである 11-KT は、精子形成開始前の個体では 1ng/ml 前後と低い値を示していたが、精子形成開始直前に上昇を開始し、精原細胞の増殖が認められる 3 月には $4.15 \pm 0.38\text{ng/ml}$ と有意に上昇した。その後、一旦その値は減少するが、精子が精巣に出現する 8 月から再び増加に転じ、産卵期の 2 週間前にはその値はほぼ 100ng/ml に達した。ウナギでは精原幹細胞の再生分裂の制御に関わる E2 は、 55.5pg/ml から 333pg/ml と個体差は激しいものの、確実に雄個体血中に存在した。その血中の季節変化は、精子形成の前半が高く、成熟が進行するにつれて減少する傾向が認められた。ウナギおよびサケ科魚類の精子成熟誘起ステロイドである $17\alpha,20\beta$ -DP は、他のサケ科魚類と同様、精原細胞増殖期での 200pg/ml の小さなピークと、産卵期の直前からの 7.5ng/ml に達する劇的な増加が認められた。これらの結果から、イトウでもウナギと同様、11-KT は精子形成の開始と二次性徴、E2 は精原幹細胞の再生分裂、 $17\alpha,20\beta$ -DP は精子成熟の制御にそれぞれ関わることが考

えられた。

次に、精原幹細胞のみを持つイトウ精巢を用いて、精巢器官培養系を構築しそれを用いて、性ステロイドホルモンの精子形成への作用を直接的に調べた。培養は、ニトロセルロース膜で覆ったニワトコの髄上に細切したイトウ精巢片を置き、それを L-15 を基本とした培養液に浮かせる方法を採用した。培養は 12℃、100% 空気条件下で行われた。この培養系に 11-KT、E2 または $17\alpha,20\beta$ -DP を添加し、これらのステロイドホルモンがイトウ精子形成に与える影響を形態学的に調べた。その結果、各ステロイドとも精原細胞の増殖を有意に誘導した。しかし、E2 によって増殖した精原幹細胞は、増殖後も精原幹細胞のままであったのに対し、11-KT および $17\alpha,20\beta$ -DP の刺激によって増殖した精原細胞は、その後減数分裂へ向かう増殖型の後期 B 型精原細胞であった。この結果は、11-KT および $17\alpha,20\beta$ -DP は減数分裂へ向かう精原細胞の増殖分裂を誘導し、E2 は精原幹細胞の再生分裂を誘導したことを示しており、11-KT および E2 に関しては、ウナギで示された仮説、すなわち 11-KT が精子形成開始因子であり、E2 が精原幹細胞の再生分裂誘起因子であることをウナギ以外の魚種で始めて生体外で追認した。しかしイトウでは、長期間の培養を行っても、減数分裂以降の精子形成過程は誘導されなかったことから、減数分裂以降の制御機構を解析するためには、今後さらに培養系の改良を重ねる必要がある。

イトウの精巢器官培養実験では、11-KT のみならず、 $17\alpha,20\beta$ -DP によっても精原細胞の増殖分裂が誘導された。魚類では、 $17\alpha,20\beta$ -DP は精子成熟の誘導に関わるホルモンと考えられているが、初期の精子形成の制御に関しては、いずれの種でも明らかとなっていない。そこで、初期精子形成過程の内分泌制御機構が明らかとなっているウナギの精巢器官培養系を用いて、 $17\alpha,20\beta$ -DP の精子形成への

作用を確かめた。 $17\alpha,20\beta$ -DP を添加してウナギ精巢を培養したところ、100 pg/ml という低濃度で、10 ng/ml の 11-KT を添加した場合と同様、精原細胞の増殖から精子変態にいたる全精子形成過程が誘導された。しかし、11-KT は、精子形成開始時に培養液中に存在していれば、その後培養液から 11-KT を取り除いても精子形成は停止することなく進行するのに対し、 $17\alpha,20\beta$ -DP は精子形成のすべての過程で常に培養液中に存在していなければ、精子形成は進行しなかった。この結果より、 $17\alpha,20\beta$ -DP は 11-KT と同様、精子形成の全過程を誘導する能力はあるが、その制御機構は明らかに異なることが判明した。このように、ウナギでもイトウと同様、 $17\alpha,20\beta$ -DP が精子形成を誘導することが明らかとなったが、11-KT と $17\alpha,20\beta$ -DP の役割の違いなど、新たな疑問が生じた。魚類の精子形成制御機構の全貌を解明するためには、今後、11-KT と $17\alpha,20\beta$ -DP の作用メカニズムの違いを分子レベルで解明することが必要となろう。

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	足立	伸次
副査	助教授	三浦	猛

学位論文題名

Control Mechanism of Spermatogenesis in Teleost Fishes: Involvement of Sex Steroid Hormones

(性ステロイドホルモンによる魚類精子形成制御機構に関する研究)

精子形成過程は、生殖腺刺激ホルモン (GTH) および GTH によって産生が誘導されている性ステロイドホルモンによって制御されている。魚類ではニホンウナギ (*Anguilla japonica*) の精巣および生殖細胞の培養系の確立以来、GTH および性ステロイドホルモンによる制御機構の詳細が分子レベルで明らかになりつつある。しかしウナギ以外の魚類では、精子形成の解析に適した実験系が存在しないため、魚類共通の制御機構を解明することは困難であった。そこで本研究は、魚類共通の精子形成の制御機構を解析することを目的として、サケ科魚のイトウ (*Hucho perryi*) を用いて精子形成の制御機構解析系を作製し、これを用いて内分泌因子、特に性ステロイドホルモンによる精子形成の制御機構を解析した。

生体外精巣器官培養系の確立に先立ち、イトウの精子形成過程とそれに伴う血中性ステロイドホルモン量の変化を調べた。3年魚の2月までは、精巣中に生殖細胞として精原幹細胞のみが存在し、それ以上に発達した生殖細胞は全く存在しない。3月になると精子形成が開始し、増殖型の精原細胞が出現し、さらに4年魚の6月には精母細胞と精細胞、8月には精子がそれぞれ出現した。その後、精子形成は進行し、翌年の2月には、産卵期(5月)とほぼ同様の精巣の状態であった。

性成熟に関わると予想される3種類の性ステロイドホルモン; 11-ケトテスト

ステロン (11-KT)、エストラジオール- 17β (E2) および $17\alpha,20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン ($17\alpha,20\beta$ -DP) の精子形成の進行に伴う血中量の変化を測定した。ウナギの精子形成誘起ホルモンである 11-KT は、精子形成開始前の個体では比較的低い値を示していたが、精子形成開始直前に上昇を開始し、精原細胞の増殖が認められる 3 月には有意に上昇した。その後、一旦その値は減少するが、精子が精巣に出現する 8 月から再び著しい増加に転じ、産卵期の 2 週間前にはピークに達した。ウナギでは精原幹細胞の再生分裂の制御に関わる E2 は、個体差は激しいものの精子形成の期間中常に雄個体血中に存在した。魚類の黄体ホルモンである $17\alpha,20\beta$ -DP は、他のサケ科魚類と同様、精原細胞増殖期での小さなピークと、産卵期の直前からの劇的な増加が認められた。

次に、精原幹細胞のみを持つイトウ精巣を用いて、精巣器官培養系を構築し、性ステロイドの精子形成への作用を直接的に調べた。培養系に 11-KT、E2 または $17\alpha,20\beta$ -DP を添加し、これらのステロイドホルモンがイトウ精子形成に与える影響を形態学的に調べところ、各ステロイドとも精原細胞の増殖を有意に誘導した。しかし、E2 によって誘導された増殖は精原幹細胞の再生分裂であったのに対し、11-KT および $17\alpha,20\beta$ -DP によって誘導された増殖は減数分裂へ向かう精原細胞の増殖分裂であった。この様に、11-KT および E2 に関しては、ウナギで示された仮説、すなわち 11-KT が精子形成開始因子であり、E2 が精原幹細胞の再生分裂誘起因子であることをウナギ以外の魚種で始めて生体外で追認した。しかしイトウでは、長期間の培養を行っても、減数分裂以降の精子形成過程は誘導されなかった。

イトウの精巣器官培養実験では、11-KT のみならず、 $17\alpha,20\beta$ -DP によっても精原細胞の増殖分裂が誘導された。魚類では、 $17\alpha,20\beta$ -DP は精子成熟の誘導に関わるホルモンと考えられているが、初期の精子形成の制御に関しては、いずれの種でも明らかとなっていない。そこで、初期精子形成過程の内分泌制御機構が明らかとなっているウナギの精巣器官培養系を用いて、 $17\alpha,20\beta$ -DP の精子形成への作用を確かめた。 $17\alpha,20\beta$ -DP を添加してウナギ精巣を培養したところ、11-KT を添加した場合と同様、精原細胞の増殖から精子変態にいたる全精子形成過程が誘導された。しかし、11-KT は、精子形成開始時に培養液中に存在していれば、その後培養液から 11-KT を取り除いても精子形成は停止することなく進行するのに対し、 $17\alpha,20\beta$ -DP は精子形成のすべての過程で常に培養液中に存在していなければ、精子形成は進行しなかった。この結果より、 $17\alpha,20\beta$ -DP は 11-KT と同様、精子形成の全過程を誘導する能力はあるが、その制御機構は明らかに異なることが判明した。

以上のように、本研究は、**E2** および **11-KT** の精子形成への作用をウナギ以外で初めて追認するとともに、黄体ホルモンの精子形成への作用を初めて明らかにした。これらの結果は、難種苗生産魚の精子作出技術の確立に大きな影響を与えるものと高く評価される。

よって審査員一同は、著者が北海道大学博士（水産科学）の学位を授与される資格を有すると認める。