

学 位 論 文 題 名

Studies on the endocrine control mechanism
of early oogenesis in fish

（魚類卵形成初期の内分泌制御機構に関する研究）

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、或いは改良する上で、非常に重要である。一般に、雌の配偶子形成過程である卵形成では、始原生殖細胞が卵巣に入り卵原細胞となり、体細胞分裂を繰り返した後、減数分裂を開始し卵母細胞となる。卵母細胞は第一減数分裂前期で分裂を一時休止し、その間に卵黄を蓄積して成長し、減数分裂を再開した後、最終成熟（卵成熟）を経て成熟卵へと分化する。その卵形成に関する内分泌制御機構は、第一減数分裂の再開から卵成熟までは詳細に解明されているが、卵原細胞の増殖から周辺期の卵母細胞に至る初期卵形成に関しては、一部の脊椎動物を除いてほとんど解明されていない。その原因の一つとして、多くの生物種の卵形成が、発生の極初期に、直ちに第一減数分裂の前期にまで達してしまうため、初期卵形成制御機構を解明することが困難であることが挙げられる。そこで本研究では、卵形成の進行が比較的遅いと考えられるマツカワ（*Verasper moseri*）及びイトウ（*Hucho perryi*）を実験モデルとして選び、初期卵形成過程を組織学的に観察するとともに、その制御機構を内分泌学的に解析した。

まず、マツカワの初期卵形成過程を、光学顕微鏡及び電子顕微鏡により観察した。光顕観察の結果、全長 3 cm では、生殖腺、生殖細胞ともにその形状は未分化であったが、全長 4 cm では、卵巣腔が形成され始め、形態的な性分化が既に始まっていた。また、全長 3 cm から 10 cm までは体成長に伴

い、生殖細胞の発達段階が進行していた。包囊は全長 4 cm から形成され、全長 7 cm まで体成長に伴って、大きくなり、包囊中の生殖細胞数も増加した。一方、全長 8 cm 以降、包囊は小さくなり、包囊中の生殖細胞数は減少した。さらに、全長 7 cm では、大きな包囊内に、卵原細胞か卵母細胞かの区別がはっきりしない核が凝縮した生殖細胞が観察された。電顕観察の結果、それらの細胞は、核内にシナプトネマ構造を持つ第一減数分裂前期の卵母細胞であり、この時期に、卵原細胞は減数分裂へと移行し、卵母細胞となることが明らかとなった。次に、マツカワの卵原細胞の増殖及び減数分裂開始時期を DNA 合成を指標として詳細に調べた。全長 3 cm から 1 cm 間隔で 12 cm までのマツカワの BrdU の腹腔内投与実験並びに免疫組織学的解析を行ったところ、全長 5 cm と 7 cm で多数の生殖細胞が BrdU を取り込んでいるのが観察され、盛んに DNA 合成を行っていた。また、DNA 合成している生殖細胞の核の面積を計測し、各全長での DNA 合成している生殖細胞の核の大きさとその割合をヒストグラムにして比較したところ、全長 5 cm では核の面積が小さい生殖細胞で DNA 合成が盛んに行われていたが、体成長が進むにつれて核の面積が大きな生殖細胞で DNA 合成が盛んに行われていた。卵原細胞の核が卵母細胞の核より小さいことから、マツカワの卵巢では、全長 5 cm で卵原細胞が体細胞分裂により活発に増殖しており、全長 7 cm で卵原細胞は減数分裂を開始し、卵母細胞となることが明らかとなった。

このような初期卵形成過程での卵原細胞増殖時の体細胞分裂や卵母細胞へ分化する際の減数分裂は、生殖腺刺激ホルモン (GTH) 等の内分泌制御因子が関与していることが示唆されているが、直接的な証明は無く、その詳細は明らかではない。そこでまず、GTH が初期卵形成制御に与える影響及び GTH の作用がステロイドホルモンの産生を介しているか否かをイトウの生体外卵巢器官培養法により調べた。GTH が含まれるサケ脳下垂体糖タンパク画分 (SPG) 単独添加群、 3β -水酸基脱水素酵素の阻害剤であるトリロスタン (Tri) 単独添加群、SPG と Tri の複合添加群及び対照群を設け、生殖細胞の BrdU の取り込みを調べたところ、SPG 0.1、1、10 ng/ml 添加群

では、対照群に比べ DNA 合成を行っている生殖細胞の割合は有意に増加していた。また、Tri 単独添加群、SPG と Tri の複合添加群での DNA 合成を行っている生殖細胞の割合は、対照群と比較し有意に減少していた。以上の結果、GTH が卵巣に作用し、卵巣で合成されたステロイドホルモンが初期卵形成を制御していることが示唆された。

次に、初期卵形成過程で GTH の作用により産生されと考えられる内分泌制御因子として、性ステロイドホルモンであるエストラジオール- 17β (E2)、 $17\alpha, 20\beta$ -ジハイドロキシ-4-プレグネン-3-オン ($17\alpha, 20\beta$ -DHP) 及び 11-ケトテストステロン (11-KT) が初期卵形成の制御に与える影響を生体外器官培養法により調べた。E2 及びアロマタースの阻害剤であるファドロゾール (Fad) 単独添加群、E2 と Fad の複合添加群、E2 と SPG の複合添加群、 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 及び Tri 単独添加群、 $17\alpha, 20\beta$ -DHP と Tri の複合添加群、11-KT 単独添加群、及び対照群を設け、生殖細胞の BrdU の取り込みを調べたところ、DNA 合成を行っている生殖細胞の割合は E2 0.1 ng/ml 添加群及び $17\alpha, 20\beta$ -DHP 1 ng/ml 添加群で、対照群に比べ有意に高値を示した。また、Fad 単独添加群及び Tri 単独添加群では、対照群に比べ有意に低値を示した。一方、E2 と Fad の複合添加群、E2 と SPG の複合添加群及び $17\alpha, 20\beta$ -DHP と Tri の複合添加群では、対照群、Fad 単独添加群及び Tri 単独添加群に比べ DNA 合成を行っている生殖細胞の割合は有意に高値を示した。さらに、全ての 11-KT 添加群での生殖細胞の DNA 合成の割合は対照群と同程度であった。これらのことから、11-KT は初期卵形成に作用せず、E2 及び $17\alpha, 20\beta$ -DHP が初期卵形成を制御していると考えられた。

最後に、上記の E2 及び $17\alpha, 20\beta$ -DHP の初期卵形成での制御機構の違いを調べた。まず、卵原細胞が活発に増殖している時期、減数分裂に移行する時期、ほぼ全ての生殖細胞が減数分裂を開始している時期及び排卵時のイトウの血中 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 量を測定したところ、卵原細胞が活発に増殖している時期やほぼ全ての生殖細胞が減数分裂を開始している時期に比べ、減数分

裂に移行する時期での血中 17α , 20β -DHP 量は有意に高値を示した。このことから、 17α , 20β -DHP は減数分裂への移行に深く関与していると考えられた。次に、生体外器官培養実験での対照群、E2 添加群及び 17α , 20β -DHP 添加群の DNA 合成を行っている生殖細胞の核の面積並びにシナプトネマ構造を有する卵母細胞の割合を計測し、それらを比較したところ、DNA 合成を行っている生殖細胞の核の面積は、E2 添加群では対照群と比較して変化は見られなかったが、 17α , 20β -DHP 添加群では、対照群、E2 添加群と比較し、有意に高値を示した。また、シナプトネマ構造を有する卵母細胞の割合は、E2 添加群では対照群に比べ有意に低値を示したのに対し、 17α , 20β -DHP 添加群では、対照群、E2 添加群に比べ有意に高値を示した。これらのことから、E2 添加群では、増殖中の卵原細胞が DNA 合成を行っていて、 17α , 20β -DHP 添加群では、減数分裂に突入した染色前期の卵母細胞が DNA 合成を行っていることが推察され、E2 と 17α , 20β -DHP は初期卵形成過程で異なる制御機構を示すと考えられた。

以上の結果より、GTH がステロイドホルモンの産生を介して魚類初期卵形成制御に作用すると考えられた。また、E2 は卵原細胞の増殖を誘導し、 17α , 20β -DHP は卵原細胞から染色前期の卵母細胞へと分化する際の減数分裂を誘導していることが明らかとなり、これらの性ステロイドホルモンが魚類初期卵形成を制御することが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 内 皓 平
副 査 教 授 三 浦 猛 (愛媛大学)
副 査 教 授 原 彰 彦
副 査 助 教 授 足 立 伸 次

学 位 論 文 題 名

Studies on the endocrine control mechanism of early oogenesis in fish

(魚類卵形成初期の内分泌制御機構に関する研究)

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、或いは改良する上で、非常に重要である。雌の配偶子形成過程である卵形成に関する内分泌制御機構は、第一減数分裂の再開から卵成熟までは詳細に解明されているが、卵原細胞の増殖から周辺仁期の卵母細胞に至る初期卵形成に関しては、一部の脊椎動物を除いてほとんど解明されていない。その原因の一つとして、多くの生物種の卵形成が、発生の極初期に、直ちに第一減数分裂の前期にまで達してしまうため、初期卵形成制御機構を解明することが困難であることが挙げられる。そこで本研究では、卵形成の進行が比較的遅いと考えられるマツカワ (*Verasper moseri*) 及びイトウ (*Hucho perryi*) を実験モデルとして選び、初期卵形成過程を組織学的に観察するとともに、その制御機構を内分泌学的に解析した。

まず、マツカワの初期卵形成過程を、光学顕微鏡及び電子顕微鏡により観察した。光顕観察の結果、全長 7 cm では、卵原細胞か卵母細胞かの区別がはっきりしない核が凝縮した生殖細胞が観察され、電顕観察の結果、それらの細胞は、核内にシナプトネマ構造を持つ第一減数分裂前期の卵母細胞であり、この時期に、卵原細胞は減数分裂へと移行し、卵母細胞となることが明らかとなった。また、マツカワの卵原細胞の増殖及び減数分裂開始時期を DNA 合成を指標として詳細に調べたところ、全長 5 cm と 7 cm で多数の生殖細胞が BrdU を取り込んでおり、盛んに DNA 合成を行っていた。さらに、DNA 合成している生殖細胞の核の面積を計測し、各全長での核の大きさとその割合をヒストグラムにして比較したところ、全長 5 cm では核の面積が小さい生殖細胞で DNA 合成が盛んに行われていたが、体成長が進むにつれて核の面積が大きな生

殖細胞で DNA 合成が盛んに行われていた。以上の結果から、マツカワの卵巢では、全長 5 cm で卵原細胞が体細胞分裂により活発に増殖しており、全長 7 cm で卵原細胞は減数分裂を開始し、卵母細胞となることが明らかとなった。

初期卵形成過程での卵原細胞増殖時の体細胞分裂や卵母細胞へ分化する際の減数分裂は、生殖腺刺激ホルモン (GTH) 等の内分泌制御因子が関与していることが示唆されているが、その詳細は明らかではない。そこでまず、GTH が初期卵形成制御に与える影響及び GTH の作用がステロイドホルモンの産生を介しているか否かをイトウの生体外卵巢器官培養法により調べたところ、GTH が含まれるサケ脳下垂体糖タンパク成分 (SPG) 添加群では、対照群に比べ DNA 合成を行っている生殖細胞の割合は有意に増加していた。一方、3 β -水酸基脱水素酵素の阻害剤であるトリロスタン (Tri) 単独添加群、SPG と Tri の複合添加群でのその割合は、対照群と比較し有意に減少していた。以上の結果、GTH が卵巢に作用し、卵巢で合成されたステロイドホルモンが初期卵形成を制御していることが示唆された。次に、初期卵形成過程で GTH の作用により産生されると考えられる内分泌制御因子として、性ステロイドホルモンであるエストラジオール-17 β (E2)、17 α , 20 β -ジハイドロキシ-4-プレグネン-3-オン (17 α , 20 β -DHP) 及び 11-ケトテストステロン (11-KT) が初期卵形成の制御に与える影響を生体外器官培養法により調べた。その結果、11-KT は初期卵形成に作用せず、E2 及び 17 α , 20 β -DHP が初期卵形成での DNA 合成を制御していた。

最後に、上記の E2 及び 17 α , 20 β -DHP の初期卵形成での制御機構の質的な違いを調べた。まず、イトウの血中 17 α , 20 β -DHP 量を測定したところ、卵原細胞が活発に増殖している時期やほぼ全ての生殖細胞が減数分裂を開始している時期に比べ、減数分裂に移行する時期での血中 17 α , 20 β -DHP 量は有意に高値を示した。また、生体外器官培養実験での対照群、E2 添加群及び 17 α , 20 β -DHP 添加群の DNA 合成を行っている生殖細胞の核の面積並びにシナプトネマ構造を有する卵母細胞の割合を計測し、それらを比較したところ、前者は、17 α , 20 β -DHP 添加群で、他の群と比較し、有意に高値を示した。また、後者は、E2 添加群では対照群に比べ有意に低値を示したのに対し、17 α , 20 β -DHP 添加群では、他の群に比べ有意に高値を示した。これらのことから、E2 添加群では、増殖中の卵原細胞が、17 α , 20 β -DHP 添加群では、減数分裂に突入した染色前期の卵母細胞がそれぞれ盛んに DNA 合成を行っており、E2 と 17 α , 20 β -DHP は初期卵形成過程で異なる制御機構を示すことが明らかとなった。

上記のように、本研究では、E2 が卵原細胞の増殖を誘導し、17 α , 20 β -DHP が卵原細胞から染色前期の卵母細胞へと分化する際の減数分裂を誘導していること等、魚類卵形成初期の内分泌制御機構に関する新たな知見が数多く得られた。これらの結果は、今後、魚類の早期成熟等、新しい人工種苗生産技術を確立するために極めて重要

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（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。