

研究課題別研究評価

1. 研究課題:ウナギが解き明かす精子形成の謎

2. 研究者名:三浦 猛

3. 研究のねらい

精子形成は、種の連続性を維持する上で必要不可欠であるが、その制御機構の詳細は、意外と明らかとなっていない。ウナギは、試験管内でホルモン処理により人為的に精子形成の全過程を誘導できる唯一の脊椎動物であることから、精子形成の制御機構を調べる上で優れた実験動物と判断される。本研究は、このウナギを実験材料として、謎の多い精子形成制御の分子機構の解明を目指した。

4. 研究成果と自己評価

ウナギの精子形成の進行過程は、①精原幹細胞再生分裂期、②精原細胞増殖期、③減数分裂期、④精子変態期、⑤精子成熟期の5期に分けることができる。このうち②から④の過程は、雄性ホルモンである11-ケトテストステロン(11-KT)、⑤の過程は黄体ホルモンである $17\alpha,20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン($17\alpha,20\beta$ -DP)によって制御されていることを以前明らかにした。本研究では更に、①の過程が雌性ホルモンであるエストラジオール- 17β (E2)によって制御されていることなどを明らかにした。

このような精子形成への性ステロイドの作用は、これらのレセプターが存在するセルトリ細胞(生殖細胞を取り囲む唯一の体細胞)での何らかの物質産生を介すると考えられる。この性ステロイド以降の制御に関わる因子(ウナギ精子形成関連因子:eSRS)は、精子形成の各過程で、或いは、性ステロイドの刺激によって、精巣での発現が変化するものと考えられる。そこで、その様な因子をコードするcDNAのクローニングを試みたところ、eSRSの候補となる35種類のcDNAクローンを得た。次いで、これらのうち精子形成の制御に関わると予想されるものの機能解析を試みた。

E2の下流で精原幹細胞の再生分裂の制御に関わると考えられるのが、血管新生因子の一種であるPD-ECGFの相同物質と考えられるeSRS34である。eSRS34はE2の刺激により精巣での発現が誘導され、さらにヒトの組換え体であるrhPD-ECGFは、生体外精巣器官培養系で、精原幹細胞の増殖誘導能を有していた。今後この仮説を証明するために、更に詳細な解析を行っていく予定である。

11-KTの下流で、減数分裂へ向けての精原細胞の増殖分裂の開始に関わると考えられるのが、eSRS1とeSRS21の2種類である。アクチビンBの相同物質であるeSRS1の発現は、精原細胞増殖開始と同時に11-KTの刺激によりセルトリ細胞で誘導される。eSRS1の組換え体タンパクを作製し、それを精巣器官培養系に添加して、eSRS1の精子形成に対する作用を解析したところ、本因子は精原細胞の増殖能を有していた。しかし、eSRS1のみの添加では、減数分裂以降の精子形成過程を誘導できなかった。このことより、ウナギではeSRS1が精原細胞の増殖を誘導する因子であることがほぼ明らかとなったが、減数分裂以降の制御に関してはeSRS1以外の因子の存在が必要であると考えられた。今後、この減数分裂開始の制御に関わる因子の検索を行う予定である。一方、eSRS21は、精原細胞増殖開始前のセルトリ細胞で発現し、増殖開始後、11-KTの刺激によ

って直ちにその発現が消失する。eSRS21 の組換え体タンパクを作製し、それを精巣器官培養に添加し、同因子の精子形成への作用を検討したところ、eSRS21 は 11-KT が持つ精原細胞増殖能を有意に抑制した。これは、eSRS21 が、その精子形成の進行を抑える機構の一翼を担う因子である可能性を示している。

変態した精子が運動能を持つ成熟精子になる過程は、精子成熟期の血中に認められる $17\alpha,20\beta$ -DP によって制御されている。この $17\alpha,20\beta$ -DP の精子成熟に対する作用は、精子に対し直接ではなく、輸精管内の精漿 pH 値の上昇を介している。本研究で、体液の pH 制御に関わる重碳酸塩緩衝系の主要な酵素、カルボニックアンヒドラーゼ II (CA II) のホモログ eSRS22 を得ることができた。eSRS22 タンパクは、 $17\alpha,20\beta$ -DP 受容体が存在する精子膜で発現していた。もし、精子に存在する eSRS22 が精漿 pH 値の上昇に関与し、精子成熟に関わるのであれば、精子成熟誘起能を持つ $17\alpha,20\beta$ -DP と eSRS22/CA II の活性との間に何らかの相関があるものと考えられる。そこで、ウナギ精子での、 $17\alpha,20\beta$ -DP と eSRS22/CA II の活性との関係を生体外で調べたところ、 $17\alpha,20\beta$ -DP は精子に作用し精漿 pH 値を有意に上昇させた。この結果より、eSRS22/CA II は精子成熟に関わる重要な酵素であることが明らかとなり、精子成熟の制御機構の一端が解明された。

本研究により、ウナギを精子形成の制御機構を調べるための実験モデルとして活用できるだけの道具立てが揃った。今後更に、ウナギを用いて精子形成の解析を進めていけば、その成果は、単に魚類だけに止まらず、生物における精子形成制御の全貌の解明に一役買うであろう。またこのような基礎研究の成果は、将来的には有用生物資源や絶滅が危惧されている希少種の繁殖技術の確立等、応用面においても貢献できるものと期待している。

5. 領域総括の見解

本研究は、試験管内で精子形成が誘導可能なウナギに着目して、脊椎動物の精子形成機構の解明を狙った本研究者の独創によるものである。本期間の研究では、既知の性ステロイドホルモンの機能と精子形成諸過程の変化を手掛かりに、新しい諸因子の発見と機能の解明に努め、雌性ホルモンのエストラジオール- 17β が精巣で精原幹細胞の増殖誘導因子を誘導発現すること、精原細胞の増殖を促進する雄性ホルモン 11-ケトテストステロンの機能を抑制する新因子の発見、pH 制御因子のカルボニックアンヒドラーゼ II が精子成熟に深く関ることなど、多くの知見をもたらしている。この努力は動物繁殖技術の発展に大きく寄与すると期待する。

6. 主な論文

Miura, T., Kudo, N., Miura, C., Yamauchi, K., and Nagahama, Y. (1998). Two testicular cDNA clones suppressed by gonadotropin stimulation exhibit ZP2- and ZP3-like structures in Japanese eel. *Mol. Reprod. Dev.* 51, 235-242.

Miura, C., Miura, T., Kudo, N., Yamashita, M., and Yamauchi, K. (1999). cDNA cloning of a stage specific gene expressed during HCG-induced spermatogenesis in the Japanese eel. *Dev. Growth. Differ.* 41, 463-471.

Nader, M. R., Miura, T., Ando, N., Miura, C., and Yamauchi, K. (1999). Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates all stages of 11-ketotestosterone induced spermatogenesis in the testis

of the Japanese eel *Anguilla japonica*, *in vitro*. *Biol. Reprod.* *61*, 944–947.

Miura, T., Miura, C., Ohta, T., Nader, M. R., Todo, T., and Yamauchi, K.(1999). Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *264*, 230–234.

Miura, T. (1999). Spermatogenetic cycle in fish. In *Encyclopedia of Reproduction* vol.4.. E. Knobil and J. D. Neill, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 571–578.

7. その他

招待講演 国内 4 件