

生殖研究部門

長 濱 嘉 孝

生殖研究部門は、生殖細胞の形成過程及びその調節機構を細胞レベル、分子レベルで総合的に解明することを目的とし、魚類を主な材料として生殖腺の性分化、卵の成長と成熟、精子の形成と成熟を制御するホルモン分子種の単離・同定及びそれらホルモン因子の作用機構の解明に重点を置き研究を進めてきた。

1. 生殖腺の性分化

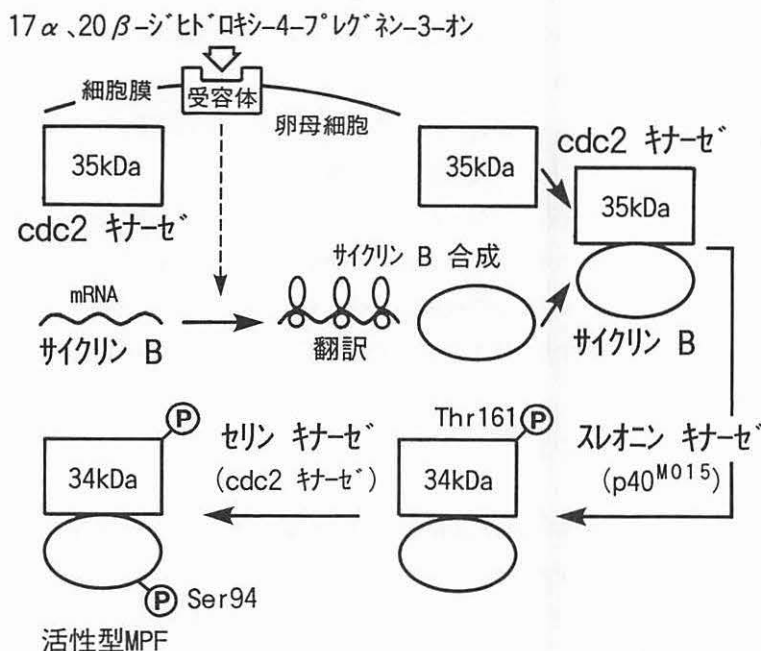
脊椎動物における生殖腺の性分化に性ステロイドホルモンが重要な役割を果たすと推察されているが、その詳細な仕組みは不明である。魚類では生殖腺が未分化な時期にアンドロゲンやエストロゲンを処理することにより遺伝的性を転換させることが可能である。したがって、魚類は性ホルモンによる生殖腺の性分化機構を研究する上で格好な実験系を提供する。我々は形態学的性分化が孵化後23-25日で起こるティラピアを用いて生殖腺の性分化におけるステロイド代謝酵素の発現様式を特異抗体を用いた免疫組織化学により解析した。その結果、遺伝的雌では形態学的な卵巣分化が明確となる数日前にすでにエストラジオール- 17β の生成に必要なステロイド代謝酵素群が卵巣中に認められるとともに、それらの活性が卵巣分化に伴って著しく高まることがわかった。一方、遺伝的雄におけるこれらステロイド代謝酵素の活性は、精巣分化時には認められず、精子形成が始まる孵化後70-80日になってはじめて明確となった。これらの結果から、魚類ではエストロゲンが生殖腺、特に卵巣分化、に中心的な役割を果たすことが明らかになった。しかし、性分化、特に精巣分化、へのアンドロゲンの関与は否定的といえる。今後、エストロゲンによる卵巣分化誘導機構、特にエストロゲン受容体の役割を解析するとともに、アンドロゲンの役割についてもさらに検討する必要がある。これらの研究のためには分子生物学的手法に加えて種々な発生工学的手法（トランスジェニック、ノックアウト魚類の作成等）の確立が必要となる。

2. 卵の成長と成熟

卵母細胞は生殖腺刺激ホルモン（GTH、LHとFSH、魚類ではGTHIとGTHII）の作用により成長し、成熟する。しかし、GTHの生殖細胞に対するこのような作用は直接的ではなく、各々（成長期と成熟期）の卵を囲む濾胞組織で生成される別々のステロイドホルモンの作用を介している。我々は、主に卵形成が同調するサケ科魚類を用いた卵母細胞と濾胞組織との共培養系を用いて、卵成長促進ホルモン（エストラジオール- 17β ）と卵成熟誘起ホルモン（ 17α 、 20β -ジヒドロキシ-4-プレグネン

-3-オン, 17α , 20β -DP) を同定するとともに, これら2種の性ホルモンがいずれも莢膜細胞と顆粒膜細胞との協同作用で生成される (2細胞型モデル) ことを示した。また, これまでにエストラジオール- 17β と 17α , 20β -DP の生成に関わるステロイド代謝酵素の遺伝子クローニングおよびそれぞれの特異的抗体の作成を完了し, 現在, 莢膜細胞と顆粒膜細胞における GTH によるエストラジオール- 17β と 17α , 20β -DP の時期・細胞特異的生成機構について遺伝子, 蛋白質レベルでの解析を行っている。

エストラジオール- 17β は肝臓に作用して卵黄前駆体 (ビテロゲニン) の生成を促進し, このビテロゲニンは血液により卵巣に運ばれ, 卵母細胞表面の受容体を介して卵に取り込まれ, 卵黄として貯蓄される。一方, 卵成熟誘起ホルモンである 17α , 20β -DP は, 十分に成長した卵にのみ作用し卵成熟を誘起する。この時, 17α , 20β -DP は卵細胞膜上にある受容体とそれに連結する抑制性の G 蛋白質を介して作用することが我々のニジマスとメダカを用いた研究から明らかになった。一般にステロイドホルモンは細胞質または核内の受容体を介して作用すると考えられており, 膜受容体を介した 17α , 20β -DP の卵成熟誘起効果はステロイドホルモンの新しい作用機構と考えられる。 17α , 20β -DP 膜受容体と抑制性 G-蛋白質を含む細胞内情報伝達系について引き続き重点的に研究を継続する。 17α , 20β -DP が卵表面に作用すると卵内にすでに不活性な状態で存在する卵成熟促進因子 (MPF) を活性化する。この MPF の活性は哺乳類, 鳥類, 両性類, 魚類, ヒトの成熟未受精卵の間で互換性があるばかりでなく, 哺乳類から酵母, 高等植物の体細胞の分裂 M 期にも普遍的にみられる。我々は魚類の MPF をコイ成熟未受精卵から精製するとともに, 17α , 20β -DP による MPF 活性化



機構のほぼ全容を解明した（図1）。コイ卵から得られた MPF は cdc2 キナーゼとサイクリン B からなる分子量約10万の複合体である。キンギョの未成熟卵には cdc2 キナーゼのみが存在し、サイクリン B は卵に 17 α , 20 β -DP が作用して後に新しく合成される。サイクリン B mRNA は未成熟卵中にすでに存在し、17 α , 20 β -DP はそのポリアデニル化を介して翻訳を開始させる。また、未成熟卵中にはサイクリン B mRNA の翻訳を抑制する RNA 結合蛋白質が存在し、この RNA 結合蛋白質も 17 α , 20 β -DP によるサイクリン B mRNA の翻訳制御に関わると考えられる。このようにして新しく合成されたサイクリン B はすでに存在する cdc2 キナーゼと直ちに結合し、その結果、すでに未成熟卵中に存在するスレオニン・キナーゼにより cdc2 キナーゼの 161 スレオニンがリン酸化される。最後に、cdc2 キナーゼによりサイクリン B のセリンがリン酸化されて、MPF ができる。さらに最近我々は、受精時に MPF が不活性化される際にみられるサイクリン B の分解に、活性型 (26S) プロテアソームが限定分解を介して深く関わっていることをはじめて明らかにした。

3. 精子の形成と成熟

多細胞動物における精子形成や成熟の制御機構はいまだにほとんど不明である。生殖研究部門では、精巣における生殖細胞と体細胞の発達が同調して進行するサケ科魚類を材料として、これまで精子形成期（11-ケトテストステロン、11-KT）と成熟期（17 α , 20 β -DP）の精巣で GTH の刺激で時期特

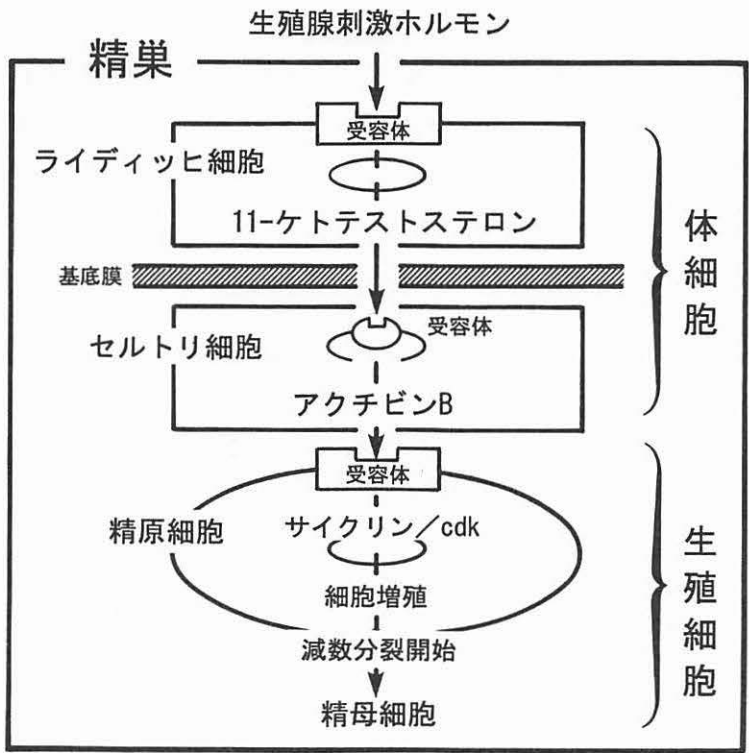


図2 精子形成開始のホルモン制御機構

異的に生成されるステロイドホルモンを単離・同定することに成功するとともに、精巣における 17α , 20β -DP生成に関して体細胞と精子が関与する新しい2細胞型モデルを提唱した。

上記の研究成果を基盤としてこの数年間は、精原細胞と未発達な体細胞（ライディッヒ細胞、セルトリ細胞）から構成される日本産養殖ウナギ精巣を用いて精子形成のホルモン制御機構に関する研究を展開してきた。まず、ウナギ精巣の無血清器官培養系を確立し、これを駆使して精子形成に及ぼす種々ホルモンの影響を調べた。用いたホルモンの中でGTHと11-KTが精原細胞に体細胞分裂、減数分裂、精子変態を起こさせ、精子まで分化させた。これはホルモンにより精子形成の全過程を試験管内で実現させた世界で最初の例である。さらに、この実験系を用いてこれらホルモンにより特異的に発現される遺伝子をcDNAサブトラクション法により検索したところ、GTHと11-KTのいずれによってもセルトリ細胞でアクチビン β Bサブユニットの遺伝子発現が特異的に誘導され、その結果アクチビンB蛋白質が多量に生成されることが明らかになった。また、CHO細胞でつくらせたウナギのリコンビナント・アクチビンBと共にウナギ精巣を器官培養すると精原細胞に頻繁な分裂像が観察された。これらの結果により、GTHの働きによりライディッヒ細胞で生成される11-KTはセルトリ細胞に作用してアクチビン β B遺伝子の発現を促進し、その結果生成されるアクチビンBが精原細胞の増殖を起こさせ、精子形成を開始させると考えられる（図2）。現在、アクチビンBによる精原細胞増殖作用の分子的基盤について、精原細胞のアクチビンI、II型受容体、細胞分裂制御関連分子種の遺伝子・蛋白質の発現制御機構について研究を進めている。これらの研究に加え、11-KTによるセルトリ細胞でのアクチビン β B遺伝子の発現制御機構についても研究を進めており、最近ウナギ精巣から11-KT・受容体のcDNAクローンを分離することに成功した。今後、この11-KTによるセルトリ細胞でのアクチビン β B遺伝子の発現制御機構についても研究を進めており、最近ウナギの精巣から11-KT受容体のcDNAクローンを分離することに成功した。今後、この11-KT・受容体複合によるアクチビン β B遺伝子の転写促進調節機構についても研究を推進する。

文献

1. Yoshikuni, M., Ishikawa, K., Isobe, M., Gotou, T. and Nagahama, Y. (1988). Characterization of 1-methyladenine binding in starfish oocyte cortices. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1708-1711.
2. Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H. and Nagahama, Y. (1991). Hormonal induction of all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5774-5778.
3. Yamashita, M., Fukada, S., Yoshikuni, M., Bulet, P., Yamaguchi, A., Lou, Y.-H., Zhao, Z. and Nagahama, Y. (1992). Purification and characterization of maturation-promoting factor in fish. Develop. Boil. 149, 8-15.
4. Tanaka, M., Ohno, S., Adachi, S., Nakajin, S., Shinoda, M. and Nagahama, Y. (1992). Pig testicular 20β -hydroxysteroid dehydrogenase exhibits carbonyl reductase-like structure and activity: cDNA cloning of pig testicular 20β -hydroxysteroid dehydrogenase. J. Boil. Chem. 267, 13451-13455.

5. Kobayashi, T., Sakaki, N., Adachi, S., Iwasawa, H., Asahina, K. and Nagahama, Y. (1993). 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one is the naturally occurring spermiation-inducing hormone in the testis of a frog, *Rana nigromaculata*. *Endocrinology* 133, 321-327.
6. Katsu, Y., Yamashita, M., Kajiura, H. and Nagahama, Y. (1993). Behavior of the components of maturation-promoting factor, cdc2 kinase and cyclin B, during oocyte maturation of goldfish. *Develop. Boil.* 160, 99-107.
7. Nagahama, Y., Miura, T. and Kobayashi, T. (1994). The onset of spermatogenesis in fish. *In* Germ-line Development, Ciba Foundation Symposium 182, 255-270.
8. Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. (1994). Involvement of an inhibitory G-protein in the signal transduction pathway of maturation-inducing hormone (17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one) action in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) oocytes. *Develop. Boil.* 166, 615-622.
9. Nagahama, Y., Yamashita, M., Tokumoto, T. and Katsu, Y. (1995). Regulation of oocyte maturation in fish. *Current Topics in Developmental Biology* 30, 103-145.
10. Yamashita, M., Kajiura, H., Tanaka, M., Onoe, S. and Nagahama, Y. (1995). Molecular mechanisms of the activation of maturation-promoting factor during goldfish oocyte maturation. *Develop. Boil.* 168, 62-75.
11. Tokumoto, T., Yamashita, M., Tokumoto, M., Katsu, Y., Kajiura, H. and Nagahama, Y. (1997). Initiation of cyclin B degradation by 26S proteasome upon egg activation. *J. Cell Boil.*, in press.

