

にして精子形成誘起ホルモンの単離・同定を行った。その結果、これらの分画のうちの一分画のみが精原細胞に体細胞分裂を起こさせる活性をもっていた。この分画に含まれる性ステロイドホルモンが 11-ケトテストステロンであることを質量分析計、HPLC などにより決定した。これらの結果より、ウナギの精子形成誘起ホルモンは 11-ケトテストステロンと同定されたが、これは動物界で精子形成誘起ホルモンが単離・同定された最初である。

11-ケトテストステロンは試験管の中の精巣にも精子をつくらせる

11-ケトテストステロンをHCGを含まない器官培養系に添加し、その中でA型精原細胞のみをもつ精巣片を約3週間培養すると精子が観察されるようになる。このことから、11-ケトテストステロンは単独で精原細胞に働いて体細胞分裂を起こさせ、精母細胞、精細胞を経て精子まで分化させる作用をもつことがわかる。

HCG投与により 11-ケトテストステロンの生成が急激に高まる

養殖ウナギにHCGを一回注射すると直ぐに精巣で 11-ケトテストステロンが生成され、注射後6時間までに血中の 11-ケトテストステロン量が急激に上昇を始める。この時でもテストステロンの血中量は低いままである。この時HCGはライディッチ細胞の膜受容体に結合して後、細胞内のサイクリックAMP量を介して11 β -水酸化酵素や11 β -水酸基脱水素酵素（テストステロンを 11-ケトテストステロンに転換する酵素）遺伝子に働きかけ、それらの転写活性を促進し、さらには翻訳活性をも増加させることにより 11-ケトテストステロンの生産を急激に高める。

11-ケトテストステロンはセルトリ細胞に働く

生殖腺刺激ホルモンの働きのもとにライディッチ細胞でつくられた 11-ケトテストステロンは直接的には精原細胞には働かない。このことはA型精原細胞のみを取り出し 11-ケトテストステロンとともに細胞培養しても精子形成が起こらないことから明らかになった。そこでHCGや 11-ケトテストステロンを働かせた精巣で新規に発現してくる遺伝子を cDNA subtraction 法を用いて単離し、それがアクチビン β B サブユニットであることを始めて示した。さらに、in situ hybridization 法を用いてこの遺伝子が発現する細胞は精巣の精細管の中にある体細胞のセルトリ細胞であることが判明した。したがって、生殖腺刺激ホルモンの働きでライディッチ細胞でつくられた 11-ケトテストステロンはセルトリ細胞に働いてアクチビン β B サブユニット遺伝子の転写を促進し、その発現を上昇させるわけである。

2種類の 11-ケトテストステロン受容体がセルトリ細胞で発現している

11-ケトテストステロンが作用するセルトリ細胞には 11-ケトテストステロン受容体が局在する筈である。そこでウナギの精巣から 11-ケトテストステロン受容体遺伝子を

クローニングすることを試み、ごく最近2種類の11-ケトテストステロン遺伝子を単離し、それらの全塩基配列を決定した。これら2種類の11-ケトテストステロン受容体のアミノ酸配列はDNA結合配列とリガンド結合配列とで高い類似性を示したが、他のドメインでの配列の類似性はきわめて低い。しかし、これらのcDNAを哺乳類のCOS細胞に発現させ、種々のリガンドを用いて転写活性を調べたが両者の間で顕著な違いは認められなかった。これら11-ケトテストステロン受容体の局在細胞セルトリ細胞であることはin situ hybridizationで確認された。

〔実験〕：アクチビンβBサブユニット遺伝子の5'上流域に11-ケトテストステロン受容体が結合する配列の存在を調べる。

11-ケトテストステロンはセルトリ細胞に働いてアクチビンBをつくらせる

セルトリ細胞で11-ケトテストステロンの働きでアクチビンβBサブユニット遺伝子の発現が急激に上昇することがわかったが、その結果つくられる物質がどのようなものであるかを生物学的検定法を用いて調べた。この検定には、細胞培養条件下で哺乳類のフレンド細胞を赤血球に分化させることを指標とするEDF活性測定法を用いた。その結果、アクチビンβBサブユニット遺伝子の発現によってセルトリ細胞で新しくつくられるタンパク質は成長因子の一種であるアクチビンBであることが明らかになった。

アクチビンBは精原細胞の増殖を促進する

アクチビンBの精子形成誘起作用を調べるために、哺乳類のCHO細胞にウナギのアクチビンβBサブユニット遺伝子を遺伝子導入し、培養液中に分泌されたアクチビンBを多量に集め、フォリスタチンカラムを用いたHPLCにより精製した。精製したウナギのリコンビナント・アクチビンBを器官培養系に添加し、A型精原細胞のみからなる精巣片を培養すると、精原細胞の頻繁な体細胞分裂が誘起されたが減数分裂への移行は観察されず、したがって精原細胞から精母細胞への移行も認められなかった。これらの結果から、HCGや11-ケトテストステロンはそれぞれ単独で精子形成の全過程を誘導させることができるが、一方それらの働きでつくられるアクチビンBは精原細胞の増殖は起こすが、精子形成のそれ以後の過程は誘起しないことがわかる。

〔実験〕：生殖腺刺激ホルモンや11-ケトテストステロンの働きでつくられると考えられる減数分裂誘起物質は何か？

精原細胞のアクチビンB受容体が局在する

上に述べたように、アクチビンBはA型精原細胞に働いて細胞増殖を起こす。したがって、精原細胞にアクチビンB受容体が局在する筈である。そこでウナギの精巣から2種類のアクチビンB受容体遺伝子（アクチビンBI型受容体、アクチビンBII型受容体）

をクローニングした。これらの2種類の受容体遺伝子はA型精原細胞にすでに局在していることが *in situ* hybridization 法により明らかになった。また、アクチビンB受容体に連結する精原細胞内の情報伝達系に関わる遺伝子として *Smad* 遺伝子を単離し、その全塩基配列を決定した。

〔実験〕：アクチビンBの作用機構におけるこれら2種類のアクチビンB受容体の機能を調べる。さらに、細胞内情報伝達因子としての *Smad* 遺伝子の機能についても解析する必要がある。

精原細胞の増殖はCDK/サイクリン複合体の働きで進行する

A型精原細胞での細胞増殖の仕組みについての解析を行うために、まずウナギの精巣から種々の細胞分裂制御因子遺伝子をクローニングした。単離し全塩基配列を決定した遺伝子は、*cdc2*、*cdk2*、*cdk4*、サイクリンA1、A2、B1、B2、D、E1、E2などである。ホルモンやアクチビンBを処理する前の精原細胞では細胞分裂に関わる遺伝子、タンパク質ともにほとんど発現していない。精原細胞をHCG、11-ケトテストステロン、あるいはアクチビンBのどれかで刺激すると、まず3日以内に *cdk2*、*cdk4*、サイクリンD、E1、E2などの遺伝子やタンパク質が発現し、次いで *cdc2* やサイクリンA2などの遺伝子、タンパク質が発現してくる。したがって、アクチビンBによる刺激がこれら遺伝子の発現、タンパク質への翻訳を制御することによりA型精原細胞の増殖が起こるものと推察される。

〔実験〕：アクチビンBによる細胞分裂関連遺伝子の転写調節機構を調べる必要がある。

サイクリンA1は減数分裂の進行に関与する？

HCGや11-ケトテストステロンで処理してから発現する細胞分裂制御関連因子の中で、注目すべきはサイクリンA1である。サイクリンA1はHCGや11-ケトテストステロン処理後の精巣で減数分裂を開始した精母細胞ではじめて発現する。アクチビンBを処理した精巣では決して発現しない。サイクリンA1が複合体を構成するのは *cdc2* であることも明らかになった。この結果から、精原細胞の減数分裂への移行には *cdc2* /サイクリンA1複合体が重要な役割を果たしているものと推察される。

〔実験〕：サイクリンA1遺伝子の転写制御をさかのぼって解析することにより、減数分裂誘起物質の実体を明らかにできる可能性がある。

2. 精子の成熟

脊椎動物の精子の成熟にアンドロゲンなどの性ステロイドホルモンが関わることが以

前から推察されてきたが詳細な機構は未だ明らかではない。最近、ヒトと含む哺乳類や魚類などで内分泌攪乱化学物質の影響と考えられる精子の受精能や運動能の低下など、精子の成熟過程が何らかの影響で異常となっていると推察される。

我々はサケ科魚類やウナギを用いて精子の運動能の獲得に果たすホルモンの役割、特に生殖腺刺激ホルモンと性ステロイドホルモンについて明らかにしてきたのでその概略について述べる。

17 α ,20 β -DP は精子に運動能を賦与する

サケ科魚類やウナギの精巣中にある精子にはまだ運動能が備わっていない。したがって、精子は卵に到達するための運動能を備えていないわけで、その意味では受精能ももっていないといえる。この精子に運動能を獲得させるためには、精子形成の場合と同様に下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモンが重要な役割を果たす。後述する卵成熟の場合程ではないが、精子の成熟期には下垂体からLH系生殖腺刺激ホルモンが分泌される。しかしこの場合にも、生殖腺刺激ホルモンの作用は直接的ではなく、精巣の体細胞に働いて性ステロイドホルモンの生成を促進することにより精子の成熟を誘起する。この精子の成熟に関わる性ホルモンをサケとウナギの精巣から単離し、17 α ,20 β -ジヒドロキシ-4 プレグネン 3-オン (17 α ,20 β -DP) と同定した。このホルモンはプロゲステロン系のステロイドであり、後述するように多くの魚類の卵成熟誘起ホルモンとしても働く重要なホルモンである。なお、魚類では哺乳類などとは異なり、黄体ホルモン (プロゲステロン) は 17 α ,20 β -DP のための前駆体として卵巣や精巣でつくられるが、分泌され血管を介して生体内を循環することはない。

17 α ,20 β -DP は精子でつくられる

17 α ,20 β -DP は成熟期の精巣でのみ生成される。前駆体の 17 α -ヒドロキシプロゲステロンはライディッヒ細胞でつくられると考えられているが、この前駆体を 17 α ,20 β -DP に転換させるステロイドホルモン代謝酵素である 20 β -水酸基脱水素酵素 (20 β -HSD) は精子膜に局在することが判明している。

17 α ,20 β -DP は輸精管に働く

精子でつくられた 17 α ,20 β -DP は輸精管に働いてのこのpHを7.5から8.5程度まで上昇させる。輸精管に移行した精子は、このpHの上昇が刺激となって細胞内のサイクリックAMP量が約2-3倍程高くなる。このことで精子は運動能を獲得するのである。

3. 卵形成

哺乳類とは異なり、それ以外の脊椎動物では卵形成は卵細胞質での卵黄の蓄積によって特徴付けられる。脊椎動物では卵黄の前駆体となるビテロゲニンは肝臓でエストロゲン

の作用のもとに合成される。内分泌攪乱化学物質の良く知られた作用機構の一つがエストロゲン受容体を介したものである。この卵黄形成の過程に内分泌攪乱化学物質が影響を及ぼす可能性は高い。実際に雌や雄の血中のビテロゲニン量を測定することで内分泌攪乱化学物質のスクリーニングを行う方法が開発されている。

卵生脊椎動物でエストロゲンは肝臓に働いて卵黄前駆体の合成を促進する

哺乳類以外の全ての脊椎動物において、卵に卵黄を蓄積させるホルモンは、生殖腺刺激ホルモンの働きで卵胞（1つの卵とそれを取り囲む2層の体細胞層、莢膜細胞層と顆粒膜細胞層）でつくられるエストロゲン（エストラジオール- 17β ）である。哺乳類と魚類（サケ科魚類）の卵胞におけるエストラジオール- 17β の生成は莢膜細胞と顆粒膜細胞との相互作用で起こる。LHは莢膜細胞に働いて前駆体のテストステロンの合成を促進し、またFSHは顆粒膜細胞に働いて芳香化酵素（テストステロンをエストラジオール- 17β に転換するステロイドホルモン代謝酵素）遺伝子の発現を促進し、莢膜細胞から送られてきたテストステロンをエストラジオール- 17β に転換させる（2生殖腺刺激ホルモン・2細胞型モデル）。

SF1は芳香化酵素遺伝子の重要な転写制御因子である

芳香化酵素（P450arom）はアンドロゲンをエストロゲンに転換させる重要な酵素である。我々はゲルシフトアッセイ法等の分子生物学的手法を用いてこの酵素遺伝子の発現を制御する転写制御因子としてSF1（Ad4BP）を同定した。P450arom遺伝子の5'上流域にはSF1結合配列が二つ存在し、これらの配列にSF1が結合することによりP450arom遺伝子発現の約70%が制御されていると考えられる（現在、引き続き残りの約30%のP450arom遺伝子の発現を制御する転写制御機構を調べている）。卵形成期の卵胞におけるSF1遺伝子の発現パターンはP450arom遺伝子の発現パターンと酷似しており、このことからSF1がこの酵素遺伝子の発現を制御していることがわかる。

P450aromの遺伝子、タンパク質、活性ともに卵形成期の終期の卵胞で急激に減少する。ごく最近のティラピア卵胞を用いて行った研究により、P450arom遺伝子の発現低下に密接に関係するSF1遺伝子発現の減少が生殖腺刺激ホルモン（LH系）により誘起されることがはじめて明らかにされた。これはSF1の活性が生殖腺刺激ホルモンにより転写レベルで制御されることを示した脊椎動物で最初の例と考えられる。

FSH/FSH受容体は卵形成に、LH/LH受容体は卵成熟に関わる

2種類（LHとFSH）の生殖腺刺激ホルモン受容体をアマゴとティラピアの卵巣からクローニングし、それらの全塩基配列を決定した。このうちFSH受容体遺伝子は卵形成期の卵胞で強く発現しており、卵成熟期には減少する。しかし、排卵後に卵巣から

卵が排出された後には再び遺伝子の発現が急激に上昇する。一方、LH受容体遺伝子の発現は卵形成期に低く、卵成熟期に急激に上昇する。これらの結果は、FSH/FSH受容体は卵形成（卵黄形成）に、またLH/LH受容体は卵成熟の制御に関わることを示している。

エストロゲンは肝臓に働いてエストロゲン受容体を介してビテロゲニン遺伝子の転写を促進する

エストロゲンは肝臓に働いてエストロゲン受容体を介してビテロゲニン遺伝子の発現を調節する。ティラピアの肝臓には2種類のエストロゲン受容体（ α 型と β 型）がいずれも発現しているが、エストロゲンの投与により発現が高まるのは α 型の方である。

4. 卵成熟

卵巣にはいろいろな発達段階の卵母細胞が存在するが、そのほとんどは第1減数分裂前期の状態にあり、染色体はまだ $2n$ の状態で、勿論受精能はない。産卵期になると、ホルモン刺激で減数分裂が再開され、第1極体の放出を経て、第2減数分裂中期に達してはじめて卵は受精可能となる。卵成熟とは、このように第1減数分裂前期の未成熟卵がホルモン刺激を受けて受精可能になることをいう。このように卵成熟は卵を受精可能にさせる生物の生殖にとって非常に重要な過程であるにもかかわらず、卵成熟のホルモン制御機構についての研究はそれ程多くはない。したがって、以下に述べる我々が行ってきた魚類を用いての研究がこの分野ではもっとも進んでいるといえる。そのようなわけで、卵成熟における内分泌攪乱化学物質の影響はこれまでまったく調べられていないのである。

脊椎動物における卵成熟誘起の共通の引き金は、下垂体から一過性に多量に分泌されるLH系GTH（魚類ではGTH-II）である。しかし、いずれの生物種でもLHは直接に卵母細胞に作用するのではなく、それを取り囲んで存在する濾胞組織での卵成熟誘起ホルモン（maturation-inducing hormone, MIH）の働きを介すると考えられている。この卵成熟誘起ホルモンが脊椎動物で単離、同定されているのは魚類が唯一である。

魚類の卵成熟誘起ホルモンは $17\alpha,20\beta$ -DP

我々は卵成熟期のアマゴ（サケ科魚類）の卵胞から濾胞組織を大量に取り出し、それらをサケの生殖腺刺激ホルモンとともに培養して集めた培養液から生化学的手法により卵成熟誘起ホルモンを脊椎動物ではじめて単離し、 $17\alpha,20\beta$ -DPと同定した。このようにして $17\alpha,20\beta$ -DP はサケ科魚類の卵成熟誘起ホルモンとして最初に同定されたが、今では多くの魚類の共通した卵成熟誘起ホルモンであると考えられている。

$17\alpha,20\beta$ -DP は莢膜細胞と顆粒膜細胞の相互作用でつくられる

$17\alpha,20\beta$ -DP は卵形成期の卵胞ではつくられなく、成熟期の卵胞でのみLHの働き

でつくられる。LHによる $17\alpha, 20\beta$ -DP の生成にはエストロゲンの場合と同様に莖膜細胞と顆粒膜細胞の2種類の体細胞が関与する(2細胞型モデル)。莖膜細胞で前駆体の 17α ヒドロキシプロゲステロンがつくられて、これが顆粒膜細胞で $17\alpha, 20\beta$ -DP に転換される。顆粒膜細胞に局在して 17α ヒドロキシプロゲステロンを $17\alpha, 20\beta$ -DP に転換させるステロイド代謝酵素は 20β -HSD である。 20β -HSD 遺伝子の発現は卵成熟期のごく限られた時期の卵胞の顆粒膜細胞で起こり、LHによって転写制御を受けている。、卵成熟期の顆粒膜細胞におけるLHによる 20β -HSD 遺伝子の転写制御機構についてゲルシフトアッセイ法などにより解析している。

17 $\alpha, 20\beta$ -DP は新規の膜受容体を介して卵成熟を誘起する

$17\alpha, 20\beta$ -DP はステロイドホルモンでありながら細胞膜上に局在する膜受容体に結合して作用を発揮する。我々はこの数年 $17\alpha, 20\beta$ -DP の膜受容体の化学的実体を明らかにすべくいろいろなアプローチを駆使して研究を進めている。しかし、この膜受容体のリガンド親和性が低いために生化学的に精製することがきわめて困難であり、これまでのところ化学的実体を明らかにすることには成功していない。最近 $17\alpha, 20\beta$ -DP やプロゲステロン(カエルの卵成熟誘起ホルモンと考えられている)などの卵成熟誘起ホルモンばかりではなく、脳細胞などに作用するエストロゲンやグルココーチコイドなどのステロイドホルモンも膜受容体と結合することで作用を発揮することが示唆されており、ゲノム発現を介さないステロイドホルモンの新規の作用機構として国際的に多くの研究者が競って研究している。

卵成熟誘起ホルモンは卵内に卵成熟促進因子(MPF)をつくらせる

$17\alpha, 20\beta$ -DP-膜受容体に連結する卵細胞内情報伝達因子として抑制性Gタンパク質-アデニル酸・シクラーゼ系が新しく同定された。 $17\alpha, 20\beta$ -DP が膜受容体に結合すると抑制性のG-タンパク質/アデニル酸・シクラーゼ系が活性化され、その結果として卵内のサイクリックAMP量が減少し、この刺激が卵成熟のトリガーとなり、卵成熟促進因子(Maturation-promoting factor, MPF)が形成される。

MPFは生物種に普遍的なM期促進因子である

MPFは $17\alpha, 20\beta$ -DP の刺激で新しく卵細胞質内につくられ、卵を成熟させる物質であるが、我々と他の研究グループの研究からMPFはあわせて、すべての体細胞の細胞分裂(体細胞分裂)のG2期からM期への移行を促進する因子でもあることが明らかになり、MPFは細胞周期の調節にとって不可欠な細胞質因子であることが判明した。したがって、最近MPFはMeta phase-promoting factor (MPF)とも呼ばれるようになっている。

卵成熟はサイクリンBの合成から始まる

魚類のMPFはcdc2キナーゼとサイクリンBの複合体である。卵黄形成を完了した未成熟卵ではMPFはまだ形成されてはいなく、卵細胞質中には35 kDaのcdc2キナーゼが存在するのみである。一方、サイクリンBに関してはそのmRNAが翻訳可能な状態ですでに未成熟卵の細胞質に存在する。しかし、サイクリンBタンパク質は未成熟卵中には決して認められない。すなわち、卵黄を完了した十分に大型な卵でも、卵成熟誘起ホルモンが作用するまではサイクリンBはそのmRNAからの翻訳が抑制されているためにタンパク質としては存在していないのである。

MPFはcdc2キナーゼの161番目のスレオニンがリン酸化されて活性化される

17 α ,20 β -DPが作用するとサイクリンB mRNAの翻訳が急速にはじまり、そのタンパク質がつくられる。このタンパク質がつくられると未成熟卵中にすでに存在するcdc2キナーゼと直ちに複合体を形成する。この複合体はすでに細胞質中に存在するスレオニンキナーゼ(MO15、サイクリンH)によりcdc2の161番目のスレオニンがリン酸化される。このリン酸化によりcdc2キナーゼのセリンキナーゼ活性が出現し、この作用でサイクリンBの94番目のセリンがリン酸化され、活性型MPFが形成される。

サイクリンBの合成はmRNAのポリアデニレーションにより始まる

17 α ,20 β -DPの刺激でサイクリンB mRNAの翻訳がはじまるが、この過程は17 α ,20 β -DPがサイクリンB mRNAのポリアデニレーションを誘起することによりもたらされることが最近の我々の研究より明らかになった。この時、17 α ,20 β -DPは卵細胞質にすでに存在する未同定のリン酸化酵素を活性化し、この酵素の作用でリン酸化されるCytoplasmic polyadenylation element (CPE)がサイクリンB mRNAのCPE配列に結合することによりサイクリンB mRNAのポリアデニル化が進行し、その結果サイクリンBの翻訳が起こり、タンパク質がつくられる。

5. まとめ

以上述べたように、性ステロイドホルモンは生殖腺の諸々の活動にきわめて重要な役割を果たす。これまで魚類では、卵巣の性分化、精子形成、精子成熟、卵形成、卵成熟を誘起させる性ステロイドホルモンが単離され、同定されてきた。そのほとんどは脊椎動物ではじめて同定されたものである。さらに、それらのステロイド性制御因子が生殖腺刺激ホルモン、LHとFSH、の働きで生殖腺の体細胞で生成される分子機構、さらにはそれらが生殖細胞に作用する機構について、そのほぼ大筋が細胞、分子レベルで明らかにされたといえる。すでに、魚類の性分化や配偶子形成に不可欠であると考えられる100を超える遺伝子が我々の研究室でクローニングされた。これらの遺伝子あるいはタンパク質のうち一つでも内分泌攪乱化学物質の影響を受けると正常な生殖機構が進行なくなると推察され、結果として性の異常、性転換、配偶子形成の異常などが起