

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580216
 研究課題名（和文） ウナギの配偶子形成におけるプロラクチン受容体の発現と生理機能
 研究課題名（英文） The expression and role of prolactin receptor in Japanese eel gametogenesis
 研究代表者
 千葉 洋明（CHIBA HIROAKI）
 北里大学・海洋生命科学部・准教授
 研究者番号：50236816

研究成果の概要：

魚類の生殖におけるプロラクチン（PRL）の機能解明を目的としてニホンウナギの性分化および成熟における生殖腺でのPRL受容体の発現とPRL投与による生殖腺への影響を調べた。その結果、PRL受容体は稚魚生殖腺の生殖原細胞から成熟開始前までの未熟な卵母細胞および精原細胞において長期に渡り発現していることが明らかとなった。さらに、雄においてPRL投与は生殖腺刺激ホルモンにより誘起された精子形成を抑制することから、PRLは精子形成の制御因子である可能性が示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：ウナギ、配偶子形成、生殖腺、プロラクチン、受容体

1. 研究開始当初の背景

魚類の繁殖は、他の脊椎動物と同様に視床下部一下垂体一体組織系のペプチドホルモンの強い支配下にある。さらに、生殖細胞の増殖・分化の制御には脳下垂体からのペプチドホルモンはもとより周囲の体細胞との相互作用が必須であり、これには様々なステロイドホルモン、成長因子などが関わっていることが示唆されている。魚類の配偶子形成機構について生化学、細胞生物学、分子生物学など多くの側面から研究がなされており、内分泌学的にも数多くのホルモンの同定に加

えて、ステロイド合成系酵素およびそれらの受容体のタンパクならびに遺伝子群など数多くのプローブが単離されている。近年、これらプローブを利用した魚類生殖腺の性分化における内分泌機構が明らかになりつつあるが、魚類の性決定様式は多様であり、その生理機構には解決すべき不明な点が多い。

プロラクチン（PRL）は下垂体前葉から分泌される多彩な生理作用を示すホルモンである。魚類では、PRLが淡水適応に関与することは古くから知られているが、生殖における知見は少ない。ウナギの精巣分化時には既

に下垂体でPRLが発現している。このプロラクチンの受容体抗体（サケ由来）を用いた生殖腺における免疫組織的観察から、精巢分化後から精子形成開始時の生殖細胞において強いPRL受容体の陽性反応が認められた。このことからPRLがウナギの精巢分化のみならず精子形成時の生殖細胞の増殖・分化に関与している可能性が示された。

2. 研究の目的

本研究では、魚類の生殖機構を解析するうえで最適な実験モデルであるニホンウナギを材料として、生殖細胞におけるPRLの作用を通して生殖細胞の増殖・分化における視床下部—下垂体—生殖腺系の調節機構の解明を目的とする。そのために、まず(1)ウナギのPRL受容体遺伝子のクローニングを行う。(2) *in situ* ハイブリダイゼーション法により生殖腺の発達に伴うPRL受容体遺伝子の局在を調べる。(3) PRL投与が生殖細胞の増殖・分化に及ぼす効果を組織学的に明らかにするとともに性ステロイドホルモンが産生される体細胞との関連も探る。

3. 研究の方法

(1) PRL受容体のcDNAと遺伝子のクローニング

ウナギの腎臓から調整した一本鎖cDNAを鋳型とし、既知の硬骨魚類のPRL受容体の塩基配列を基に保存性の高い領域で設計した縮重プライマーを用いたPCRによりcDNA断片を増幅した。決定した塩基配列を基にプライマーを作製し、PRL受容体の5'および3'領域cDNAをRACE法により増幅し、サブクローン化した後に塩基配列を決定した。

(2) 生殖腺の発達に伴うPRL受容体タンパクおよび遺伝子の局在

cDNAクローニングにより得られたPRL受容体の一部をPCRによって増幅し、ベクターに組み込んだ。これによりアンチセンスcRNAおよびセンスcRNA合成用の鋳型組換えプラスミドを調製した。インビトロ逆転写により、標識アンチセンスcRNA、および対照実験の標識センスcRNAを調製し、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

試料には天然で捕獲したウナギ雌、水槽飼育した体長5~50cmのウナギおよび生殖腺刺激ホルモン(HCG)投与により精子形成を誘起された様々な発達段階の精巢の生殖腺をブアン液で固定し、パラフィン切片を作製した。それらの生殖腺の発達過程を形態学的に観察するとともに、サケPRL受容体抗体を用いて生殖腺におけるPRL受容体の発現部位を免疫組織化学的に観察した。

(3) PRL投与が生殖細胞の発達に及ぼす効果

①性的未分化期：体長約10cm前後のウナギ幼魚にPRL経口投与にて性が決定する体長20cm以上に達するまで数ヶ月間処理する。

②前精子形成期：ウナギ成魚の腹腔内にPRLを連続投与する。投与は体長約40cmの精巢が未発達の間を用いて5回(1週間に1回)以上行う。

③精子形成期：生殖腺刺激ホルモン(HCG)により精子形成を誘起されたウナギ成魚の腹腔内にPRLを連続投与する。

実験終了時に、採血を行った後、精巢を摘出し生殖腺の組織学的研究用に固定する。

精子形成に関わる血中性ステロイド(テストステロン、11-ケトテストステロン)量を時間分解蛍光免疫測定法(TR-FIA)法により測定する。

4. 研究成果

(1) PRL受容体遺伝子のクローニング

ウナギの腎臓から受容体cDNA断片をクローニングした。PRL受容体遺伝子は2156塩基からなり、595アミノ酸残基をコードする全塩基配列を決定した。ウナギPRL受容体は、魚類(コイ、キンギョ、ニジマス、ティラピア、ヒラメ)PRL受容体に対し、50~56%の相同率を示した。

(2) 生殖腺の発達に伴うPRL受容体タンパクおよび遺伝子の局在

ウナギ生殖腺でのPRL受容体の発現を免疫組織化学により調べたところ、シラス期より既に生殖原細胞において明瞭な免疫陽性反応が認められた。その後、生殖細胞の増殖に伴い免疫陽性細胞数も増加し、精巢分化後にはすべての精原細胞で免疫陽性反応が見られた(図1)。同様にウナギ卵巢でも卵母細胞で免疫陽性反応が観察された。これらのことから生殖腺の性分化とそれに続く卵巢および精巢の発達のみならず原生殖細胞を含む初期の生殖腺形成にもPRLが関与していることが示唆された。

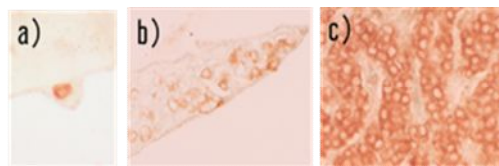


図1 精巢の発達に伴うPRL受容体の発現。

a) 未分化期 b) 精巢分化期 c) 前精子形成期

一方、精子形成過程においては、実験開始時の精巣はA型精原細胞あるいは分裂回数の少ないB型精原細胞からなり、これら生殖細胞全てにおいて強い免疫陽性反応が認められた。しかし、HCG投与後の精子形成が誘起された個体の精巣では、精原細胞におけるPRL受容体の免疫陽性反応は低下し、投与6から18日後の減数分裂中の精母細胞を含んだ精巣内での免疫陽性反応は消失していた(図2)。以上の結果から精子形成過程におけるPRL受容体の発現部位は、未熟な精原細胞に限られていることから、PRLは精子形成の初期過程に何らかの役割を果たしているものと考えられた。

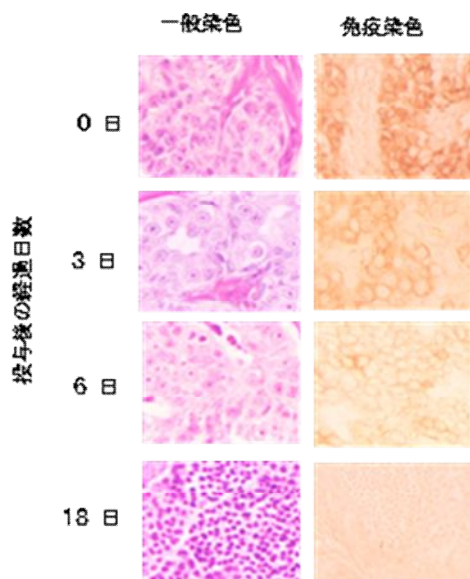


図2 HCG投与に伴うPRL受容体の発現。

PRLおよびPRL受容体のcDNAと遺伝子のクローニングを行い、標識アンチセンスcRNAおよび標識センスcRNAを調整した。これらを用い*in situ*ハイブリダイゼーション法により生殖腺におけるPRL受容体遺伝子の発現を解析した。免疫組織化学の結果と同様に未熟精巣の精原細胞でPRL受容体遺伝子の強いシグナルが得られた(図3)。このことから本研究に用いたサケPRL受容体抗体を用いた免疫組織化学の観察結果の妥当性が示され、PRL受容体は性分化前の原生殖細胞から精巣分化後の精原細胞まで長期にわたり発現していることが確認された。今後、より小型個体での遺伝子発現解析を行うとともに、成熟過程においては定量PCR法による生殖腺でのPRL mRNAの発現動態の解析を行う必要がある。

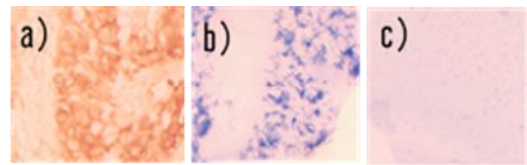


図3 免疫組織染色(a:Anti-PRL)と*In situ*ハイブリダイゼーション(b:Anti-sense probe, c:Sense probe)による精巣でのPRL受容体発現部位の比較

(3) PRL投与が生殖細胞の発達に及ぼす効果

PRLの異なる発達段階における生殖細胞に及ぼす影響を*in vivo*投与実験により調べた。①性的未分化期、②前精子形成期のいずれのPRL投与実験においても生殖腺の発達に影響は認められなかった。また、精子形成に関わる血中性ステロイド(テストステロン、11-ケトテストステロン)量にも変化は見られなかった。

一方、③精子形成期の生殖腺刺激ホルモン(HCG)投与により精子形成が誘起された個体では、HCGとPRLの併用投与群における精原細胞後期B型から精細胞の出現率はHCGのみの投与群のそれと比較して有意に低かった(図4)。これは、PRLがHCGにより誘起された精子形成を抑制したことを示している。

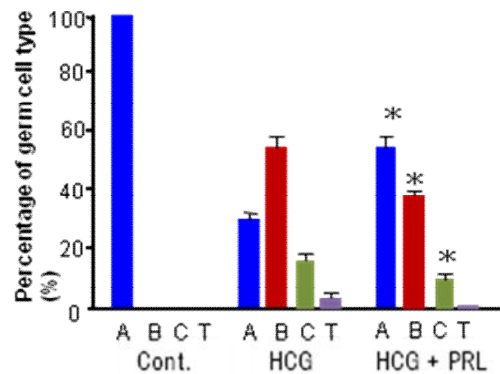


図4 精巣中の各生殖細胞の包囊の出現率の変化(実験終了時:18日目)

A: A型精原細胞、B: 後期B型精原細胞、C: 精母細胞、T: 精細胞

*は、HCGおよびHCG+PRL投与群間で有意な差があることを示す($p < 0.05$)。

また、精子形成に関わる血中性ステロイドホルモン(11-ケトテストステロン、エストラジオール 17β)量もPRLを投与された個体群ではHCGのみの投与群より有意に低下した(図5)。このPRL投与による性ステロイド産生の抑制は、PRL投与がHCGによる精子形成の進行を妨げたことと一致する。

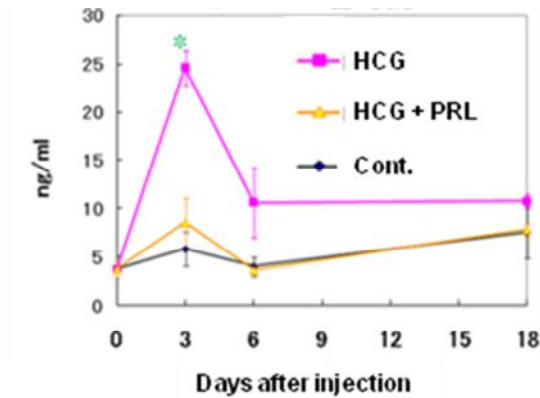


図5 HCG および HCG と PRL の併用投与に伴う血中 11-ケトテストステロン量の変化
*は、HCG および HCG+PRL 投与群間で有意な差があることを示す ($p < 0.05$).

以上のように PRL は生殖細胞全般の発達に関与し、精子形成時には性ステロイドホルモンの産生抑制を介して精子形成を抑制する作用を有することが明らかとなった。PRL は生殖腺形成において生殖細胞を未熟な状態に留まらせる調節因子としての役割を担っている可能性がある。

これまでに、魚類ではタイ科の魚において PRL が魚類の繁殖に強く関与することを示している。しかし、本研究のように、PRL の生理作用を実証した研究例はない。また、生殖腺の初期発達における PRL の関与を示した研究も他に見られない。本研究によって得られた知見は魚類のみならず脊椎動物の繁殖生理学にも新たな展開をもたらす可能性がある。

ウナギは脊椎動物で唯一精巣の器官培養系が確立している種であり、魚類の生殖機構を解析するうえで最適な実験モデルである。今後、器官培養系を用いた組換え体ウナギ PRL の生殖腺への作用解析などにより、生殖細胞の増殖・分化機構の詳細が明らかにでき、水産科学において極めて重要な繁殖に関わる知見が飛躍的に増大するものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Moriyama S, Yamaguchi K, Takasawa T, Chiba H, Kawauchi H. Identification of two insulin-like growth factor IIs in the Japanese eel, *Anguilla japonica*: cloning, tissue distribution, and expression after growth hormone treatment and seawater acclimation. *Comp. Biochem. Physiol. B* 査読有 149: 47-57 (2008).

[学会発表] (計 2 件)

- ① 森山俊介、ウナギ稚魚の成長促進に及ぼすエストラジオール 17β の効果、平成 21 年度日本水産学会春季大会、2009 年 3 月 30 日、東京海洋大学
- ② 千葉洋明、ウナギの生殖腺におけるプロラクチン受容体の免疫組織化学的観察、平成 21 年度日本水産学会春季大会、2009 年 3 月 29 日、東京海洋大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 洋明
北里大学・海洋生命科学部・准教授
研究者番号：50236816

(2) 研究分担者

森山 俊介
北里大学・海洋生命科学部・准教授
研究者番号：50222352