

プラナリアの雄性ホルモンに関する研究

岩手大学大学院連合農学研究科

生物資源科学専攻

福島 誠

目次

第1章 序論	1
1. 導入	
2. 研究構想	
第2章 材料と方法	6
1. 材料	7
2. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析	10
3. Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA)	11
4. 透過型電子顕微鏡観察	13
5. SDS-PAGE とウェスタンブロット法	14
6. 免疫組織化学的手法	16
a. パラフィン包埋試料	
b. O. C. T. compound 包埋試料	
c. 抗アンドロゲンレセプター抗体を用いた免疫染色	
d. 抗テストステロン抗体を用いた免疫染色	
第3章 結果	19
1. イズミオオウズムシ体内テストステロンの検出	20
2. 精子形成過程に着目したテストステロン含有量の変動	21
3. アンドロゲンレセプター様タンパク質の検出と局在	24
4. テストステロンの局在	26
5. テストステロン含有量の増加と卵黄腺の発達との関係	27
第4章 考察	30
1. 精子形成過程に着目したテストステロンの検出と変動	31
2. テストステロンの役割について	35
3. レセプターについて	38
4. テストステロンの合成と局在	41
第5章 総括	43
謝辞	45
参考文献	47
表・図説	56

第 1 章

序論

1. 導入

近年、数種の無脊椎動物において脊椎動物型の性ステロイドホルモンが存在していることが明らかとなっている (Bose *et al.*, 1997; De Clerck *et al.*, 1983; Mechoulam *et al.*, 1984; Ollevier *et al.*, 1986; Reis-Henriques *et al.*, 1990; Verslycke *et al.*, 2002)。

軟体動物においては、ステロイドレベルは繁殖状況 (reproductive status) に関連して測定されている (De Longcamp *et al.*, 1974; Gooding and LeBlanc, 2004; Reis-Henriques and Coimbra, 1990)。二枚貝の *Mya arenaria* においてプロゲステロンとテストステロンが (Siah *et al.*, 2002)、*Mytilus edulis* においてプロゲステロン、アンドロステンジオン、テストステロン、エストロン (Reis-Henriques *et al.*, 1990) と 17β -エストラジオール (Reis-Henriques *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 2003) が同定されている。プロゲステロン濃度は *Mytilus edulis* (Reis-Henriques and Coimbra, 1990) と *Mya arenaria* (Siah *et al.*, 2002) において、配偶子形成サイクルで調べられている。Osada *et al.* (2004) はホタテ貝 (*Patinopecten yessoensis*) においてエストロゲンの生殖巣プロファイルを報告している。

頭足類のマダコ (*Octopus vulgaris*) では、性ステロイドに対する高い結合能を持ったタンパク質が発見されている (D' Aniello A, 1996)。軟体動物のアメフラシ (*Aplysia californica*) においてエストロゲンレセプターの存在が報告されるまで (Thornton, 2003)、エストロゲンレセプターは無脊椎動物には存在しないとされていた。しかし、無脊椎動物ではエストロゲンレセプターが単離

される以前にエストロゲンが内因性のモジュレーターとして働いている、ということを示唆する報告が幾つかあった。例えば、棘皮動物において、Schoenmakers (1981) は、ヒトデ (*Asterias rubens*) にエストラジオールを注入すると、卵母細胞の成長が見られる、と報告した。一方 Barker と Xu (1993) は他種ヒトデ (*Sclerasterias mollis*) において、エストラジオールの注入後にプロゲステロン量の増加が生じる、と報告している。ホタテ貝 (*Patinopecten yessoensis*) においては、エストラジオールは生殖巣に vitellin を蓄えさせる (Osada *et al.*, 2004)。また、テストステロン投与は去勢されたオスのナメクジ (*Euhadra prelionphala*) にオス的二次性徴の形成を促す (Takeda, 1979)。さらに、テストステロンの投与はメスの腹足類 (gastropods) にインポセックスを引き起こさせる (Bettin *et al.*, 1996; Spooner N, 1991)。

また、無脊椎動物のステロイドの生合成に関しては、ヒトデにおいて体組織と生殖巣で、アンドロゲン (androstenedione) を他のアンドロゲンに代謝することが知られている (Hines, 1992)。

淡水棲プラナリアには、2つの生殖様式 (無性生殖と有性生殖) がある。無性生殖で繁殖するプラナリアは、生殖器官を持たず、自らの体を切断 (自切) して繁殖する (図 1)。有性生殖で繁殖するプラナリアは、雌雄両性の生殖器官を持ち、卵 (複合卵、複数の受精卵とそれらを取り囲む卵黄細胞が卵殻に被われている) を産んで繁殖する (図 2、図 3)。季節の移り変わりに伴い無性生殖と有性生殖の可逆的な転換をするプラナリアも存在する (Curtis, 1902; Hyman, 1939)。本研究に用いた淡水棲プラナリア、イズミオオウズムシ (*Bdellocephala brunnea*) は有性生殖様式を行なう個体のみ確認されており、イズミオオウズム

シの様な有性生殖を行うプラナリアは、卵殻から孵化した後、卵巢、精巢、交接器官、卵黄腺の順に分化・形成される(手代木と石田 1987a)。有性化実験においても、その順で現れる(Kobayashi and Hoshi, 2002; Kobayashi *et al.*, 1999; Sakurai, 1981)。繁殖時期になると、成体では腹側から観察すると咽頭の両側に2本の白い輸精管膨大部(輸精管の一部)が認められる(図4)。これは、その器官に自己の精子が蓄えられることにより肥大し、外形的に可視化されるためである(手代木と石田 1987b)。このような雌雄同体型の生殖器官の分化・形成や生殖器官の発達・退縮には性ステロイドが関与している、と考えられる。

淡水棲プラナリアにおいては、近年、リュウキュウナミウズムシ(*Dugesia ryukyuensis*)において、ステロイド/チロイドレセプターファミリーに属する Fushi tarazu factor-1 (FTZ-F1) ホモログや、ステロイドの生合成に関与しているといわれているチトクローム P450 ホモログが見つかっており、プラナリアにも endocrine like system が存在することが示唆されている(Nakagawa *et al.*, 2004)。また、淡水棲プラナリアの1種である *Schmidtea mediterranea* のゲノムデータベースが公表されており、プラナリアゲノム中には内分泌系に関連する様々な遺伝子が存在している(Robb *et al.*, 2008)。しかし、まだ性ステロイドは検出されていない。

淡水棲プラナリア、イズミオオウズムシの精細胞には、哺乳類のアンドロゲン合成細胞(Leydig cell)に見られる(Zirkin and Chen, 2000)ような、数多くの滑面小胞体を確認されている(石田 1987)。ヒト(男性)において、主な血中アンドロゲンはテストステロンであり、精巢において95%以上が合成され、残りは副腎で合成されている(Coffey, 1992)。そのため、イズミオオウズムシ

精巢の精細胞でアンドロゲンが合成されている、という仮説をたて、実験によって虫体内におけるテストステロンの存在を確かめた。さらに、イズミオオウズムシ体内でテストステロンが性ホルモンとしての役割を担っているのか否かを考察した。

2. 研究構想

まず、淡水棲プラナリアにアンドロゲンが存在することを立証するため、第1にホルモン物質を検出すること、第2にその受容体タンパク質を検出すること、第3にホルモン合成・代謝系に関する酵素又は受容体タンパク質の遺伝子を単離することの3つの視点から総合的に研究する必要がある、と考えた(図5)。さらに、これらの3視点から、アンドロゲンが淡水棲プラナリアの性ホルモンとしての役割をもっているのか否かを推察することが出来る。

また、研究に用いる淡水棲プラナリアには、青森県弘前市で容易に数多くの個体を採集することができ、有性生殖で繁殖し、淡水棲プラナリアの中でも個体サイズが大きいイズミオオウズムシを材料にすることで、実験的な便利さを得ることが出来る、と考えた。さらに、イズミオオウズムシでは発生や配偶子形成等について既に調べられており、本研究を行うにあたり、実験的生物種として最適である、と考えた。

第 2 章

材料と方法

1. 材料

プラナリア

淡水棲プラナリア、イズミオオウズムシは有性生殖で繁殖するプラナリアである。他の淡水棲プラナリアのナミウズムシ (*Dugesia japonica*) やリュウキウナミウズムシ (*Dugesia ryukyuensis*) の有性生殖で繁殖する個体では、卵巣と精巣、卵黄腺等の生殖器官を外形的に確認することが出来るが、イズミオオウズムシの場合、体表にある色素の影響により、交接器官と輸精管膨大部を除く、ほとんどの生殖器官は外形的に確認することが困難である。仔虫は、成長する過程において生殖器官を分化・形成し、成体になるが、成体の指標として、生殖孔を選択した。生殖孔とは、交接器官の末端が腹側に開孔した孔である。その孔が形成されないと、他個体と交接することが出来ない。また、交接器官は他の生殖器官と比べて遅く分化・形成され、生殖孔の開孔は、その過程の後期に起こる (手代木と石田 1987a)。そのため、イズミオオウズムシにおいて、外形的に生殖孔の開孔を個体が性的に成熟していることの指標とした。このことから、生殖孔の開孔した個体を性的成熟個体、開孔していない個体を性的未成熟個体とした (図 6)。

イズミオオウズムシは青森県弘前市の泉から採集された。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるテストステロン分析に用いた個体群は 2007 年 1 月と 2 月に採集し、組織観察をせずに実体顕微鏡下で生殖孔の開孔している個体だけを選別し、精巣で産生された精子が蓄えられる輸精管膨大部が、外形的に観察される (図 4) か否かにより 2 つに分け、直ちに -30°C で凍結した。Enzyme-linked

immuno-sorbent assay (ELISA) 法によるテストステロンの定量に用いた個体群は 2005 年 12 月から 2006 年 12 月までの期間に採集し、2005 年 12 月、2006 年 1 月と 2 月を除く他の月では、約 1 週間に 1 回、5 個体ずつの割合で採集した。採集したイズミオオウズムシを、研究室で直ちに体長を計測し、生殖孔の有無を実体顕微鏡下で確認し、開孔している個体を選別した。そのとき、輸精管膨大部の有無も確認した。その後直ぐに、外科的に片側の卵巣と精巣を含む領域 (図 7 B) を切除し、それを Bouin 氏液で固定した。固定した試料をエタノールアップシリーズによる脱水処理とキシレンによる透徹後、パラフィン包埋した。6 μ m のパラフィン切片 (縦断切片) を作り、キシレンによる脱パラフィンとエタノールダウンシリーズによる再水和処理後、ヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色を施し、その組織片中に含まれている生殖器官の状態を、光学顕微鏡下で組織観察した。残りの部分 (図 7 A、C) は直ちに -30°C で凍結し、その後の実験に用いるまで保存した。ウェスタンブロット法と免疫組織化学的手法での解析では、採集したプラナリアを研究室において脱塩素処理した水道水で、水温約 12°C 、餌として鶏のレバーを与えて飼育し、実験に用いる前に 10 日から 14 日間飢餓処理を施した。

マウスとラットの精巣

ウェスタンブロット法による抗アンドロゲンレセプター抗体のポジティブコントロールとして、生後 32 週目のオスのマウスと生後 9 週目のオスのラットを用いた。外科的に両精巣を摘出し、PBS (pH 7.2) で洗浄後、マウス精巣は直ちに PBS (pH 7.2) で氷温にて粉砕、 -80°C で凍結保存した。ラット精巣は使用する

るまで -80°C で凍結保存し、使用するときには氷上で精巢の一部を切り取り、それを PBS (pH 7.2) で氷温にて粉砕、 -80°C で凍結保存した。

2. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析

実体顕微鏡下での観察により輸精管膨大部の有無を区別したイズミオオウズムシ性的成熟個体をそれぞれのプールとし、ドライアイス上で1つのチューブに移し、氷上に置き換え、PBS (pH 7.2) を加えホモジナイザー (HG30 Homogenizer, HITACHI) で粉砕した。粉砕液を、タンパク質定量用と SDS-PAGE 用と HPLC サンプルとしての抽出用の3つに分けた。タンパク質定量はブラッドフォード法を用いて定量した (Bradford, 1976)。その後、SDS-PAGE によってブラッドフォード法での各タンパク質の定量が適正であるか否かを再度確認した。それぞれの粉砕液の濃度を PBS (pH 7.2) でそろえ、同じ量の粉砕液をその後の抽出に用いた。ジエチルエーテル (Wako) を加え、シェーカー (TAITEC RECIPRO SHAKER SR-1) により室温で5分間攪拌し、エーテル層を分離するため遠心後、エーテル層を回収、残りに再びジエチルエーテルを加え、同様に全8回繰り返す。回収したジエチルエーテル総量は粉砕液の10倍量となるように行った。回収したエーテル層を乾燥させ、10ml のジエチルエーテルで濃縮・攪拌し、不溶物を取り除くため10分間室温にて遠心後、上清を回収し、濾過、乾燥を経て、ケン化処理を行い、酢酸エチルで溶解し、HPLC (HITACHI UV-VIS Detector L-7420) で測定した。試薬の調製や測定方法に関しては、すでに報告されてある方法に従った (Ng and Yuen, 2003)。

3. Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA)

イズミオオウズムシ性的成熟個体を光学顕微鏡下での組織観察により、精子形成過程の 6 つのステージに区別した。そして、各精子形成過程のステージ毎に性的成熟個体を振り分け、それぞれのプールとした (図 7)。エーテル抽出前までのサンプル調製は HPLC での方法と同様に行った。粉碎液に 10 倍量のジエチルエーテルを加え、1 分間室温にて攪拌した。その後、エーテル層を分離するために数分間室温にて静置し、エーテル層を回収した。回収したエーテル層は 30℃にて一昼夜乾燥させ、析出物をテストステロン ELISA キット (NEOGEN) 添付の抽出液 (1×Extraction buffer) で溶解させた。その後、数本のチューブに分注し、これらのサンプルは ELISA 解析まで -30℃にて冷凍保存した。基本的な手法はテストステロン ELISA キット (NEOGEN) 付随の説明書に従ったが、一部改変した。一連の手法を以下に示す。抽出したサンプルを添付の抽出液 (1×Extraction buffer) で各々任意に希釈し、サンプルとホースラディッシュ・ペルオキシターゼ (HRP) 標識テストステロンを等量ずつ混ぜ、氷上に置いた。1 ウェル当り 100 μ l の混合液を入れ、静かに混ぜ、室温にて 1 時間静置させた。その後、ウェル内の混合液を捨て、1×Wash buffer 300 μ l で 3 回、ウェルを洗浄した。HRP の発色基質 150 μ l をウェルに入れ、30 分間室温にて静置させた。その後、プレートリーダー (MTP-450 MICROPLATE READER, CORONA ELECTRIC) により、650nm の波長で、吸光度を測定した。スタンダードは、説明書に従い調製した。一連の各スタンダード及び一連の希釈した各サンプルは、1 回のアッセイ当り 3 ウェルに分注し、それらの平均値を 1 アッセイの値とし、2 回のアッセイ

イの平均値を求めた。

4. 透過型電子顕微鏡観察

イズミオオウズムシ試料は終濃度 3% のグルタルアルデヒド (カコジレートバッファー) で 2 時間、4°C にて前固定し、カコジレートバッファー (pH 7.2) で洗浄後、終濃度 1% のオスミウム (リン酸バッファー、pH 7.3) で 2 時間、後固定した。試料はエタノールと n-ブチルグリシジルエーテル (QY-1; Oken) で脱水後、エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片作製後、3% 酢酸ウラニル水溶液と佐藤の鉛液 (Sato, 1968) で電子染色し、透過型電子顕微鏡 (Hitachi; HU-12A) により観察した。

5. SDS-PAGE とウェスタンブロット法

イズミオオウズムシの性的成熟個体数匹と性的未成熟個体数十匹に、1/4 に希釈した PBS を加え、氷温にて粉碎し、実験に使用するまで -80°C にて保存した。

SDS-PAGE を行なう前に、ブラッドフォード法により総タンパク質を定量した。定量した粉碎液を実験に用いるタンパク質濃度に 1/4 PBS、マウスとラット精巢粉碎液には PBS を加えて調製し、等量の 2×SDS-PAGE サンプルバッファー (0.1M Tris-HCl、4% SDS、20% グリセロール、5% β メルカプトエタノール、BPB) を加え、ヒートブロックによって 100°C にて 5 分間加熱した。濃縮ゲル (3% アクリルアミド)、分離ゲル (7.5% アクリルアミド) で SDS-PAGE を行ない、各総タンパク質を分離した。

ウェスタンブロット法では、SDS-PAGE で各サンプルの総タンパク質を分離した後、Immun-Blot™ PVDF Membrane (BIO RAD) に 1 cm^2 当たり 1.5 mA、1.5 時間、セミドライで室温にて転写した。Immun-Blot™ PVDF Membrane (BIO RAD) の前処理は、メタノールで室温にて 5 分間洗浄し、ブロッキングバッファー (495mM Tris、1.3M Glycine) で 30 分間、室温にてインキュベートした後、再度新しいブロッキングバッファーで洗浄した。転写された PVDF 膜を終濃度 0.02% の Tween 20 を含有した PBS (PBT) で数回洗い、終濃度 5% のスキムミルクを含有した PBT (ブロッキング溶液) で、室温にて 1 時間インキュベートした。その後 PVDF 膜を、一次抗体として、ブロッキング溶液で 1:150 に希釈したウサギ抗ヒト・アンドロゲンレセプター抗体 (SIGMA) 又は 1:20 に希釈したウサギ抗ラット・アンドロゲンレセプター抗体 (PG-21、Prins *et al.*, 1991) 中で、 4°C にて一

昼夜、抗原抗体反応させた。ネガティブコントロールとしては、ブロッキング溶液だけを用いた。PBT で 5 分間、室温にて 5 回洗浄後、二次抗体として、ブロッキング溶液で 1:2000~1:1000 に希釈したアルカリフォスファターゼ (AP) 標識のヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (CEMICON INTERNATIONAL) 溶液中で、4°Cにて一昼夜、抗原抗体反応させた。PBT で 5 分間、室温にて 5 回洗浄した後、アルカリフォスファターゼバッファー (TMN buffer、100mM Tris、100mM NaCl、50mM MgCl₂ · 6H₂O) で 5 分間、室温にて 3 回置換し、BCIP/NBT 混合発色液で室温にて発色させた。

6. 免疫組織化学的手法

a. パラフィン包埋試料

イズミオオウズムシを終濃度 2%の HCl を含有した 5/8 Holtfreter 氏液中で 5 分間、氷温にて弛緩させ、終濃度 6%のホルムアルデヒド (1/4 PBS) で 24 時間、室温にて固定した。固定したプラナリアをエタノールアップシリーズで脱水し、キシレンを仲介して、パラフィンに包埋した。包埋した試料を 6 μ m の厚さでセクションした。その試料を脱パラフィン処理とエタノールダウンシリーズによる再水和を行い、その後の免疫染色に用いた。

b. O. C. T. Compound 包埋試料

基本的な試料作製については Matsumoto *et al* (1999) と Osada *et al* (2004) を参考にした。イズミオオウズムシ性的成熟個体を Bouin 氏溶液中で、氷温にて一昼夜固定した。固定したプラナリアを PBS (pH 7.2) で洗浄し、終濃度 10%、15%、20%のスクロースを含有した PBS で 30 分間、室温にて順に浸漬した。その後、O. C. T. Compound (Tissue-Tek、Sakura Finetechnical) に固定試料を置換し、ドライアイス・エタノールで凍結、セクションするまで -80°C にて保存した。包埋した試料を 10 μ m の厚さで、-16~-15°C にて凍結切片を作製し、その後の免疫染色まで -30°C にて保存した。

c. 抗アンドロゲンレセプター抗体を用いた免疫染色

脱パラフィン後の試料を終濃度 0.1%の Tween 20 を含有した PBS (PBT) で数

回洗い、終濃度 10%のヤギ正常血清又は 5%スキムミルクを含有した PBT (ブロッキング溶液) で 1 時間、室温にてインキュベートした。その後試料を、一次抗体として、ブロッキング溶液で 1:150 に希釈したウサギ抗ヒト・アンドロゲンレセプター抗体又は 1:20 に希釈したウサギ抗ラット・アンドロゲンレセプター抗体中で、4°Cにて一昼夜、抗原抗体反応させた。ネガティブコントロールとしては、ブロッキング溶液だけでインキュベートした。PBT で 10 分間、室温にて 5 回洗浄後、二次抗体としてブロッキング溶液で 1:2000-1:1000 に希釈したアルカリフォスファターゼ (AP) 標識のヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (CEMICON INTERNATIONAL) 溶液中で、4°Cにて一昼夜、抗原抗体反応させた。PBT で 10 分間、室温にて 5 回洗浄した後、アルカリフォスファターゼバッファーで 10 分間、室温にて 3 回置換し、BCIP/NBT 混合発色液で室温にて発色させた。発色後、水洗し、100%グリセロールで封入した。作製したプレパラートを微分干渉光学顕微鏡 (Nikon M1-364) で検鏡し、デジタルカメラ (Nikon CoolPicks) で撮影し、Photoshop を用いて、明るさ・コントラストについて画像処理を行なった。

d. 抗テストステロン抗体を用いた免疫染色

-30°Cにて保存してある凍結切片試料を PBS (pH 7.2) で、室温にて洗浄後、終濃度 5%のスキムミルクを含有した PBS (ブロッキング溶液) で 1 時間、室温にてインキュベートした。その後、試料を一次抗体としてブロッキング溶液で 1:100 に希釈したウサギ抗テストステロン抗体 (AbD serotec) で、4°Cにて一昼夜、抗原抗体反応させた。ネガティブコントロールとしては、ブロッキング溶液だけでインキュベートした。PBS (pH 7.2) で 10 分間、室温にて洗浄を 8

回繰り返し、二次抗体としてブロッキング溶液で 1 : 2000 に希釈したアルカリ
フォスファターゼ (AP) 標識のヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (CEMICON INTERNATIONAL)
溶液中で、4°Cにて一昼夜、抗原抗体反応させた。PBS (pH 7.2) で 10 分間、室
温にて洗浄を 8 回繰り返した後、アルカリフォスファターゼバッファーで 5 分
間、室温にて置換を 3 回繰り返し、BCIP/NBT 混合発色液で室温にて発色させた。
発色後、水洗し、100%グリセロールで封入した。プレパラートを光学顕微鏡
(Nikon) で検鏡し、CCD デジタルカメラ (Nikon) で撮影し、明るさ・コントラ
ストについて画像処理を行った。

c 及び d については、必要に応じてエオシンでカウンター染色し、エタノール
アップシリーズとキシレンを仲介し、Bioleit (Oken) で封入した。

第 3 章

結果

1. イズミオオウズムシ体内テストステロンの検出

イズミオオウズムシの腹側を実体顕微鏡下で観察し、性的成熟個体を輸精管膨大部の可視・不可視により分け、可視された個体を SV0、不可視の個体を SVX とした。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) での分析に用いるサンプルとして、SV0 と SVX は両方とも 100 匹の個体を用いた。HPLC において、スタンダードのテストステロン (Nacalai Tesque, Inc) とのクロマトグラムの比較の結果、イズミオオウズムシ SV0、SVX の両個体群とも、テストステロンのピークが検出された (図 8、矢印)。スタンダードカーブより、イズミオオウズムシ総タンパク質当り、SV0 では 343.3 pg/mg、SVX では 604.4 pg/mg であった。予備実験的に、HPLC に用いた同じ粉砕液を用いて Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) 法により、テストステロンの定量を行った結果でも、HPLC と同様に SVX が SV0 の約 2 倍の値となった。

2. 精子形成過程に着目したテストステロン含有量の変動

精巣の発達・退縮

光学顕微鏡下での組織観察により、イズミオオウズムシ性的成熟個体の精巣を、精子形成過程段階により、概略的に6つのステージに分類した(図9、表1)。精子形成ステージ1は精原細胞のみで構成された精巣である。精子形成ステージ2は精巣外側に精原細胞があり、内側に精母細胞が形成されている。精子形成ステージ3はさらに内側に減数分裂を経た精細胞が形成されている。精子形成ステージ4では精細胞の精子への変態が始まり、変態中の精細胞が確認される。精子形成ステージ5は精子への変態が進み、精巣の腔内に精子が観察される。精子形成ステージ4と5の違いは、ステージ4では精巣に占める精母細胞が、ステージ5では精巣に占める精細胞の割合が見た目上高いことである。精子形成ステージ6は精巣に精母細胞がなく、精巣は小さくなり、退縮した精巣である。光学顕微鏡での観察では、明確に完全な精子との区別が出来なかったため、変態がかなり進んだ精細胞も精子とした。

6ヶ月間のサンプリングデータ

2006年7月から12月までの6ヶ月間に、野外から採集したイズミオオウズムシ性的成熟個体128匹の各精子形成ステージを個体数で月毎に示した(表2)。採集してきたイズミオオウズムシ各個体の精子形成ステージは、図7のB領域の組織観察により決定した。精子形成ステージ5の個体数は10月を除く5ヶ月で最も多く確認された。10月では、精子形成ステージ4の個体数が最も多いよ

うだが、精子形成ステージ 5 の個体数と同程度であった。精子形成ステージ 1 の個体は、8月と9月では確認されなかった。同様に、精子形成ステージ 2 の個体は12月では確認されず、精子形成ステージ 3 の個体は7月と8月で確認されず、精子形成ステージ 6 の個体は11月で確認されなかった。このように、採集した性的成熟個体群の精子形成ステージは、各月においてばらつきが見られた。

体内テストステロン含有量の変動

光学顕微鏡下での組織観察の結果（図9、表1）から、各精子形成ステージの性的成熟個体をそれぞれプールし、ELISA法により、組織観察用の領域（図7B）を除くイズミオオウズムシ総タンパク質あたりのテストステロン含有量（pg/mg）を測定した（図10）。その結果、精子形成ステージ1の個体群（n=12）では 114.4 ± 4.0 pg/mg、精子形成ステージ2の個体群（n=9）では 128.0 ± 20.5 pg/mg、精子形成ステージ3の個体群（n=12）では 107.8 ± 6.3 pg/mg、精子形成ステージ4の個体群（n=12）では 70.2 ± 9.2 pg/mg、精子形成ステージ5の個体群（n=12）では 141.0 ± 9.0 pg/mg、精子形成ステージ6の個体群（n=8）では 222.0 ± 35.0 pg/mgのテストステロン含有量であった。このときのアッセイ間変動係数とアッセイ内変動係数はそれぞれ4.75%、5.7%であった。テストステロン含有量は精子形成ステージ6ではステージ4よりも3倍以上高く、他と比べても約2倍高かった。精子形成ステージ4は6つのステージ中、最も低かった。精子形成ステージ1からステージ3は同様の値であった。

精細胞の微細構造（変態過程の精細胞の滑面小胞体）

イズミオオウズムシ精巣の精細胞を、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。イズミオオウズムシの精細胞の変態過程は、電子顕微鏡下での観察により、7つのステージに区別されている（石田 1987）。精細胞の変態ステージ2から核の凝縮が始まり、核の周りにはミトコンドリアが並び、ゴルジ体も発達する。また、滑面小胞体が細胞膜に沿って配列しているのが観察された（図 11 A）。変態完了後の精子が離れた、精細胞残余体においても、細胞膜に沿って数多くの滑面小胞体が存在しているのが観察された（図 11 B）。

3. アンドロゲンレセプター様タンパク質の検出と局在

アンドロゲンレセプター様タンパク質の検出

ウェスタンブロット法により、イズミオオウズムシの性的成熟個体の総タンパク質 (SDS-PAGE で分離したタンパク質: 40 μ g) におけるウサギ抗ヒト・アンドロゲンレセプター抗体と交叉するタンパク質の存在を調べた。その結果、ポジティブコントロールとして用いたマウス精巣の総タンパク質 (40 μ g) と同様の約 116 kDa の位置に、交叉するタンパク質が検出された (図 12)。一方、性的未成熟個体の総タンパク質 (40 μ g) においては、交叉するタンパク質がほとんど検出されないほど微弱なシグナルが見られた。また、他の分子量のタンパク質は交叉しなかった。コントロールにおいて、二次抗体の非特異的な結合は確認されなかった (データは示されていない)。

同様に、ウサギ抗ラット・アンドロゲンレセプター抗体 (PG-21) において、ポジティブコントロールとして用いたラット精巣の総タンパク質 (40 μ g) と約 121 kDa の位置で交叉するタンパク質が検出された (図 13)。

アンドロゲンレセプター様タンパク質の局在

免疫組織化学的手法により、イズミオオウズムシの性的成熟個体におけるウサギ抗ヒト・アンドロゲンレセプター抗体と交叉したタンパク質の局在を調べた。特異的な強い交叉反応が横断切片においては、吸着器官 (図 14 A) から眼点に挟まれた内側 (図 14 C) を通り、虫体側面に分布し、(図 14 E)、縦断切片においては、尾部先端部にかけて局在している (図 14 G) 腺細胞とそこから連

なる輸送管に見られた。また、連続切片であるコントロールには二次抗体の非特異的な結合は確認されなかった（図 14 B、D、F）。ウェスタンブロット法ではほとんど検出されなかったイズミオオウズムシ性的未成熟個体での局在を調べたところ、縦断切片において性的成熟個体と同様の腺細胞とそこから連なる輸送管に特異的な交叉反応が見られた（図 14 H）。縦断切片において、免疫染色後にエオシンでカウンター染色をした結果、局在部位は好エオシン性の細胞とは異なった細胞であることが確認された（図 15）。

イズミオオウズムシ性的成熟個体の横断切片においては、生殖器官の卵黄腺と交接囊上皮にも弱い特異的な交叉反応が見られた。卵黄腺においては、僅かに卵黄粒が確認される発達途中の卵黄腺に局在していた（図 16-1）。交接囊上皮においては、核に局在していた（図 16-2）。一方、生殖巣である精巣、卵巢には局在が見られなかった（図 16-3）。

一方、ウサギ抗ラット・アンドロゲンレセプター抗体（PG-21）においては、イズミオオウズムシ性的成熟個体の卵黄腺にのみ特異的な交叉反応が見られた（図 17 B、矢頭）。この抗体においても、精巣や卵巢には交叉するタンパク質が検出されなかった（データは示されていない）。

4. テストステロンの局在

免疫組織化学的手法により、イズミオオウズムシ性的成熟個体におけるテストステロンの局在を調べた。その結果、アンドロゲンレセプター様タンパク質が検出された卵黄腺（卵黄細胞）にテストステロンが局在していた（図 17 D、矢頭）。また、卵黄腺以外にもテストステロン陽性を示した部域は、腸管（図 18）と咽頭の内層（図 19）、生殖器官では交接囊であった（図 20）。交接囊においては、上皮と他個体からの精子に強い陽性反応が確認された。また、交接囊上皮が、主に腹側の尾部方向に開孔しており（図 21、22）、開孔部から他個体精子が交接囊外へ移行し、腸管へ達していた（図 22、23）。さらに、腸管に存在する他個体精子において、テストステロンは頭部を覆うように局在していた（図 24）。

5. テストステロン含有量の増加と卵黄腺の発達との関係

各月での精巣の精子形成ステージ及び卵黄腺の発達の移り変わり

表 3 A と図 25 A に、2005 年 12 月から 2006 年 12 月までに採集した淡水棲プラナリア、イズミオオウズムシ性的成熟個体における各月での、それぞれの精子形成ステージの頻度を示した。特に、精子形成ステージ 5 と 6 の合計個体数の頻度は、2005 年 12 月から 2006 年 12 月までにそれぞれ、46.7%、100%、100%、73.3%、55.5%、47.6%、73.6%、70.8%、60%、55%、32%、40%、47.4%であった。2005 年 12 月では採集した個体数は多く ($n = 60$)、2006 年 1 月と 2 月では採集した個体数は少なかった ($n = 4$ 、 $n = 6$)。また、同様に卵黄腺ステージの頻度を調べてみると、表 3 B 及び図 25 B のようになった。卵黄腺の発達度合いは図 26 に示したように、卵黄腺は卵黄細胞の集合組織であり、産卵時期には発達すると卵殻形成顆粒と卵黄粒が形成され、肥大する。卵殻形成顆粒や卵黄粒が見られない、又は卵殻形成顆粒は見られるが卵黄粒が見られず、肥大していないステージを YD1、卵殻形成顆粒と卵黄粒が共に見られるステージを YD2 とした (表 4)。卵黄腺ステージ YD2 の頻度は、2005 年 12 月から 2006 年 12 月ではそれぞれ、20%、50%、100%、86.7%、83.3%、79.2%、90%、75%、55%、30%、8%、25%、36.8%となっていた (表 3 B、図 25 B)。

体内テストステロン含有量の変動と卵黄腺の発達

2005 年 12 月から 2006 年 6 月までの組織観察の結果から、精子形成ステージ 4 の個体群と、精子形成ステージ 5 の個体群、精子形成ステージ 6 の個体群の 3

つの個体群（各 $n = 12$ ）をサンプルとし、ELISA 法により、組織観察用の領域を除くイズミオオウズムシ総タンパク質あたりのテストステロン含有量（pg/mg）を測定した（図 27 A）。その結果、精子形成ステージ 4 の個体群、精子形成ステージ 5 の個体群、精子形成ステージ 6 の個体群では、それぞれ 4.7 ± 0.15 pg/mg、 41.4 ± 1.2 pg/mg、 136.5 ± 4.5 pg/mg のテストステロン含有量であった。このときのアッセイ間変動係数とアッセイ内変動係数はそれぞれ 11.8%、15.5%であった。その時の ELISA サンプルに用いた各精子形成ステージの個体群において、組織観察の結果、各個体群間で卵黄腺ステージ（YD1、YD2）の割合（個体数）に顕著な違いが確認された（図 27 B）。それぞれの ELISA サンプルの個体群における YD2 個体の割合（個体数）は、精子形成ステージ 4 の個体群、精子形成ステージ 5 の個体群、精子形成ステージ 6 の個体群では、0%（12 個体中 0 個体）、58.3%（12 個体中 7 個体）、100%（12 個体中 12 個体）であった。

同様に、2006 年 7 月から 12 月までの ELISA サンプルでは、組織観察の結果から、精子形成ステージ 4 の個体群（ $n = 12$ ）、精子形成ステージ 5 の個体群（ $n = 12$ ）、精子形成ステージ 6 の個体群（ $n = 8$ ）のテストステロン含有量の値はそれぞれ 70.2 ± 9.2 pg/mg、 141.0 ± 9.0 pg/mg、 222.0 ± 35.0 pg/mg であり（図 27 C）、組織観察の結果から、それぞれの ELISA サンプルの個体群における YD2 の個体の割合は 16.7%（12 個体中 2 個体）、50%（12 個体中 6 個体）、100%（8 個体中 8 個体）であった（図 27 D）。一方、精子形成ステージ 1 の個体群（ $n = 12$ ）、精子形成ステージ 2 の個体群（ $n = 9$ ）、精子形成ステージ 3 の個体群（ $n = 12$ ）のテストステロン含有量の値はそれぞれ、 114.4 ± 4.0 pg/mg、 128.0 ± 20.5 pg/mg、

107.8±6.3 pg/mg であり (図 27 E)、それぞれの ELISA サンプルの個体群における YD2 の個体の割合は 8.3% (12 個体中 1 個体)、11.1% (9 個体中 1 個体)、16.7% (12 個体中 2 個体) であった (図 27 F)。精子形成ステージ 1 からステージ 4 の個体群では卵黄腺の発達している (YD2) 個体頻度 (数) に顕著な差は見られないが、ステージ 5 から急激に卵黄腺ステージ YD2 の割合が増加していた。

第 4 章

考察

1. 精子形成過程に着目したテストステロンの検出と変動

6ヶ月間のイズミオオウズムシの精巣各ステージについて

表2でまとめられたように、この半年間では10月を除いた5ヶ月間で精子形成ステージ5の個体を一番多く観察した。この結果は、精子形成ステージ5の期間が他の5つのステージよりも格段に長くなっていることを示しているだろう。また、Kobayashi *et al* (2002) は2000年8月から2001年6月までに2ヶ月おきに採集したイズミオオウズムシ性的成熟個体群の精巣において、明確な季節的成熟変化を示しているが、この実験期間中の6ヶ月の間では、同じ月の8月、10月、12月でさえ、野外でのイズミオオウズムシ集団における明確な精巣の時期的成熟変化を確認できなかった（例えば、8月では野外のイズミオオウズムシ性的成熟個体群の精巣は精子形成ステージ1の状態である、ということを確認できなかった）。これに関しては、彼らが実験に用いた個体は体長20 mm以上であり（体長差）、山形から採集し（地域差）、2000年8月から2001年6月の時期に採集した（年次差）、という違いによるものと推察される。

体内テストステロンの検出について

今回の研究においては、イズミオオウズムシ性的成熟個体の体内テストステロン含有量を、テストステロン ELISA キットを用いて測定した。そのキットに添付されているデータには、20種のステロイドにおける交叉反応が示されている（表5）。それによると、テストステロンとデヒドロテストステロンでは、交叉反応は両方とも100%である。それ以外の記載されている18種類のステロイド

では 1.0%未満である。特に、アンドロステンジオンでは 0.86%、エストリオールでは 0.1%、エストラジオールでは 0.05%、エストロンでは 0.01%未満、プロゲステロンでは 0.01%未満である。これらは、主要な性ステロイドであり、主に合成・代謝経路でテストステロンの上流や下流に位置する。添付データによる交叉反応から、イズミオオウズムシ性的成熟個体から検出された物質はテストステロンかデヒドロテストステロンであろう。

二枚貝においては、クロマトグラフィーと免疫アッセイによってステロイドの同定と定量を行っている (Matsumoto *et al.*, 1997; Reis-Henriques *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 2003)。テストステロンに関しては GC-MS 等において同定を行っており (Reis-Henriques *et al.*, 1990; Siah *et al.*, 2003)、ELISA (Gauthier-Clerc *et al.*, 2006) や RIA によって定量されている (De Longcamp *et al.*, 1974; Reis-Henriques *et al.*, 1990)。今回は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) においてテストステロンスタンダードと同様のピークをイズミオオウズムシの性的成熟個体で検出した (図 8)。このことは、Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) 法で測定した物質がテストステロンであることを支持している、と考えられる。しかし、このテストステロン ELISA キットで使われている抗テストステロン抗体のエピトープがステロイド骨格のどの領域を認識しているのかは不明である。

体内テストステロンの変動について

図 10 において、イズミオオウズムシ性的成熟個体の体内テストステロン含有量は、精子形成がほぼ終了している時期の精子形成ステージ 6 が最も高く、次

いで精子形成ステージ5が高く、精子変態途中の段階である精子形成ステージ4が最も低くなっていた。雌雄同体のプラナリアにおいては、繁殖期に輸精管膨大部へ精子が蓄積される。精子形成終了期では、精巣内の精子は殆ど輸精管、或は輸精管膨大部へと移送されて、交接により受精のために使われる。二枚貝の *Mytilus edulis* においては、オスにおいて精子形成期よりも精子形成が終了した繁殖期で高い含有量となっている (De Longcamp *et al.*, 1974)。 *Mya arenaria* においては、オスでは生殖腺に精子が満たされている時期に、メスでは産卵期にテストステロン含有量のピークとなっている (Gauthier-Clerc *et al.*, 2006)。巻貝の *Ilyanassa obsoleta* においては、フリーのテストステロン含有量はオスとメスの両方で繁殖期の初期と終期にピークに達しており、繁殖期ではオスの輸精管が成熟している (Gooding and LeBlanc, 2004)。今回の結果は、雌雄同体のプラナリアにおいても繁殖期における精子形成終了期 (精子形成ステージ6) にテストステロン含有量は一時的な増加をする、ということを示している。

軟体動物の *Marisa cornuarietis*、甲殻類の *Hyalomma azteca*、棘皮動物の *Paracentrotus lividus* では、アンドロゲン代謝に関する研究において、種間差と組織特異的分布はあるものの、テストステロンは、 5α -reductase (5α -R)、hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)、hydroxylase、sulfotransferase (SULT)、fatty-acid acyl-Co A acyltransferase (ATAT) により触媒される、異なった系で代謝されている、という報告がある (Janer *et al.*, 2005b)。最近の研究では、エステル化は軟体動物においてフリーのステロイド含有量を維持するためのホメオスタシス機構として考えられている (Gooding *et al.*, 2003; Janer *et al.*, 2005a)。また、エステル化テストステロンは免疫アッセイでは検出され

ず(Gooding *et al.*, 2003; Janer *et al.*, 2006)、我々の予備実験的な HPLC の結果でも、輸精管膨大部が外形的に可視される SV0 サンプルで非ケン化、ケン化サンプルの 2 つを比べても含有量の有意な差が見られなかった。ケン化サンプルでのクロマトグラムは総テストステロンを検出している。HPLC 分析と同じ粉砕液を用いた ELISA 法での結果はフリーのテストステロンを測定しており、HPLC と同様の結果となった。この結果から、イズミオオウズムシ性的成熟個体においてフリーのテストステロンは精子形成終了期まで合成され、生体内にフリーの状態のまま保持され続けており、その後（精子形成ステージ 6 の直後もしくは精子形成ステージ 1 の直前から）、代謝され始める、と考えられる。

また、HPLC 分析の結果から、テストステロン含有量は SV0 よりも SVX の方が多かった。精子形成終了期では、精子は輸精管や輸精管膨大部へ移送され、輸精管膨大部は腹側に可視されるようになる。ELISA における体内テストステロン含有量は、精子形成終了期に増加する (図 10)。このことから、HPLC においてもテストステロン含有量は SV0 の方が多くなるはずである。この矛盾の理由についてはわからないが、テストステロンは交接器官の一部である交接囊にも局在していたことから (図 20)、今後、精巣と輸精管膨大部、交接器官の関連を組織学的に調べる必要がある。

2. テストステロンの役割について

テストステロンは淡水棲プラナリアの性ホルモンとなりうるのか

1年を通した毎月の精子形成ステージと卵黄腺ステージの割合の移り変わりでは、2005年12月から2006年12月までにおいて、精子形成ステージ5の個体群と精子形成ステージ6の個体群を合わせた割合と、卵黄腺ステージYD2個体の割合は相関的な移り変わりを示していた(図25)。このことから、精巣と卵黄腺の間には内因的な関連性があると考えられる。また、2005年12月から2006年5月までに精子形成ステージ5と6の各個体群が1つのピークを迎え、それと同調的に卵黄腺ステージYD2の個体群がピークを迎える(2006年2月又は3月)。それとは別に、約4ヶ月後に再び同様の同調性を示すピークが見られている(2006年6月又は7月)。このことは、おそらく自然環境で、イズミオオウズムシ集団において季節的な生殖期もしくは繁殖期に、少なくとも2つの独立した異なる繁殖周期を持つ集団がある、と考えられる。実際、手代木と石田(1987c)は、自然環境での1年を通した産卵頻度を調べ、産卵頻度が2つのピークを示していることを確認している。ただ、2006年1月と2月では採集個体数が少ないため、他の月と明確な精子形成ステージと卵黄腺ステージの割合を示すことが出来なかったが、2005年12月から2006年5月までの1つの繁殖周期では、2005年12月(60個体)を除き、採集個体については他の月とさほど差はなかった。そのため、2006年1月と2月の採集個体数が少なくても、おそらく2つの周期性が見いだされる、と考えた。

ELISA法による結果において、2005年12月から2006年6月までのサンプル

(図 27 A) と 2006 年 7 月から 12 月までのサンプル (図 27 C) においてテストステロン含有量に差が生じているが、この理由としては、時期的な差異とアッセイが異なるためである、と考えられる。精子形成ステージ 4 からステージ 6 でのテストステロン含有量が上昇するとともに、同サンプルの個体群内の卵黄腺ステージ YD2 個体の割合も増加しており (図 27 B、D)、テストステロン含有量の変動が見られない精子形成ステージ 1 からステージ 3 では同サンプルの個体群内の卵黄腺ステージ YD2 個体の割合は殆ど変化がなかった (図 27 E、F)。この結果は、テストステロンが卵黄腺の発達と関連が有ることを示している。

卵黄腺においては、アンドロゲンレセプター様タンパク質が卵黄腺ステージ YD2 の前期に局在しており、テストステロンも卵黄腺ステージ YD2 の時期に局在していた (図 16 A、17 B、D)。テストステロン含有量の上昇、アンドロゲンレセプター様タンパク質の卵黄腺での局在とテストステロンの卵黄腺での局在から、テストステロンはイズミオオウズムシの内因性モジュレーターとして、卵黄腺に作用している、と考えられる。今回の研究においては、発達途中の卵黄腺にアンドロゲンレセプター様タンパク質が局在していたが、さらに発達し、肥大した卵黄腺での交叉反応は確認出来なかった。そのため、発達途中の卵黄腺に局在が見られたことにより、テストステロンは卵黄腺の発達に関与している可能性がある。しかし、未だ同一の試料においてテストステロンとアンドロゲンレセプター様タンパク質が卵黄腺に共局在していることや、テストステロンとレセプター様タンパク質が結合することを見いだしていないため、テストステロンの卵黄腺に対する直接的な役割を証明することが出来ない。

テストステロンは配偶子形成に関与していない

脊椎動物と同様に、無脊椎動物のウニと二枚貝においてもテストステロンは配偶子形成に関与している、という報告がある (Barbaglio *et al.*, 2007; Gauthier-Clerc *et al.*, 2006; Ketata *et al.*, 2007)。今回の研究において、イズミオオウズムシ性的成熟個体の配偶子形成にテストステロンが直接関与することを証明することは出来なかったが、アンドロゲンレセプター様タンパク質は精巣や卵巣には局在しておらず (図 16 E、F)、テストステロンも局在していなかった (データは示されていない)。これらのことから、プラナリアにおいては、テストステロンは配偶子形成には関与していない、と考えられる。

3. レセプターについて

ウェスタンブロット法の結果、ポジティブコントロールとして用いたマウス精巢の総タンパク質で検出されたものと同様の分子量約 116 kDa に、イズミオオウズムシ性的成熟個体総タンパク質においても交叉するタンパク質をシングルバンドで検出した (図 12)。マウス精巢はアンドロゲンレセプターが局在する主要な器官である。一次抗体として用いたウサギ抗ヒト・アンドロゲンレセプター抗体は、ヒトのアンドロゲンレセプタータンパク質の N 末端側領域 (N 末端アミノ酸残基 1-21 番目、MEVQLGLGKVYPRPPSKTYRG) を抗原としてウサギに免疫している。抗体のエピトープについては不明であるが、ポジティブコントロール (マウス精巢) と同様の分子量の位置にシングルバンドで検出されたことは、この交叉タンパク質はイズミオオウズムシ性的成熟個体のアンドロゲンレセプター様タンパク質と見なすことができるだろう。この抗体を用いて、数多くの脊椎動物で同様の交叉反応が確認されている (表 6)。このことから、この抗体はアンドロゲンレセプタータンパク質の生物種間で保存された、かなり限定された構造もしくは配列を認識している、と考えられる。

この抗体を用いてさらに研究を進める予定であったが、不幸にも、この抗体は製造中止になったため、この抗体に代わる新たな抗体を探したところ、新たな抗体であるウサギ抗ラット・アンドロゲンレセプター抗体 (PG-21、Prins *et al.*, 1991) では、ウェスタンブロット法により、ラット精巢タンパク質において明確な 3 本のバンドが検出された (図 13、レーン 1)。そのうち、前述の抗体において検出されたタンパク質の分子量と同様の位置 (約 121 kDa 近傍) に、

イズミオオウズムシ性的成熟個体総タンパク質においても、交叉するタンパク質が検出された（図 13、レーン 2）。ポジティブコントロールとして用いた動物種の違いや、イズミオオウズムシ性的成熟個体のサンプル間の違いはあるが、この抗体（PG-21）は前述の抗体に代わる有用なツールになると考え、その後の研究に用いた。また、イズミオオウズムシのアンドロゲンレセプター様タンパク質については、現在、淡水棲プラナリアの 1 種である *Schmidtea mediterranea* のゲノムデータベース（Robb *et al.*, 2008）をもとに、遺伝子クローニングの研究に着手している。その研究により、配列情報が明らかとなり、この抗体のエピトープについての考察やアンドロゲンレセプターの分子進化的探求が可能となるはずである。

アンドロゲンレセプター様タンパク質はイズミオオウズムシの吸着器官から眼点内側を通り体側腹側へ開口し、尾部先端に達する腺細胞にも局在していた（図 14 A、C、E、G）。また、ウェスタンブロット法において交叉反応が確認されなかったイズミオオウズムシ性的未成熟個体においても、性的成熟個体と同様の腺細胞に局在が確認された（図 14 H）。Kawakatsu *et al.* (1978) は、イズミオオウズムシの近縁種であるリシリオオウズムシにおいて、その吸着器官には 2 種類の腺細胞（好エオシン性、好塩基性）を確認している。免疫染色後にエオシンでカウンター染色をした結果、好エオシン性の腺細胞とは異なる細胞に検出された（図 15）。このため、この抗体に陽性反応を示した細胞は、好塩基性の腺細胞とそこから連なる輸送管である、と考えられる。アンドロゲンレセプター様タンパク質が生殖器官以外の組織に局在していることは、哺乳類におけるアンドロゲンレセプタータンパク質の局在と同様であるが、プラナリアに

おける好塩基性の腺細胞に対しての役割についてはわからない。

また、ウサギ抗ラット・アンドロゲンレセプター抗体 (PG-21) では、交叉するタンパク質はイズミオオウズムシの卵黄腺 (卵黄細胞) にのみ局在していた (図 17 B)。このことから、この抗体 (PG-21) は前の抗体とエピトープが異なっている、と考えられるが、2種類の異なる抗体による局在調査から、イズミオオウズムシのアンドロゲンレセプター様タンパク質は、卵黄腺には少なくとも局在している可能性が強く示唆される。

4. テストステロンの合成と局在

哺乳類において、テストステロンは主に精巣のライディッヒ細胞で合成されており (Zirkin and Chen, 2000)、軟体動物の二枚貝と巻貝では、明確なテストステロン合成細胞の特定はされていないものの、全生体や生殖巣で主にテストステロンが検出されている (Gauthier-Clerc *et al.*, 2006; Gooding *et al.*, 2003; Janer *et al.*, 2006)。イズミオオウズムシ性的成熟個体で定量された体内テストステロン含有量は、精巣に精母細胞が豊富な個体群 (精子形成ステージ 4) より精細胞が豊富な個体群 (精子形成ステージ 5) で多く、精子形成終了期ともいえる精子形成ステージ 6 でテストステロン含有量がピークに達している。テストステロンを合成する酵素の存在をイズミオオウズムシ性的成熟個体精巣で未だ発見していないため、イズミオオウズムシのテストステロンは精巣の精細胞で合成されていることを直接的に証明することは出来ない。また、精巣や卵巣においてテストステロンの局在が示されなかったことは、精細胞においてテストステロンが合成されているという仮説と対立している。しかし、今回行ったテストステロンの局在調査は、精巣やその他の生殖器官の発達状況を事前に特定しておらず、それらの実験を行って確認した試料においても発達状況には明らかな差が見られなかったため、今後、イズミオオウズムシにおいてテストステロン合成酵素の探求や、生殖器官の発達状況を事前に確認した上で、より詳細なテストステロンの局在を調べる必要がある。

イズミオオウズムシ性的成熟個体におけるテストステロンの局在は、卵黄腺以外に、他個体からの精子の貯蔵、分解、吸収の場である交接囊 (柳田 1997、

Fischlshweiger and Clausnitzer, 1984) にも確認されたが、自己の精子が蓄えられている輸精管膨大部には確認されなかった (図 20)。さらに、光学的に高倍率で陽性反応を示した他個体精子を観察したところ、精子の頭部を覆うようにテストステロンが局在していた (図 24)。このことから、他個体精子におけるテストステロンの役割を探るためには、精子における詳細かつ微細な局在調査を行う必要がある。精子におけるテストステロンの役割については、交接前の精子と交接後の精子では電子顕微鏡観察により鞭毛の構造が変化しているため (Ishida *et al.*, 1991)、精子を覆っているテストステロンが、その構造の変化を引き起こし、精子の受精能獲得に関っている可能性がある。

第5章

総括

本研究では、淡水棲プラナリアにおける性ホルモンの存在の有無及びその機能についての洞察を得ることを目的として、物質の検出から量的変動を元にした合成細胞の考察、量的変動と組織学的研究による内因性モジュレーターとしての役割を導きだすに至った。

第3章、定量的な研究においては、プラナリアからの抽出物から異なる2種類の手法により、同様の結果を得ることが出来た。これにより、検出された物質がテストステロンであることを強く示唆した。

組織学的研究を元に、精子形成過程とテストステロン含有量の関連を導きだしたが、今回の研究では、テストステロンが精細胞で合成されていることは立証できなかった。さらに、青森県弘前市での1年を通じた野外におけるプラナリアの生殖器官発達状況を、新たに得ることが出来た。

免疫化学的研究により、プラナリアにも転写因子としての役割を持つ核内レセプター様タンパク質の存在が示され、アンドロゲンレセプター様タンパク質とテストステロンが雌雄同体のプラナリアにおいて雌性的な生殖器官に局在するという、興味深い結果を得た。また、テストステロンの局在部位から、プラナリア特異的なテストステロンの役割も示唆された。

総合的に考察すると、テストステロンはプラナリアにおいても性ホルモンとしての役割を持っており、おそらく雌雄同体のプラナリア独自の働きをしているのであろう。今後、プラナリアにおけるテストステロンの役割について、特にテストステロン投与や遺伝子調節により、性ホルモンとしての役割を直接的に解明して行く研究が行われることを期待している。

謝辭

本研究を行うにあたり、基本的な示唆や御指導・激励を賜り、また御校閲くださいました主指導教員の石田幸子教授（弘前大学）、第一副指導教員の石黒誠一教授（弘前大学）、第二副指導教員の橋爪 力教授（岩手大学）、補助教員の吉田 渉助教（弘前大学）に、この場をお借りして深く御礼申し上げます。また、英語論文執筆に当たり、的確な助言をして頂いた Dr. Bernhard Egger（インスブルック大学）に感謝致します。

さらに、本研究の実験に関して、必要な施設、設備、機械等の利用にあたって、多大なる御配慮と御助言を頂いた遺伝子実験施設の赤田辰治准教授（弘前大学）と千田峰生准教授（弘前大学）、また当時、弘前大学農学生命科学部応用生命工学科におられた長田恭一准教授（現在、明治大学）、ウサギ抗ラット・アンドロゲンレセプター抗体を提供して下さった山本和俊先生（早稲田大学）に厚く御礼申し上げます。

最後になりますが、様々な面で御協力して頂きました当研究室ならびに弘前大学農学生命科学部他研究室の諸先輩方、同輩、後輩の学生、岩手大学農学部橋爪研究室の学生の皆様に心から感謝の意を表します。

参考文献

- Barbaglio A, Sugni M, Di Benedetto C, Bonasoro F, Schnell S, Lavado R, Porte C, Candia Carnevali DM. 2007. Gametogenesis correlated with steroid levels during the gonadal cycle of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Comp Biochem Physiol* 147(2):466-474.
- Barker MF, Xu RA. 1993. Effects of estrogens on gametogenesis and steroid levels in the ovaries and pyloric caeca of *Sclerasterias mollis* (Echinodermata: Asteroidea). *Invert Reprod Dev* 24:53-58.
- Bettin C, Oehlmann J, Stroben E. 1996. TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. *Helgol Meeresunters* 50:299-317.
- Bose R, Majumdar C, Bhattacharya S. 1997. Steroids in *Achatina fulica* (Bowdich): steroid profile in haemolymph and in vitro release of steroids from endogenous precursors by ovotestis and albumen gland. *Comp Biochem Physiol C* 116(3):179-182.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Coffey DS. 1992. The molecular biology, endocrinology and physiology of the prostate and seminal vesicles. In "Campbell's Urology 6th ed" Ed by PC Walsh, AB Retik, TA Stamey, JED Vaughn, WB Saunders Company, Philadelphia, pp 1381-1428.

- Curtis WC. 1902. The life history, the normal fission, and the reproductive organs of *Planaria maculata*. Proc Boston Soc Nat Hist 30:515-559.
- D' Aniello A DCA, Di Cristo C, Assisi L, Botte V, Di Fiore MM. 1996. Occurrence of sex steroid hormones and their binding proteins in *Octopus vulgaris* Lam. Biochem Biophys Res Commun 227:782-788.
- De Clerck D, Eechaute W, Leusen I, Diederik H, De Loof A. 1983. Identification of testosterone and progesterone in hemolymph of larvae of the fleshfly *Sarcophaga bullata*. Gen Comp Endocrinol 52(3):368-378.
- De Longcamp D, Lubet P, Drosowsky M. 1974. The in vitro biosynthesis of steroids by the gonad of the mussel (*Mytilus edulis*). Gen Comp Endocrinol 22(1):116-127.
- Fischlshweiger W and Clausnitzer E. 1984. Bursa, bursa canal, and female antrum of *Dugesia tigrina* (Plathelminthes, Tricladida). Zoomorphology 104: 386-395.
- Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Amiard JC. 2006. Estradiol-17beta and testosterone concentrations in male and female *Mya arenaria* (Mollusca bivalvia) during the reproductive cycle. Gen Comp Endocrinol 145(2):133-139.
- Gooding MP, LeBlanc GA. 2004. Seasonal variation in the regulation of testosterone levels in the eastern mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). Invertebr Biol 123(3):237-243.

- Gooding MP, Wilson VS, Folmar LC, Marcovich DT, LeBlanc GA. 2003. The biocide tributyltin reduces the accumulation of testosterone as fatty acid esters in the mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). Environ Health Perspect 111(4):426-430.
- Hines GA, Watts, S.A., Walker, C.W., Voogt, P.A 1992. Androgen metabolism in somatic and gonadal tissues of the sea star *Asterias vulgaris*. Comp Biochem Physiol 102B:521-526.
- Hyman LH. 1939. North American triclad Turbellaria. IX. The priority of *Dugesia* Girard 1850 over *Euplanaria* Hesse 1897 with notes on American species of *Dugesia*. T Am Microsc Soc 58(3):264-275.
- 石田幸子 1987. 「精巢と精子形成」 プラナリアの生物学—基礎と応用と実験—. 手代木渉 編著. 共立出版 pp143-145.
- Ishida S, Yoshihisa Y, Teshirogi W. 1991. Analytical studies of the ultrastructure and movement of the spermatozoa of freshwater triclads. Hydrobiologia 227:95-104.
- Janer G, Lavado R, Thibaut R, Porte C. 2005a. Effects of 17beta-estradiol exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: a possible regulating role for steroid acyltransferases. Aquat toxicol 75(1):32-42.
- Janer G, Leblanc GA, Porte C. 2005b. Androgen metabolism in invertebrates and its modulation by xenoandrogens: a comparative study. Ann N Y Acad Sci 1040:354-356.

- Janer G, Lyssimachou A, Bachmann J, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Porte C. 2006. Sexual dimorphism in esterified steroid levels in the gastropod *Marisa cornuarietis*: the effect of xenoandrogenic compounds. *Steroids* 71(6):435-444.
- Kawakatsu M, Asai E, Yamada T. 1978. *Bdellocephala borealis* sp. Nov., a new freshwater planarian from Rishiri and Okushiri islands of Hokkaido.
- Ketata I, Guerhazi F, Rebai T, Hamza-Chaffai A. 2007. Variation of steroid concentrations during the reproductive cycle of the clam *Ruditapes decussatus*: a one year study in the gulf of Gabes area. *Comp Biochem Physiol* 147(2):424-431.
- Kobayashi K, Arioka S, Hoshi M. 2002. Seasonal changes in the sexualization of the planarian *Dugesia ryukyuensis*. *Zool Sci* 19(11):1267-1278.
- Kobayashi K, Hoshi M. 2002. Switching from asexual to sexual reproduction in the planarian *Dugesia ryukyuensis*: change of the fissiparous capacity along with the sexualizing process. *Zool Sci* 19(6):661-666.
- Kobayashi K, Koyanagi R, Matsumoto M, Cabrera JP, Hoshi M. 1999. Switching from asexual to sexual reproduction in the planarian *Dugesia ryukyuensis*: bioassay system and basic description of sexualizing process. *Zool Sci* 16:291-298.
- Matsumoto T, Osada M, Osawa Y, Mori K. 1997. Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the

- oyster and scallop during sexual maturation. *Comp Biochem Physiol B* 118(4):811-817.
- Mechoulam R, Brueggemeier RW, Denlinger DL. 1984. Estrogens in insects. *Experientia* 40:942-944.
- Nakagawa H, Maezawa T, Ajima H, Sakakibara Y, Tarui H, Agata K, Kazuya K, Hoshi M, Matsumoto M. 2004. Endocrine system in planarian. *Zool Sci* 21:1334.
- Ng BH, Yuen KH. 2003. Determination of plasma testosterone using a simple liquid chromatographic method. *J Chromatogr* 793(2):421-426.
- Ollevier F, De Clerck D, Diederik H, De Loof A. 1986. Identification of nonecdysteroid steroids in hemolymph of both male and female *Astacus leptodactylus* (Crustacea) by gas chromatography-mass spectrometry. *Gen Comp Endocrinol* 61(2):214-228.
- Osada M, Tawarayama H, Mori K. 2004. Estrogen synthesis in relation to gonadal development of Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*: gonadal profile and immunolocalization of P450 aromatase and estrogen. *Comp Biochem Physiol B* 139(1):123-128.
- Prins GS, Birch L, Greene GL. 1991. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology* 129(6):3187-3199.
- Reis-Henriques MA, Coimbra J. 1990. Variation in the levels of progesterone in *Mytilus edulis* during the annual reproductive cycle. *Comp Biochem*

- Physiol A 95(3):343-348.
- Reis-Henriques MA, Guellec DL, Remy-Martin JP, Adessi GL. 1990. Studies of endogenous steroids from the marine mollusc *Mytilus edulis* L. by gas chromatography and mass spectrometry. Comp Biochem Physiol B 95(2):303-309.
- Robb SMC, Ross E, and Alvarado AS. 2008. SmedGD: the *Schmidtea mediterranea* genome database. Nucleic Acids Res 36:D599-D606.
- Sakurai T. 1981. Sexual induction by feeding in an asexual strain of the freshwater planarian, *Dugesia japonica japonica*. Annot Zool Jap 54(2):103-112.
- Sato T. 1968. A modified method for lead staining of thin sections. J Electron Microsc (Tokyo) 17(2):158-159.
- Schoenmakers HJN, van Bohemen, C.G., Dieleman, S.J 1981. Effects of oestradiol-17 on the ovaries of the starfish *Asterias rubens*. Dev Growth Differ 23:125-135.
- Siah A, Pellerin J, Benosman A, Gagne JP, Amiard JC. 2002. Seasonal gonad progesterone pattern in the soft-shell clam *Mya arenaria*. Comp Biochem Physiol A 132(2):499-511.
- Siah A, Pellerin J, Saint-Louis R, Amiard J-C, Pelletier E. 2003. The tributyltin: a potential sex hormones disruptor in *Mya arenaria*. Study in mesocosms. Proceedings of the Aquatic Toxicity workshop, Ottawa(October 1):94.

- Spooner N GP, Bryan GW, Goad LJ 1991. The effect of tributyltin upon steroid titers in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. *Mar Environ Res* 32:37-49.
- Takeda N. 1979. Induction of egg-laying by steroid hormones in slugs. *Comp Biochem Physiol* 62:273-278.
- 手代木渉、石田幸子 1987a. 「イズミオオウズムシ *Bdellocephala brunnea* の発生段階」 プラナリアの生物学—基礎と応用と実験—. 手代木渉 編著. 共立出版 pp143-145.
- 手代木渉、石田幸子 1987b. 「受精」 プラナリアの生物学—基礎と応用と実験—. 手代木渉 編著. 共立出版 pp140-143.
- 手代木渉、石田幸子 1987c. 「繁殖期」 プラナリアの生物学—基礎と応用と実験—. 手代木渉 編著. 共立出版 pp132.
- Thornton JW NE, Crews D 2003. Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling. *Science* 301:1714-1717.
- Verslycke T, De Wasch K, De Brabander HF, Janssen CR. 2002. Testosterone metabolism in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea; Mysidacea): identification of testosterone metabolites and endogenous vertebrate-type steroids. *Gen Comp Endocrinol* 126(2):190-199.
- 柳田欣作 1977. エゾウズムシ *Dendrocoelopsis ezensis* の交接のう内容物の由来と運命. *動物学雑誌* 86:14-19.
- Zhu W, Mantione K, Jones D, Salamon E, Cho JJ, Cadet P, Stefano GB. 2003.

The presence of 17-beta estradiol in *Mytilus edulis* gonadal tissues:
evidence for estradiol isoforms. Neuro Endocrinol lett
24(3-4):137-140.

Zirkin BR, Chen H. 2000. Regulation of Leydig cell steroidogenic function
during aging. Biol Reprod 63(4):977-981.

表・図説

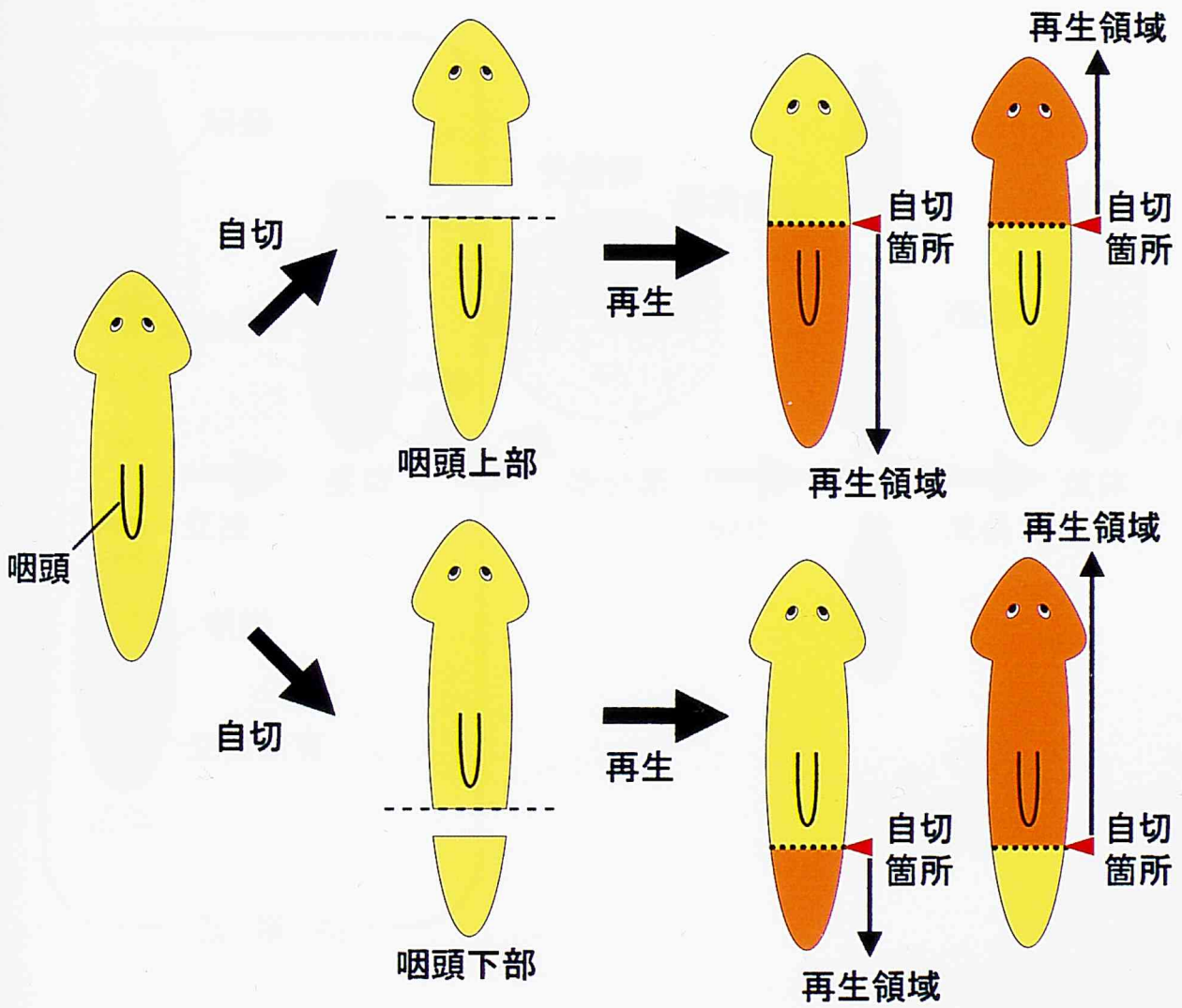


図1. 無性生殖様式模式図

無性生殖で繁殖する淡水棲プラナリアは、自切により咽頭上部又は咽頭下部で分裂する。分裂した頭・尾断片は、失った組織を再生することにより、完全な1個体に戻り、その種は個体数を増やす。

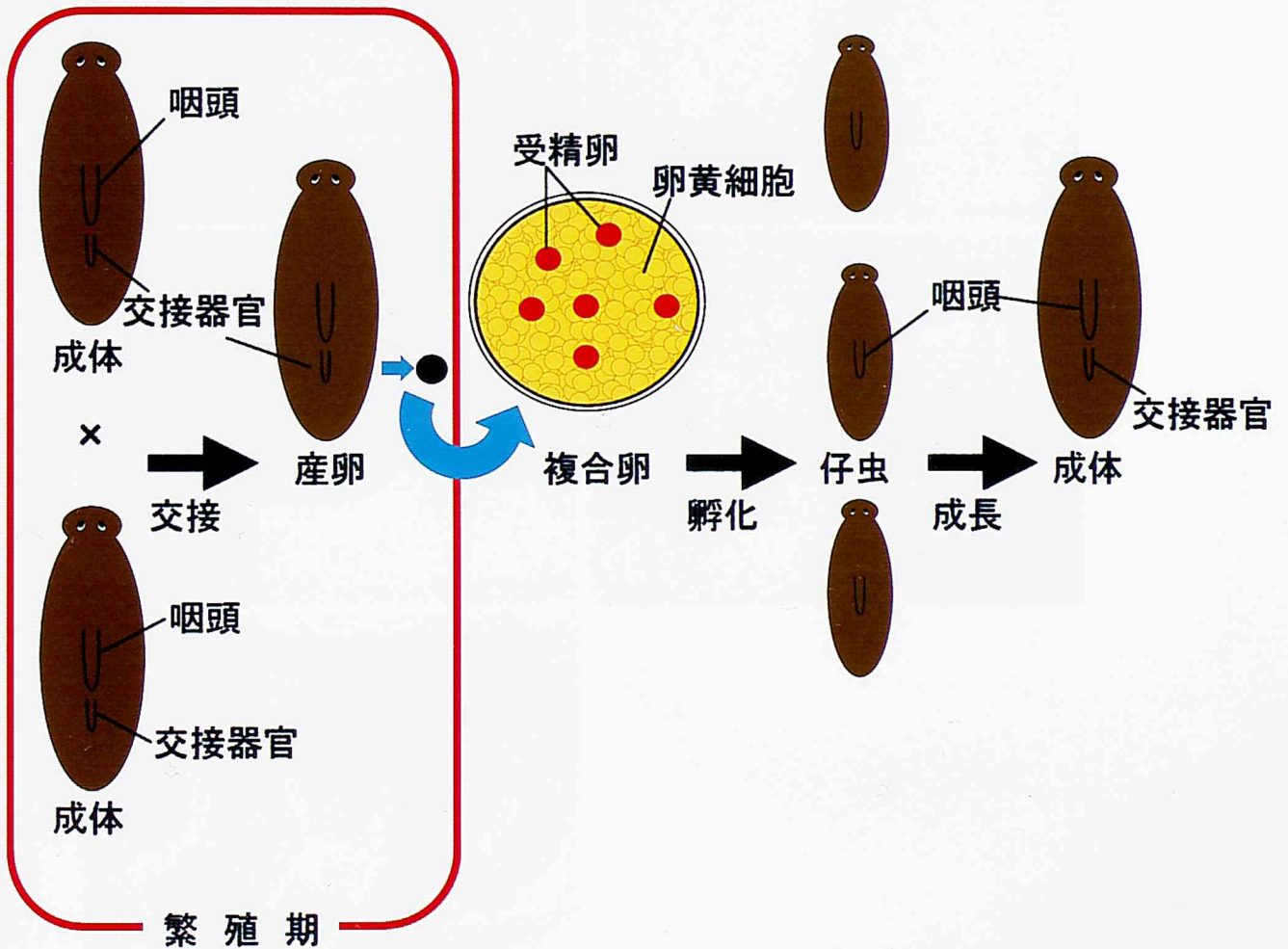


図2. 有性生殖様式模式図

有性生殖で繁殖する淡水棲プラナリアは、成体同士が交接をした後、複合卵（卵殻内に、複数の受精卵と、それらの周りを取り囲むように位置する多数の卵黄細胞を含んでいる）を産む。卵殻から孵化した複数の仔虫は成長し、成体となり、その種は再び他個体と交接し、個体を増やす。

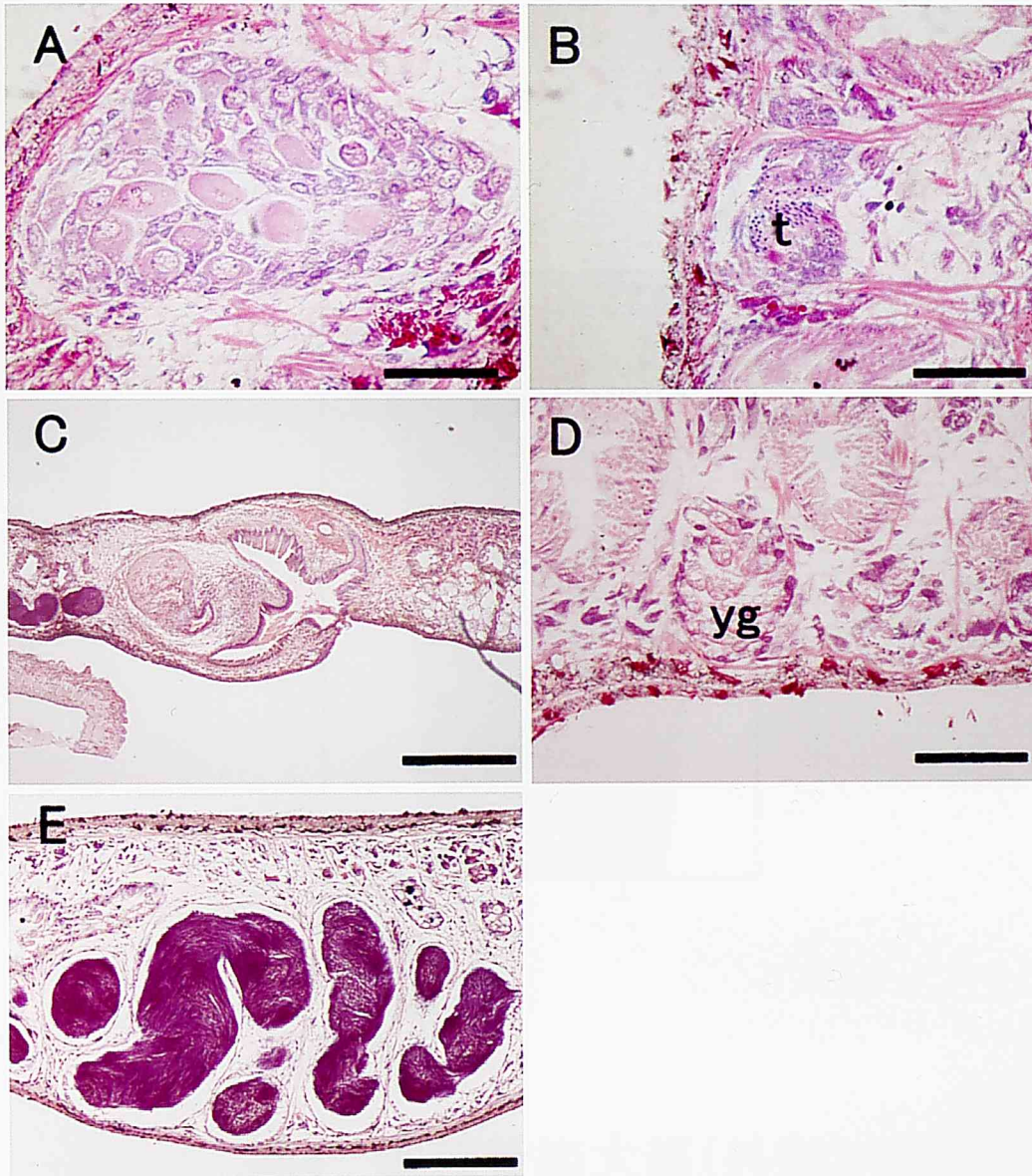
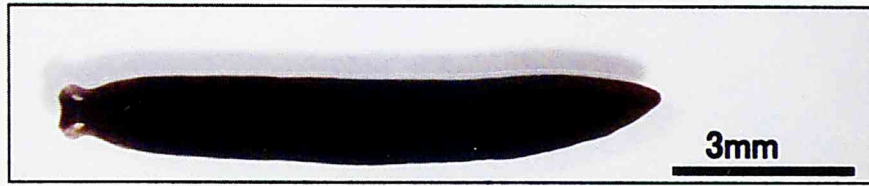


図3. イズミオオウズムシ虫体と生殖器官組織

卵巣と卵黄腺は複合卵を構成するための卵(母)細胞と卵黄細胞を産生するため、雌性生殖器官といえる。また、精巣と輸精管膨大部は精子の産生と精子の貯蔵をするため、雄性生殖器官といえる。一方、交接器官は陰茎や膣など雌雄両性の生殖器官が混在しているため、複合的な生殖器官といえる。

(A)卵巣 (B)精巣(t) (C)交接器官 (D)卵黄腺(yg) (E)輸精管膨大部
 スケールバー:(A)100 μ m (B)50 μ m (C)500 μ m (D)50 μ m (E)200 μ m

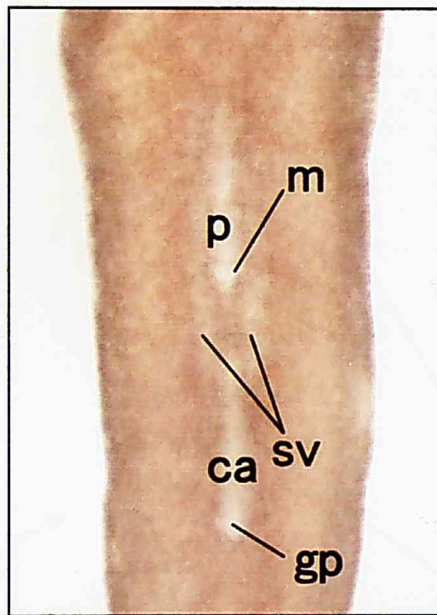


図4. 輸精管膨大部(外形)

虫体腹面の一部拡大写真

輸精管膨大部は、繁殖期になると、蓄えられた精子により、肉眼でも腹側から、咽頭の両側に2本の白い線状に観察できるようになる。個体により、輸精管膨大部の可視の程度には差があり、これは虫体色の濃淡や精子の蓄積量の差、交接による蓄えられた精子量の減少等による、と考えられる。

ca: 交接器官 gp: 生殖孔 m: 口 p: 咽頭 sv: 輸精管膨大部

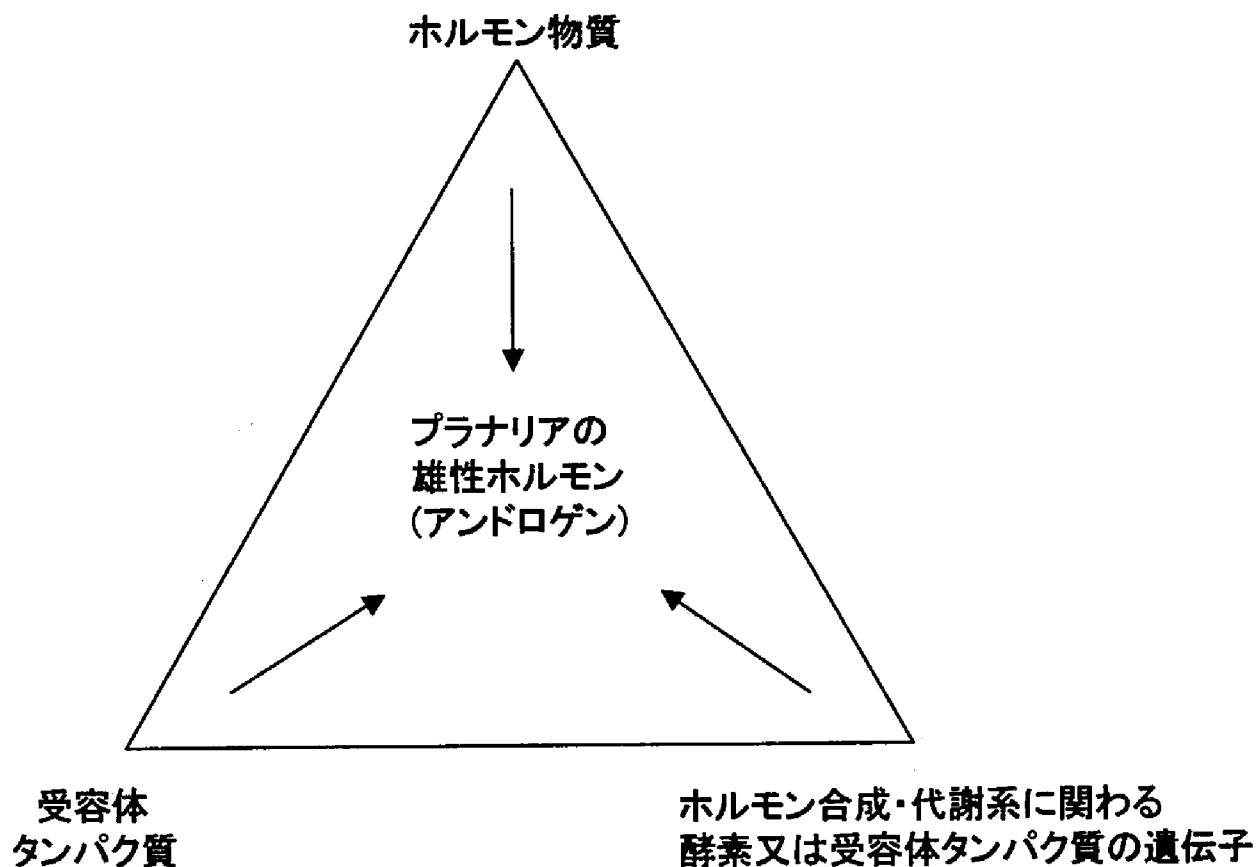


図5. 研究構想

プラナリアにおいて、未だ同定されていない雄性ホルモン(アンドロゲン)の存在を立証するためには、3つの要素から総合的に研究する必要がある。3つの要素とは、ホルモン物質からの研究、受容体タンパク質からの研究、ホルモン合成・代謝酵素や受容体遺伝子からの研究である。

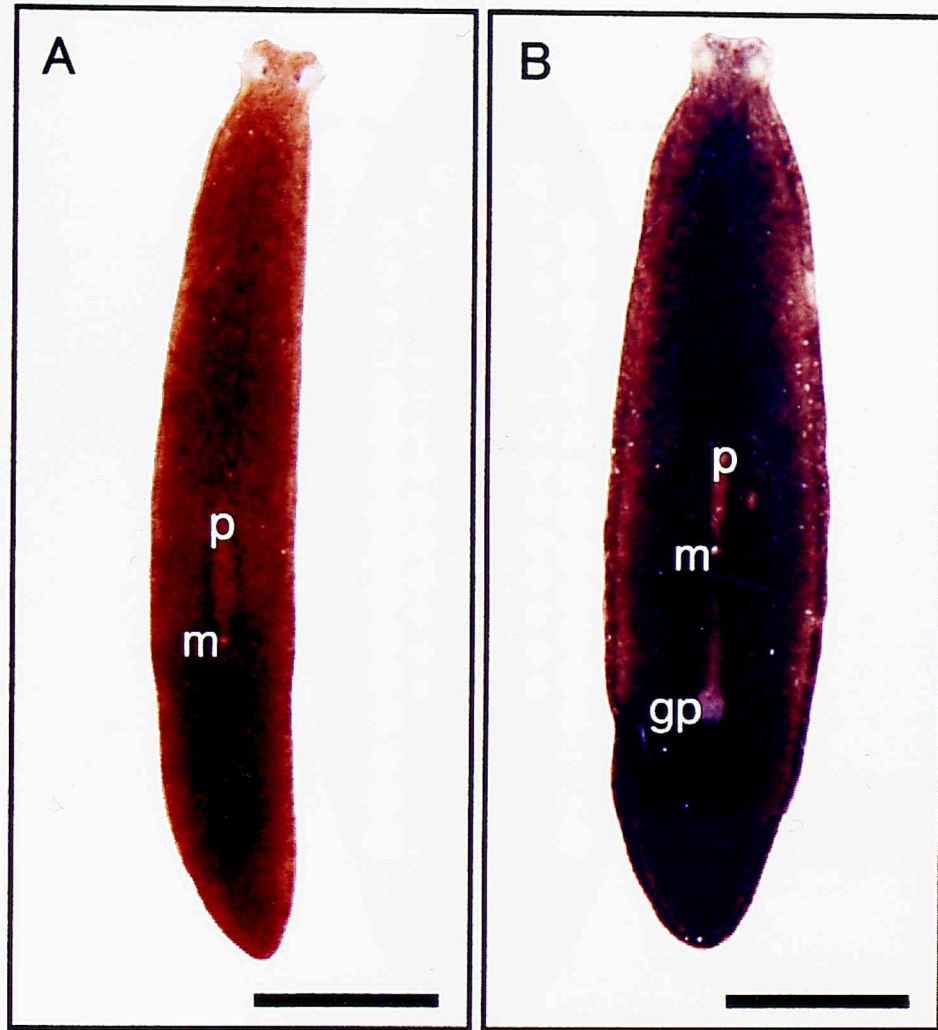


図6. イズミオオウズムシの生体写真(腹面図)

虫体が成長すると、交接器官とそれが腹側に開孔する生殖孔が外形的に容易に確認することが出来るようになる。有性生殖で繁殖するプラナリアは、生殖孔を介して交接する。そのため、個体において外形的な成熟の指標を生殖孔の開孔とした。

(A) 性的未成熟個体 (B) 性的成熟個体

gp: 生殖孔 m: 口 p: 咽頭 スケールバー: (A) 1mm (B) 3mm

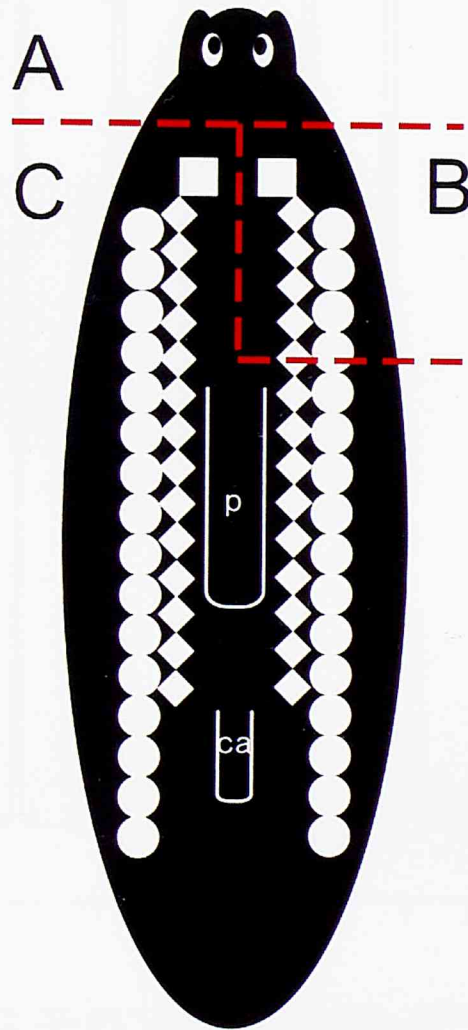


図7. 外科的切除方法

B領域を組織観察し、個体の精子形成過程を特定した。同じ精子形成過程の個体をそれぞれプールし、AとCの領域をELISAのサンプルとして用いた。

A: 第1切断による頭部領域: 精巣と卵巣は含んでいない。

B: 片側の卵巣と精巣、卵黄腺を含んだ領域: 組織観察に用いた。

C: 残りの領域

AとCの領域をELISAに用いた。

□: 卵巣 ○: 精巣 ◇: 卵黄腺 ca: 交接器官 p: 咽頭

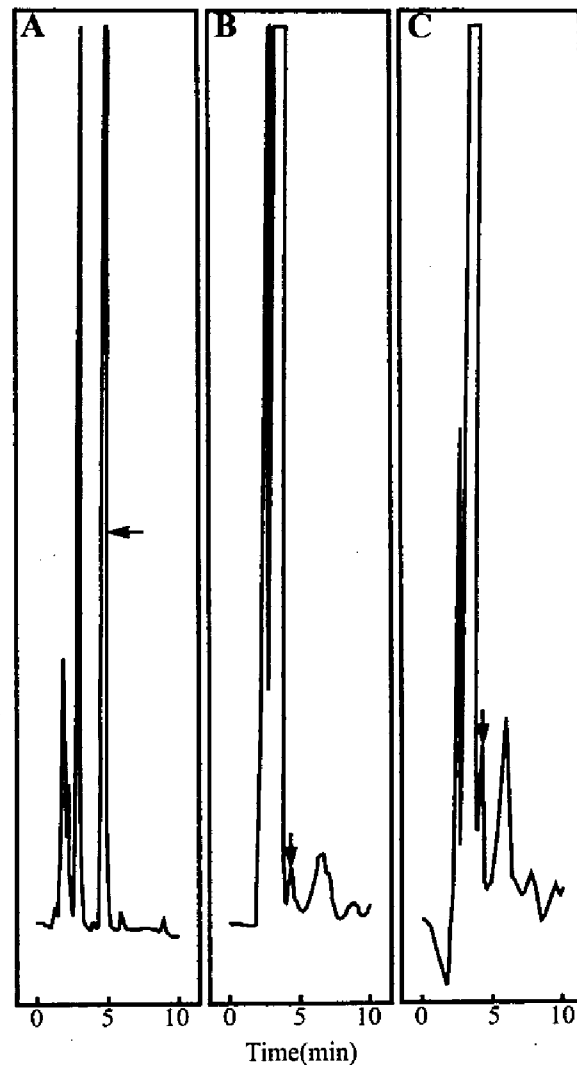


図8. テストステロンのクロマトグラム

2007年1月と2月に同地から採集したプラナリアを、組織観察せずに生殖孔の開孔している個体だけを選別した。その個体群を輸精管膨大部が外形的に観察される個体(SVO)と観察されない個体(SVX)に分類し、サンプルとした(各個体数 n=100)。

(A) 基準テストステロン(200ng)

(B) SVOから抽出したテストステロン

(C) SVXから抽出したテストステロン

矢印:テストステロンのピーク

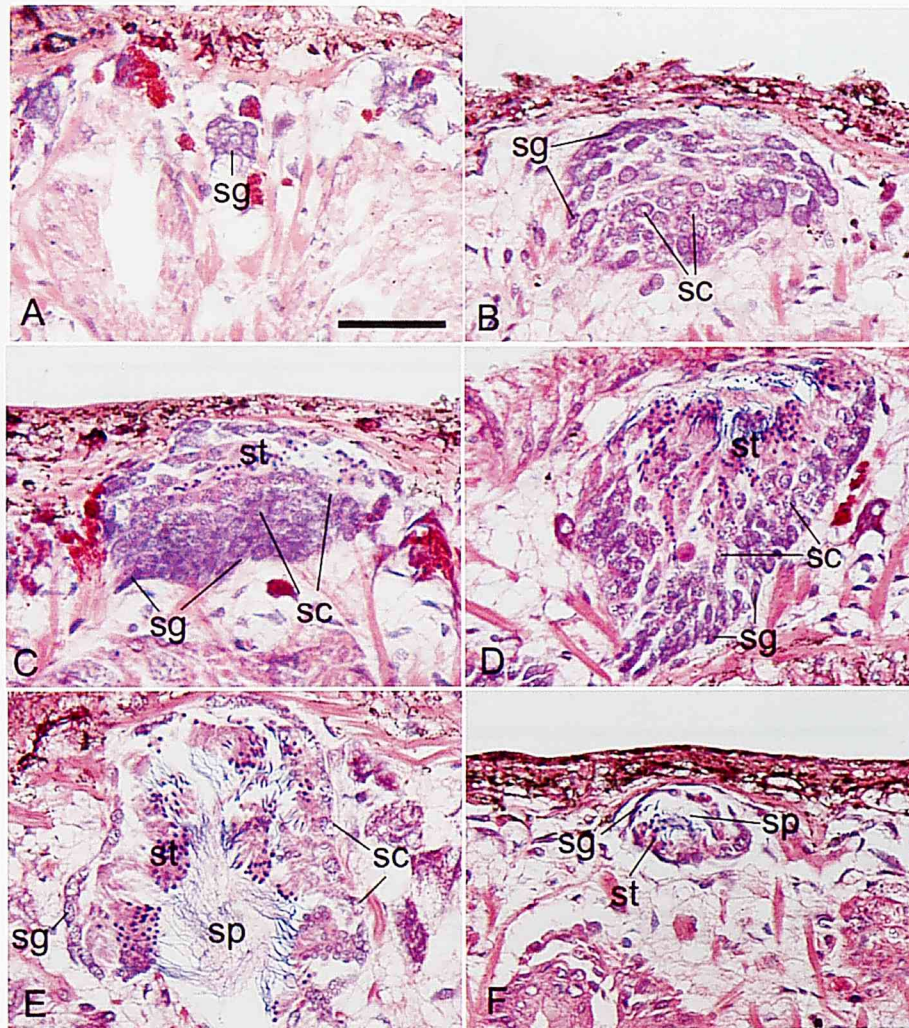


図9. イズミオオウズムシ性的成熟個体の精子形成過程

図7のB領域を組織観察した結果、その領域に含まれる複数の精巣は、同調的な精子形成過程となっていたため、個体の精子形成過程を概略的に6つのステージに分類した。

(A)ステージ1 (B)ステージ2 (C)ステージ3

(D)ステージ4 (E)ステージ5 (F)ステージ6

sc:精母細胞 sg:精原細胞 sp:精子 st:精細胞

スケールバー:50 μ m

表1. イズミオオウズムシ性的成熟個体の
精子形成ステージ分類表

	sg	sc	st	sp
stage 1	+	-	-	-
stage 2	+	+	-	-
stage 3	+	+	+	-
stage 4	+	++	+	+
stage 5	+	+	++	+
stage 6	+	-	±	+

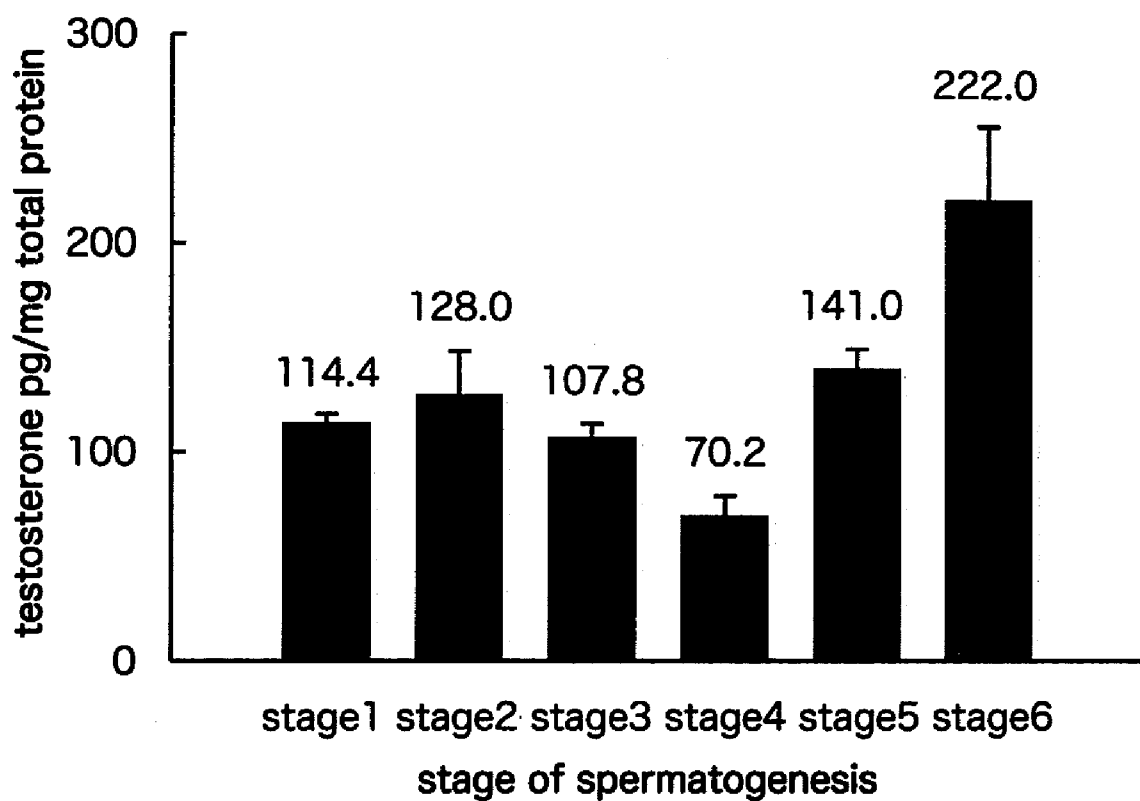
-, absence +, presence ++, many ±, absence or presence

sg:精原細胞 sc:精母細胞 st:精細胞 sp:精子

表2. 各月での精子形成ステージ頻度

	stage1	stage2	stage3	stage4	stage5	stage6	total
July	2	3	0	2	11	6	24
August	0	5	0	3	8	4	20
September	0	2	4	3	9	2	20
October	2	2	5	8	7	1	25
November	5	2	2	3	8	0	20
December	5	0	2	3	8	1	19
total	14	14	13	22	51	14	128

2006年7月から12月までに青森県弘前市で採集したイズミオオウズムシ性的成熟個体群の精子形成ステージを個体数で表した。



**図10. 精子形成過程の6ステージにおける
テストステロン含有量**

図7のB領域の組織観察により、性的成熟個体を各精子形成ステージ毎にプールし(stage 1:n=12, stage 2:n=9, stage 3:n=12, stage 4:n=12, stage 5:n=12, stage 6:n=8)、それぞれからエーテル抽出によって得たサンプルによりELISAを行った。数値は2回のアッセイの平均値を示す。

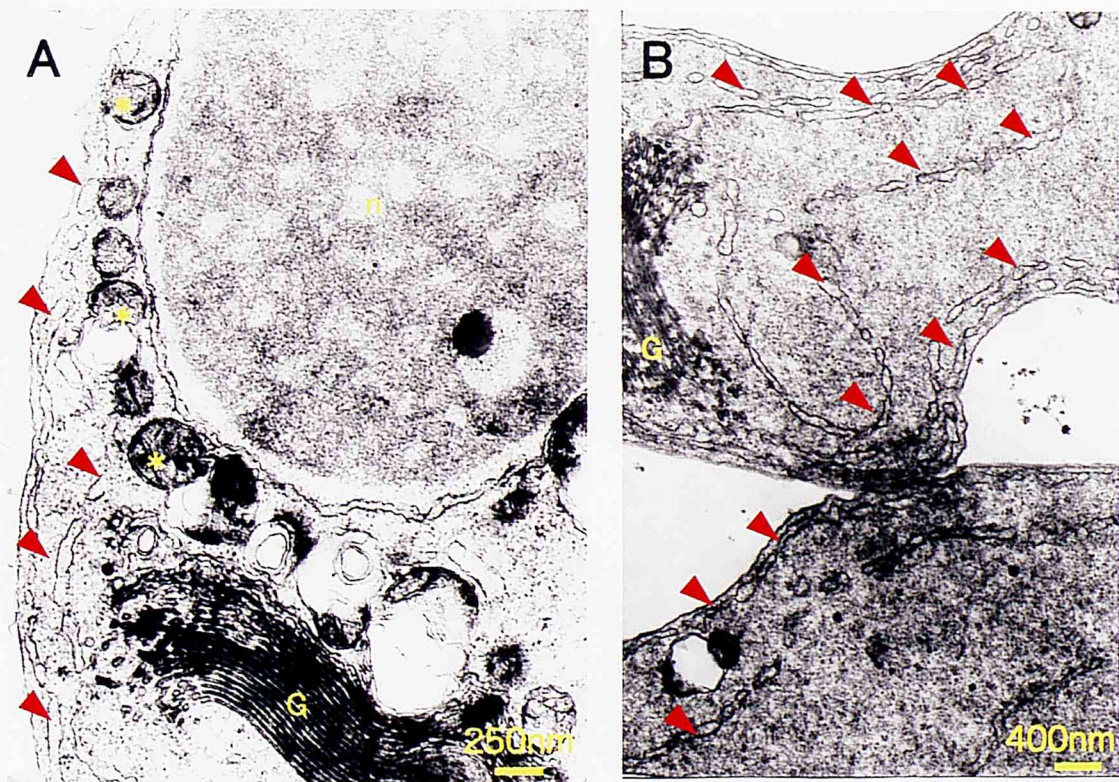


図11. 精細胞の電子顕微鏡図

- (A) 変態中の精細胞(変態ステージ2)
 (B) 精子が離れた2個の精細胞残余体
 多数のsER(矢頭)が細胞膜に沿って観察された。
 G:ゴルジ体 n:核 *:ミトコンドリア

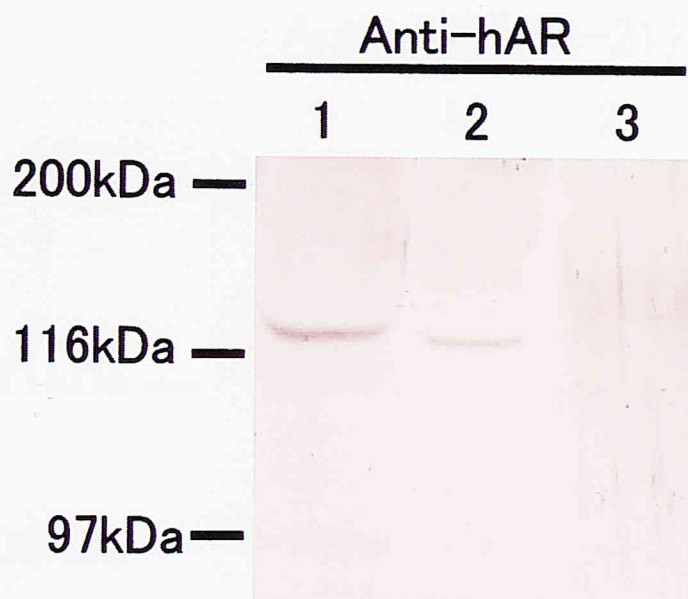


図12. アンドロゲンレセプター様タンパク質の検出

性的成熟個体において、この抗体と交叉するタンパク質が検出され、それはマウス精巣(ポジティブコントロール)と同様の分子量であった。また、性的未成熟個体にも微弱なシグナルがみられた。

1: マウス精巣

2: イズミオオウズムシ性的成熟個体

3: イズミオオウズムシ性的未成熟個体

Anti-hAR: 抗ヒト・アンドロゲンレセプター抗体での交叉反応

左側の数字は分子量を示す。

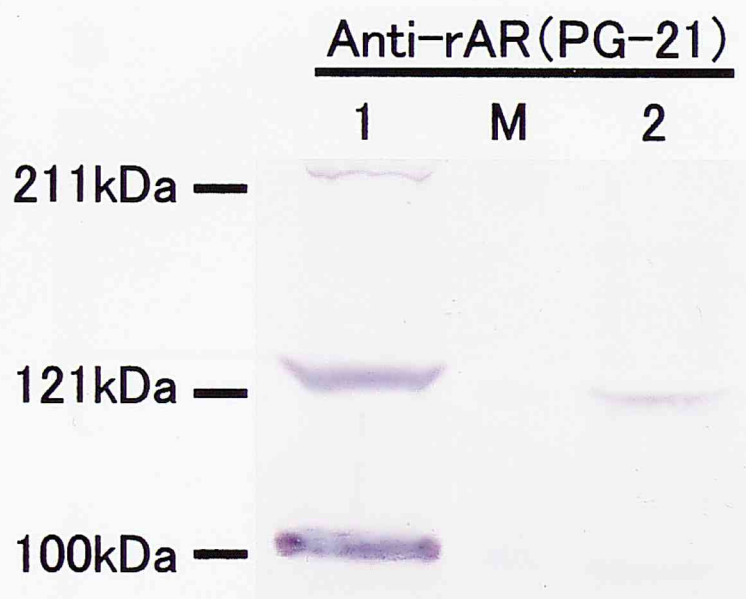


図13. アンドロゲンレセプター様タンパク質の検出

性的成熟個体において、この抗体と交叉するタンパク質が検出され、それはラット精巢(ポジティブコントロール)と約121 kDaの分子量の位置に強いシグナルとしてみられた。

1:ラット精巢

2:イズミオオウズムシ性的成熟個体

M:分子量マーカー

Anti-rAR(PG-21):抗ラット・アンドロゲンレセプター抗体での交叉反応

左側の数字は分子量を示す。

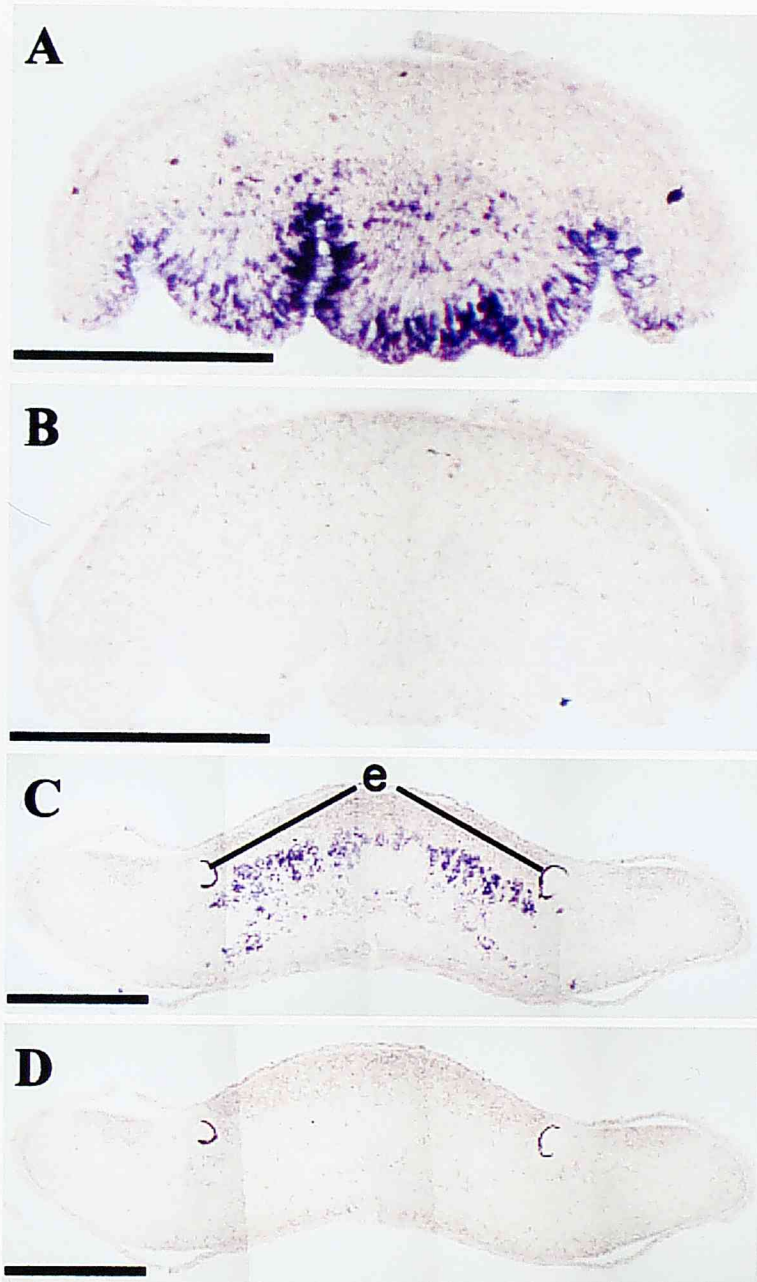


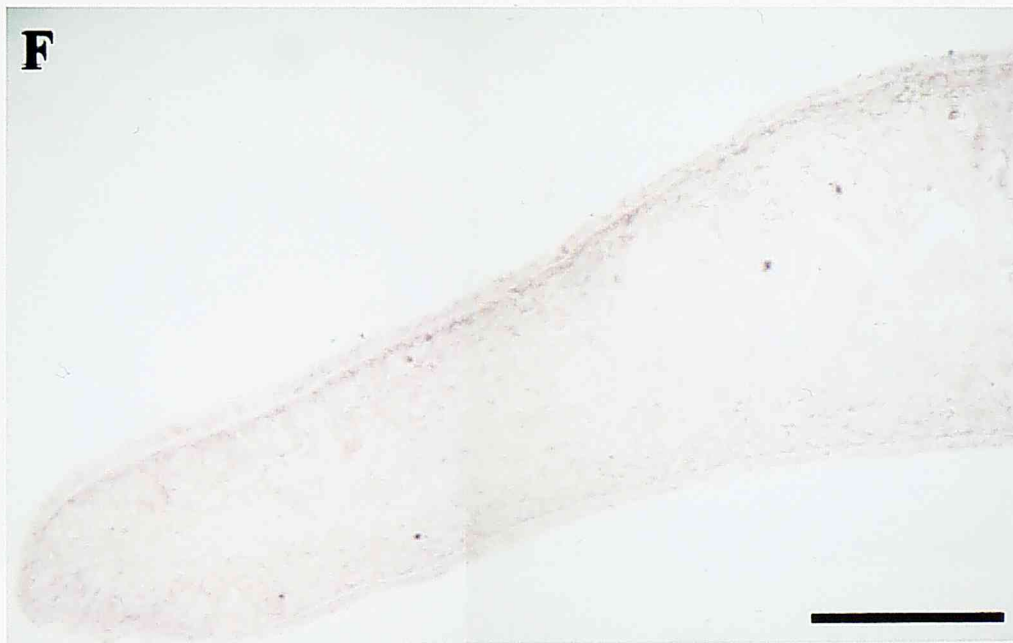
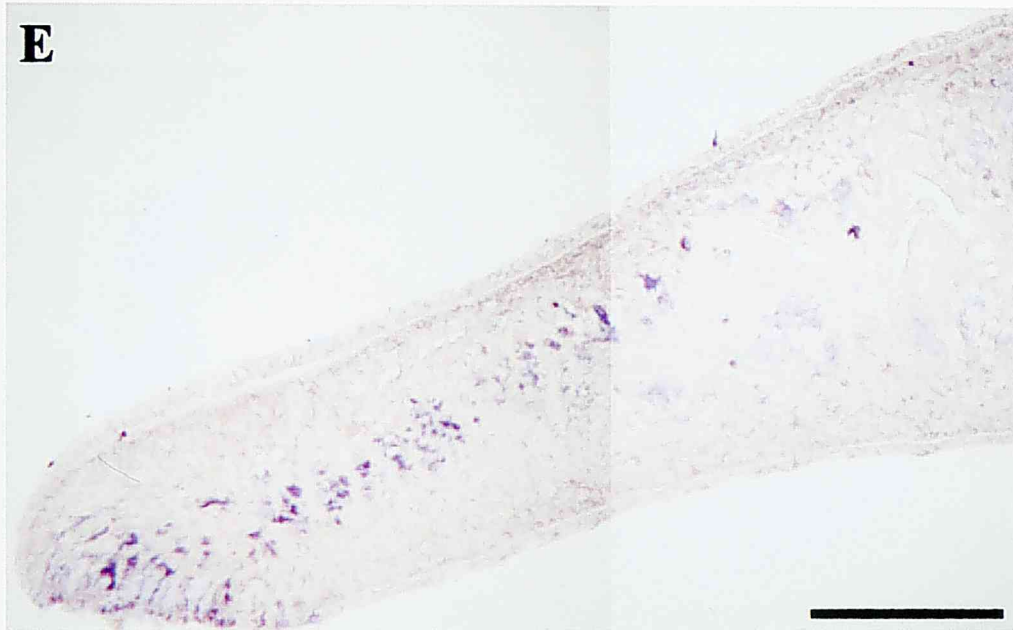
図14-1. アンドロゲンレセプター様タンパク質の局在
(横断切片)

ウサギ抗ヒト・アンドロゲンレセプター抗体と交叉するタンパク質の局在は、
吸着器官から眼点内側を通るように移行する。

(A)(B)吸着器官部域 (C)(D)眼点部域

AとCは陽性反応を示し、BとDはコントロールである。

e:眼点 スケールバー:200 μ m



**図14-2. アンドロゲンレセプター様タンパク質の局在
(横断切片)**

眼点内側から背側を通り体側腹側へ開口するように移行する。

(E) (F) 体側部域

Eは陽性反応を示し、Fはコントロールである。

スケールバー: 200 μ m



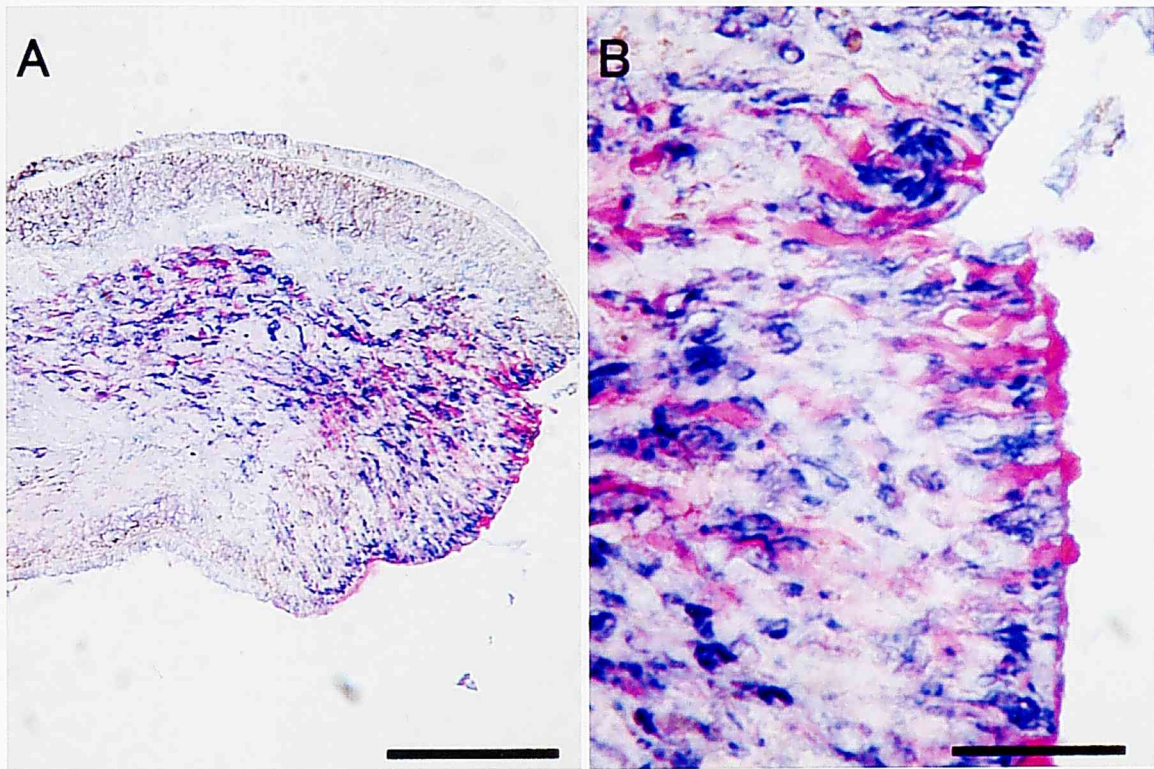
図14-3. アンドロゲンレセプター様タンパク質の局在 (縦断切片)

体側から尾部先端腹側に開口するように移行する。また、性的未成熟個体においても、性的成熟個体と同様な局在を示していた。

(G) 性的成熟個体尾部域 (H) 性的未成熟個体頭部域

GとHは共に陽性反応を示す。

スケールバー: (G) 200 μm (H) 100 μm



**図15. アンドロゲンレセプター様タンパク質の局在
(縦断切片)**

(A)イズミオオウズムシ性的成熟個体吸着器官 (B)拡大図
免疫染色後、エオシン染色を施している。
好エオシン性腺細胞には局在がみられなかった。
スケールバー:(A)200 μ m (B)50 μ m

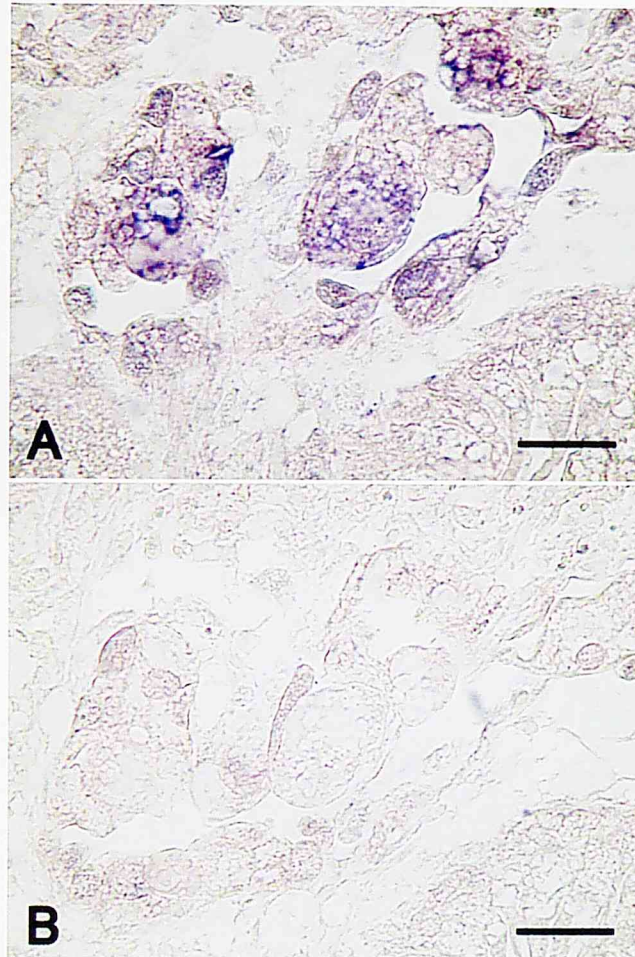


図16-1. 卵黄腺におけるアンドロゲン レセプター様タンパク質

発達途中の卵黄腺の核と思われる部位や細胞質に局在していた。

(A)陽性反応 (B)コントロール

スケールバー:25 μ m

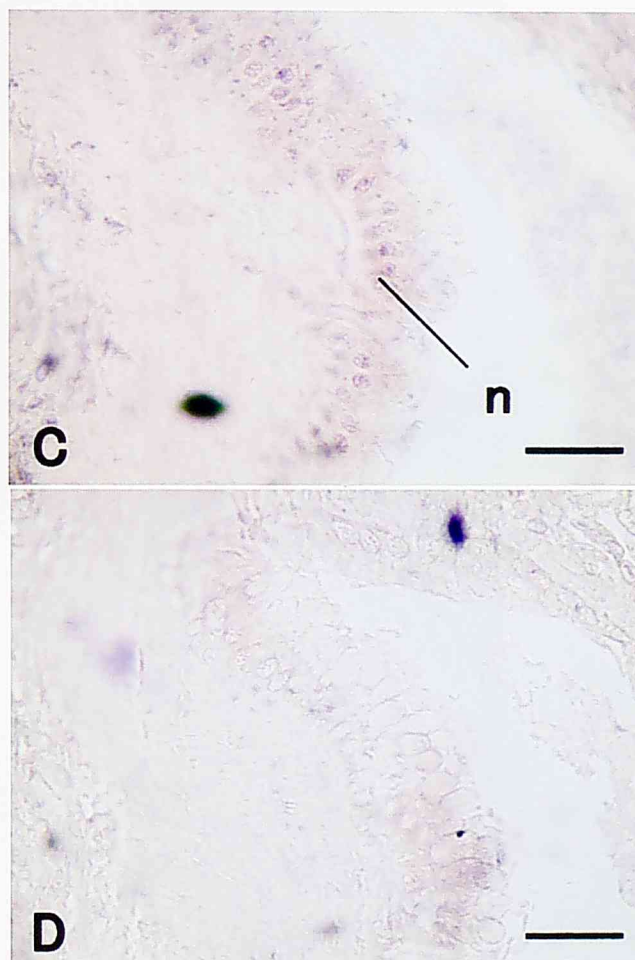


図16-2. 交接囊上皮における アンドロゲンレセプター様タンパク質

(C)陽性反応 (D)コントロール
核に陽性反応がみられた。
n:核 スケールバー:25 μ m

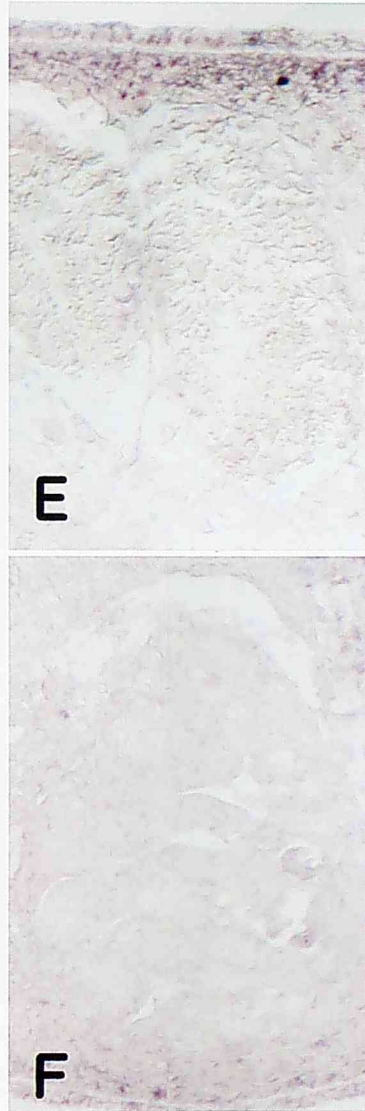


図16-3. 精巣(E)と卵巣(F)

生殖巣である精巣と卵巣には、アンドロゲンレセプター様タンパク質は局在していなかった。

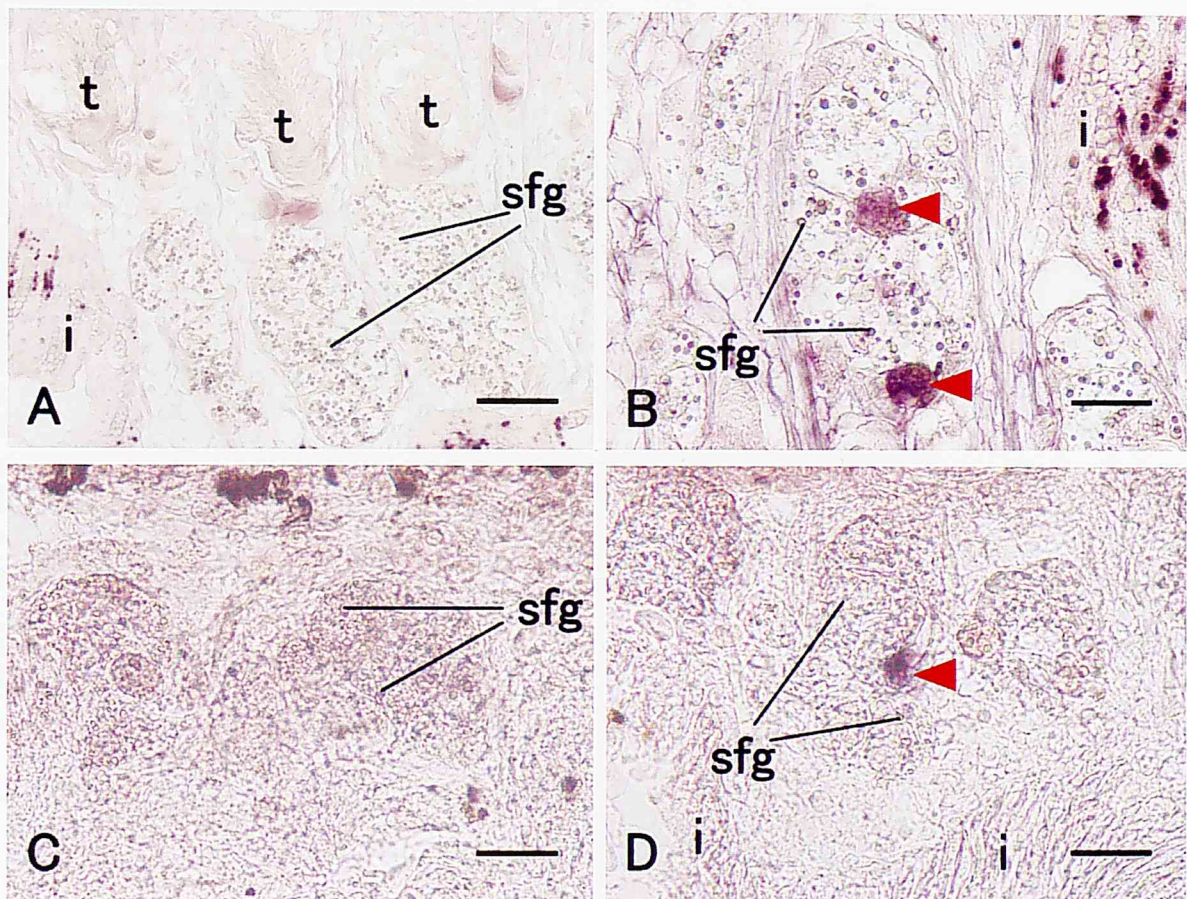


図17. 卵黄腺(卵黄細胞)におけるアンドロゲンレセプター様タンパク質とテストステロンの局在

両抗体により、卵黄腺において核と思われる部位に陽性反応が検出された。

(A) (B) : 抗ラット・アンドロゲンレセプター抗体(PG-21)による検出
(パラフィン包埋試料)

(C) (D) : 抗テストステロン抗体による検出(O.C.T. compound 包埋試料)

AとCはコントロールを示し、BとDは陽性反応(矢頭)である。

sfg: 卵殻形成顆粒 スケールバー: (A) 25 μ m (B) (C) (D) 50 μ m

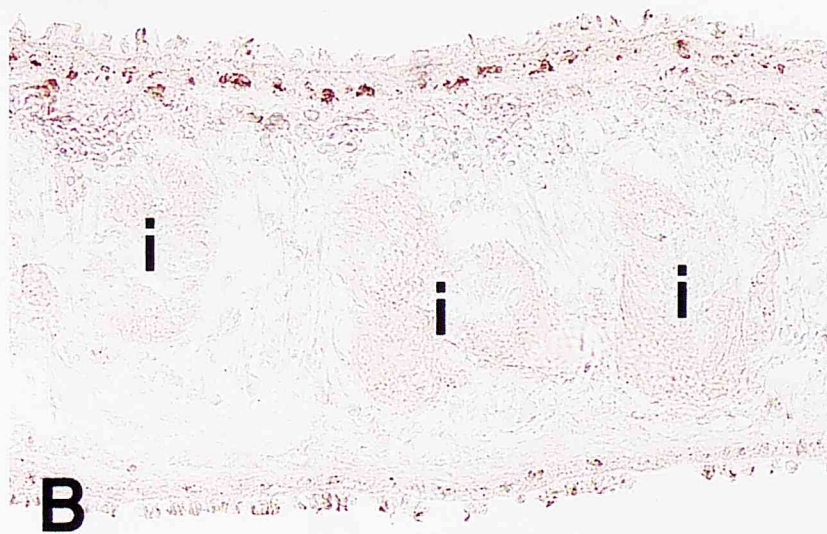
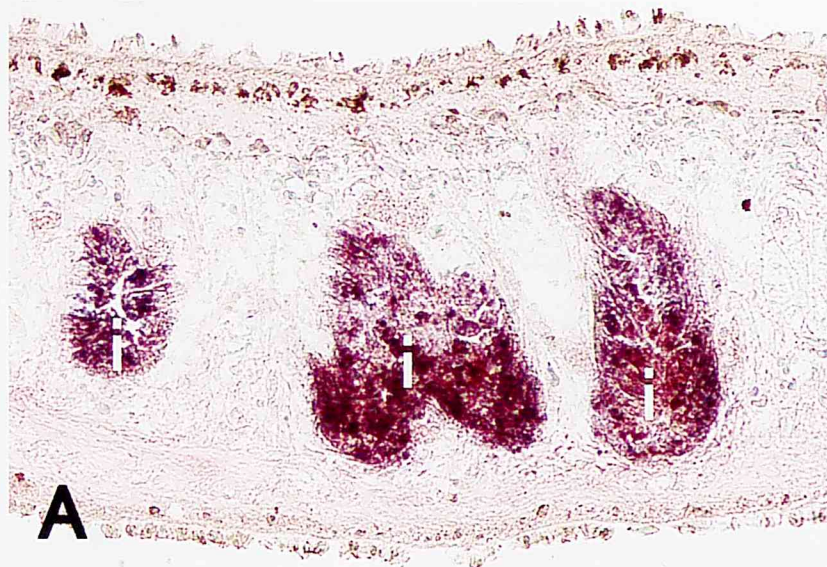


図18. 腸管でのテストステロン陽性細胞の局在

(A): テストステロン陽性部域

(B): コントロール

i: 腸管 スケールバー: 100 μ m

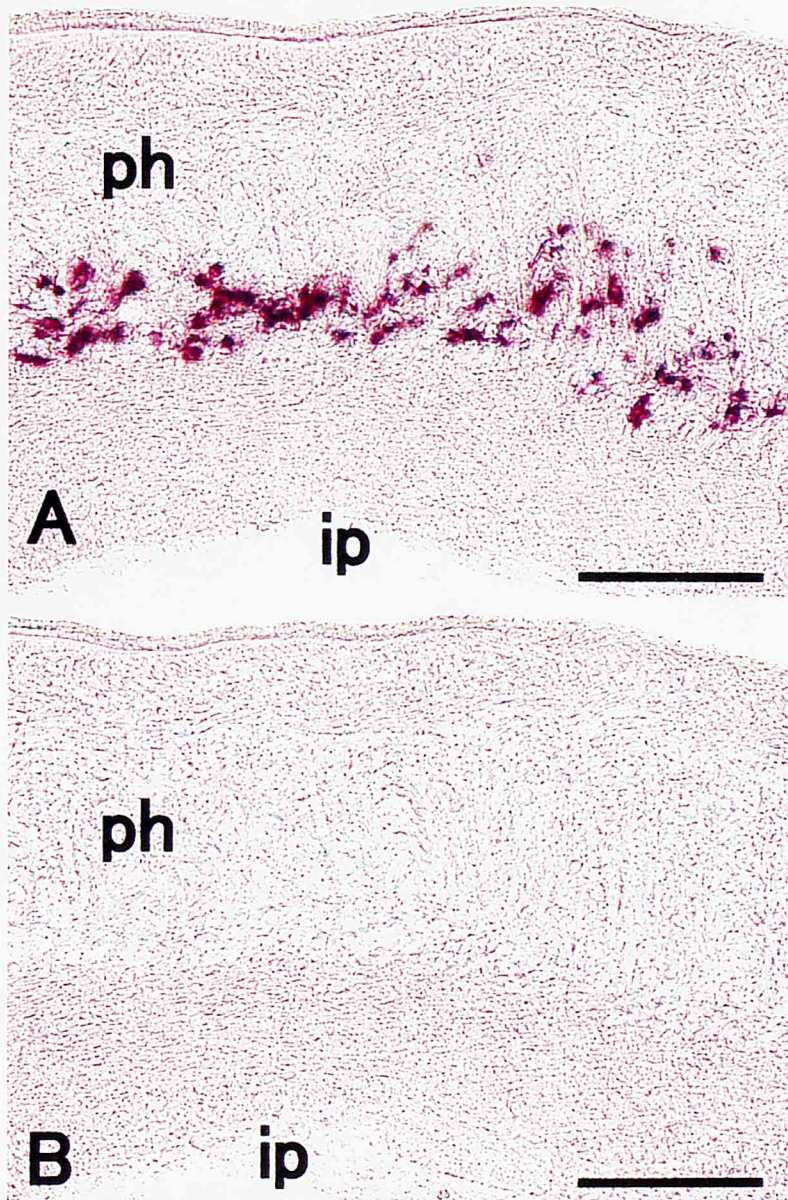


図19. 咽頭でのテストステロン陽性細胞の局在

咽頭におけるテストステロンの局在については、考察できなかった。

(A): テストステロン陽性部域

(B): コントロール

ip: 咽頭内腔 ph: 咽頭 スケールバー: 50 μ m

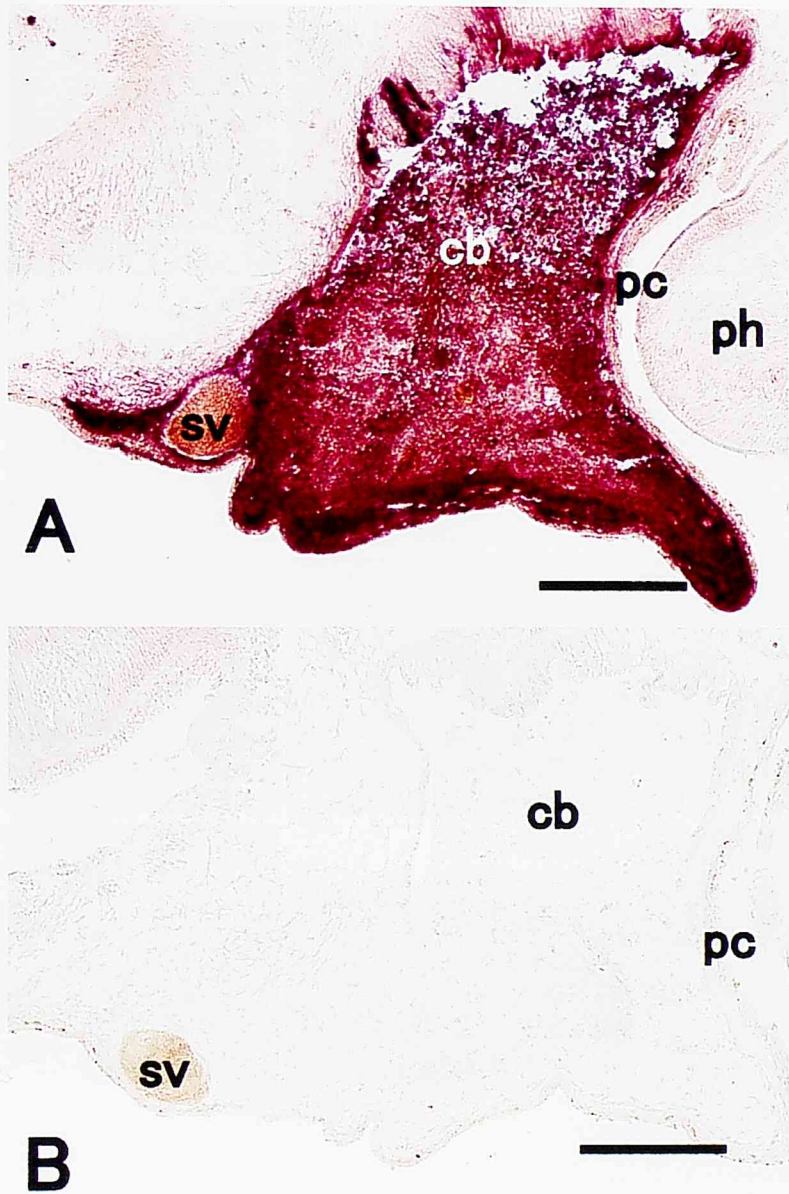


図20. 交換器官でのテストステロンの局在

交換囊上皮と交換囊内他個体精子に陽性反応がみられた。

(A): テストステロン陽性部域

(B): コントロール

cb: 交換囊 pc: 咽頭腔 ph: 咽頭 sv: 輸精管膨大部 スケールバー: 100 μ m

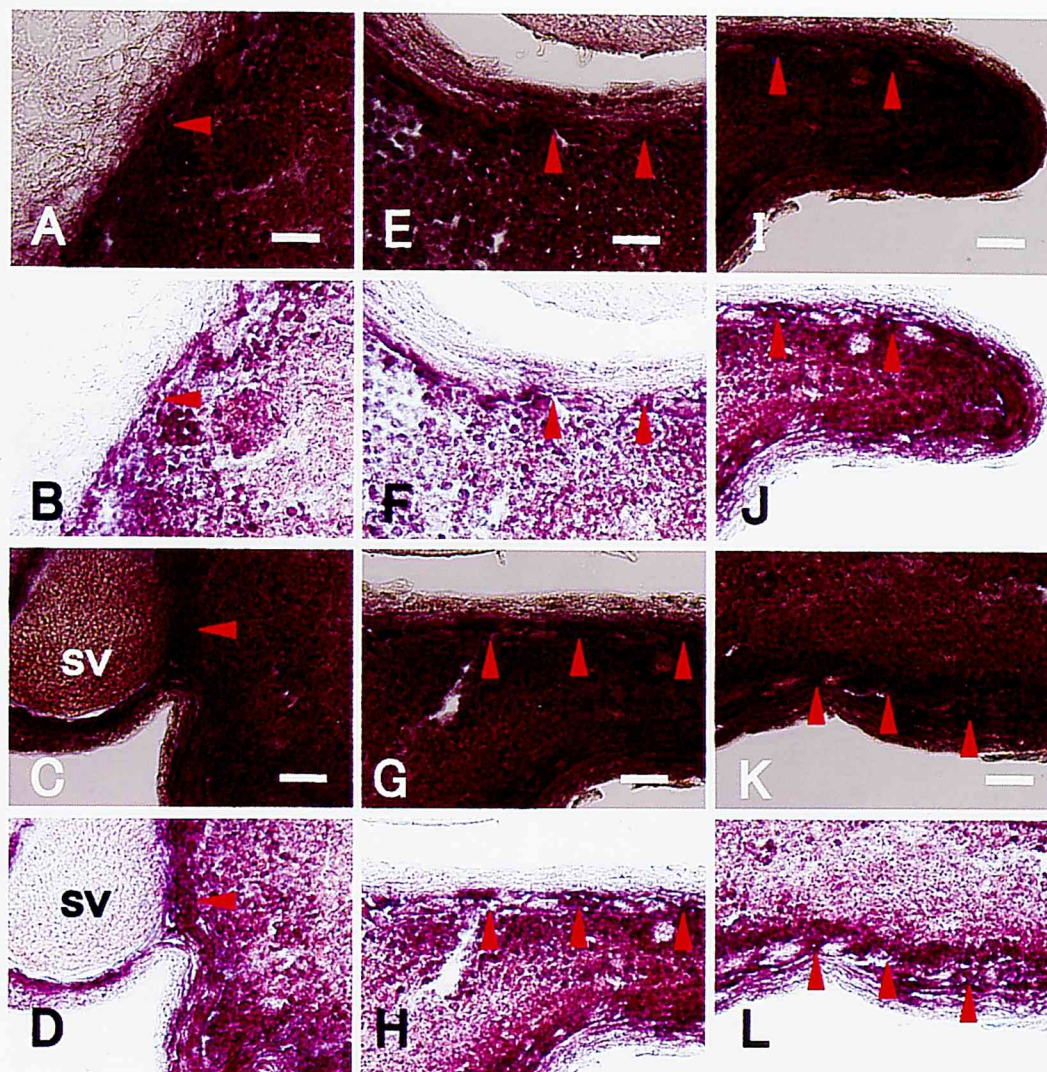


図21. 交接囊上皮に存在する孔

交接囊上皮には無数に孔が存在し、そこから囊外に他個体精子が出ている。

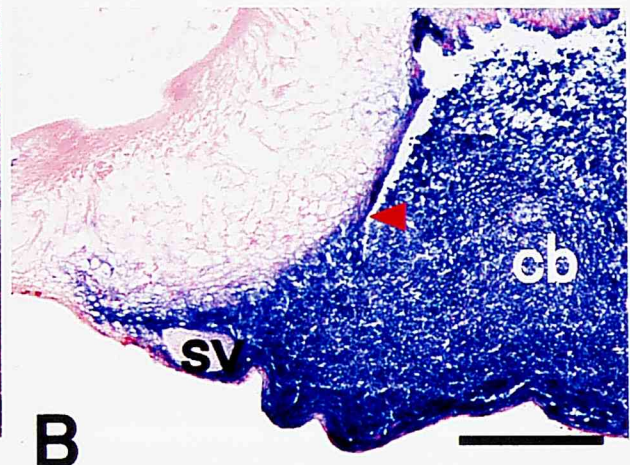
(A) (C) (E) (G) (I) (K) : 抗テストステロン抗体により検出した切片

(B) (D) (F) (H) (J) (L) : 同切片を強光下で観察

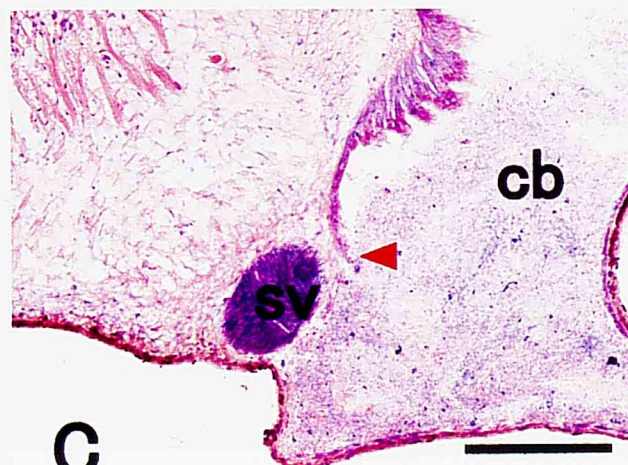
sv: 輸精管膨大部 矢頭: 孔 スケールバー: 25 μ m



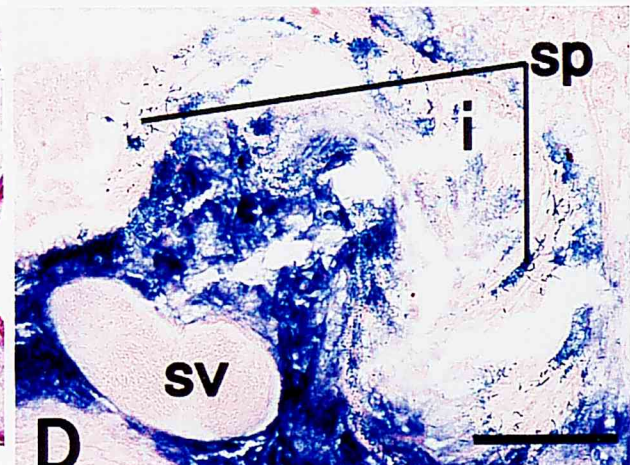
A



B



C



D

図22. 交接囊上皮に存在する孔からの他個体精子の移行

他個体精子は、交接囊上皮に存在する孔から囊外に移行し、腸管へ達していた。

(A) 抗テストステロン抗体により検出した切片

(B) 免疫染色後にエオシン染色した切片

(C) HE染色を施した切片

(D) 交接囊外から腸管への他個体精子の移行

cb: 交接囊 i: 腸管 sp: 精子 sv: 輸精管膨大部 矢頭: 交接囊上皮

スケールバー: (A) (B) (C) 100 μ m (D) 50 μ m

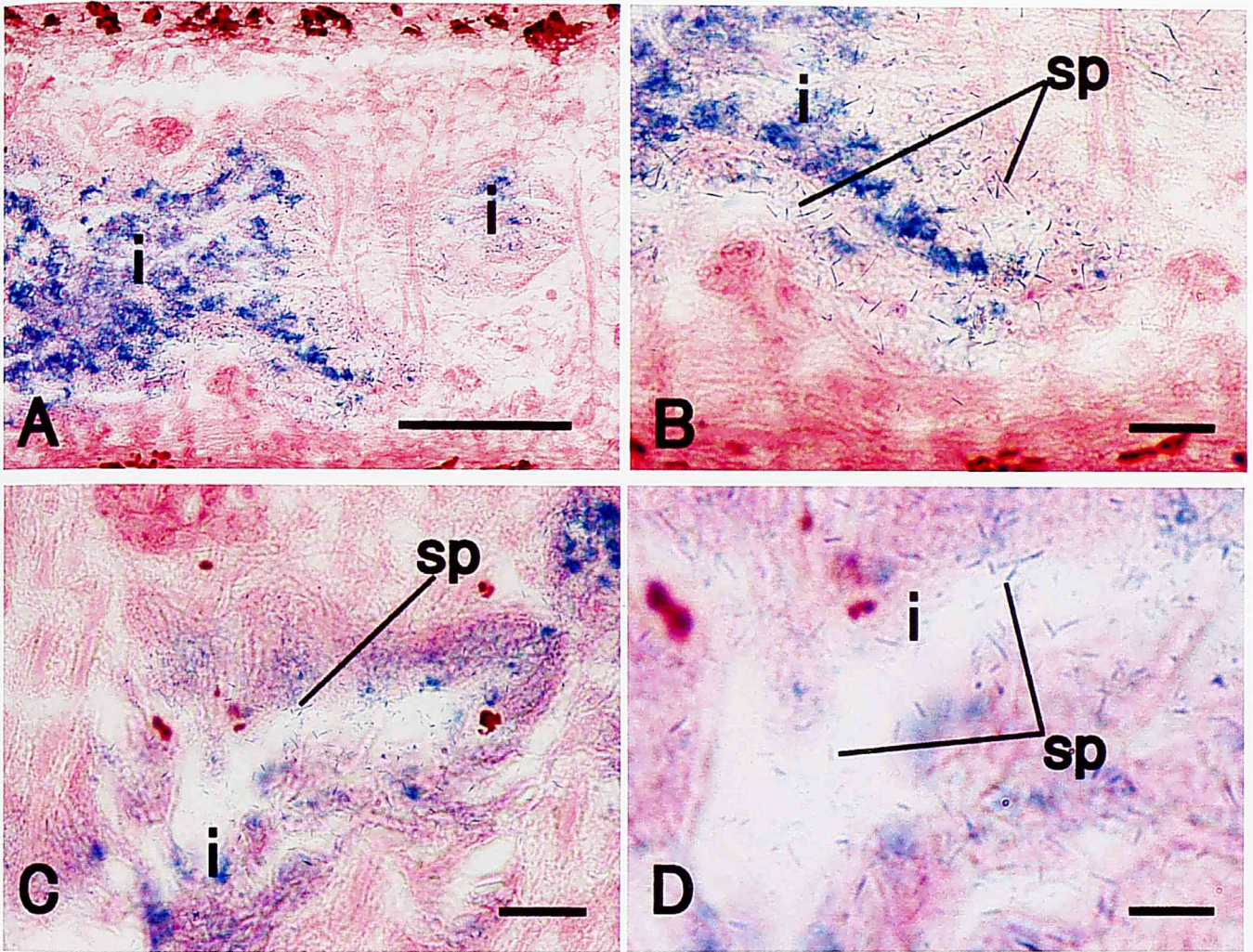


図23. 腸管に存在する精子

免疫染色後、エオシン染色を施している。

テストステロン陽性の精子が腸管内と周辺にみられる。

i:腸管 sp:精子

スケールバー:(A) 100 μ m (B) (C) 25 μ m (D) 10 μ m

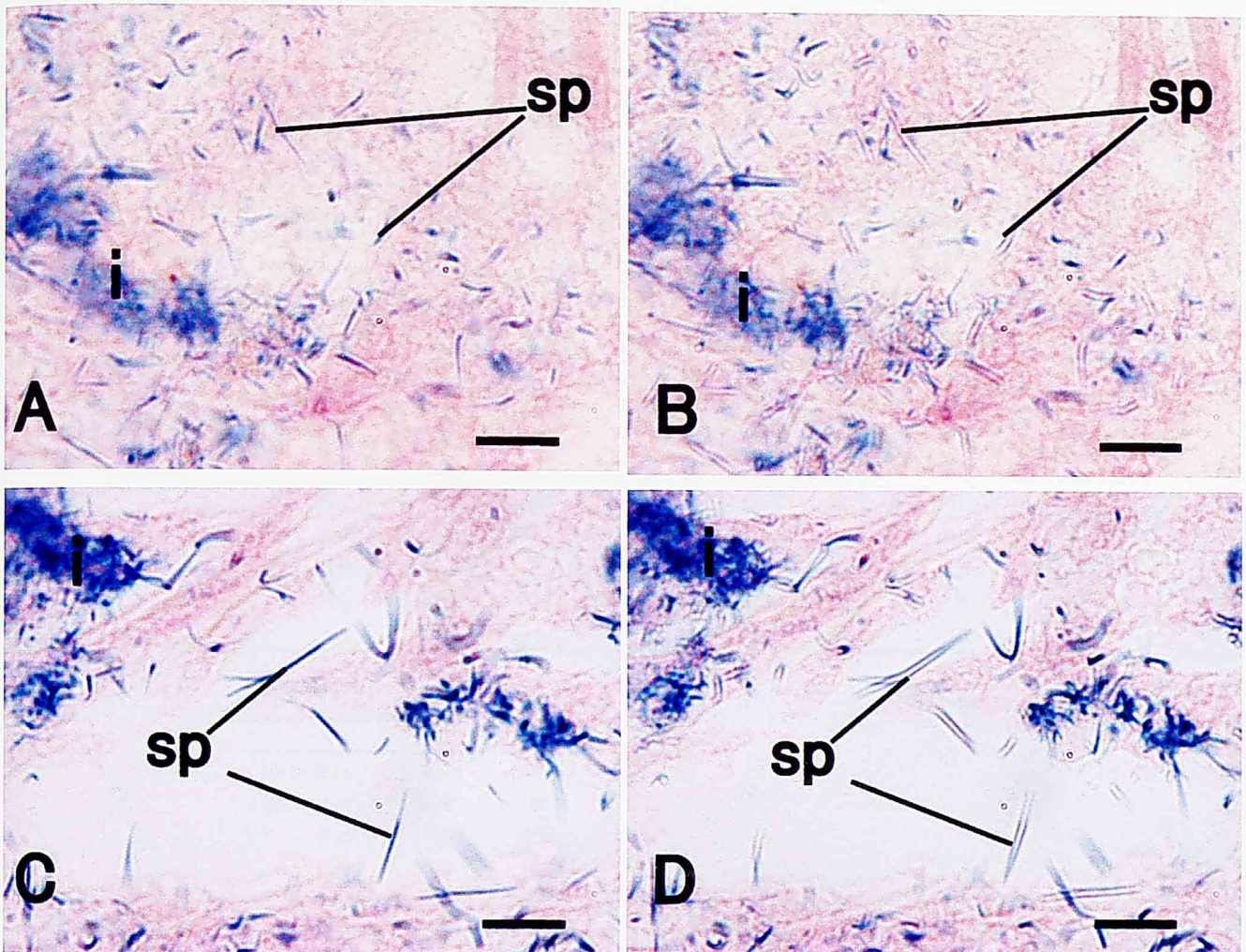


図24. 他個体精子の頭部コーティング

免疫染色後、エオシン染色を施している。
テストステロンが精子頭部をコーティングするように局在していた。
i:腸管 sp:精子 スケールバー:10 μ m

表3. 1年間(2005年12月から2006年12月)のイズミ
オオウズムシ性的成熟個体サンプリングデータ
(A)精巢 (B)卵黄腺

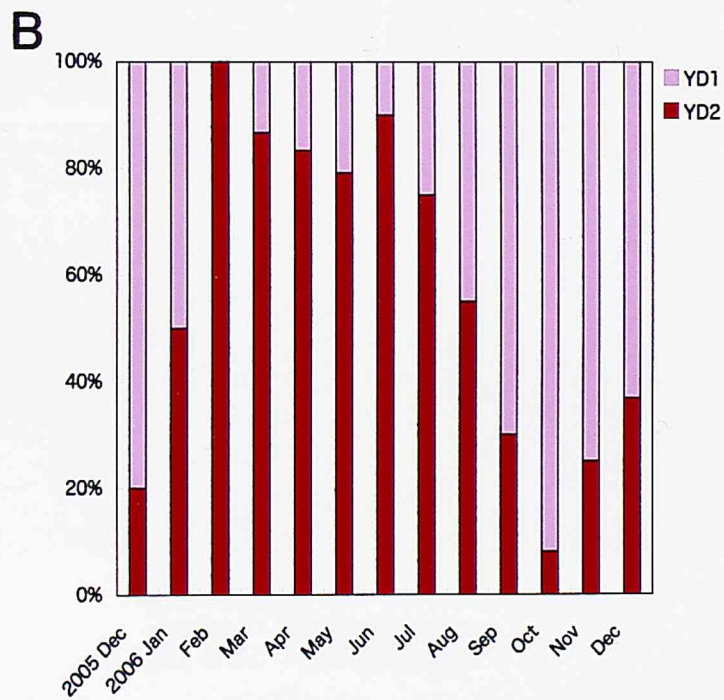
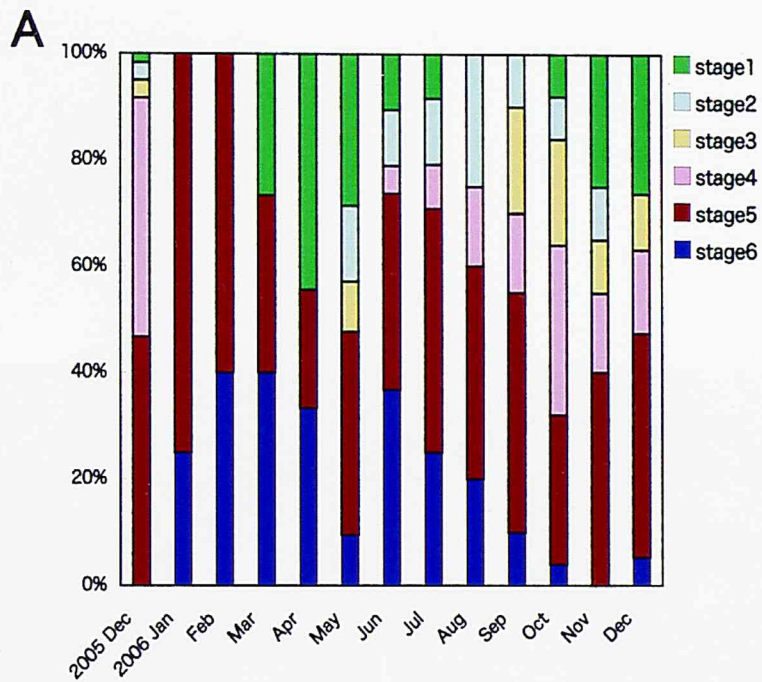
A

		(%)					
		stage 1	stage 2	stage 3	stage 4	stage 5	stage 6
2005	Dec	1.7	3.3	3.3	45.0	46.7	0
2006	Jun	0	0	0	0	75.0	25.0
	Feb	0	0	0	0	60.0	40.0
	Mar	26.7	0	0	0	33.3	40.0
	Apr	44.4	0	0	0	22.2	33.3
	May	28.6	14.3	9.5	0	38.1	9.5
	Jun	10.5	10.5	0	5.3	36.8	36.8
	Jul	8.3	12.5	0	8.3	45.8	25.0
	Aug	0	25.0	0	15.0	40.0	20.0
	Sep	0	10.0	20.0	15.0	45.0	10.0
	Oct	8.0	8.0	20.0	32.0	28.0	4.0
	Nov	25.0	10.0	10.0	15.0	40.0	0
	Dec	26.3	0	10.5	15.8	42.1	5.3

B

		(%)	
		YD1	YD2
2005	Dec	80.0	20.0
2006	Jun	50.0	50.0
	Feb	0.0	100.0
	Mar	13.3	86.7
	Apr	16.7	83.3
	May	20.8	79.2
	Jun	10.0	90.0
	Jul	25.0	75.0
	Aug	45.0	55.0
	Sep	70.0	30.0
	Oct	92.0	8.0
	Nov	75.0	25.0
	Dec	63.2	36.8

YD 1: yolk gland development 1 YD 2: yolk gland development 2



**図25. 1年間のイズミオオウズムシ性的成熟個体
サンプリングデータ**

精子形成ステージ5と6を足した値と、YD2の値に同調傾向がみられた。
表3をグラフ化したもの。(A)精巣 (B)卵黄腺

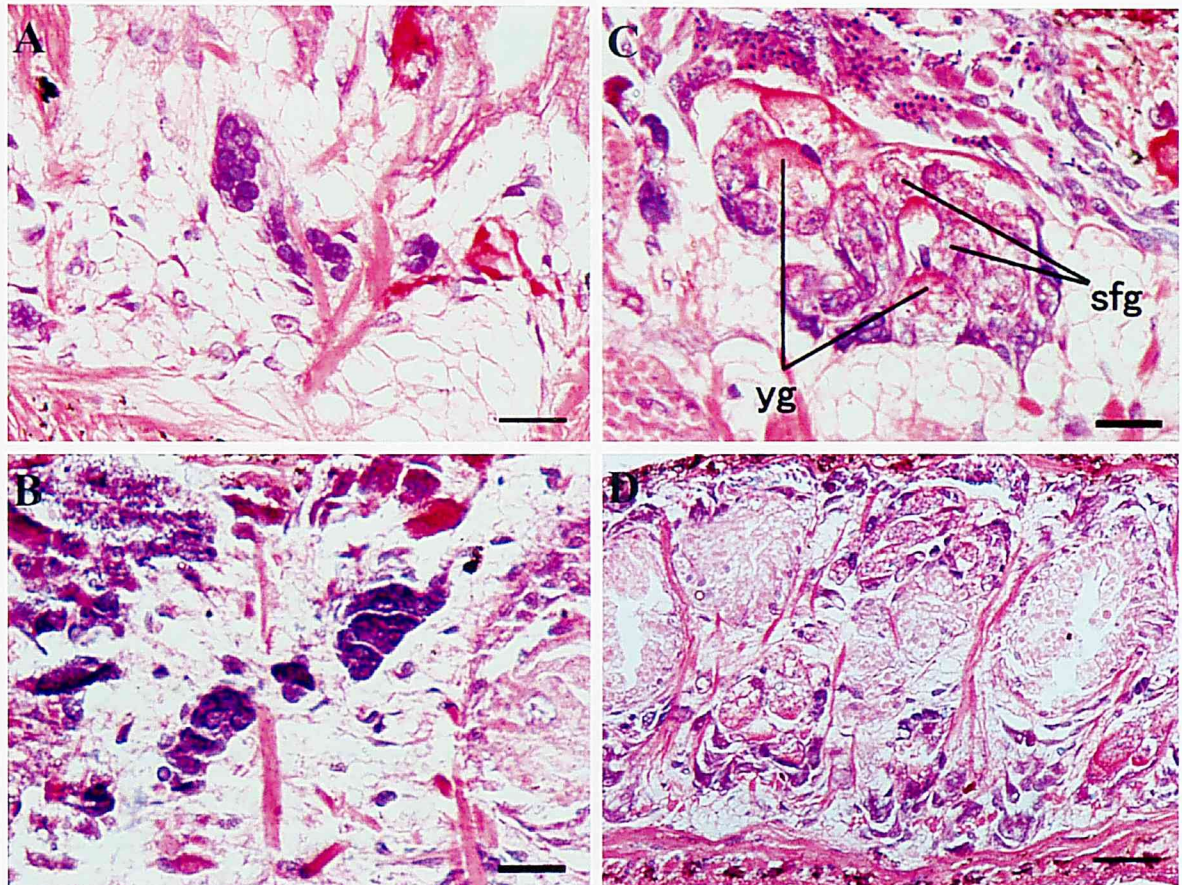


図26. 卵黄腺ステージ

卵黄腺は卵黄細胞の集合組織であり、産卵時期に発達する。発達すると、まず卵殻形成顆粒がつくれ、次に卵黄粒がつくれ、次第に肥大する。

(A) (B) : YD 1 (C) (D) : YD 2

YD1 : yolk gland development 1 YD2 : yolk gland development 2

sfg : 卵殻形成顆粒 yg : 卵黄粒

スケールバー : (A) (B) (C) 25 μ m (D) 50 μ m

表4. 卵黄腺ステージ

	sfg	yg
YD1	±	-
YD2	+	+

-, absence +, presence ±, absence or presence

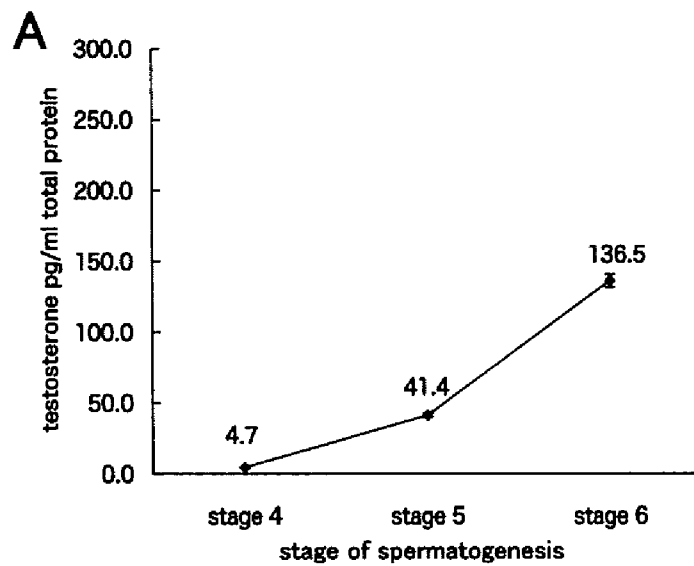
卵黄細胞は、卵黄粒がつくられると肥大するため、卵黄粒がつくられておらず、肥大していない卵黄腺をYD1とし、卵黄粒がつくれ、肥大している卵黄腺をYD2とした。

yg: yolk granule

sfg: shell forming granule

YD1: yolk gland developmental stage 1

YD2: yolk gland developmental stage 2



inter-assay coefficient of variation: 15.5%
 intra-assay coefficient of variation: 11.8%

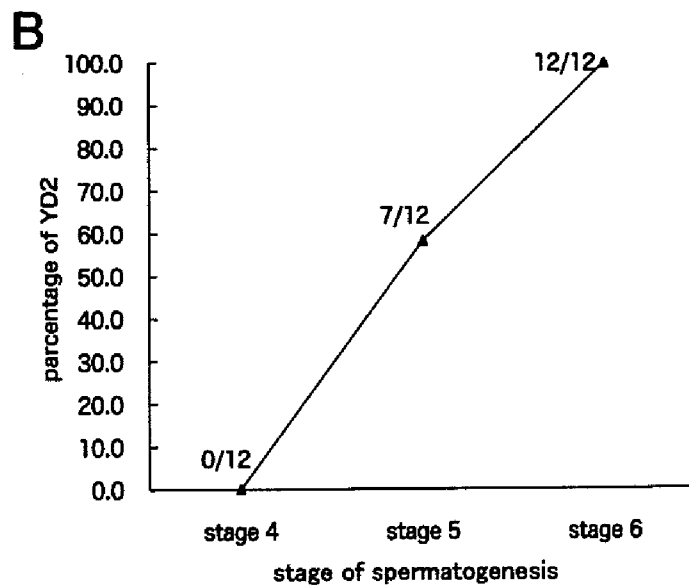
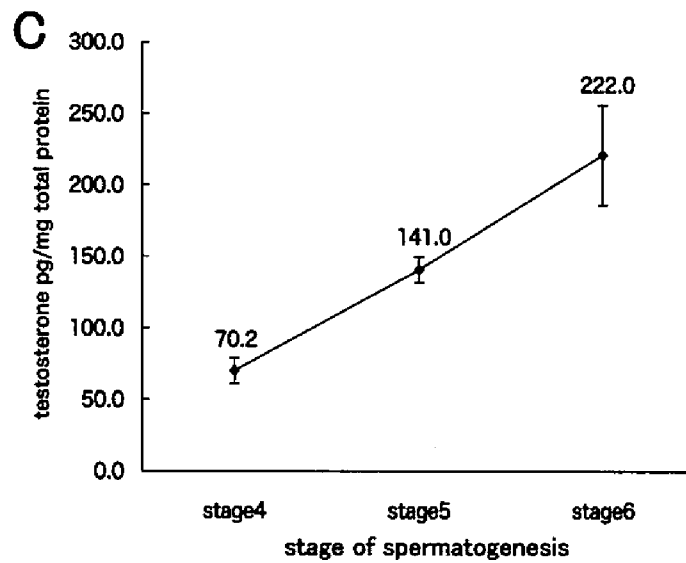


図27-1. テストステロンの変動と卵黄腺発達頻度

(A)テストステロン含有量 (B)サンプル内の卵黄腺発達個体の頻度
 2005年12月から2006年6月までの個体群を分析(精子形成ステージ4から6)
 Aにおいては、2回のアッセイの平均値を示した。
 Bにおいては、分数によってYD2の個体数を示した。
 分子:YD2の個体数 分母:サンプル内の全個体数



inter-assay coefficient of variation: 5.7%
 intra-assay coefficient of variation: 4.8%

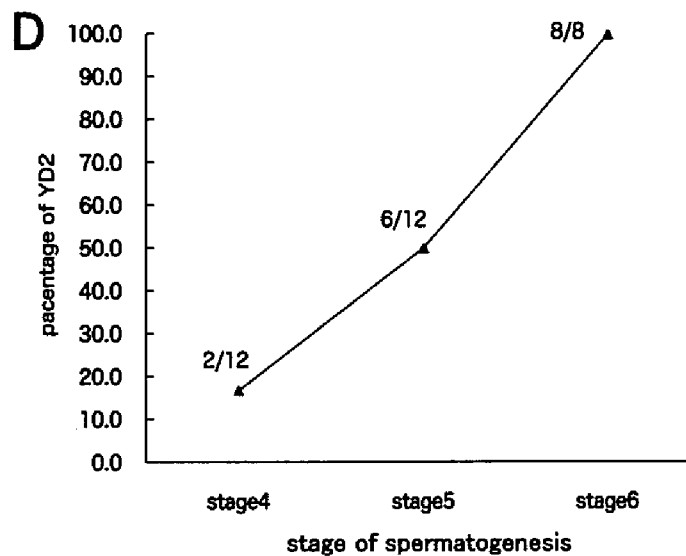
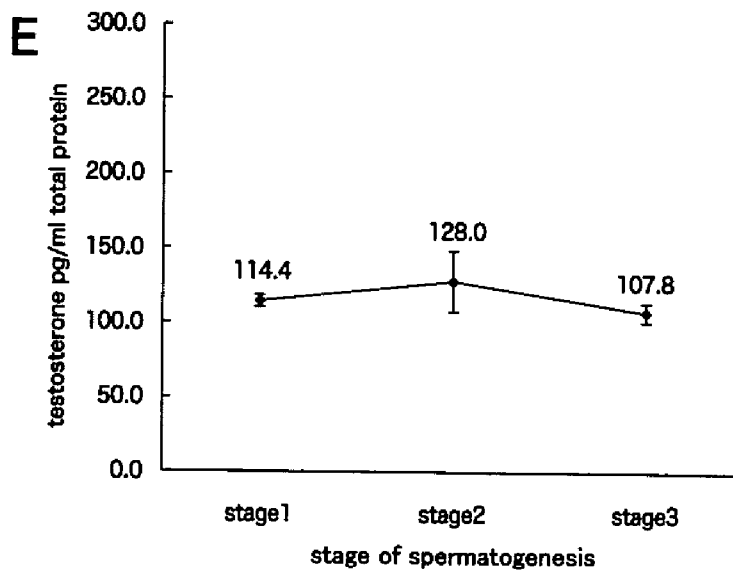


図27-2. テストステロンの変動と卵黄腺発達頻度

(C)テストステロン含有量 (D)サンプル内の卵黄腺発達個体の頻度
 2006年7月から12月までの個体群を分析(精子形成ステージ4から6)
 Cにおいては、2回のアッセイの平均値を示した。
 Dにおいては、分数によってYD2の個体数を示した。
 分子:YD2の個体数 分母:サンプル内の全個体数



inter-assay coefficient of variation: 5.7%

intra-assay coefficient of variation: 4.8%

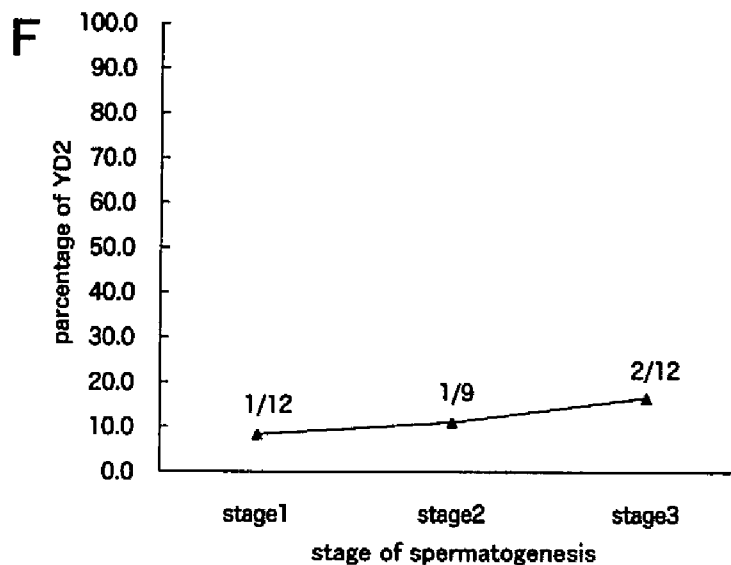


図27-3. テストステロンの変動と卵黄腺発達頻度

(E)テストステロン含有量 (F)サンプル内の卵黄腺発達個体の頻度

2006年7月から12月までの個体群を分析(精子形成ステージ1から3)

Eにおいては、2回のアッセイの平均値を示した。

Fにおいては、分数によってYD2の個体数を示した。

分子: YD2の個体数 分母: サンプル内の全個体数

表5. 本研究に用いたテストステロン
ELISAキット添付データ

cross reactivity	(%)
testosterone	100
dihydrotestosterone	100
androstenedione	0.86
bolandiol	0.86
testosterone enanthate	0.13
estriol	0.1
testosterone benzoate	0.1
estradiol	0.05
dehydroepiandrosterone	0.04
testosterone propionate	0.04
deoxycorticosterone	0.03
testosterone 17 β -cypionate	0.02
androsterone	<0.01
corticosterone	<0.01
cortisol	<0.01
cortisone	<0.01
estrone	<0.01
17-hydroxyprogesterone	<0.01
pregnenolone	<0.01
progesterone	<0.01

テストステロンとデヒドロテストステロン以外の物質での交差性は1%未満である。

表6. 本実験で用いた抗hAR抗体の交叉反応

<u>陽性反応</u>
マウス
ラット
ニワトリ
カエル
ウシ
ブタ
魚類
霊長類
ハイエナ
フェレット
ハムスター
<u>ハタネズミ</u>

添付データを表に示した。生物種は順不同である。