

令和元年5月29日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04983

研究課題名(和文) 環境依存的性決定の分子機構とその普遍性の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism and universality of environmental sex determination

研究代表者

北野 健 (KITANO, TAKESHI)

熊本大学・大学院先端科学研究部(理)・准教授

研究者番号：40336219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：メダカはXX-XY型の性決定システムをもつが、高温飼育によりXXメダカが雄化することが知られている。この原因としては、高温ストレスにより増加するグルココルチコイドの一種であるコルチゾルが関与していることが分かっているが、詳細は不明である。そこで本研究では、まず、コルチゾル合成に関わる因子の機能解析を実施した。次に、高温飼育個体及びコルチゾル処理個体を用いて次世代シーケンス解析を行った。その結果、高温及びコルチゾル処理個体両方で発現量が上昇する80遺伝子と減少する41遺伝子を同定した。一方、ミツボシキユウセンやウナギについては、コルチゾル合成阻害剤等の投与実験を行って影響を調査した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒラメ等の養殖においては、雄よりも雌の方が成長が速い等の理由により、雌だけを作る性統御の技術開発が求められている。しかしながら、ヒラメの遺伝的雌は高温ストレス等により雄化するため、完全な性統御が行えないのが現状である。本研究では、温度依存的性決定にコルチゾルが関与することを初めて明らかにし、このホルモンの合成経路や雄化誘導経路について解析した。これらの研究成果は、安定した性統御が困難な環境依存的性決定を持つ魚種における画期的な性統御法となりうる。

研究成果の概要(英文)：Medaka (*Oryzias latipes*) is a teleost fish with a XX/XY sex determination system. Previously, we reported that high temperature (HT) induced the masculinization of XX medaka by increasing the levels of cortisol, a major glucocorticoid produced by interrenal cells in teleosts. However, it remains unclear how HT induces cortisol levels and the hormone causes female-to-male sex reversal. Here, we first generated and analyzed corticotropin-releasing hormone knockout medaka, arginine vasotocin knockout fish and gonadal soma-derived growth factor knockout fish. Next, we performed next generation sequencing analysis using the larvae treated by HT or cortisol. As results, we identified 80 genes expression-induced by both HT and cortisol, and 41 genes expression-reduced by them. Moreover, we performed some treatment experiments using the protogynous wrasse (*Halichoeres trimaculatus*) and Japanese eel (*Anguilla japonica*).

研究分野：比較内分泌学

キーワード：コルチゾル 環境依存的性決定 メダカ ミツボシキユウセン ウナギ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒラメ等の養殖においては、雄よりも雌の方が成長が速い等の理由により、雌だけを作る性統御の技術開発が要望されているが、ヒラメの遺伝的雌は高温や低温飼育により雄化するため、完全な性統御が行えないのが現状である(北野, 2016)。

ヒラメを含む多くの水産魚種は、遺伝的な要因により性が決定するシステム(遺伝的性決定システム)だけでなく、環境に依存して性が決定するシステム(環境依存的性決定システム)を保持している。この環境依存的性決定システムにおいては、温度、pH、社会環境など、様々な環境要因で性が決定(転換)することが知られているが、この基本原理及び分子機構については未だに分からない。

研究代表者らは、1999年以來、水産魚種であるヒラメとモデル魚であるメダカを用いて、温度依存的な性決定機構に関わる多くの重要な研究成果を発表してきた(北野, 2016)。近年の具体的な成果としては、ヒラメ遺伝的雌の未分化生殖腺を培養したところ、高温処理での雄化は確認できなかったが、雌化温度においてストレスホルモン(コルチゾル)で処理すると、生殖腺の雄化が誘導された(Yamaguchi et al., 2010)。また、性分化時期のコルチゾル量を測定したところ、高温により生体内のコルチゾル量が急上昇した。さらに、実際にコルチゾルをこれら遺伝的雌に投与した結果、高温処理やエストロゲン合成酵素(アロマターゼ)阻害剤処理の結果と同様に、濾胞刺激ホルモン(FSH)受容体、アロマターゼ遺伝子の発現が抑制され、機能的な雄へと分化することが明らかとなった(Hayashi et al., 2010)。一方、ヒラメやメダカの遺伝的雌を高温環境下でコルチゾル合成阻害剤またはエストロゲンで処理すると、アロマターゼ遺伝子の発現が誘導されて雄化が阻害されたことから(Hayashi et al., 2010; Yamaguchi et al., 2010; Kitano et al., 2012)、高温による雄化には、高温 コルチゾル量上昇 エストロゲン合成抑制

雄化の分子カスケードが存在している可能性が考えられる。しかしながら、高温によるコルチゾル誘導機構やコルチゾルによる雄化誘導機構については、不明な点が多く残されている。

ミツボシキウセンは雌性先熟魚であり、社会環境に伴って雌から雄へと性転換することが知られている(雌だけの環境下では、最も大きな個体が雄へと性転換)。研究分担者である沖縄美ら島財団の中村将博士、研究協力者の野津了博士は、ミツボシキウセンを含むいくつかの性転換魚において、アロマターゼ阻害剤を投与することで雌から雄への性転換を誘導できること、性転換に伴いエストロゲン量が減少することなどを報告している(Nozu et al., 2009)。さらに最近、中村、野津らは、ミツボシキウセンにコルチゾル処理を行った結果、血中のエストロゲン量が減少し、雌から雄への性転換が誘導されることを明らかにした(Nozu and Nakamura, 2015)。このように、コルチゾルは、ミツボシキウセンを含む性転換魚においても、雌から雄への性転換に関与している可能性がある。

ニホンウナギは重要な養殖対象魚であるが、種苗となる天然シラスウナギの漁獲量が激減しており、天然資源の保全と人工種苗生産技術の開発が急務である。人工種苗の生産には親魚の安定供給が求められるが、養殖ウナギはほとんどが雄に分化するため、その一部の個体にエストロゲンを投与して雌個体を作る必要があり、より安全で効率的な性統御の技術開発が求められている。通常、捕獲される天然ウナギの性比はおおよそ1:1であることから、養殖ウナギのほとんどが雄へと分化するのは大変不思議であるが、その原因は未だに分からない。最近、研究分担者である北海道大学の井尻成保博士らは、養殖ウナギに自然の餌料を与えて低密度で飼育することにより、雌の割合が増加することを明らかにした。このように、ウナギは飼育環境のストレスにより雄化している可能性があるため、この性分化とコルチゾルとの関係性は大変興味深い。

2. 研究の目的

本研究では、メダカを用いて基本的な環境依存的性決定の分子機構を解析すると同時に、温度以外の環境依存的性決定を行う魚種(ミツボシキウセンとウナギ)を用いてこのシステムの普遍性についても明らかにし、新たな性統御技術の開発に寄与することで水産業に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

ゲノム編集技術の一つである transcription activator-like effector nuclease (TALEN)を利用して副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)ノックアウト(CRH-KO)メダカ、CRISPR/Cas9システムを利用して生殖腺体細胞由来増殖因子(GSDF)ノックアウト(GSDF-KO)メダカ及びアルギニン・バソトシン(AVT)ノックアウト(AVT-KO)メダカを作製した(Sawamura et al., 2017)。一方、高温処理及びコルチゾル処理により誘導される新規遺伝子を同定するため、HiSeq4000(Illumina社製)を利用して次世代シーケンズ(NGS)解析を実施した。高温処理及びコルチゾル処理は、Hayashi et al.(2010)の方法に従って、メダカ胚を受精後0日目から孵化日まで行ってサンプリングした。遺伝子発現解析は、Kitano et al.(2012)の方法に従って、LightCycler480(Roche社製)を用いて定量的リアルタイムPCRにより実施した。コルチゾル量は、Hayashi et al.(2010)の方法に従って、Cortisol EIA kit(Cayman社製)を用いてマイクロプレートリーダー680(BioRad社製)により測定された。さらに、雌雄判別及び免疫化学染色は、Yamaguchi et al.(2010)の方法に従って行った。

4. 研究成果

(1) メダカ視床下部におけるコルチゾル誘導機構の解析

コルチゾルは、高温等のストレスに応答して副腎（硬骨魚類では頭腎）で合成されるステロイドホルモンであり、この合成の引き金は、視床下部からの CRH や AVT の分泌であると考えられるが、詳細は不明である。そこで、まず、ゲノム編集により作製した CRH-KO 及び AVT-KO メダカを用いてコルチゾル量を測定した。その結果、これらメダカは野生型メダカと同様に、高温処理によりコルチゾル量が上昇することが明らかとなった。次に、CRH 及び AVT のダブル KO メダカを作製して表現型を解析した。その結果、このダブル KO メダカは雌雄ともに妊性をもつことが確認された。今後は、このダブル KO メダカにおけるコルチゾル量を測定する必要があると考えられる。

(2) メダカ生殖腺におけるコルチゾルによる雄化誘導機構の解析

コルチゾルによる XX メダカの雄化は、生殖腺体細胞において GSDF の発現量が増加することにより引き起こされると考えられる。そこでまず、CRISPR/Cas9 システムにより作製した GSDF-KO メダカをコルチゾル処理し、雄化するかどうかを調べた。その結果、この KO の XX メダカは雄化しなかったことから、コルチゾルによる雄化には GSDF の発現が重要であることが確認された。次に、通常水温飼育個体、高温飼育個体、コルチゾル処理個体等の生殖腺領域を用いて、NGS 解析を実施した。その結果、高温飼育個体及びコルチゾル処理個体両方で発現量が上昇する 80 遺伝子と減少する 41 遺伝子を同定した。また、これら遺伝子に関して、定量的リアルタイム PCR により発現パターンを調べたところ、NGS 解析と同様の傾向が確認された。今後は、これら遺伝子に関して、CRISPR/Cas9 システムにより KO 系統を作製する予定である。

(3) 阻害剤等が及ぼすミツボシキウセン及びウナギへの影響調査

ミツボシキウセンにおいては、コルチゾルによる雄への性転換機構を明らかにするため、精巣分化に重要な役割を果たすと考えられる GSDF 抗体を作成してミツボシキウセンの成熟精巣の免疫染色を行った。その結果、A 型精原細胞を取り囲む支持細胞の細胞質のみに強い免疫陽性反応がみられた。今後この抗体を用いて GSDF の性転換に果たす役割を解明する。一方、雄個体にエストロゲン投与することで精巣から卵巣への転換（雌化）を誘導し、精巣分化・維持に關与する *Dmrt1* の発現変化を免疫染色により調べた。E2 投与により精巣中に卵原細胞、卵母細胞が出現したが、精原細胞を取り囲むセルトリ細胞には強い免疫陽性がみとめられた。精子形成の生殖細胞の完全な消失後には、免疫陽性のセルトリ細胞は集塊となり周辺仁期の卵の間隙に分布していた。しかし、転換後の成熟した卵巣中では免疫陽性細胞は完全に消失した。このことから、E2 は精巣のセルトリ細胞の *dmrt1* の発現を直接抑制しないことが明らかになった。

ウナギにおいては、シラスウナギを 15cm まで育て、コルチゾル合成阻害剤（メチラポン）を 100 または 1000mg/kg-飼料で投与し、30cm 以上までの成長を待ち生殖腺の性分化を調べたが、いずれの群でも全て精巣に分化し、卵巣分化個体は現れなかった。また、血中コルチゾル量は 100mg 群で 15.4 ± 4.1 ng/ml、1000mg 群 2 尾で、 13.8 および 14.1 ng/ml であった。未投与は 7.0 ± 3.1 ng/ml であり、メチラポン投与によるコルチゾル量の低下は認められなかった。天然採集個体では、 4.7 ± 1.3 ng/ml であり、飼育群と比べて低い傾向がみられた。また、天然個体では、全長 25 cm 以降から性分化の兆候がみられ、32 cm 以降で多くの個体で明らかな形態的性分化が始まっていることがわかった。このことは、飼育環境下において 20 cm 以降にエストロゲン処理を開始しても卵巣分化が誘導されることに符合すると考えられた。

<引用文献>

- 北野健. 魚類の性決定, ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ (伊藤道彦, 高橋明義 編集), 裳華房, 3, 76-91 (2016).
- Hayashi Y., Kobira H., Yamaguchi T., Shiraishi E., Yazawa T., Hirai T., Kamei Y. and Kitano T. High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. *Mol Reprod Dev*, 77, 679-686 (2010).
- Kitano T, Hayashi Y, Shiraishi E, Kamei Y. Estrogen rescues masculinization of genetically female medaka by exposure to cortisol or high temperature. *Mol Reprod Dev*, 79, 719-726 (2012).
- Nozu R, Kojima Y, Nakamura M. Short term treatment with aromatase inhibitor induces sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. *Gen Comp Endocrinol*, 161, 360-364 (2009).
- Nozu R, Nakamura M. Cortisol administration induces sex change from ovary to testis in the protogynous Wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. *Sex Dev*, 9, 118-124 (2015).
- Sawamura R, Osafune N, Murakami T, Furukawa F, Kitano T. Generation of biallelic F0 mutants in medaka using the CRISPR/Cas9 system, *Genes Cells*, 22, 756-763 (2017).
- Yamaguchi T., Yoshinaga N., Yazawa T., Gen K. and Kitano T. Cortisol is involved in temperature-dependent sex determination in the Japanese flounder. *Endocrinology*, 151,

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) Horiguchi R, Nozu R, Hirai T, Kobayashi Y, Nakamura M, Expression patterns of sex differentiation-related genes during gonadal sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. Gen Comp Endocrinol (査読有), 257: 67-73 (2018). DOI: 10.1016/j.ygcen.2017.06.017.
- (2) Sawamura R, Osafune N, Murakami T, Furukawa F, Kitano T, Generation of biallelic F0 mutants in medaka using the CRISPR/Cas9 system, Genes Cells (査読有), 22, 756-763 (2017). DOI: 10.1111/gtc.12511.

〔学会発表〕(計 16 件)

- (1) 北野健. 魚類における環境依存的な性決定に関する研究. 平成 31 年度日本水産学会春季大会. (招待講演) (2019).
- (2) 原誠二、白石絵吏、北野健. メダカの雄化機構におけるコルチゾル下流因子の探索. 平成 31 年度日本水産学会春季大会. (2019).
- (3) 堀内萌未、中司大智、長谷川祐也、萩原聖士、板倉光、山下洋、久米学、寺島佑樹、塚本勝巳、井尻成保、足立伸次. 天然ニホンウナギにおける形態的性分化開始時期. 平成 31 年度日本水産学会春季大会. (2019).
- (4) Horiuchi M, Matsuya N, Lokman PM, Ijiri S, Adachi S. Gonadal sex differentiation of wild Australian shortfin eel *Anguilla australis*, in comparison with Japanese eel. The 15th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea. (2018).
- (5) 原誠二、澤村理英、白石絵吏、北野健. メダカの雄化における GSDF の役割. 平成 30 年度日本水産学会春季大会. (2018).
- (6) 堀内萌未、松谷紀明・Lokman PM、井尻成保、足立伸次. 天然オーストラリアウナギにおける形態的性分化期の推定. 平成 30 年度日本水産学会秋季大会. (2018).
- (7) 井尻成保. ティラピア、チョウザメ、ウナギの性分化. 魚類の性決定・性分化・性転換-これまでとこれから-. 平成 30 年度日本水産学会秋季大会シンポジウム. (2018).
- (8) 北野健. 魚類の性分化におけるエストロゲンの役割. 平成 30 年度日本水産学会秋季大会シンポジウム. (2018).
- (9) 中村將. 魚類の性転換現象から何を知らることができたか. 平成 30 年度日本水産学会秋季大会シンポジウム. (2018).
- (10) Furukawa F, Hamasaki S, Osafune N, Kitano T. The role of heat shock transcription factor 1 in medaka. JSPS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium. (2017).
- (11) 古川史弥、濱崎心、長船奈津美、北野健. 熱ショック転写因子ノックアウトメダカの作製と表現型解析. 第 41 回日本比較内分泌学会. (2017).
- (12) 稲葉駿、松谷紀明、井尻成保、足立伸次. ニホンウナギの生殖腺性分化に及ぼす低密度および単独飼育の影響. 平成 29 年度日本水産学会春季大会. (2017).
- (13) Kitano T, Takenaka T, Murozumi N, Hara S. Gonadotropins and their roles on sexual development in medaka. 8th Congress of the Asia and Oceania Society for comparative Endocrinology. (招待講演) (2016).
- (14) Hara S, Murakami T, Osafune N, Kitano T. Role of estrogens on gonadal sex differentiation in medaka. 8th Congress of the Asia and Oceania Society for comparative Endocrinology. (2016).
- (15) Nakamura M. What we know from sex changes in fish? 22nd International Congress of Zoology. (招待講演) (2016).
- (16) Horiguchi R, Nozu R, Nakamura M. Changes in expression of sex differentiation-related genes during sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. 8th International Symposium on Fish Endocrinology. (2016).

〔図書〕(計 5 件)

- (1) Kitano T. Endocrine and environmental control of sex differentiation in gonochoristic fish, In: Diversity in Sex Differentiation, Reproductive & Developmental Strategies (Kobayashi, Kitano, Iwao, Kondo Eds.), Springer, 307-320 (2018).
- (2) Nakamura M, Kobayashi Y, Sex determination and control in groupers, In: Sex Control in Aquaculture (H-P Wang, F Piferrer, S-I Chen Eds.), Wiley Blackwell,

735-750 (2018).

- (3) Kobayashi Y, Nozu R, Horiguchi R, Nakamura M, Variety of sex change in Tropical Fish, In: Diversity in Sex Differentiation, Reproductive & Developmental Strategies (Kobayashi, Kitano, Iwao, Kondo Eds.), Springer, 321-347 (2018).
- (4) 北野健. 魚類の性決定, ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ (伊藤道彦, 高橋明義編集), 裳華房, 3, 76-91 (2016).
- (5) 小林靖尚, 中村將. 魚類の性転換, ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ (伊藤道彦, 高橋明義編集), 裳華房, 3, 92-106 (2016).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中村 將

ローマ字氏名：Nakamura Masaru

所属研究機関名：沖縄美ら島財団

部局名：総合研究センター

職名：参与

研究者番号 (8桁)：1 0 1 0 1 7 3 4

研究分担者氏名：井尻 成保

ローマ字氏名：Ijiri Shigeho

所属研究機関名：北海道大学

部局名：水産科学研究科

職名：准教授

研究者番号 (8桁)：9 0 4 2 5 4 2 1

(2)研究協力者

研究協力者氏名：野津 了

ローマ字氏名：Nozu Ryo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。