

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07873

研究課題名(和文)ハタ科魚類の種苗生産技術の高度化：成熟・性・不妊化に関する生理学的研究

研究課題名(英文) Sophistication of aquaculture technique for grouper: Physiological studies on maturation, sex change and sterilization.

研究代表者

小林 靖尚 (Kobayashi, Yasuhisa)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：10643786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ハタ科魚類の種苗を安定的に生産することは困難で、現在の生産技術を改良する余地が多く残されている。そこで本研究では、我々がこれまでに扱ってきた小型のカンモンハタから得られた基礎的な生理学的知見を元にして、実際に種苗生産を行っているハタ科魚類二種(キジハタ、クエ)の種苗生産技術を高度化させることを目標としている。本研究では主としてハタ親魚の性のコントロール技術の開発に取り組んだ。その結果、アンドロゲン投与によって通常メスからオスへの性転換を誘導する事に成功した。しかしながら逆方向のオスからメスへの性転換を誘導する事は出来なかった。そのためハタ科魚類の性的可塑性が性転換後に低下すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ハタ科魚類に関する研究は国内外で増加する傾向にあるが、性に関する研究は少ない。我々は長年にわたりハタ科魚類なかでも小型であるカンモンハタを実験モデルとして、その性と生殖に関する基礎研究を行ってきた。本研究では、これまでに蓄積したカンモンハタの基礎知見を、実際に養殖されている大型のハタ科魚類であるキジハタやクエに実証可能かを調べる事に最大の特徴がある。また本研究で開発されたハタ親魚の性のコントロール技術は、将来多くの他の水産重要魚種に応用されることが期待されるため水産学的波及効果は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)： Groupers of the genus *Epinephelus* are one of the most important aquaculture species in the world. The sexuality of groupers is almost protogynous hermaphrodite. Therefore, in general, males of a species are larger than females. Larger males in the wild have decreased remarkably in numbers, owing to overfishing so, although both males and females are essential for offspring production, collecting larger male groupers from the field is very difficult. In this study, we developed sex control method of groupers. Androgen treatment easily induced normal sex change in Longtooth grouper. However, it was not possible to induce reverse sex change (male-to-female) in Redspotted grouper. Therefore, it was considered that the sexual plasticity of grouper decreased after sex change.

研究分野：農学

キーワード：ハタ科魚類 キジハタ クエ 性転換

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ハタ科魚類の増養殖の現状：ハタ科魚類は、メスからオスへ性転換する雌性先熟型の生殖様式をもつ魚で、本州中部からインドまで広く棲息する。本科魚種は、美味であることから市場価値が極めて高い(8,000-10,000 円/kg)。そのためハタ科魚類の資源増大が強く望まれており、東アジア諸国を初めとして世界各国で、ハタ科魚類の種苗生産が盛んに行われている。そのなかで我が国のハタ科魚類の種苗生産は、世界に先駆けて昭和五十年代から試みられている。多くの研究者による長年の努力の結果、現在では7種のハタ科魚類の増養殖が可能となり、西日本各地で種苗の量産化が実施されている。しかしながら近年、養殖現場から「種苗生産が安定しない」「親魚の確保/維持が困難」などの新たな問題が提起されている。加えて早く育つ優良種苗への需要も高まっている。つまりハタ科魚類の増養殖は、養殖魚の優等生であるマダイの様に、計画的に、効率良く、容易に優良な種苗の生産が行われる次のステップへ移行する時期に差し掛かっていると考えられる。そのためにはハタ科魚類の繁殖に関する基礎的な知見を元にして既存の種苗生産技術を高度化させる必要が有る。しかしハタの繁殖に関する生理学的研究は国内外を見渡しても限られている。これはハタ科魚類が大型で高価であることから、サンプル数を確保することが困難で有る事に原因がある。そこで我々は、ハタ科魚類の中でも容易に確保でき、且つ小型で実験室内飼育が可能なカンモンハタ(*Epinephelus merra*)を実験モデルとして、その繁殖および性転換の生理機構を解析してきた(引用①)。

### 2. 研究の目的

前述の通り、これまでに我々はハタ科魚類の中で体サイズが小さいカンモンハタを用いて、その生殖および性転換機構を解析してきた。本研究ではカンモンハタで得られた知見を、他のハタ科魚類に応用することにより、種苗生産技術を高度化させることを目指した。そのため本研究では、種苗生産されているハタ科魚類の代表種であるキジハタ(*E. akkara*)とクエ(*E. bruneus*)を用いた。

### 3. 研究の方法

#### (1) キジハタにおける逆方向の性転換(オス→メス)誘導：

ハタ科魚類は、最初にメスとして成熟する。その後、かなり成長してからオスへと性転換する。このような繁殖様式を持つためハタの種苗生産では、オスの親魚を確保することが困難となる。しかし西日本で養殖されているキジハタ(*E. akkara*)に関しては、これとは全く逆の状況である。つまりキジハタのメスを育成中に意図しない性転換が多く起こり、結果として親魚の性比がオスへと大きく偏る。これはキジハタ親魚の養育環境によって性転換が誘導されたと考えられるが、その詳細は明らかになっていない。現在、キジハタでは親魚を三年ごとに更新することで、親魚の性の偏り問題を解決している。しかし、このような親魚の更新は、資金や労力を要するばかりではなく、ブランド化を見越した優良種苗選抜への足枷となる。そのため本研究では、キジハタのオス親魚を用いて通常起こらない「オスからメスへの逆方向の性転換」を人為的に誘導できるのかを下記の方法を用いて検討した。

これまで我々は、カンモンハタを用いた研究で通常のメスからオスへの性転換の開始には、性ステロイドホルモンであるエストロゲンの急減が重要であることを見出している。ハタのオスに性的可塑性が残されていると仮定すると、減ったエストロゲンをオスに補填すれば逆方向のメスへの性転換が誘導できると考えられる。そこで本研究では、キジハタのオスに、エストロゲン(EE2: ethinylestradiol)と、アンドロゲンの受容体への結合を阻害するフルタミドをオスモティックポンプにより投与し、精巣に与える影響を組織学的に解析した。

#### (2) メチルテストステロン投与によるクエのメスからオスへの性転換誘導：

研究代表者の異動に伴い平成29年度よりクエ(*E. bruneus*)を実験対象とした。クエはハタ科魚類の中では北方に生息する種である。そのため成長が遅くメスの初回成熟は4-6歳で起こる。また他のハタ科魚類と同様にオスは性転換によって生じるため、排精可能なオスの確保には永い年月とコストが必要となる。本研究では最初にクエのオスを計画的かつ安定的に確保することを目的として、メスに合成アンドロゲン(MT)を投与し人為的な性転換誘導に取り組んだ。

実験には6歳魚のクエを使用した(1.6-3.8kg)。投与はコレステロールペレットによって行い、二つの濃度区を設けた(低濃度群: MT 1mg/kg, 高濃度群: MT 2mg/kg)。投与1-2ヶ月後に、実験魚の排精の有無を確認すると共に、生殖腺を採取し性転換の状況を組織学的に観察した。精子が得られた場合は、運動性等を確認後、人工授精を行い、受精率、孵化率等を調査した。

またクエの性転換/成熟に関する網羅的な基礎データ取得を目指して、卵巣と精巣のRNA-seqも行った。

#### (3) 海産養殖魚の不妊化技術の開発：

一般的に多くの魚は、成熟に伴って体内に蓄積した多くの栄養を生殖腺の発達に用いる。故に成熟することによって魚の成長は停滞し、身が細り、味も落ちる。そのため養殖現場では、生殖細胞が欠損/性成熟しない「不妊魚」の作出が熱望されている。しかし不妊魚の作出には、煩雑な染色体操作や薬剤を用いる必要があるため、ニーズはあるものの現実化していない。我々はナイルティラピア(*Oreochromis niloticus*)の孵化稚魚を高水温で長期間飼育する事(37℃, 40

日間)のみで不可逆的な不妊化を誘導出来る事を明らかにした(引用②)。当初、この高水温飼育による不妊化誘導をハタ科魚類に試みる予定であったが、研究期間中にハタ科魚類の孵化稚魚を用いる事が出来なかった。そこで本研究では、海産養殖魚シロギス(*Sillago japonica*)の稚魚を用いて高水温飼育が生殖腺に与える影響を調べた。具体的には性分化前の孵化後70日齢のシロギス稚魚を32℃の高水温にて90日間育成し、生殖腺を組織学的に観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) キジハタにおける逆方向の性転換(オス→メス)誘導：

キジハタのオスに EE2 とフルタミドを1ヶ月投与した結果を図1に示す。対照群および低濃度群(EE2: 10 µg/µl, フルタミド: 2 mg/µl)の生殖腺は、全て成熟した精巣であった(図1A)。一方、高濃度群(EE2: 100 µg/µl, フルタミド: 2 mg/µl)の生殖腺内には、成熟した精巣組織内に多数の周辺仁期の卵母細胞が観察された(図1B & C)。これらの卵母細胞はEE2にて誘導されたと考えられる。また増殖細胞核抗原(PCNA)に対する一次抗体を用いた免疫染色を行った結果、未熟な生殖細胞の増殖も確認された。しかし卵黄形成の進んだ卵母細胞は観察されなかった。そのため本手法によるキジハタの逆方向性転換は困難で有ると考えられた。これはキジハタの性転換が不可逆的な現象で、オスの精巣には性的可塑性が残されていない事を示しているかもしれない。しかし、養殖現場においてキジハタの逆方向性転換を誘導して大型のメスを作成するメリットは、非常に大きい。今後は、エストロゲンの投与濃度や期間について検討を行う予定である。

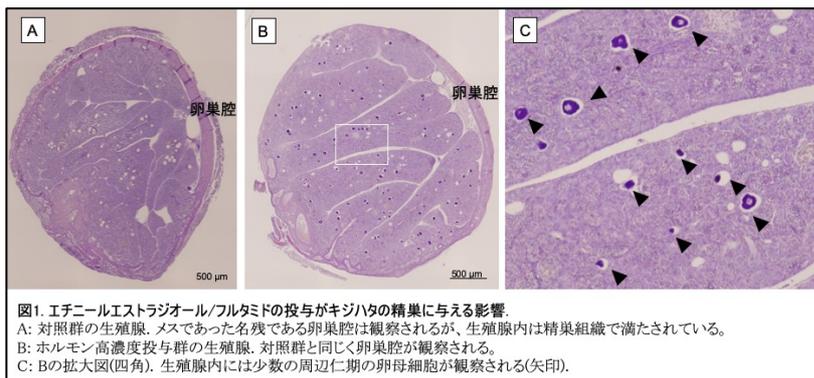


図1. エチニルエストラジオール/フルタミドの投与がキジハタの精巣に与える影響。  
A: 対照群の生殖腺。メスであった名残である卵巣腔は観察されるが、生殖腺内は精巣組織で満たされている。  
B: ホルモン高濃度投与群の生殖腺。対照群と同じく卵巣腔が観察される。  
C: Bの拡大図(四角)。生殖腺内には少数の周辺仁期の卵母細胞が観察される(矢印)。

##### (2) メチルテストステロン投与によるクエのメスからオスへの性転換誘導：

投与した全ての試験区において性転換が誘導され、排精も確認された(図2)。特に高濃度処理群では排精個体率が100%と高かった。また得られた精子の運動性にも問題が見られず、人工授精試験においても正常孵化を観察出来た。これらの結果から、クエはMTペレット処理により2ヶ月程で雄性化が可能で有ることが明らかになった。しかしMTで誘導されたオスの排精量は非常に少なかった。そのため今後はクエの排精量を増加させる検討を行う予定である。

加えて誘導された性転換オスが再びメスに戻らない事実も確認した。上記のキジハタの結果も含めると、ハタ科魚類の成体の性転換は不可逆的である可能性が高いと考えられた。

さらにクエの生殖腺(卵巣/精巣)のRNA-seqを行った結果、185,486本のcontigを得ることが出来た(N50 = 1453bp)。この内アノテーションが付いた遺伝子数は66,625本であった。これらのデータは、今後の解析の基盤となると考えられる。

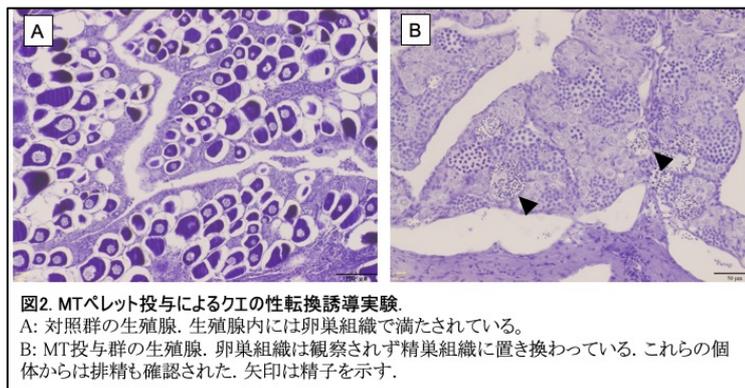


図2. MTペレット投与によるクエの性転換誘導実験。  
A: 対照群の生殖腺。生殖腺内には卵巣組織で満たされている。  
B: MT投与群の生殖腺。卵巣組織は観察されず精巣組織に置き換わっている。これらの個体からは排精も確認された。矢印は精子を示す。

##### (3) 海産養殖魚の不妊化技術の開発：

孵化後70日齢のシロギス稚魚を32℃の高水温にて90日間育成した結果、生殖腺の成長が大きく阻害されることを明らかにした。しかしながら処理した個体群を通常水温に戻し210日間にかけて飼育したところ(210日間)、対照群と変わらず生殖腺が発達した。これは高水温によってシロギスの生殖細胞を完全に除去できなかったためであると考えられる。今後は、生殖細胞を完全に除去し、且つ個体が死亡しない水温を探る予定である。

#### <引用文献>

- ① 泉田 大介, 小林 靖尚, 征矢野 清. ハタ科魚類の増養殖を支える科学 I 章 生殖の化学. 2014. 水産学シリーズ 181. ハタ科魚類の水産研究最前線. 9-20.
- ② Pandit NP, Bhandari RK, Kobayashi Y, Nakamura M. High temperature-induced sterility in the female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. 2015. Gen. Comp. Endocrinol. 213: 110-117.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Yasuhisa Kobayashi, Ryo Nozu, Masaru Nakamura. Expression and Localization of two gonadotropin receptors in gonads of the yellowtail clownfish, *Amphiprion Clarkii*. Journal of Aquaculture and Marine Biology, 2017, 5. (査読あり) DOI:[10.15406/jamb.2017.05.00120](https://doi.org/10.15406/jamb.2017.05.00120)
- ② 山本 昌幸, 小林 靖尚. 瀬戸内海中央部におけるキジハタ *Epinephelus akaara* の産卵期と肉眼的観察による性判別の信頼性. 水産増殖, 2017, 165-169. (査読有り) DOI:[10.11233/aquaculturesci.65.165](https://doi.org/10.11233/aquaculturesci.65.165)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 中田 久, 菅野航太郎, 山本眞司, 中務 寛, 服部亘宏, 小林靖尚, 村田 修, 升間主計. メチルテストステロンのコレステロールペレット処理によるクエの雄性化誘導. 2019 年 3 月. 日本水産学会.
- ② 山本 昌幸, 小林 靖尚. キジハタの産卵期と肉眼観察による性別判定の信頼性. 2017 年 3 月. 日本水産学会.

[図書] (計 2 件)

- ① Masaru Nakamura, Yasuhisa Kobayashi. Sex Differentiation, Sex Change, and Sex Control in Groupers. In: Sex Control in Aquaculture. 2019, Chapter 38, 735-750. DOI:[10.1002/9781119127291.ch38](https://doi.org/10.1002/9781119127291.ch38)
- ② Yasuhisa Kobayashi, Ryo Nozu, Ryo Horiguchi, Masaru Nakamura. Variety of Sex Change in Tropical Fish. In: Reproductive and Developmental Strategies. 2018, 321-347.

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

該当なし

### (2) 研究協力者

研究強力者氏名 : 山本 昌幸

ローマ字氏名 : (YAMAMOTO, Masayuki)

※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。