

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14521

研究課題名（和文）イカ類の性分化、性成熟における生殖腺組織構築及びGnRH作用メカニズムの解明

研究課題名（英文）Gonadal construction and GnRH action mechanism in squid sexual differentiation and maturation

研究代表者

村田 良介（Murata, Ryosuke）

長崎大学・海洋未来イノベーション機構・助教

研究者番号：40809159

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：カミナリイカの生殖腺の性分化過程を組織学的に調べた結果、本種の生殖腺の性分化は孵化前の時点から開始することが明らかになった。生殖腺の性分化に伴う脳内GnRH-like発現変動を定量PCR及び免疫組織化学により調べた結果、発現変動に雌雄差は認められず、性分化へのGnRH-likeの関与は不明であった。本種の初期発生は18℃以上の水温帯では高水温ほど早く進行することが明らかになった。アオリイカの生殖腺発達に伴う脳内GnRH-like発現変動を定量PCRにより調べた結果、卵巣発達との関連は認められなかった一方、精巣発達との関連性が認められ、本種の精子形成へのGnRH-likeの関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、海洋環境変動によるイカ類の生殖機能への生理的影響を評価する際の基盤となる知見を得ることができた。また、本研究により得られたイカ類の生殖生理メカニズムに関する基礎知見は、イカ類の増養殖技術開発を行う際に必須となる。以上の点において本研究により得られた成果はイカ類資源の持続可能な利用と増殖への発展が期待される。無脊椎動物に広く存在が知られているGnRH-likeは、その具体的な機能に関する知見が不足している。本研究結果によりイカ類に関してはGnRH-likeは性分化への関与は少なく、性成熟に関しては精子形成への関与が示されたことから頭足類の生殖生理学的側面の理解が深まった。

研究成果の概要（英文）：Histological examination of the gonad sex differentiation process of Kisslip cuttlefish, *Sepia lycidas*, revealed that the gonad sex differentiation of this species begins before hatching. As a result of investigating the fluctuation of GnRH-like expression in the brain associated with sexual differentiation of the gonad by qPCR and immunohistochemistry, no difference between male and female was observed in the expression levels, and the involvement of GnRH-like in sexual differentiation was unknown. It was clarified that the embryogenesis of this species progresses faster at higher water temperatures in the water temperature zone above 18 °C. As a result of investigating changes in GnRH-like expression in the brain associated with gonad development of Bigfin reef squid, *Sepioteuthis lessoniana*, by qPCR, no association with ovarian development was observed, but association with testis development was observed, suggesting the involvement of GnRH-like on their spermatogenesis.

研究分野：環境生殖生理学

キーワード：アオリイカ カミナリイカ 卵巣 精巣 性分化 性成熟 GnRH-like peptide 性ステロイドホルモン

1. 研究開始当初の背景

イカ類は美味で独特な食感を持つことから、日本国では古くから食用として親しまれている。しかし、日本国におけるイカ類の漁獲量は、この10年の間で約30万トンから10万トンにまで減少している(農林水産省資料, 2016)。そのためイカ類資源の増大が求められており、将来的にはイカ類の増養殖技術の開発が必要になると予測される。

海洋生物における急激な資源量減少は、海水温の上昇(海洋温暖化)や海洋酸性化、藻場の減少(磯焼け)などの海洋環境変動によって引き起こされることが知られている。例えば魚や貝、ウニなどにおいて高水温や酸性化による生殖機能の阻害が報告されている(Kawaguchi et al., 2013; Pandit et al., 2015)。イカ類の生殖機能に環境変動が及ぼす影響を調べるためには、イカ類の生殖に関する生理学的な知見が必要となる。特に発生後間もない生殖腺の性分化が起こる時期は生殖機能が環境変動などによる外部からの刺激を受けやすい時期であるため、性分化に関する生理学的な知見は必須となる。また、イカ類増養殖技術開発を行う上でも性成熟に関する知見は必須である。しかし、イカ類はこれまで安定した資源量推移を示していたため、資源保護や増養殖への応用を目的とした生殖生理学的研究は行われてこなかった。また、飼育、育成が困難でありサンプルの安定確保が難しいことも、イカ類の生殖生理に関する研究の妨げとなってきた。本研究ではイカ類の生殖腺の性分化、発達、性成熟過程を組織学的に観察すると共に、生殖生理メカニズムの解明を目指す。

無脊椎動物の中でも高等な軟体動物においては、脊椎動物と同様の性ホルモンが生殖腺の発達に影響することが報告されている(Scot 2013; Liu et al., 2014)。いずれの報告も頭足類における性ホルモンの存在を示している一方で、性ホルモンの産生場所や伝達経路、具体的な生殖生理学的役割などの詳細は謎に包まれている。近年、数種の軟体動物において、脊椎動物における生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンに相当するGnRHが同定された(Minakata and Tsutsui, 2016)。GnRHは主に視柄腺で合成され、生殖腺における性ホルモン合成を促すことが器官培養実験系により証明されているが、生体内における具体的役割に関しては未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、沿岸性のコウイカ類であるカミナリイカ *Sepia lycidas* と、美味であるため高級食材として知られるツツイカの仲間であるアオリイカ *Sepioteuthis lessoniana* をモデルとして、イカ類の生殖生理メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) カミナリイカの生殖腺性分化過程の組織学的観察と脳内GnRH発現変動

野外から採集した本種を水槽内に収容し、自然産卵した受精卵を孵化させた。孵化14日前、孵化後1, 10, 20, 30, 90, 150日目(days-post hatching, dph)に、それぞれ8から15個体の稚イカをサンプリングし、生殖腺の組織学的観察を行った。

未成熟のカミナリイカ雌個体の脳から *gnrh* をクローニングし、生殖腺性分化に伴う脳内 *gnrh* 発現変化をリアルタイム定量PCRにより調べた。次に脳内GnRHの発現局在を調べるために、GnRHに対する特異抗体を作製し、免疫染色を行なった。

カミナリイカの性分化に果たす役割を明らかにするために、性的に未分化なカミナリイカの胚が持つ外部卵黄嚢に生理食塩水に溶かした合成GnRHを注入し生殖腺発達へのGnRHによる影響を組織学的に調べた。

(2) カミナリイカの生殖腺性分化及び脳内GnRH発現に及ぼす水温の影響

飼育下にて得られた本種の受精卵を、18, 21, 24, 27, 30°Cの5つの水温帯にて孵化後1ヶ月目まで育成し、個体の初期発生、生殖腺発達、脳内GnRH発現に及ぼす影響を調べた。

倍数体作出による本種の不妊化を目的として、産卵直後の受精卵を0°C処理することによる生殖腺への影響を調べた。

(3) カミナリイカの生殖腺発達に伴う脳内GnRH発現及び性ステロイドホルモン変動

本種の非繁殖期である2018年12月と、繁殖期である2019年4月に長崎県沿岸にて捕獲された本種雌雄成体を材料とした。まず、脳の各部位における *gnrh* 発現量を定量PCRにより調べた。次に特異抗体を用いた免疫染色により脳内GnRHの発現局在を調べた。血中及び生殖腺中の性ステロイドホルモン(エストラジオール17 β 、テストステロン)濃度をELISA法により測定した。本種の卵巣、精巣1検体ずつをRNAseq解析に供し、生殖腺にて発現する遺伝子カタログの作成を行なった。カミナリイカの成熟・産卵を制御する環境要因を明らかにするために、飼育下

にて育成したカミナリイカ未熟個体の雌雄ペアを、12月~2月の期間、昇温、長日化処理、長日化処理のみ、自然水温日長、の3群を用意し、産卵の有無を調べた。

(4) アオリイカの生殖腺発達過程の組織学的観察と脳内 GnRH 発現変動

本種の産卵期とされる4~6月と、非繁殖期である3月と11月に長崎県沿岸で釣獲された本種を用いた。サンプリングの際には5%海水エタノールにて麻酔を施した後、体重・外套背長・生殖腺重量・生殖付属器官重量を計測した。生殖腺、脳を採取し、生殖腺は生殖腺体指数 (GSI) の算出及び組織学的観察に、脳は遺伝子解析に供した。生殖腺はダビッドソン液で固定し、組織切片を作成した。ヘマトキシリン・エオシンで染色して、実体顕微鏡で組織を観察し、各個体の生殖腺の組織状態に基づき成熟ステージの判定を行った。脳は、Total RNA を抽出して *gnrh-like* のクローニングに用い、脳内 *gnrh-like* 発現量を定量 PCR により測定した。

4. 研究成果

(1) カミナリイカの生殖腺性分化過程の組織学的観察と脳内 GnRH 発現変動

孵化14日前の稚イカの胴体後部、内部卵黄嚢の間隙に、生殖細胞を含む未分化生殖腺が形成されていた。その後、生殖細胞の活発な増殖により、卵巣の分化が1dphの時点で判別できた。10dphになると卵巣内に無卵黄前期の卵母細胞が出現し始め、その数は徐々に増加し、90dphの卵巣は無卵黄前期の卵母細胞によって満たされていた。150dphになると一部の個体の卵巣において濾胞細胞が卵母細胞の細胞質に陥入し、卵黄形成を開始した大型の卵母細胞が認められた。精巣の分化は、1~30dphまで生殖細胞の増殖が見られず、90dph以降に生殖細胞がシストを形成し活発に増殖することで判別できた。150dphの精巣では活発な精子形成が認められた。本研究成果は国際学術雑誌に掲載された。

gnrh は性的未分化期に既に発現しており、その発現量は性分化開始時期(卵巣分化期)に有意な上昇を示した。その後、*gnrh* の発現量は急激に減少し、精巣分化期、及びその後の発達段階において常に低い発現量を示した。*gnrh* の発現量に雌雄差は見られなかった。免疫染色の結果、性的未分化期の脳内後方の少数の細胞及び軸索に GnRH 陽性反応が検出された。その後、性分化の開始と生殖巣の発達に伴い、GnRH 陽性反応は脳の後方に位置する外套内臓葉、脳深部、視索、眼柄腺近傍へと分布域を広げたが、その強度及び分布に雌雄差は認められなかった。本研究成果は国際学術雑誌に掲載された。

GnRH の濃度に関わらず性比及び生殖腺組織への影響は認められなかった。抗 GnRH 抗体投与による障害実験も同時に実施したが、こちらも性比及び生殖腺性分化への影響は見られなかった。試薬の注射により孵化率は50%ほど低下することが分かった。

(2) カミナリイカの生殖腺性分化及び脳内 GnRH 発現に及ぼす水温の影響

18°C においてのみ孵化率が顕著に低下したことから 18°C は本種の適正水温範囲外であることが明らかになった。21°C 以上の水温帯では水温の上昇に伴い孵化日数、孵化後2週間の成長、脳内 GnRH 発現量が増加することが明らかになった。一方、生殖腺の性分化、発達への水温の影響は認められなかった。水温による性比への影響も見られなかった。以上の結果から本種の脳内 GnRH は胚発生や孵化に関与している可能性が示唆された。本研究成果は国際学術雑誌への投稿準備中である。

本種の不妊化を目的として、産卵直後の受精卵を0°C 処理することによる生殖腺への影響を調べたが、孵化率が10%以下まで低下し、孵化した個体の生殖腺は対照個体と比べて差のない分化・発達を示したことから、本種は初期発生期間の低温に弱く、魚類において実施されているような低温処理による不妊化の適用は難しい可能性が考えられた。

(3) カミナリイカの生殖腺発達に伴う脳内 GnRH 発現及び性ステロイドホルモン変動

定量 PCR の結果、視柄腺及び視索における *gnrh* 発現量は雌雄共に非繁殖期に高い傾向を示したのに対し、脳では逆に繁殖期に高い傾向を示した。免疫染色の結果、視索において非繁殖期に強い陽性反応が検出されたが、繁殖期になると陽性反応は消失した。一方、脳では非繁殖期に外套内臓葉近傍に分布するグリア細胞に陽性反応が検出され、繁殖期になるとグリア細胞に加えて神経細胞にも陽性反応が認められた。以上の結果から、本種の視索と脳で発現する GnRH は、非繁殖期と繁殖期においてそれぞれ異なる役割を持つ可能性が示唆された。

本種の繁殖期及び非繁殖期の生殖腺からステロイド抽出を行い、エストラジオール17ベータとテストステロン量を測定したところ、個体によって値に大きなバラつき(10~900 pg/ml)が認められ、生殖腺発達との関与は不明であった。

RNAseq 解析により得られた生殖腺発現遺伝子カタログ情報を参考にし、カミナリイカの生殖細胞マーカー候補因子である *piwi* 遺伝子と、GnRH 受容体遺伝子のクローニングを行い、ISH用のプローブ合成と定量 PCR 用プライマーの設計を行なった。

カミナリイカの成熟・産卵を制御する環境要因を明らかにするために、飼育下にて育成したカミナリイカ未熟個体の雌雄ペアを、12月~2月の期間、昇温、長日化処理、長日化処理のみ、自然水温日長、の3群を用意し、産卵の有無を調べた。その結果、の雌個体

のみ、長日化終了後1週間後に産卵した。しかし産卵数はごく少量であり発生の進行も見られず未受精卵であると考えられた。卵巣の状態も未熟であり、卵黄形成途上の状態であった。雌個体は実験期間中に産卵は確認されなかったが、実験終了後の卵巣は卵黄蓄積が完了した卵で満たされた状態であった。このことから本種の産卵開始には光情報が重要である一方、水温上昇は産卵の抑制と卵黄蓄積の進行を促す作用がある可能性が示唆された。

(4) アオリイカの生殖腺発達過程の組織学的観察と脳内 GnRH 発現変動

生殖腺の組織学的観察から、11月から3月にかけて卵巣、精巣共に性成熟が進行し、4~6月には最終成熟に達することが明らかになった。*gnrh-like* 塩基配列の特定では、本種において発現している *gnrh-like* が初めてクローニングされ、268 bp の塩基配列を特定することができた。この配列は既知のケンサキイカの *gnrh-like* 塩基配列と 92% 一致していた。また、推定されるアミノ酸配列の機能領域は、マダコの GnRH-like の機能領域と 100% 一致していたため、それぞれの類縁度が高いことが示された。脳内 *gnrh-like* 発現量と生殖腺発達の関係性を調べた結果、本種のメスの脳内 *gnrh-like* 発現量と卵黄蓄積や濾胞細胞の陥入との間に明確な関係性は見られなかった。一方、オスでは、成熟段階ごとの有意差は見られなかったものの、精子形成に向かうにつれて脳内 *gnrh-like* 発現量に上昇傾向が見られた。ホタテガイにおいて、GnRH-like が精子形成を加速させるという可能性が示唆されていることから、本種においても GnRH-like が精子形成に寄与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Murata Ryosuke, Mushirobira Yuji, Tanaka Yoshiaki, Soyano Kiyoshi	4. 巻 304
2. 論文標題 Expression profile of GnRH-like peptide during gonadal sex differentiation in the cephalopod kisslip cuttlefish, <i>Sepia lycidas</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 113718 ~ 113718
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygcen.2021.113718	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murata Ryosuke, Mushirobira Yuji, Fujita Takeshi, Soyano Kiyoshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Gonadal sex differentiation and development during early ontogenesis in the breeding kisslip cuttlefish (<i>Sepia lycidas</i>)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e01948
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2019.e01948	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 村田良介 薙平裕次 征矢野清
2. 発表標題 カミナリイカの性成熟に伴う脳内 GnRH 発現解析
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村田良介・薙平裕次・征矢野清
2. 発表標題 カミナリイカの性分化に伴う脳内GnRHの発現解析
3. 学会等名 令和元年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryosuke Murata, Yuji Mushiobira, Kiyoshi Soyano
2. 発表標題 Gonadal sex differentiation and the expression pattern of GnRH in the brain of kisslip cuttlefish, Sepia lycidas
3. 学会等名 The 16th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shoma Yoshida, Ryosuke Murata, Kiyoshi Soyano
2. 発表標題 Temperature effects on gonadal sex determination and differentiation in kisslip cuttlefish (Sepia lycidas)
3. 学会等名 The 16th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

環東シナ海環境資源研究センターHP http://www-mri.fish.nagasaki-u.ac.jp/ja/ 環境生殖生理学研究室HP https://sites.google.com/site/muratalabhome/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	征矢野 清 (Soyano Kiyoshi) (80260735)	長崎大学・海洋未来イノベーション機構・教授	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	莚平 裕次 (Mushirobira Yuji) (20806971)	長崎大学・海洋未来イノベーション機構・特任研究員	2022年度以降：高知大学，教育研究部自然科学系農学部門，助教
研究協力者	田中 議頭 (Tanaka Yoshiaki)	島根県立しまね海洋館・魚類展示課・獣医師	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関