

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19580207

研究課題名（和文） フィンガープリント法を用いたトラフグ性特異的ゲノム領域の決定

研究課題名（英文） Analysis of the mechanism of sex determination and gonadal sexual differentiation of the pufferfish, *Takifugu rubripes*

研究代表者

山口 明彦（Akihiiko Yamaguchi）

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：10332842

研究成果の概要（和文）：トラフグ稚魚の性分化可塑期に、女性ホルモン合成酵素（アロマターゼ）の阻害剤を加えた食餌法を行い全雄化に成功した。一方他魚種でよく用いられる高温処理による性転換はトラフグには適応できなかった。トラフグ稚魚期の生殖腺器官培養系を構築し、アロマターゼの発現を指標に性転換機構を解析した。その結果、稚魚期生殖腺でのアロマターゼ合成が濾胞刺激ホルモンの添加により制御可能であることを初めて示した。

研究成果の概要（英文）：In order to assess the involvement of aromatase and sex steroids in gonadal differentiation, an aromatase inhibitor (AI) was administered to developing pufferfish (torafugu) till the 100th day after hatch. AI inhibits ovarian cavity formation, and then irreversible sex change (female to male) was observed. High temperature treatment, which is used for sex reversal of many fishes, induces gonadal degeneration in the pufferfish. We also show that aromatase expression can be regulated by gonadotropin using our newly developed in vitro gonad culture system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生殖生物学・細胞生物学

科研費の分科・細目：水産学一般・遺伝 育種

キーワード：内分泌・配偶子形成・環境要因・ステロイドホルモン

1. 研究開始当初の背景

魚類ではその品種によりオス、メスで商品価値の異なるものが多いことが知られている。その理由から、魚類の簡易性操作、性別判別技術の開発は産業的にも要望が高い。魚類の遺伝的性は、受精直後に染色体レベルで決定されると考えられるが、性染色体が明らかになっている魚種は少ない。また、生殖腺は置かれた環境下(温度、PH、社会環境など)で

オスにもメスにも変化する可塑性がある事が知られ、魚種によってその仕組みも異なる事が多く知られている。2000年にメダカで魚類初の性決定遺伝子 **DMY** が同定されたが、性決定遺伝子は魚種ごとに異なることが明らかになりつつあったが、海産魚では全く解析されていない状況であった。トラフグは東シナ海で漁獲される日本人が好む魚種の一つであり、特にオスは精巣が白子として重宝さ

れ付加価値が高いので、全オス化の技術開発が望まれている。一方、トラフグは脊椎動物で一番コンパクトなゲノムサイズを持っており、すでに90%以上のDNAが解読されていた。ゲノム情報は主に比較ゲノミクスとして利用されていたが、水産業への応用はまだ考えられていなかった。

多くの魚種では性決定と性分化は異なるレベルで制御されており、遺伝的雌雄と個体の雌雄(精巣をもつか卵巣をもつか)は別と考えられている。トラフグでは高温処理やホルモン処理など一般に他魚種で行われている性転換の技法が適応できるかどうかという基本的な情報も得られてはなかった。

我々の研究室において、18°Cの飼育下ではトラフグ生殖腺は孵化後42日以内に性分化が起きており、更に脊椎動物で保存されている遺伝子 *DMRT1* が精巣特異的に発現していることを見つけていた。従って、トラフグゲノムの情報を利用した分子生物学的手法により、トラフグにおける性決定および生殖腺の性分化機構の解明が可能となり、得られた結果は食に安全なトラフグ全オス化という水産種苗業界で極めて要求の高い技術に還元できると考え、本研究はスタートした。

2. 研究の目的

当初は、フィンガープリント法を用いて性決定ゲノム領域を絞りこむという考えで研究を計画していたが、2007年に他研究室でトラフグの性決定領域が報告されたため、本研究の目的と手法を大幅に修正し、トラフグに魚類特有の性転換機構を誘導できるか、否か、また、生殖腺の性分化機構を明らかにするための実験を行った。

(1) 環境要因(温度) およびステロイドホルモンによるトラフグの性分化への影響

多くの魚種で温度処理やエストロゲンの被ばくにより性比の偏りが報告されていたので、環境要因、特に温度処理による性転換誘導がトラフグでも起こるのか調査した。また、エストロゲン処理あるいはエストロゲン合成酵素であるアロマターゼ阻害による性転換の誘導実験を行うことにより、性分化調節機構の鍵となる因子や酵素およびそれらの制御機構を明らかにする。また、地球温暖化により海水の温度も急激に変化しており、そのような環境下でさまざまな海産魚の世代交代がどのような運命を辿るのかを予測することも大切である。その一例としてトラフグ稚魚を高温処理し飼育するという意味もあった。

(2) トラフグ初期生殖腺器官培養系を用いた性分化機構の解析

他魚種(ウナギやティラピア等)では生殖腺

の器官培養系が確立されており、さまざまな因子やホルモンの効果を添加実験等によって調べることにより、性分化機構を詳細に解析している。海産魚のトラフグでも、器官、組織レベルでの性転換実験を試験管内で再現できる器官培養系を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 温度処理は20、26、29、32°Cの4段階でヒータを加え、加温を行った。エストロゲン合成酵素であるアロマターゼ阻害剤(AI: フアドロゾール)は食餌法により摂取させた。処理期間は生殖腺の性分化時期の孵化後1-2週間目から約100日齢前後まで行い、経時的に生殖腺の組織切片、生殖細胞特異的に発現する遺伝子(*VASA*)、雌雄特異的な遺伝子発現する遺伝子(*p450CYP19*, *DMRT1*等)を用いたRT-PCR法やISH法を用いてmRNAの発現と分布を解析した。また、AI処理したトラフグにおいては、脳、生殖腺のアロマターゼmRNAレベルと血清中のホルモン濃度(エストロゲン、11-KT、テストステロン)をELISA法により測定した。

(2) トラフグ稚魚(孵化後42日齢前後)から顕微鏡下で生殖腺を含む筋肉組織を摘出し、さまざまな培地条件で培養を行い、細胞増殖率の高い培地組成を検討した。各個体の生殖腺を器官培養後の組織切片観察およびアロマターゼ発現パターンを解析した。性分化時期の性決定領域(*f2006*)を用いたSTR解析により判定した。更にコントロール区と生殖腺刺激ホルモン(FSH)添加区で初期生殖腺を培養し、アロマターゼ発現を免疫組織化学法によって解析した。

4. 研究成果

(1) トラフグは稚魚期(孵化後100日間)の高温処理(29度まで)では、性のふらつきはなく遺伝的性と一致していた(図1)。32度まで温度を上げると両生殖腺において生殖細胞が死滅し、生殖細胞の失われた卵巣においては雄特有の遺伝子 *DMRT1* の発現が誘導された。これは、生殖細胞とそれを取り囲む濾胞組織との接触が失われた事が原因と推測される。生殖細胞欠損型メダカやゼブラフ

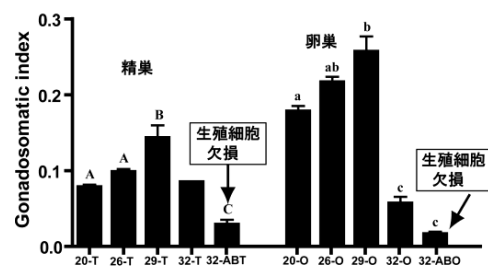


図1 トラフグ(孵化後260日齢)の温度処理の影響と生殖腺指数(GSI)

イシユにおいても類似の報告があり、トラフグにおいても性的可塑性においては、体細胞と生殖細胞間の相互作用が、生殖細胞とそれを取り囲む体細胞組織の性決定に重要である事が示された(文献2)。

エストロゲンは多くの魚種で雌化を引き起こす女性ホルモンであるが、エストロゲンを混合した食餌法では、トラフグ稚魚は中間的な生殖腺を有し、完全なメス化(オスからメスへの性転換)を引き起こせなかった(文献1)。一方、アロマターゼ阻害剤(AI)を加えた食餌法では、完全な雄化(メスからオスへの性転換)が誘導できた。また、アロマターゼ mRNA とステロイドホルモンのレベルでも AI の阻害効果は顕著に表れていた(図2)。これは、AI 処理によって、アロマターゼの酵素活性だけではなく mRNA の転写レベルでも負の制御を誘導したことになる。AI 処理による生殖腺の性分化は非可逆的であり、AI を含まない通常の飼料に戻しても精巣が卵巣に転換することはなかった。

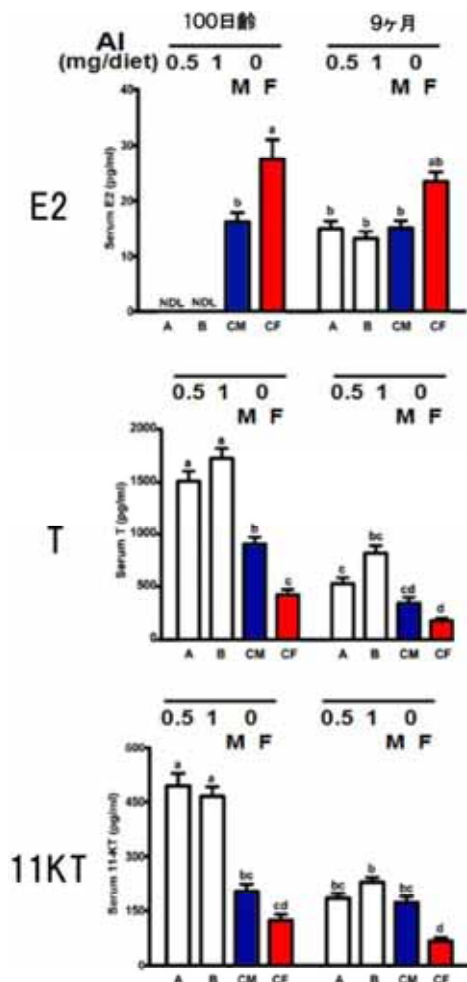


図2 AI処理によるトラフグ血清中のステロイド濃度の変化
上からE2、テストステロン、11KT
A,B(白), AI濃度0.5 1.0mg/diet
CM(青) 無処理オス; CF(赤)無処理メス

これらの実験結果から、トラフグでは薬剤を用いずアロマターゼ活性をどのように阻害するかが、種苗での性統御の鍵となることが明確になった。従って、アロマターゼ活性を安全に抑制する方法を探索することが重要と考えられた(文献3)。

(2) 生殖腺組織を浮遊させるため、フィコールの濃度を5%、仔牛血清20%を含むL15培地を基本に20°Cで約2週間の培養が可能となった。また、無添加区の正常卵巣でのみアロマターゼ発現が確認できたが、ブタ濾胞刺激ホルモン(FSH)の添加区では、濃度依存的に発現抑制が確認できた。トラフグ性分化期の脳下垂体では、FSHの発現は非常に低くISH法では検出以下であるから、通常の性分化期間には生殖腺刺激ホルモンの分泌がない事が性分化には必要であると考えられた。この結果は、通常の性分化にはFSHは必要がなく、遺伝的性決定のシグナルが雌生殖腺でアロマターゼの発現を促す事を意味する。従って、環境からの刺激により性分化期でFSH発現を促し、アロマターゼ活性を抑制することができれば、性転換を誘導できる可能性を示した(未発表)。また、魚類ではアロマターゼが、脳型、卵巣型の2種類存在する。このうち特に脳型アロマターゼmRNAがトラフグ生殖腺において高いレベルで発現していることが明らかになった。特に、成熟シストを含む精巣では多くのスプライシングバリエーションが発現していた。今後、2種類のアロマターゼ遺伝子の発現様式や酵素学的解析が必要と考えられる。

トラフグは染色体レベルで性が決まる魚種であるが、多くの他魚種同様に性的可塑性をもちアロマターゼ活性を制御する事により性転換も可能である事が明らかになった。全ての環境要因(温度、光、色、pH、個体密度など)を調査したわけではないが、少なくとも高温は、アロマターゼの発現を抑制できる環境要因ではなかった。しかし器官培養系を用いた実験では、生殖腺刺激ホルモン(FSH)が生殖腺に存在する受容体を介しアロマターゼの発現を抑制した。従って、トラフグ稚魚の性転換誘導は環境情報-脳(Brain)-脳下垂体(Pituitary)-生殖腺(Gonad)でのアロマターゼ発現までのBPG軸上でのシグナル伝達システムの解明と置き換えて考える事が可能になったと考えている。研究の難しいとされる多年生の1回産卵海産魚の性分化研究の具体的な目標が見えてきたことは3年間にわたる本研究の大きな成果と考えている。

食用魚である海産魚種は飼育実験が困難な事、またその多くが多年性の産卵形態をとるため、性分化機構の研究は進んでいないが、トラフグでは性決定遺伝子や性決定機構も

明らかになりつつある。また、生殖腺の発達、成熟に重要な役割を担う脳下垂体からの生殖腺刺激ホルモンなどの分泌パターンも単純である。従って、トラフグは多年生で年1回産卵を行う海産魚の良いモデルとなろう。今回の研究対象であるトラフグを例にとると、一般に性転換の難しいと思われる魚種でもその機構を司る蛋白質やホルモンなどの部品は類似しており、魚種特有の修飾(それぞれの道具の使い方)さえ理解できれば人為的な性統御は可能と思われる。最近、深層海水を用いた低温処理によりトラフグの性転換も可能になったという報告もある。魚類生殖腺性分化の本質的な仕組みを明らかにすれば、多くの海産魚種で、場所や施設を問わず安価で安全に性を統御できる養殖技術が開発できると考える。ホルモンや遺伝子組換えを使用せず、消費者に安心して提供できる商品の開発は、これからの農水産、食品業界では非常に重要である。今後さらに環境要因と性分化機構を分子レベルで研究を進めていきたいと考えている。

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 4 件)

1. Lee, K.H, Yanaguchi, A., Rashid, H., Kadomura, K., Yasunoto, S., Mitsuyama, M. (2009). Estradiol-17 β treatment induces intersexual gonadal development in the pufferfish *Takifugu rubripes*. *Zool. Sci.* 26, 639-645.
2. Lee, K.H, Yanaguchi, A., Rashid, H., Kadomura, K., Yasunoto, S., Mitsuyama, M. (2009). Germcell degeneration in high temperature treated pufferfish *Takifugu rubripes*. *Sex. Dev.* 3, 225-232.
3. 山口明彦 全オス化は可能か?トラフグの性決定・性分化研究 (2008) 月刊養殖 7月号 p14-18.
4. Rashid, H., Kitano, H., Lee, K.H., Ni, S., Shigenatsu, T., Kadomura, K., Yanaguchi, A., Mitsuyama, M. (2007). Fugu (*Takifugu rubripes*) sexual differentiation: CYP19 regulation and aromatase inhibitor induced testicular development. *Sex. Dev.* 1, 311-322.

[学会発表] (計 10 件)

1. Lee, K.H, Yanaguchi, A., Rashid, H., Kitano, H., Ni, S., Shigenatsu, T., Kadomura, K., Yasunoto, S., Mitsuyama, M.

Estradiol-17 β treatment induces ovarian development in testis of pufferfish *Takifugu rubripes*. 5th World Fisheries Congress 2008年10月23日 横浜

2. Rashid, H., Lee, K.H., Mitsuyama, M., Yanaguchi, A. トラフグ精巢に存在する2種類の brain-type アロマターゼ mRNA の発現と分布。第79回日本動物学会 2008年9月7日 福岡大学

3. Rashid, H., Yanaguchi, A., Mitsuyama, M. Modulation of aromatase activity results in masculinization of Japanese tiger puffer *Takifugu rubripes*. 15th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction. 2008年08月06日 Mynensingh, Bangladesh

4. Rashid, H., Lee, K.H., Kadomura, K., Yanaguchi, A., Mitsuyama, M. Effects of exogenous factors on gonadal sex differentiation and development of fugu *Takifugu rubripes*. World Aquaculture 2008. 2008年5月19日 釜山

5. 重松 亨・李 敬勲・新居早也佳・Harunur Rashid・山口明彦・松山倫也 未成熟期トラフグの脳下垂体における生殖腺刺激ホルモン(GH mRNA)の発現解析。平成19年度日本水産学会九州支部大会 2008年1月26日 宮崎大学

6. 新居早也佳・李 敬勲・山口明彦・松山倫也 トラフグ精巢セルトリ細胞の培養系の開発 平成19年度日本水産学会九州支部大会 2008年1月26日 宮崎大学

7. Rashid, H., Kitano, H., Lee, K.H., Ni, S., Shigenatsu, T., Yanaguchi, A., Mitsuyama, M. Production of all male population of torafugu (*Takifugu rubripes*) using an aromatase inhibitor, fadrozole The 4th International Joint Symposium between Japan and Korea 鳥取大学 2007年11月

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/asweb/sui1/lmb.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 明彦 (YAMAGUCHI AKIHIKO)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号: 10332842

(2) 研究分担者

松山 倫也 (MITSUYAMA MICHYA)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号: 00183955