

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03052

研究課題名(和文) 環境依存的性決定の分子機構の解明とその応用

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms of environmental sex determination and its applications

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)・教授

研究者番号：40336219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000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、高温ストレスによりコルチゾル量が上昇し、XXメダカが雄化することが知られている。最近、我々は、高温やコルチゾル処理により核内受容体であるPPARシグナリングが活性化することをRNA-seq解析により見出した。そこで本研究では、PPARノックアウト(KO)メダカを作製して、その表現型を解析した。その結果、このKOのXXメダカは、コルチゾルやPPAR活性化剤処理により全く雄化しなかったことから、コルチゾルによる雄化におけるPPARの関与が示唆された。さらに、性転換魚やウナギについても、コルチゾルやPPARが性転換に関与するかどうか調査した。

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 an XX/XY sex determination system. However, under high temperature conditions, XX medaka is masculinized by elevation of cortisol, the major teleost glucocorticoid. Recently, we found using RNA-seq analysis that peroxisome proliferator-activated receptor alpha-a (pparaa) is activated by high temperature and cortisol. In this study, we first generated pparaa KO medaka using the CRISPR/Cas9 system and analyzed its phenotype. As results, treatment of pparaa KO medaka with cortisol or a PPAR agonist did not induce masculinization, suggesting an important role of PPAR in environmental sex determination in medaka. Moreover, we investigated whether cortisol and PPAR activation are involved in the sex reversal of protogynous wrasse (*Halichoeres trimaculatus*) and Japanese eel (*Anguilla japonica*).

研究分野：魚類生理学

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

養殖魚種の中には、ヒラメ(*Paralichthys olivaceus*)のように雌雄で成長差がある(雄より雌の方が成長が速い)種類や、チョウザメ科魚類のように卵巣自体に付加価値がある種類が存在しており、多くの魚種で雌雄のコントロール(性統御)技術の確立が求められている。一方、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(北野, 2016)。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、未だに不明な部分が多く残されている。

ヒラメは、XX(雌)-XY(雄)型の性決定システムをもつ海産魚であり、成長が良い雌だけを作る目的で全XX集団の生産技術が確立している。しかしながら、ヒラメのXX個体は高温や低温飼育により簡単に雄化するため、完全な性統御が行えないのが現状である(北野, 2016)。研究代表者らは、1999年以來、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。まず、ヒラメやメダカの性分化時期のコレチゾル量を測定したところ、高温により生体内のコレチゾル量が急上昇したため、実際にコレチゾルをXX個体に投与した結果、エストロゲン合成酵素(*cyp19a*)遺伝子の発現が抑制されて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; Yamaguchi et al., 2010)。次に、ヒラメやメダカのXX個体を高温環境下でコレチゾル合成阻害剤またはエストロゲンで処理すると、*cyp19a*遺伝子の発現が誘導されて雄化が阻害されたことから(Yamaguchi et al., 2010; Kitano et al., 2012)、高温による雄化は、高温コレ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た。しかしながら、コレチゾルによる雄化誘導機構の全貌は未だに明らかとなっていない。

最近、研究代表者らは、メダカ孵化仔魚を用いてRNAシーケンシング(RNA-seq)及び定量PCR解析を実施したところ、高温やコレチゾル処理によりPeroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)及びその標的遺伝子の発現が上昇することを見出した(Hara et al., 2020)。PPARは脂肪酸を内因性リガンドとする核内受容体であり、個体のエネルギー源となる脂肪酸代謝を調節することが知られている。しかしながら、このPPARと性分化との関連性は全く分かっていない。

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、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、エストロゲン合成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レ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、コレチゾルは、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、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っていない。

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(性転換魚及びニホンウナギ)を用いてこのシステムの保存性を明らかにし、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CRISPR/Cas9システムを利用して、卵巣型エストロゲン合成酵素(*cyp19a*)、脳型エストロゲン合成酵素(*cyp19b*)、PPAR α (*pparaa*)遺伝子のノックアウト(KO)メダカを作製した(Hara et al., 2020)。一方、メダカにおけるコレチゾル及びPPAR活性化剤処理は、Hara et al. (2020)の方法に従って実施した。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。性転換魚の飼育実験は、Nozu et al. (2009)の方法に従って行った。ニホンウナギの飼育実験は、Inaba et al. (2021)の方法に従って実施した。

4. 研究成果

(1) メダカ生殖腺におけるコレチゾルによる雌化抑制機構の解析

研究代表者らは、メダカ孵化仔魚の生殖腺を用いてRNA-seq解析を実施したところ、高温やコレチゾル処理により*cyp19b*の遺伝子発現が抑制されることを見出した。そこで、ゲノム編集技術を利用して*cyp19a*と*cyp19b*のダブルKOメダカを作製してその表現型を解析した。これら

ダブル KO メダカの生殖腺の組織学的観察を行ったところ、XY 個体においては全てで精巣が観察されたが、XX 個体においては、1 カ月齢で卵巣、2 カ月齢で卵精巣、6 カ月齢で精巣が観察されたことから、これら遺伝子は卵巣の発達や維持に重要な役割を果たしていると考えられた。

(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

研究代表者らは、コルチゾルによる雄化誘導機構を解明するため、メダカ孵化仔魚の生殖腺を用いた RNA-seq 及び定量 PCR 解析したところ、高温やコルチゾル処理により脂質代謝に関連する遺伝子の発現が増加し、PPAR シグナリングが活性化することを見出した。そこで、ゲノム編集技術を利用して *pparaa* KO メダカを作製して、その表現型を解析した。その結果、この KO 系統の XX メダカは、コルチゾル処理により全く雄化しなかったことから、コルチゾルでの雄化における PPAR の関与が示唆された。次に、PPAR 活性化剤が XX メダカの雄化を誘導できるかどうか調べた。その結果、通常メダカに PPAR 活性化剤である Fenofibrate や GW7647 を投与したところ、有意に雄化を誘導できた。一方、*pparaa* KO メダカに Fenofibrate を投与した結果、全く雄化しなかったことから、Fenofibrate による雄化は PPAR を介していることが示唆された。このように、研究代表者らは、環境依存的性決定には高温 コルチゾル量上昇 PPAR 活性化 雄化の分子カスケードが存在していることを初めて証明した。今後は、PPAR のリガンドと考えられる脂肪酸による雄化の影響を調べるのと同時に、他の PPAR サブタイプの役割についても調査する予定である。さらには、ストレスによる雄化の本質的意義についても迫っていきたいと考えている。

(3) 阻害剤等が及ぼす性転換魚及びニホンウナギへの影響調査

研究分担者らは、コルチゾルがハタ科魚類の生殖腺に及ぼす影響を調べるため、ヤイトハタを用いてコルチゾルの経口投与実験を実施した。1 群 10 尾とし、コルチゾル(低、中、高濃度)処理群、対照群を設定し、6 週間処理した。終了時に低濃度群は 8 尾生存したが、中濃度群は全個体が死亡し、高濃度群は 1 尾のみ生存した。組織学的観察の結果、処理群の生殖腺は対照群の卵巣と相違なく、ハタ科魚卵巣においてコルチゾル投与の影響は認められなかった。次に、コルチゾルをココアバターと混合し、これらをヤイトハタ雌の腹腔内に注入した。処理後の 7 個体の卵巣には影響は観察されなかったが、アンドロゲンを腹腔内注入した 10 個体では全てで精子形成が認められた。これらのことから、ヤイトハタでは、コルチゾルは雄化を誘導できないのではないかと考えられた。

ミツボシキウセンにおけるコルチゾルの関与を調べるため、ミツボシキウセンの雌 6 尾を同一水槽に入れ、コルチゾル合成阻害剤であるメチラポン(1mg/g 飼料)を 4 週間投与した。投与終了後に生殖腺を組織学的に観察した結果、対照群および投与群において性転換個体が出現し、メチラポンでは性転換を抑制できないことが示された。一方、ミツボシキウセン雌を用いて、PPAR 活性化剤である Fenofibrate の卵巣に及ぼす影響を調べた。処理開始 4 週間では、処理した個体の卵巣に明瞭な変化は認められなかったが、コルチゾルでは精巣へと転換した。これらのことから、ミツボシキウセンでは、コルチゾルは雄化を誘導できるが、Fenofibrate は誘導できない可能性が示唆された。

研究分担者らは、養殖ウナギの雄化とコルチゾルとの関連性を調べるため、メチラポンやコルチゾル拮抗剤(RU486)を用いた飼育試験を実施した。高濃度のメチラポン(3mg/g 飼料)を混合した餌をシラスウナギに与え、全長 30cm 以上まで飼育して雌雄判別を行ったが、雌の個体は出現しなかった。また、RU486 を混合した餌をシラスウナギに給餌して同様の飼育試験を行ったが、雌の個体は出現しなかった。一方、コルチゾルが雄化を誘導するか検証するため、シラスウナギにエストラジオールを 10ug/g 飼料の割合で混合した餌を与え、全長 18cm まで雌化処理した後に、コルチゾルを 100ug/g 飼料の割合で混合した餌を給餌した。その結果、コルチゾル処理した個体群では雄比率が僅かに高くなったことから、コルチゾルは養殖ウナギに対しても雄化を誘導するのではないかと考えられた。

一方、1 尾ずつを屋外のタンクで飼育するニホンウナギの単独飼育を試みた。シラスウナギを全長 15cm 程度まで集団で飼育した後、単独飼育を半年間行った結果、およそ半数の個体が雌へと分化した。このように、単独飼育環境下で雌雄が等しく現れることから、ニホンウナギには遺伝的性決定が存在することが分かり、集団飼育する養殖ウナギでは高密度ストレスにより雄化している可能性が示唆された。

<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).

Hara S., Furukawa F., Mukai K., Yazawa T., Kitano T. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is involved in the temperature-induced sex differentiation of a vertebrate. Sci Rep, 10, 11672 (2020).

- 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).
- Inaba H, Hara S, Horiuchi M, Ijiri S, Kitano T. Gonadal expression profiles of sex-specific genes during early sexual differentiation in Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish Sci*, 87, 203-209 (2021).
- 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).
- 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, 3900-3908 (2010).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Furukawa Fumiya, Hamasaki Shin, Hara Seiji, Uchimura Tomoya, Shiraishi Eri, Osafune Natsumi, Takagi Hisanori, Yazawa Takashi, Kamei Yasuhiro, Kitano Takeshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Heat shock factor 1 protects germ cell proliferation during early ovarian differentiation in medaka	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43472-4	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 -
1. 著者名 Uchimura Tomoya, Hara Seiji, Yazawa Takashi, Kamei Yasuhiro, Kitano Takeshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Involvement of Heat Shock Proteins on the Transcriptional Regulation of Corticotropin-Releasing Hormone in Medaka	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2019.00529	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 -
1. 著者名 Hara Seiji, Furukawa Fumiya, Mukai Koki, Yazawa Takashi, Kitano Takeshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is involved in the temperature-induced sex differentiation of a vertebrate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11672
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-68594-y	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 -
1. 著者名 Kawabe Toshiaki, Kariya Hiroyuki, Hara Seiji, Shirozu Tsuyoshi, Shiraishi Eri, Mukai Koki, Yazawa Takashi, Inoue Seiya, Kitano Takeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Transcriptional Regulation of Mullerian Inhibiting Substance (MIS) and Establishment of a Gonadal Somatic Cell Line Using mis-GFP Transgenic Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 578885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2020.578885	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 -

1. 著者名 Hara Seiji, Sawamura Rie, Kitano Takeshi	4. 巻 87
2. 論文標題 Cortisol induces masculinization of XX medaka through gonadal soma-derived growth factor (GSDF) and anti-Müllerian hormone receptor type 2 (AMHR2)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 85 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-020-01479-1	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 -

1. 著者名 Inaba Hiroyuki, Hara Seiji, Horiuchi Moemi, Ijiri Shigeho, Kitano Takeshi	4. 巻 87
2. 論文標題 Gonadal expression profiles of sex-specific genes during early sexual differentiation in Japanese eel <i>Anguilla japonica</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 203 ~ 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-020-01491-5	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 Kitano Takeshi, Takenaka Tomoaki, Takagi Hisanori, Yoshiura Yasutoshi, Kazeto Yukinori, Hirai Toshiaki, Mukai Koki, Nozu Ryo	4. 巻 11
2. 論文標題 Roles of Gonadotropin Receptors in Sexual Development of Medaka	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 387 ~ 387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11030387	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7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 北野健
2. 発表標題 不妊化するノックアウトメダカの表現型解析
3. 学会等名 令和元年度日本水産学会秋季大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原誠二、北野健
2. 発表標題 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体の活性化によるメダカの雄化誘導
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 稲葉博之、原誠二、堀内萌未、井尻成保、北野健
2. 発表標題 養殖ウナギの性分化における性特異的遺伝子の発現解析
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 原誠二、北野健
2. 発表標題 メダカの性分化における 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体の機能解析
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 堀内萌未、稲葉駿、萩原聖土、板倉光、山下洋、久米学、塚本勝巳、井尻成保、足立伸次
2. 発表標題 二ホンウナギ生殖腺における新規性分化関連遺伝子の探索
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲葉博之、原誠二、北野健
2. 発表標題 大豆イソフラボンを用いた養殖ウナギの雌化技術の確立
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原誠二、北野健
2. 発表標題 メダカの性分化における 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体の活性化剤及び阻害剤の影響
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 菊池 潔、井尻成保、北野 健	4. 発行年 2021年
2. 出版社 恒星社厚生閣	5. 総ページ数 258
3. 書名 魚類の性決定・性分化・性転換	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 分担 者	中村 將 (Nakamura Masaru) (10101734)	一般財団法人沖縄美ら島財団(総合研究センター)・総合研究センター 動物研究室・参与 (88003)	

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
研究分担者	稲葉 博之 (Inaba Hiroyuki) (60790293)	愛知県水産試験場・内水面漁業研究所・技師 (83913)	
研究分担者	井尻 成保 (Ijiri Shigeho) (90425421)	北海道大学・水産科学研究院・准教授 (10101)	
研究分担者	野津 了 (Nozu Ryo) (70774397)	一般財団法人沖縄美ら島財団（総合研究センター）・総合研究センター 動物研究室・主任研究員 (88003)	

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