

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：28003

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23248034

研究課題名(和文) 魚類の生殖腺の性的可塑性および水産増養殖応用技術開発

研究課題名(英文) Sexual plasticity of gonads in fish and its technical development into fisheries

研究代表者

中村 将(Nakamura, Masaru)

名桜大学・公私立大学の部局等・研究員

研究者番号：10101734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,600,000円

研究成果の概要(和文)：雌雄異体魚のティラピア、メダカ、ゼブラフィッシュ、コイ、ゴマアイゴの雌(卵巢)へのアロマタゼ阻害剤の長期間投与により雄(精巣)へ転換させることをまとめ国際学術雑誌に投稿の結果、掲載され新聞等のマスコミで大きく報道された。この技術は雌雄産み分け等の技術として広く応用されることが期待される。性的可塑性を調節している遺伝子の検索のためミツボシキウセンを用いて卵巢から精巣へ転換する際に発現変動している遺伝子の抽出を試みた。その結果、性転換開始時に変動している21個の転写因子が特定された。これらの遺伝子は、これまでに性転換との関連は報告されておらず、新たな性転換関連遺伝子となることが予想された。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in inducing sex reversal, ovaries to testes, in gonochoristic tilapia, medaka, zebrafish, carp and rabbitfish through treatment of the fish with an aromatase inhibitor. The results of these studies have been reported in international scientific journals and in public news media via newspapers and Internet news services. The application of this technique will allow control over the sex of fishes in commercial aquaculture. Furthermore, through transcriptome analysis of sex change from ovaries to testes, we identified 21 new genes that are likely to play a role in sexual plasticity. This work has broad importance for understanding the ontogeny and genetics of sexual identity in vertebrate animals.

研究分野：魚類生殖生理学

キーワード：sex change ovary testis sex hormone

### 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物では性分化後の生殖腺は性的可塑性を失い、もはや性を換えることは不可能と長い間考えられて来たが、雌雄異体魚のティラピアとメダカ成熟雌（卵巢）に雌性ホルモン合成阻害剤(AI)を投与し、雌性ホルモンを劇的に低下させると雄（精巢）へと性転換させることに成功した。この事実により、魚類の成熟した卵巢には性的可塑性を持つ精子に分化可能な生殖細胞が一生存在していること、体細胞にもセルトリ細胞やライデヒ細胞へと分化可能な性的可塑性を持つ細胞が存在していること、雌性ホルモンの欠如が可塑性を持つ生殖細胞と体細胞の精巢分化への開始に決定的引き金のなることを明らかにした。一方、魚類の中には、親になっても自然に卵巢から精巢へと性転換する。この性転換の生理的機構を明らかにしてきた。魚類の生殖腺のもつ性的可塑性を利用した雌雄産み分けなどの水産技術開発が求められていた。

### 2. 研究の目的

魚類には哺乳類等と同様に一度決定した性が変わらない雌雄異体と、生涯のうちに性を変える（性転換）雌雄同体が存在している。沖縄のサンゴ礁域には性転換魚が多数生息おり、魚類の性的可塑性を研究する上で非常に適した環境であると言える。我々のグループでは、魚類に見られる両現象を比較することで性的可塑性および普遍性機構の解明を試みてきた。本研究では雌雄異体魚のモデルとしてナイルティラピア（*Oreochromis niloticus*）を、雌雄同体魚のモデルとしてベラ科のミツボシキウセン（*Halichoeres trimaculatus*）を対象として、生殖腺や脳の性的可塑性機構の解明および、そこから得られた知見を基にした新たな水産応用技術の確立を目指して研究を進めることを目的とした。

### 3. 研究の方法

雌雄異体魚ティラピア、メダカ、ゼブラフィッシュ、コイ、ゴマアイゴの卵巢分化後や成熟雌個体への AI の長期投与を行ない卵巢から精巢への転換誘導をおこなった。

ミツボシキウセンにおいて、アロマターゼ阻害剤（AI）投与による性転換誘導系を利用した場合、不可逆的な性転換が誘導される“ポイント・オブ・ノーリターン”が特定されている。このことは、このポイントにおいて性転換の引き金となる決定的な変化が起きていることを示しており、不可逆的な転換を引き起こす因子・分子メカニズムが存在していることを示唆している。この因子・分子メカニズムの解明を目的とし、ミツボシキウセンの生殖腺において RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。

### 4. 研究成果

ティラピアとメダカの成熟雌を女性ホルモン合成阻害剤投与で女性ホルモンを低下させると卵巢は退化、消失して精巢が出現する。精巢は成熟して機能的雄になることを論文としてまとめ国際科学雑誌に報告した（Paul-Prasanth B., et al, Sci Rep.,2013）また、共同研究により、ゼブラフィッシュ、コイ、ゴマアイゴにおいても卵巢を精巢に換えることが出来ることに成功し、国際学術雑誌へ報告した（Miyaoku K., et al. Sci Rep., 2013）。このことから、魚類全般的に性分化後でも卵巢は精巢へと換わる性的可塑性を持つことを証明することが出来た。これらの成果は今後養殖技術への応用や希少種の保存への貢献が期待される。以上の一連の成果は新聞等のマスコミにも大きく報道された。

ミツボシキウセンのリファレンスとなる配列情報が乏しいため、まずミツボシキウセンのリファレンストランスクリプトーム配列を作製する必要があった。そこで、ミツボシキウセン de novo トラン

スクリプトームアセンブリを行った。雌、雄およびアロマターゼ阻害剤投与により作出した性転換過程個体の生殖腺から total RNA を抽出し Illumina HiSeq 2000 に供した。またリファレンス配列の基盤を強化する目的で雌雄の他の組織（脳、心臓、肝臓、小腸）からも total RNA を抽出しシーケンスを行った。シーケンスの結果、各サンプルから 2500 万~2700 万本のリード（Paired-end, 90 bases）を得ることができた。得られたリードを用いアセンブリした結果、246021 本のコンティグ（N50, 2573; 平均配列長, 1031 bases）を得ることができた。これらのコンティグセットに対し Ensembl データベースに登録されているプロテイン配列（ヒト、ゼブラフィッシュ、メダカ、ティラピア、フグ、ミドリフグ、イトヨ）を参照配列として BLASTX により相同性検索を行った。その結果、84679 本のコンティグが注釈付けられた。さらに、相互ベストヒット検索により重複のない17816本のコンティグ(N50, 3215; 平均配列長, 2556 bases)を抽出した。この配列セットをミツボシキウセンのリファレンストランスクリプトーム配列とした。統計値から判断して高品質なリファレンス配列の作成に成功したと考えられる。

続いて、不可逆的な性転換が誘導される際に発現変動している遺伝子の抽出を試みた。発現変動している遺伝子を抽出するため、成熟卵巣および不可逆的な転換開始直後の生殖腺から抽出した total RNA を用い、再度シーケンスを行った。各サンプルから 3000 万本前後のショートリードが得られた。得られたショートリードを、リファレンス配列にマッピングし、DEseq を用いて発現変動遺伝子を推定した。False Discovery Rate 0.01 を閾値とした結果、638 個の遺伝子が抽出された。この遺伝子群に対し Gene Ontology 解析を行い、転写

因子を抽出したところ、性転換開始時に変動している 21 個の転写因子が特定された。これらの遺伝子は、これまでに性転換との関連は報告されておらず、新たな性転換関連遺伝子となることが予想された。

#### 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 20 件)

1. Pandit NP, Kobayashi Y, Bhandari RK, Nakamura M, 2015 High Temperature-induced Sterility in the Female Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Gen Comp Endocrinol, 213:110-117
2. Nozu R, Nakamura M, 2014 Cortisol administration induces sex change from ovary to testis in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. Sex Devel, 9:118-124
3. Kobayashi Y, Nozu R, Horiguchi R, Nakamura M, 2014 Histological observation of doublesex-mab 3-related transcription factor 1 (DMRT1) localization in the adult testis of three-spot wrasse. Int Aquat Res, 6:68
4. Murata R, Kobayashi Y, Karimata H, Kishimoto K, Kimura M., Nakamura M, 2014 Transient sex change in the immature malabar grouper, *Epinephelus malabaricus*, by androgen treatment, Biol Reprod, 91: 25, 1-7
5. Miura S, Kobayashi Y, Bhandari RK, Nakamura M, 2013 Estrogen favors the differentiation of ovarian tissues in the ambisexual gonads of anemonefish *Amphiprion clarkii*. J Exp Zool, 319A: 560-568,
6. Miyaoku K, Takatsu K, Sago T, Itagaki H, Nakamura M, Tokumoto T. 2013 Induction of female-to male sex reversal in adult zebrafish by fadrozole treatments. Sci Rep, 3: 3400
7. Paul-Prasanth B, Bhandari RK, Kobayashi T, Horiguchi R, Kobayashi Y, Nakamoto M, Shibata Y, Sakai F, Nakamura M, Nagahama Y. 2013 Estrogen oversees the maintenance of the female genetic program in terminal differentiated gonochorists, Sci Rep, 3: 2862
8. Kobayashi Y, Murata R, Nakamura M, 2013 Physiological and endocrinological mechanisms of sex change in the grouper, In: B. Senthilkumaran (ed.) Sexual plasticity and gametogenesis in fish, Chapter 14: 1-13, Nova Biomedica,

9. Horiguchi R, Nozu R, Kobayashi Y, Nagahama Y, Nakamura M. 2013 Characterization of gonadal soma-derived factor expression during sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. Dev Dyn, 23929, 2013

10. Colleye1 O, Nakamura M, Frédérich B, Parmentier E. 2012 Further insight into the sound-producing mechanism of clownfishes: what structure is involved in sound radiation? J Exp Biol, 215: 2192-2202

11. Kanemaru T, Nakamura M, Murata R, Kuroki K, Horie H, Uchida K, Senthilkumar B, Kagawa H. 2012 Induction of sexual maturation of the female honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, in the non-breeding season by modulating environmental factors with GnRH analogue implantation. Aquaculture, 358: 85-91

12. Kobayashi Y, Nagahama Y, Nakamura M. 2012 Diversity and Plasticity of Sex Determination and Differentiation in Fishes. Sex Dev, 1-11

13. Murata R, Kobayashi Y, Karimata H., Kishimoto K, Kimura M, Shimizu A, Nakamura M. 2012 The role of pituitary gonadotropins in gonadal sex differentiation in the protogynous Malabar grouper, *Epinephelus malabaricus* Gem Comp Endocrinol, 178: 587-592

14. Nozu R, Horiguchi R, Murata R, Kobayashi Y, Nakamura M. 2012 The fate of ovarian somatic cells during sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. Fish Physiol Biochem, Indian J Sci Technol 9<sup>th</sup> ISRPF issue4,S8

15. Kobayashi Y, Nakamura M. 2012 Histological observation of the urogenital papillae in bi-directional sex changing gobiid fish, *Trimma okinawae*. Zool Sci, 21: 121-126

16. Malarvannan G, Takahashi S, Isobe T, Kunisue T, Sundaryanto A, Miyagi T, Nakamura M, Yasumura S, Tanabe S, 2011, Levels and distribution of polybrominated diphenyl ethers and organochlorine compounds in sea turtles from Japan. Mar Pollut Bulletin, 63: 172-178.

17. Malarvannan G, Takahashi S, Ikemoto T, Isobe T, Kunisue T, Kunisue T, Sundaryanto A, Miyagi T, Nakamura M, Yasumura S, Tanabe S, 2011, Contamination status and spatial distribution of organochlorine compounds in fishes from Nansei Islands, Japan, Mar Pollut Bulletin, 63: 541-547

18. Ruksana S, Alam MA, Kobayashi Y, Nakamura M. 2011, Differentiation of steroid-producing cells (SPCs) and folliculogenesis in the developing ovary of Nile Tilapia, *Oreochromis nilotica*. Zool Sci, 28: 845-852

19. Kobayashi Y, Nozu R, Nakamura M. 2011, Role of estrogen in spermatogenesis in initial phase male of the three spot-wrasse *Halichoeres trimaculatus*. Devel Dynamics, 240: 116-121

20. Murata R, Karimata H, Kishimoto K, Kobayashi Y, Kobayashi T, Nakamura M. 2011, Two types of steroid-producing cells in the gonads during sex differentiation in the protogynous Malabar grouper, *Epinephelus malabaricus*. Int J Develop Biol, 55: 619-625

〔学会発表〕(計 2件)

1) Nakamura M and R Nozu, The sterilization of tilapia by high temperature, International Symposium on Reproductive Biology and Comparative Endocrinology International Symposium on Reproductive Biology and Comparative Endocrinology, India Baranasi, Plenary Lecture, 25-27 Feb 2015

2) 中村 將 魚は性を自由に換える GID(性同一性障害)学会 第16回研究大会 特別講演 沖縄(那覇市) 平成26年3月21日-22日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中村 將 (NAKAMURA Masaru)

名桜大学・公私立大学の部局等・研究員

研究者番号：10101734