

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月 16日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658163

研究課題名（和文） 魚類の春季発動を制御する脳機能研究

研究課題名（英文） Neuroendocrinological Studies of Fish Puberty

研究代表者

松山 倫也 (MATSUYAMA MICHIIYA)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：00183955

研究成果の概要（和文）：

魚類の春季発動（初回成熟）を制御すると考えられる神経ペプチド、キスペプチンの機能を、マサバを用いて解析し、以下の結果を得た。マサバの未成魚を対象にして、合成Kiss1およびKiss2を筋肉内投与し、42日後に取り上げた。その結果、Kiss1投与した雄では精子形成が促進されるとともに、血中ステロイドホルモン（11-KT）量も有意に増加した。一方、Kiss1投与した雌、およびKiss-2投与した雌雄では、顕著な変化は認められなかった。これらの結果より、マサバではKiss1が雄の春機発動を促進していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Kisspeptins, encoded by *kiss* genes have emerged as critical regulator of reproductive function in vertebrates. In the present study, we evaluated the potency of Kiss1 and Kiss2 to induce pubertal onset in prepubertal chub mackerel. Gonadosomatic index (GSI) of Kiss1 treated fish increased significantly in comparison to other treatments. Histologically, 66.7% of Kiss1 treated fish exhibited presence of spermatozoa in the testes. However, Kiss2-12 treated fish showed only spermatocytes as the advanced germ cells in the testes. In contrast, only spermatogonia were observed in the testes of initial and untreated final control fish. Levels of sex steroids were significantly higher in Kiss1 treated fish. These results indicate application of Kiss1 peptides for accelerating pubertal onset in chub mackerel.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：春季発動、キスペプチン、神経ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の性成熟を支配する脳-脳下垂体-生殖腺軸（BPG-axis）の活動は、春季発動の開始に伴い活性化すると考えられているが、魚類ではその詳細が明らかになっていない。これまでBPG-axisの最上位における生殖制御因子として生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）が知られていたが、近年、哺乳類において、GnRHの分泌を促して性成熟の引金を引く因子、キスペプチン（Kiss）が発見された。

急速に進展している哺乳類でのKiss研究に比べ、魚類のKiss研究は少なく、現在、メダカ、ゼブラフィッシュ、キンギョ、フグやシーバスでの研究があるに過ぎず、その機能もほとんど明らかでない。さらに、魚類は哺乳類と比べてはるかに大きな多様性を有するグループであるため、研究結果が魚種によって異なり、知識の集積に障害となる。申請者は海産の多回産卵魚であるマサバの配偶子形成に関わるBPG-axisの機能解明を目的として、Kiss、

GnRH, 生殖腺刺激ホルモン (GtH), 各種性ステロイドホルモン, それらの受容体, および各種抗体などツールの整備も含め研究を進めてきた。

## 2. 研究の目的

マサバの春季発動機構解明ならびに春季発動促進期果を目的とした以下の項目の研究を行う。

- (1) マサバの春季発動 (初回成熟) に伴う, 各種成熟関連因子遺伝子の発現変動解析
- (2) マサバへの Kiss 投与による春季発動促進実験

## 3. 研究の方法

- (1) 春季発動に伴う各種内分泌因子の遺伝子発現量の変動解析

稚魚から満1歳に至る各種成長段階の雌雄マサバを採集し, それらの脳, 脳下垂体, 生殖腺を採取し, 春季発動に伴う2種 Kiss, 2種 Kiss 受容体, 3種 GnRH, FSH- $\beta$ , LH- $\beta$ , FSH 受容体, LH 受容体の mRNA 量の発現変化を real-time PCR を用いて解析する。

- (2) マサバへの Kiss 投与による春季発動促進効果

春季発動前のマサバ雌雄 (0 歳) に対して, 合成 Kiss1 および Kiss2 を筋肉内投与し, 定期採集を行う。6 週間後に採集し, 脳, 脳下垂体, 生殖腺を採取し, 上記(1)の mRNA 量の発現変化を real-time PCR を用いて解析するとともに, 投与効果を生殖細胞の発達状態で判定する。

## 4. 研究成果

- (1) 春季発動に伴う各種内分泌因子の遺伝子発現量の変動解析

雌では初回成熟の直前に, 脳内の *kiss1*, *kiss1r*, *kiss2r*, *gnrh1*, および脳下垂体内の *fshb* 量が一時的に上昇した (図 1)。一方, 雄では, 初回成熟の直前に, 脳内の *kiss2* および *gnrh1* 量が上昇した。

本研究により, 初回成熟に伴う, Kiss および KissR 遺伝子の発現変動が, 魚類において初めて明らかとなった。

- (2) マサバへの Kiss 投与による春季発動促進効果

Kiss1 投与した雄では精巣が肥大化するとともに (図 2) 精子形成が促進された (図 3)。さらに, それらの個体では魚類特有の雄性ホルモンで, 精子形成促進作用のある 11-ケトテストステロン (11KT) の血中量が有意に増加していた (図 4)。

一方, Kiss1 投与した雌, Kiss-2 投与した雌雄および GnRHa を投与した雌雄では, 顕著な変化は認められなかった。これらの結果より, マサバでは Kiss1 が雄の春季発動を促進していることが示唆された。

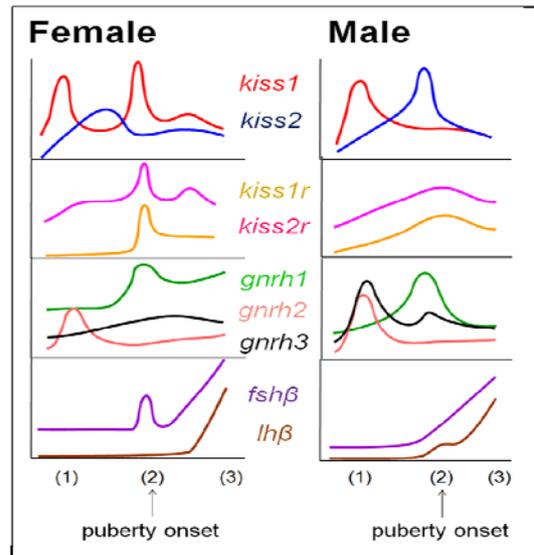


図 1. 春季発動 (puberty onset) に伴う各種遺伝子の発現変動

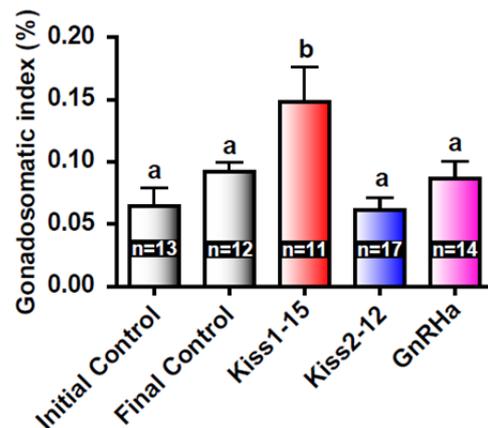


図 2. 雄の生殖腺指数 (GSI) の変化

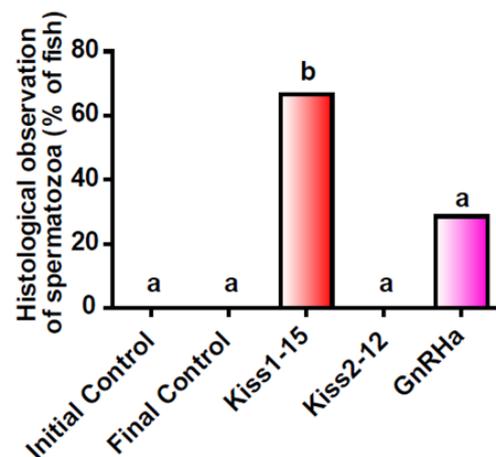


図 3. 精巣における精子の出現率

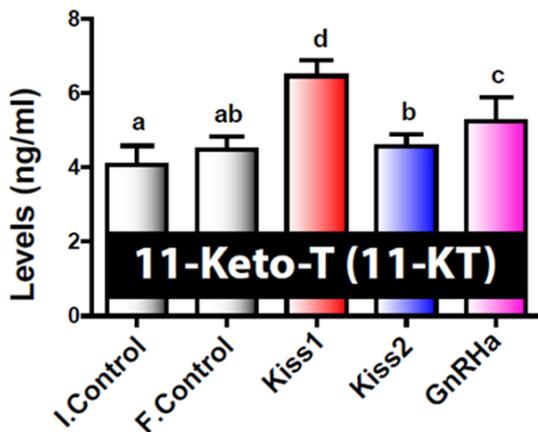


図 4. 血中 11-KT 量

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 3 件)

- Selvaraj S, Kitano H, Amano M, Nyuji M, Kaneko K, Yamaguchi A, Matsuyama M. Molecular characterization and expression profiles of three GnRH forms in the brain and pituitary of adult chub mackerel (*Scomber japonicus*) maintained in captivity. *Aquaculture*, 査読有, 356-357 (2012), 200-210.
- Selvaraj S, Kitano H, Amano M, Ohga H, Yoneda M, Yamaguchi A, Shimizu A, Matsuyama M. Increased expression of kisspeptin and GnRH forms in the brain of scombroid fish during final ovarian maturation and ovulation. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 査読有, 10 (2012), 64.
- Ohga H, Kaneko K, Shimizu A, Kitano H, Selvaraj S, Nyuji M, Adachi H, Yamaguchi A, Matsuyama M. Steroidogenic and maturation-inducing potency of native gonadotropic hormones in female chub mackerel, *Scomber japonicus*. *Reprod Biol Endocrinol.*, 査読有, 10 (2012), 71.

[学会発表] (計 12 件)

- Adachi H. Temporal expressions of Kisspeptins, Kisspeptin receptors, GnRHs and GtHs during the prepubertal process of chub mackerel, *Scomber japonicus*. 10th Asian Fisheries and Aquaculture Forum. 2 May, 2013, Yosus, Korea
- Ohga H. Functional analysis of Kisspeptin peptides using an intracerebroventricular administration method in adult chub mackerel (*Scomber japonicus*). 10th Asian Fisheries and Aquaculture Forum. 2 May, 2013, Yosus, Korea
- Selvaraj S. (2013) Kiss1 pentadecapeptide induces spermatogenesis in prepubertal male

chub mackerel, *Scomber japonicus*. 10th Asian Fisheries and Aquaculture Forum. 1 May, 2013, Yosus, Korea

- Nyuji M. Purification and characterization of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in chub mackerel *Scomber japonicus*. 10th Japan-Korea, Korea-Japan Joint Symposium on Aquaculture, 8 Dec, 2012, Nagasaki, Japan
- Selvaraj S. Neuroanatomical distribution of kisspeptin systems in the brain of the perciform scombroid fish (*Scomber japonicus*). 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain, 7 Nov, 2012, Tokyo, Japan
- Ohga H. Identification and seasonal expression variations of two subtypes of kisspeptin receptors in a scombroid fish, chub mackerel. 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain, 7 Nov, 2012, Tokyo, Japan
- Nyuji M. Localization and differential expression profiles of two gonadotropin receptors in the ovarian follicles of chub mackerel (*Scomber japonicus*). 7th International Symposium of Fish Endocrinology, 5 Sept, 2012, Buenos Aires, Argentina
- Selvaraj S. Chronic implantation of Kiss1 pentadecapeptide induces spermiation in adult immature male of chub mackerel. 7th Congress of the AOSCE, 5 March, 2012, Kuala Lumpur, Malaysia
- 入路光雄. マサバにおけるGtH受容体の機能解析. 日本水産学会春季大会, 平成25年3月27日, 東京
- 児玉諒子. マサバの初回成熟過程とそれに伴うGtHβサブユニット遺伝子の発現解析. 日本水産学会秋季大会, 平成24年9月16日, 下関
- 大賀浩史. マサバ雌雄の脳、脳下垂体および生殖腺における生殖周期に伴う2種キスペプチン受容体の遺伝子発現解析. 日本水産学会秋季大会, 平成24年9月16日, 下関
- 入路光雄. マサバ卵濾胞組織における生殖腺刺激ホルモン受容体mRNAの発現局在. 日本水産学会秋季大会, 平成24年9月16日, 下関

[図書] (計 1 件)

松山倫也, 恒星社厚生閣, 漁業資源の繁殖特性研究□-1 飼育実験を用いた繁殖特性研究. 2013, 35-49

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松山 倫也 (MATSUYAMA MICHIIYA)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：00183955

### (2) 研究分担者)

研究者番号：

### (3) 連携研究者

研究者番号：