

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660173

研究課題名(和文) 魚類の松果体・脳・下垂体における春機発動関連因子の探索

研究課題名(英文) Search of puberty related factors in pineal, brain, and pituitary gland of fish

研究代表者

征矢野 清 (SOYANO, Kiyoshi)

長崎大学・海洋未来イノベーション機構・教授

研究者番号：80260735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の春機発動(生まれて初めて成熟すること)の生理メカニズムの解明に向けて、脳内で発現するキスペプチン遺伝子の発現、脳下垂体における生殖腺刺激ホルモン遺伝子の解析を行った。また、初回成熟を左右する成長と年齢の関係をハタ科魚類を用いて調べた。その結果、脳内におけるキスペプチン遺伝子の配列が明らかになるとともに、その測定が可能となった。この遺伝子は、卵黄蓄積を行っている個体で高い発現がみられた。また、魚種によって生殖腺刺激ホルモンの発現は性分化前と後で異なることがわかった。さらに、同じハタ科魚類であっても、初回成熟の決定に強く関わる因子は年齢である場合と成長である場合があることがわかった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the physiological and endocrinological mechanisms of puberty (first maturation after hatching) in fish, gene expression of kisspeptin in brain and immunohisto-chemistry of gonadotropins protein expression in the pituitary gland were conducted using the red spotted grouper, the kelp grouper, and the honeycomb grouper. In addition, growth analysis and age determination were done to obtain the information on relationships between these factors and first maturation. As a result, the sequence of the kisspeptin gene in the brain was obtained. It was also found that expression of gonadotropins in immature fish varied depending on fish species. In addition, the role of two factors (age and growth) on first maturation is different in each species of grouper.

研究分野：繁殖生理学

キーワード：春機発動 初回成熟 生殖腺発達 脳下垂体 成熟関連ホルモン 年齢 成長

1. 研究開始当初の背景

(1) 魚類の性分化・生殖腺発達・成熟・産卵のメカニズムの解明は、これに係るホルモンの解析やその遺伝子の解析により急速に進んでいる。しかし、春機発動(初回成熟開始)に関する情報は断片的であり(奥澤, 2006)、そのメカニズムは、全く解明されていない。通常の成熟の開始は、日長と水温を中心とする外部環境要因によって制御されている。日長と水温の変化などの環境情報は脳内で処理され、脳下垂体から生殖腺刺激ホルモンが放出されることによって成熟は開始される。しかし、春機発動は単純に外部環境要因によって誘導されるわけではない。生殖現象を制御するホルモン(生殖内分泌系)の活性化を誘導する環境情報の感受伝達機構が整わない限り成熟は開始されないと考えられている。この問題を解決するためには、初回成熟を人為的に誘導する技術や実験対象魚を産卵から初回成熟まで維持飼育することが必要である。また、実験に適した魚種の選定も重要であるが、このような条件が整っていないのが、本研究を開始する当時の現状であった。

(2) 大型魚類の養殖、特に種苗生産現場では、設備及び飼育コストの軽減のため、成熟を人為的に調節し、小型かつ若齢の親魚を作出する技術開発が求められている。これには春機発動のメカニズム解明が必須である。このような背景から、本課題は、水産業の活性化に向けて取り組むべき重要な研究課題として、注目されていた。

2. 研究の目的

春機発動は、成熟に関わる生殖内分泌系が活性化させることによって惹き起こされると考えられる。それには、成長と年齢の2つの内因性要因が春機発動において重要な役割を担うと推測されている(Taranger et al., 2010)。我々はハタ科魚類のクエを用いて、初回成熟年齢と体サイズの関係調べたところ、クエでは3歳で成熟を開始するが、成長の悪い個体は4歳以降で成熟する。しかし、2歳魚の場合、3歳魚同様の成熟可能サイズに達した個体でも、成熟することはない。これは、初回成熟の開始には年齢と成長の両者が関与することを強く示唆する。そこで、本研究では成長・年齢と成熟に関わる情報伝達物質の変動を明らかにするとともに、生殖内分泌系の活性化に関わる因子の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) カンモンハタを用いた成熟関連脳内情報伝達物質の解析と年齢と成熟の関係解析: 春機発動に関連する因子の一つであると考えられる脳内情報伝達物質であるキスペプチン(Gopurappilly et al., 2013)の遺伝子(kiss)に注目し、ハタ科魚類におけるkissの単離同定を行った。カンモンハタの成

熟個体より脳を摘出し、すでに他魚種で明らかにされている kiss 遺伝子の配列をもとにプライマーを作成し、kiss 1 および kiss 2 の両遺伝子をクローニングするとともに、測定系の確立を行った。また、天然海域にて採集した様々なサイズのカンモンハタを用いて、耳石による年齢査定と生殖腺の組織学的観察による成熟の有無の確認を行った。あわせて、未熟個体と成熟個体の脳を用いて kiss の発現を調べた。

(2) 脳下垂体における生殖腺刺激ホルモンの発現解析: 30 日齢から 333 日齢までのクエとキジハタを用いて、脳下垂体における生殖腺刺激ホルモン(濾胞刺激ホルモン FSH と黄体形成ホルモン LH)のタンパク発現を、これらのホルモンに対する特異抗体を用いた免疫組織化学的手法により、解析した。また、FSH および LH 発現解析に用いた個体の生殖腺組を組織学的に観察し、性分化の有無、生殖腺発達状態を明らかにした。

(3) アカハタを用いた成長と年齢の関係解析: 長崎近郊で捕獲した 372 個体のアカハタを用いて、成長・年齢と成熟状態の関係を解析した。成長は体重を測定することによって、年齢は耳石の輪紋を測定することによって査定した。また、生殖腺の組織学的観察を行い、生殖腺発達と成熟の有無を調べた。

4. 研究成果

(1) カンモンハタを用いた成熟関連脳内情報伝達物質の解析と年齢と成熟の関係解析: キスペプチン遺伝子には kiss 1 と kiss 2 が存在することが知られており、幾つかの魚種でその遺伝子解析が行われている(Shi et al., 2010)。クエとキジハタでは両者が存在するが、カンモンハタでは kiss 2 のみが確認された。得られた kiss 2 には kiss 10 と呼ばれる kiss 遺伝子に特有の配列が確認された。

様々なサイズのカンモンハタ(全 26 個体)の年齢と成熟の有無を調べたところ、1 歳から 7 歳までの個体が確認された。成熟が確認されたのは 2 歳からで、61%の個体が成熟することがわかった。3 歳になると全ての個体が成熟した。以前に我々が調べたクエと異なり、成熟は年齢よりも体サイズと強い相関があることがわかった。しかし、検体数が少ないことから、今後さらなる調査が必要である。一方、kiss 2 の発現は、卵黄蓄積が確認された個体で優位に高いことがわかった。年齢による違いは認められず、成熟との関連が強く示唆された。Kiss 2 は初回成熟開始前に発現が強くなると予想されるが、今回の研究では明らかにできなかったことから、春機発動前後の個体を用いて、発現の解析をする予定である。

(2) 脳下垂体における生殖腺刺激ホルモンの発現解析: ふ化後のキジハタを定期的に採集し、脳下垂体における FSH と LH の発現を免疫組織化学的に観察したところ、性的に未

分化の 55 日齢の個体において両ホルモンとも発現が確認された。その後、卵巣への分化が確認された個体では両ホルモンの発現が増加したが、この時期になると LH の発現が FSH のそれに比べ強いことがわかった。クエにおける両ホルモンの発現もキジハタのそれとよく一致し、性分化後に発現が強まること、特に LH の発現が高いことがわかった。

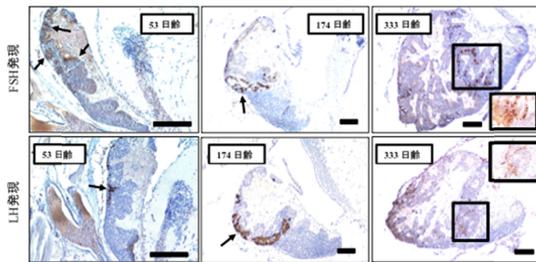


図1. クエ脳下垂体におけるFSHおよびLHの発現
茶色がホルモンの発現部位

ヤイトハタでは、FSH が LH に先立って発現するという (Murata et al., 2012)。これは本研究で得られたキジハタとクエにおける発現と異なる。性分化後 100 日齢を超えた個体の発現はヤイトハタでも、本研究の結果と類似した発現を示したことから、性分化前後の FSH と LH の役割は、魚種によって異なる可能性がある。ふ化から約 1 年が経過した、333 日齢のクエでは LH に変わり、FSH の発現が強くなった。ハタ科魚類における以上の結果より、性分化には両ホルモンが関わるものの、その後の発達には LH が強く作用する可能性が示された。しかし、333 日齢で FSH が強く発現したことから、初期の生殖腺発達の進行にこのホルモンが特異的に関与している可能性が考えられた。本実験で比較のために行ったマダイ 1 歳魚における両ホルモンの発現解析では、FSH が強く発現するものの、LH の発現は認められなかった。これは、初期の生殖腺における FSH の特異的作用を予想させる。成熟個体では両ホルモンの働きは明らかとされており、LH が雌としての成熟を誘導し、FSH は雌から雄への性転換、およびその後の雄としての成熟に関わるという (Kobayashi et al., 2010)。しかし、春機発動以前から初期の生殖腺発達に関わる両ホルモンの作用は、成熟の引き金がかかれた個体のそれと大きく異なると考えられることから、両ホルモンの機能を、春機発動と関連付けて理解するためには、発現解析を継続的に進めるべきである。

(3) アカハタを用いた成長と年齢の関係解析：本種の耳石は年に 1 度不透明帯を形成することから、年齢査定に適していることがわかった。そこで、耳石による年齢査定を行ったところ、本種の成長曲線は $L_t = 429.579(1 - e^{-0.169(t+2.628)})$ と推定された。最小成熟全長は 210mm であり、220mm までの成熟率は 37.5% であった。全長が 280mm を超えると 75.0% の個体が成熟した。これは成長が成熟に強く影響することを示している。しかし、

本種の成熟サイズは生息域によって大きく変わる可能性がある。フィリピンにおいて捕獲された本種の最小成熟サイズは 138mm であるという (Mishima et al., 2006)。

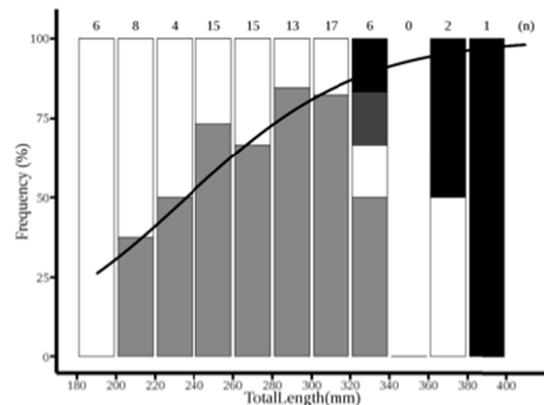


図2. 体長と成熟の関係:

□ : 未成熟雌, ■ : 成熟雌, ■ : 間性, ■ : 雄

一方、年齢と成熟の関係を調べところ、1 歳魚では成熟個体を確認することはできなかったが、2 歳魚で 15.8% の成熟率を示し、3 歳を超えるとそれは 70% を超えることがわかった。

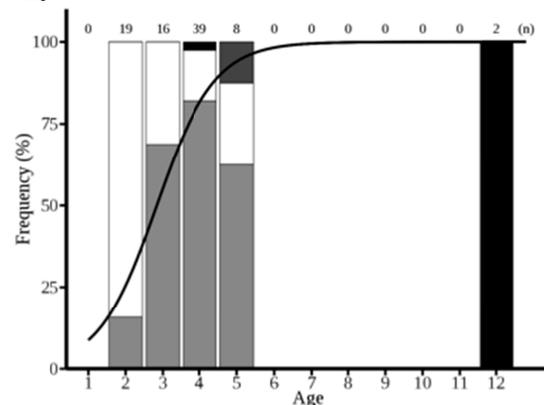


図3. 年齢と成熟の関係:

□ : 未成熟雌, ■ : 成熟雌, ■ : 間性, ■ : 雄

以上の結果から、本種は 2 歳より成熟が可能であるものの、本格的な成熟は 3 歳以降であり、また、成長の良い個体ほどその傾向は高いことがわかった。しかし、成長を促進させる高水温飼育では、成熟年齢を早めることが可能である (Oh et al., 2016)。この個体を用いて、FSH と LH および kiss の発現を解析することで、春機発動と内分泌因子の関係を調べる予定であったが、測定するまでに至らなかった。このサンプルは現在解析を進めている。

< 引用文献 >

- Gopurappilly, R., Ogawa, S., Parhar, I. S. (2013). Functional significance of GnRH and kisspeptin, and their cognate receptors in teleost reproduction. *Frontiers in Endocrinology*, 4, 1-13.
- Kobayashi Y., Alam M.A., Horiguchi R., Shimizu A., Nakamura M. (2010). Sexually dimorphic expression of

gonadotropin subunits in the pituitary of protogynous Honeycomb Grouper (*Epinephelus merra*): Evidence that Follicle-Stimulating Hormone (FSH) induces gonadal sex Change. Bio. Rep.82,1030-1036.

- ③ Mishima H., Gonzales B., Pagaliawan H., Moteki M., Khono H. (2006). Reproductive biology of blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*, in Sulu Sea, Philippines. La mer, 44, 23-31.
- ④ 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*. Gen. Comp. Endocrinol.178 :587-592.
- ⑤ Oh S., Lee C., Kim B., Jo S., Boo M., Yeo I., Kim H., Soyano K. Lee Y. (2016). Early onset of puberty at elevated rearing water temperature in red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *The 13th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea*. p. 7.
- ⑥ 奥澤 公一 (2006). 魚類の初回成熟. 水産総合研究センター研究報告, 4, 75-85.
- ⑦ Shi, Y., Zhang, Y., Li, S., Liu, Q. Lu, D., Liu, M., Meng, Z., Cheng, C. H. K., Liu, X., Lin, H. (2010). Molecular identification of the kiss1/kiss1ra system and its potential function during 17 alpha-methyltestosterone-induced sex reversal in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Biol. Reprod., 83, 63-74.
- ⑧ Taranger L. G., Carrillo M., Schulz W. R., Fontaine P., Zauny S., Felip A., Weltzien F., Dufour S., Karlson O., Norberg B., Andersson E., Hansen T. (2010). Control of puberty in farmed fish. Gen. Comp. Endocrinol., 165, 483-515.

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)

[学会発表](計 11 件)

Amagai, T., Izumida, D., Soyano, K. Physiological changes during final oocyte maturation induced by HCG injection and mela-released pheromone exposure in the honeycomb grouper, The 13th International Meeting on

Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East Chia Sea, 2016年11月29日, キャナルシティーホール (福岡県福岡市)

Xu W., Manabe, S., Soyano, K. Immunohistochemical identification of pituitary FS and LH cells during sex differentiation and early gonadal development in groupers, The 13th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East Chia Sea, 2016年11月29日, キャナルシティーホール (福岡県福岡市)

Sugiyama, S., Soyano, K. Relationship among growth, age, and maturation in the blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*, The 13th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East Chia Sea, 2016年11月29日, キャナルシティーホール (福岡県福岡市)

Manabe, S., Amagai, T., Soyano, K. Gene analysis of kisspeptin and age determination, The 13th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East Chia Sea, 2016年11月29日, キャナルシティーホール (福岡県福岡市)

杉山周平・征矢野清 長崎近郊におけるアカハタの成長・年齢および成熟, 平成28年度日本水産学会秋季大会, 2016年9月9日, 近畿大学農学部(奈良県奈良市)

Sugiyama, S., Soyano, K. Physiological analysis of maturation size and age in the blacktip grouper *Epinephelus fasciatus*, The 12th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East Chia Sea, 2015年11月12日, Jeju National University (Jeju, Korea)

Amagai, T., Izumida, D., Soyano, K. Effects of hCG and sex pheromone on final maturation in the honeycomb grouper, *Epinephelus merra*. The 12th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East Chia Sea, 2015年11月12日, Jeju National University (Jeju, Korea)

Xu, W., Amagai, T., Song, J., Soyano, K. The histological observation of pituitary and gonad in the juvenile groupers, The 12th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East Chia Sea, 2015年11月12日, Jeju National University (Jeju, Korea)

天谷貴史・泉田大介・真鍋颯一朗・征矢野清 カンモンハタ雌の最終成熟・排卵過程, 平成27年度日本水産学会秋季大会, 2015年9月24日, 東北大学(宮城県仙

台市)

Sugiyama, S., Izimida, D., Soyano, K.
Induction of ovarian maturation in
blacktip grouper *Epihaphelus*
fasciatus by the manipulation of water
temperature, The 11th International
Meeting on Reproductive Biology of
Aquatic Animals of the East Chia Sea,
2014 年 12 月 6 日, ルートイングランデ
ィア太宰府 (福岡県太宰府市)
征矢野清 親魚養成と受精卵確保, 日本
水産増殖学会シンポジウム, 2014 年 10
月 19 日, 広島大学大学院生物圏科学研究
科 (広島県東広島市)

〔図書〕(計 1 件)

征矢野清・照屋和久・中田久 八夕科魚類
の水産研究最前線, 恒星社厚生閣, 2015, 157
pp.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

征矢野 清 (SOYANO, Kiyoshi)

長崎大学・海洋未来イノベーション機構・
教授

研究者番号: 80260735