

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07588

研究課題名(和文) 魚類生殖腺性分化における組織構築と性的可塑性の関連

研究課題名(英文) Morphogenesis and plasticity of gonadal sex differentiation in fish

研究代表者

平井 俊朗 (Hirai, Toshiaki)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：30238331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：性統御技術の高度化に資するべく、「雌雄生殖腺の組織構築過程と性的可塑性の関連性」に着目し、養殖事業において全雌化が重要となるニシキゴイならびにサケ科魚を用いて、全雌生産の鍵となる偽雄(遺伝的雌の性転換)について形態・分子生物学的解析を行った。サケ科魚では、偽雄生産で問題となる輸精管形成不全の鍵となる輸精管形成の初期段階(上皮性細胞の集塊形成)を捉えることができ、この細胞に特異的に発現する分子の特定を進めている。一方、ニシキゴイについては、雄化処理直後と比較して親魚育成飼育後の段階で雄化率の低下が観察され、機能的雄化に到達し得ない不完全な雄化が起こっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Artificial sex control with hormonal manipulation is an effective tool for aquaculture production of commercially valuable monosex fish, while functionally complete sex change requires optimized administration with proper dose and period. To investigate the cause of functional deficiency in sex change for practical use, histogenetic and organogenetic process of gonadal formation was examined in relation to the failure of artificial masculinization of carp and salmon. In salmon, an epithelial cell population was observed in the first step of sperm duct formation in genetic male, while this histogenesis was frequently deficient in androgen treated (masculinized) genetic female. In carp, many of genetic female treated with the hormonal manipulation had testes, but milt could not be stripped in many of them, suggesting some physiological disorder.

研究分野：生殖生物学

キーワード：性分化 器官形成 生殖輸管

1. 研究開始当初の背景

- (1) 水産増養殖対象種の中には市場価値に大きな雌雄差を持つものがあり、多くの種では実用に耐えうる効率的な性統御技術の確立には至っていない。その一因として生産現場における長年の試行錯誤に基づいた経験的手技に頼っている部分が多く、詳細な評価がなされてこなかったことが挙げられる。
- (2) ニシキゴイは世界的競争力を有するわが国発祥の観賞魚養殖の主要種であり、商品価値の高い雌のみを生産する技術が待望されている。しかし、全雌生産に必要な偽雄（性転換雄）生産技術の成功率は十分とは言えないのが現状である。一方、食用魚であるサケマス類でも全雌生産が必要とされる場合があり、偽雄生産において輸精管形成不全により生殖腺実質部が完全に精巢化・成熟しているにも関わらず精液が搾出できない個体の出現が問題となっている。
- (3) 以上のような問題の解決のために生殖腺組織構築過程の詳細な理解が必要である。

2. 研究の目的

- (1) 本研究では輸管系を含めた生殖器官全体の組織構築過程と機能獲得との関連性について詳細な理解を得て、より効率的に、完全に機能的な性転換誘導するための技術開発を目指した。
- (2) 生殖腺各部の形成過程について形態学的知見を集積し、これまであまり注目されてこなかった生殖輸管の形成過程についても調査を行い、生殖腺各部の性的可塑性の臨界期に関連する形態的・分子的基盤の情報集積をもとに、効率的に完全な性転換を誘導しうる作業プロトコルの提案を目指した。

3. 研究の方法

- (1) ニシキゴイ遺伝的全雄群、遺伝的全雌群から、飼育条件調整により成長速度の異なる複数群を作成し、体成長と生殖腺形成過程の進行との関係を形態的、分子生物学的に調査する。同時に雌性ホルモン、雌性ホルモン合成阻害剤投与による人為性転換誘導実験を開始し、生殖腺形成過程への影響を追跡することにより、体成長と性的可塑性との関連性を調査する。
- (2) アメマス通常交配群について、孵化後から経時的に生殖腺形成過程の進行を調査し、同時に性決定遺伝子（SdY）検査による遺伝的性判別を行うことで、形態的雌雄差発現の時期および様相について明らかにする。特に雄における輸精管形成の初期過程について追跡する。得られた知見を基に、雄化処理を施した遺伝的全雌群について生殖腺形成過程を調

査し、遺伝的雄との比較により輸精管形成不全の原因解明を目指す。

4. 研究成果

- (1) コイの体成長に伴う生殖腺各部の形態的雌雄差発現について経時的な追跡を行った。その結果、体サイズと生殖腺各部の形態形成との関連性について以下の点が明らかとなった。1) 全長4から5cmにかけての時期に雌生殖腺の頭部側から卵巣腔形成が開始される。2) 次に全長5から6cmにかけての時期に雌特異的な生殖細胞の増殖が開始される。3) 全長9から10cmにかけての時期に卵形成が開始され、初期周辺仁期卵母細胞が出現する。4) 一方、雄では全長5から6cmにかけての時期に生殖腺基部に輸精管の形成が開始される。5) 次に全長6cmから7cmにかけての時期に精巢内に精小嚢が形成される。6) 全長8から9cmにかけての時期に精子形成開始に伴う生殖細胞の増殖が開始される。
- (2) コイについて異なる体サイズからの性転換処理実験を行った。遺伝的雌（XX）に対する雄化試験では、6cm 辺りから精巢化効率が上昇し、それ以前では比較的高率で不妊化することが明らかとなった。雄化試験では高率で精巢化が確認できたにも関わらず、精液搾出可能個体の割合が少なかった。そのため、経過観察を行ったところ、処理終了12ヶ月後もほぼ同率で精巢組織は維持されていたが、精液搾出率については時間経過による改善は確認できず、性転換魚における輸精管機能に何らかの構造的または機能的不全が生じている可能性が示唆された。そのため、性転換雄の生殖腺尾部側（総排泄口直前）における生殖輸管の形成状況について組織学的観察を行ったが、通常雄（XY）精液搾出魚との比較において明確な形態差は確認できず、機能的不全の可能性が高まった。
- (3) ところが、処理24ヶ月後の観察では精液搾出不能魚の多くは不妊化個体であり、前年度までの成績との間に齟齬が生じてしまった。この原因については現在のところ不明であるが、前年度の組織学的観察において精巢化が確認されたものの、精巢組織の発達が全般的に悪かったことと関連している可能性が考えられた。
- (4) 本研究において、これまでコイの雄化処理に用いられてきた雄性ホルモン、雌性ホルモン合成阻害剤に加えて、ストレスホルモンであるコルチゾールが雄化を誘導しうること、その作用は雌性ホルモン同時投与によって阻害されることが明らかとなった。
- (5) コイ遺伝的雄（XY）に対する雌化試験では全長5cm以前の時期から、比較的低濃

度の処理を開始し、これを長期間（1年間）継続することで高い卵巣化効率を得ることができた。また、得られた性転換雌では処理終了 24 ヶ月後には排卵が確認された個体もいたことから、機能的にも完全な卵巣化が誘導できたと推察された。

- (6) アメマスについては、輸精管形成過程に注目して雌雄生殖腺の形態形成過程を追跡した。その結果、孵化後 80 日では生殖腺に形態的雌雄差が見られなかったのに対して、孵化後 140 日では遺伝的雄（XY）でのみ生殖腺門部に輸精管の起源と思われる内腔が出現した。
- (7) 一方、遺伝的雌（XX）の雄化試験では、生殖腺本体の精巣化は誘導できなかったが、生殖器系尾部側では不完全ながら雄化の兆候と思しき形態的所見が確認された。そこで孵化後 12 ヶ月において不完全ながら雄化傾向（卵巣分化の阻害）が見られた個体について生殖腺全体の観察を行った。その結果、生殖腺本体（頭部側）で部分的に精子形成が確認され、その基部には輸精管が形成され、尾部側でも輸精管の原基と思しき上皮細胞の集塊が観察された。一方、中間部では輸精管形成は確認されず、頭部寄りの部位では卵母細胞が観察された。さらに生殖腺全体で雌（卵巣）に特徴的な繊毛上皮が確認された。以上の結果より、輸精管形成は生殖腺の両端から中央部に向かって進行することが示唆された。
- (8) 雄化処理方法をそれまでの断続浸漬から、連続浸漬へと変更し、3 種の薬剤で複数の濃度区を設定した。その結果、いくつかの実験区で精巣化を示す組織学的所見を得ることができ、それらの個体では生殖腺後部全体に輸精管の原基と思しき上皮性細胞の集塊が見いだされた。現在、本飼育試験を継続中であり、成熟に向けて輸精管形成過程を追跡するとともに輸精管形成細胞の起源を探るべく、特異マーカーの探索を継続中である。
- (9) 当初の計画では今回、確認された輸精管原基と思しき組織についてレーザーマイクロダイセクションによる特異的発現遺伝子解析を実施予定であったが、研究期間における研究代表者の所属機関移籍、使用予定機材のメーカーサポート終了など、想定外の事態が発生したため、実施することは出来なかった。しかし、計画途中より柴田博士を分担者に迎え、パラフィン切片からの mRNA 回収・高感度分析を可能とする組織固定法を開発することができたので、今後本法を用いて輸精管発生過程の分子機構を明らかにする予定である。
- (10) 本研究において、魚類組織観察に汎用されているブアン固定が組織切片染色像

に影響を及ぼすことを見だし、詳細に調査を行った。その結果、固定液内での長期保存による過固定の影響は温水魚であるコイよりも冷水魚であるサケ科魚で顕著であり、ブアン液の酸性度を低減することにより、過固定の影響が低減され、固定液をそのまま保存液としても利用できることが明らかとなった。

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 5 件）

小川智史、飯島啓、柴田安司、中村將、平井俊朗、ニジマス各臓器のヘマトキシリン・エオシン染色像に対するブアン固定条件の影響、帝京科学大学紀要、査読有、14、2018、65-75

<http://id.nii.ac.jp/1409/00000507/>

飯島啓、柴田安司、野津了、中村將、平井俊朗、コイ雌の血中エストロゲン量に対するストレスホルモンの影響についての予備的検討、帝京科学大学紀要、査読有、14、2018、65-75

<http://id.nii.ac.jp/1409/00000519/>

Horiguchi Ryo, Nozu Ryo, Hirai Toshiaki, Kobayashi Yasuhisa, Nakamura Masaru, Expression patterns of sex differentiation-related genes during gonadal sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*., General and Comparative Endocrinology、査読有、257、2018、67-73

DOI: 10.1016/j.ygcen.2017.06.017

小川智史、佐藤将、兵藤則行、中村將、平井俊朗、魚類組織切片のヘマトキシリン・エオシン染色に対するブアン液による固定条件の影響、帝京科学大学紀要、査読有、12、2016、121-127

<http://id.nii.ac.jp/1409/00000298/>

小川智史、佐藤将、兵藤則行、中村將、平井俊朗、ニシキゴイの生殖腺発達過程に関する組織学的観察、帝京科学大学紀要、査読有、11、2015、61-75

<http://id.nii.ac.jp/1409/00000217/>

〔学会発表〕（計 10 件）

小川智史、柴田安司、小林健一郎、兵藤則行、中村將、平井俊朗、アメマス遺伝的雌の生殖腺形成 に対する雄化処理の影響、平成 30 年度日本水産学会春季大会、2018

Satoshi Ogawa, Kei Iizima, Yasushi Shibata, Noriyuki Hyodo, Shoh Sato, Masaru Nakamura, Toshiaki Hirai, Relationship between sexual

plasticity and body growth in the ovary of Koi carp (*Cyprinus carpio*)..、18th International Congress of Comparative Endocrinology、2017
小川智史、飯島啓、兵藤則行、佐藤将、柴田安司、中村將、平井俊朗、コイ遺伝的雌生殖腺の性的可塑性に及ぼす体成長の影響、第42回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム、2017
飯島啓、小川智史、柴田安司、兵藤則行、佐藤将、北野健、中村將、平井俊朗、ニシキゴイ遺伝的雌の生殖腺性分化に及ぼす高温ストレスの影響、第42回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム、2017
Toshiaki Hirai, Kei Iizima, Yasushi Shibata, Noriyuki Hyodo, Shoh Sato, Takeshi Kitano and Masaru Nakamura, Chronic administration of cortisol induces gonadal masculinization in common carp.、8TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FISH ENDOCRINOLOGY、2016
小川智史、飯島啓、兵藤則行、佐藤将、柴田安司、中村將、平井俊朗、コイの体成長に相関する雌卵巣発達段階と性的可塑性の関連性、第41回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム、2016
飯島啓、小川智史、森田沙矢、柴田安司、兵藤則行、佐藤将、中村將、平井俊朗、コルチゾールおよび高温によるコイの雄化に関する研究、第41回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム、2016
竹中亨彰、長船奈津美、風藤行紀、吉浦康寿、平井俊朗、北野健、メダカにおける生殖腺刺激ホルモンの役割、第41回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム、2016
平井俊朗、島大樹、丸野康宏、篠原詢貴、深沢海人、小川智史、兵藤則行、佐藤将、中村將、コイ生殖腺の性分化と体成長の関連性、日本動物学会第86回大会、2015
Toshiaki Hirai, Shuhei Yamaguchi, Tsubasa Konno, Kei Iizima, Saya Morita, Noriyuki Hyodo, Shoh Sato, Takeshi Kitano and Masaru Nakamura, Effect of cortisol on gonadal sex of genetic female carp.、第40回日本比較内分泌学会・第37回日本比較生理生化学会合同大会 (CompBiol 2015 広島大会) 2015

〔図書〕(計0件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 俊朗 (HIRAI, Toshiaki)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号：30238331

(2) 研究分担者

柴田 安司 (SHIBATA, Yasushi)
帝京科学大学・生命環境学部・准教授
研究者番号：80446260

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()