

平成22年5月26日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19380107

研究課題名（和文） 成熟促進技術開発のための魚類の初期卵成長機構解析

研究課題名（英文） Mechanism of previtellogenic oocyte growth in fish

研究代表者

足立 伸次（ADACHI SHINJI）

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授

研究者番号：40231930

研究成果の概要（和文）：ウナギでは、性分化以前からのエストロゲン処理は雌化および卵巣形成ばかりではなく、初期卵成長促進効果があることが示唆された。一方、前卵黄形成期の卵母細胞の成長はアンドロゲン処理により促進されることが確認された。チョウザメでは、卵径約100 μ mから約400 μ mまでの卵成長には数年あるいは10数年を要するが、この時期の卵成長はエストロゲンあるいはアンドロゲン依存ではなく、体成長依存であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Estrogen treatment may promote oocyte growth during ovarian differentiation in eel and sturgeon. Androgen treatment accelerates previtellogenic oocyte growth in eel. Somatic growth may promote oocyte growth between estrogen and androgen-dependent phase in fish.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2008年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

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：生理、初期卵成長、ウナギ、チョウザメ、イトウ、エストロゲン、アンドロゲン

1. 研究開始当初の背景

有用魚種において、雌魚の成熟促進に関しては国内外で数多くの研究があるが、卵黄蓄積開始後のいわゆる卵黄形成期以降のステージの卵母細胞を対象としており、それ以前の初期卵成長期（前卵黄形成期）の卵母細胞の発達促進に関してはほとんど報告がない。チョウザメやイトウなど成熟に長期間を要する魚種では、この初期卵成長期が非常に長いことが判っているが、この

期間を効果的に短縮する方法がないのが現状である。従って、この初期卵成長期を大幅に短縮するためには、ほとんど判っていない初期卵成長機構を明らかにする必要がある。

一般に、早く成長した個体は成熟が早いことは経験的に知られており、成長と成熟は密接な関係にあると思われる。成長に関与する成長ホルモンと成熟に関与する生殖腺刺激ホルモンはともに脳下垂体で産生さ

れるタンパクホルモンであり、脳下垂体中の産生部位も近接している。高成長期には活発に成長ホルモンが産生されるが、どのような機構で成熟促進に繋がるかは全く不明である。

これまで我々は、主に雌ウナギを用いて成熟統御技術の確立を目指して、卵形成の分子機構解析を行ってきた。雌ウナギは天然状態では 7-10 年で成熟を開始し、下りウナギとなって産卵のため降海する。この下りウナギの卵巣中の卵母細胞は卵黄形成初期の段階にあるが、飼育環境下ではこれ以上発達しないことから、ホルモン処理により人為的に成熟誘導している。近年、下りウナギの安定的入手が困難になっていることおよび養成ウナギの多くが雄になることから、稚魚（シラスウナギ）を雌性ホルモン（エストロゲン；エストラジオール-17 β ）処理した雌化養成ウナギが親魚として使用されている。ところが、この雌化養成ウナギは 1-2 年で卵黄形成開始前後にまで達することが判ってきた。エストロゲン処理されていない通常の養成ウナギは上述のように多くが雄になるが、わずかに出現する雌魚は 1-2 年で卵黄形成開始にまで達することはない。このことは、シラスウナギに対するエストロゲン処理が雌化ばかりではなく、早期成熟誘導効果があることを示唆している。

魚類を含む卵生脊椎動物では、卵黄形成にエストロゲンが、精子形成に雄性ホルモン（アンドロゲン；魚類では 11-ケトテストステロン）が重要な役割を果たすことはよく知られている。しかし、前卵黄形成期にどのようなホルモンが関与しているかは全く判っていなかった。ところが最近、雌魚において成熟初期から血中アンドロゲンが検出されることなどが明らかになり、アンドロゲンが初期卵成長に何らかの役割を果たしていることが示唆された。これまで我々は、雌ウナギにおいて血中アンドロゲンが検出されること、卵巣でアンドロゲンが生成されることおよび卵巣にアンドロゲン受容体が存在することを明らかにしている。従って、アンドロゲンは卵巣に作用して卵形成に何らかの役割を果たしていると思われる。

2. 研究の目的

以上のように、初期卵成長には成長ホルモン、エストロゲンおよびアンドロゲンが関与していると思われ、これらホルモンの役割を詳細に解明することは、チョウザメ、イトウおよびウナギのみならずハタ類やマ

グロなど成熟に数年から二十年以上を要する魚種における早期成熟誘導技術の開発に必須である。このような理由から、本研究を企画した。本研究では、チョウザメ、イトウおよびウナギを用いて、ホルモン処理が初期卵成長に及ぼす影響を詳細に調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 初期卵成長に及ぼすエストロゲンおよびアンドロゲン投与の影響

ウナギ、イトウおよびチョウザメを用いて、性分化前から卵黄形成開始前の様々な時期に、エストロゲン（エストラジオール-17 β ；E2）およびアンドロゲン（17 α -メチルテストステロン；MT）混合飼料を与え、初期卵成長に及ぼす影響を調べた。

(2) チョウザメ稚魚の脳下垂体の成長ホルモン、濾胞刺激ホルモンおよび黄体形成ホルモンの発現解析

アムールチョウザメ脳下垂体の成長ホルモン（GH）、濾胞刺激ホルモン（FSH）および黄体形成ホルモン（LH）の cDNA クローニングおよび抗体作製を行なった。また、バステルに加えてその他の種あるいは交雑種の繁殖も行ない、得られた稚魚の性分化および初期卵成長に伴う脳下垂体ホルモン発現変化を調べた。

4. 研究成果

(1) 初期卵成長に及ぼすエストロゲンおよびアンドロゲン投与の影響

シラスウナギ（性分化前）を 5 ヶ月間 E2 処理して雌化した個体を用いて、さらに 4 ヶ月間 E2 処理を継続する群と未処理群とを比較した。その結果、E2 処理群は未処理群より生殖腺体指数が高く、約 100 μ m までの卵母細胞の成長を促進した。また、E2 処理群の卵母細胞中の油球数も増加傾向にあった。従って、シラスウナギへのエストロゲン処理は雌化ばかりではなく、卵成長促進効果があることが示唆された。

未熟なウナギ（卵径約 150 μ m）に MT を経口投与した結果、投与終了時には MT 処理群の卵径は対照群に比べて有意に高値を示した。しかし、その後は対照群の卵母細胞は成長を続けたのに対し、MT 処理群の卵母細胞は急速に退行した。従って、MT 投与による初期卵成長促進効果は常に MT が存在している必要があり、投与終了後にその効果は失われることが明らかになった。

イトウ 2 年魚（性分化後）を用いて、E2 お

よびMTを12ヶ月間経口投与した。その結果、E2およびMT処理による卵成長促進効果は認められなかったが、FSHおよびLHの発現が促進された。特に、E2によるLH発現誘導は顕著であった。

ベストルチョウザメ2ヶ月魚（性分化前）を用いて、E2およびMTを18ヶ月間経口投与した。その結果、E2処理では雌化に加えて若干の卵成長促進効果が、MT処理では雄化に加えて明確な精子形成促進効果が認められた。また、E2およびMTを18ヶ月間経口投与した後、さらに通常餌で12ヶ月間飼育を続けた。しかし、E2およびMT処理では卵成長促進効果は認められなかった。

(2) チョウザメ稚魚の脳下垂体の成長ホルモン、濾胞刺激ホルモンおよび黄体形成ホルモンの発現解析

アムールチョウザメ脳下垂体のGH、FSHおよびLHのcDNAクローニングを行ない、得られた配列をもとに、大腸菌発現系により組換えタンパク質を作製後、家兎に免疫してそれぞれの特異抗体を作製した。これら抗体は、アムールチョウザメだけではなく、その他チョウザメ類のGH、FSHおよびLH産生細胞も特異的に検出できることが明らかになった。

絶滅種ミカドチョウザメの人為繁殖に国内で初めて成功し、孵化前後より孵化後2ヵ月まで、脳下垂体および生殖腺形成過程を観察した。脳下垂体に関しては、孵化前後からその原基は確認され、成長とともに濾胞状から扁平状構造へと形態は変化した。GHの発現は孵化前後からすでに認められたが、FSHおよびLH発現は調べたすべての期間（孵化後2ヵ月まで）検出されなかった。生殖腺に関しては、孵化後1ヵ月の個体で生殖隆起が観察された。2ヵ月の個体においては未分化生殖腺が形成され、生殖腺内に少数の生殖細胞も確認された。

さらに、カルーガとアムールチョウザメの天然交雑種カラムの人為繁殖に国内で初めて成功し、孵化後6ヵ月まで、脳下垂体および生殖腺形成過程を観察した。その結果、GH発現は孵化前後からすでに認められたが、FSHおよびLH発現は調べたすべての期間（孵化後6ヵ月まで）検出されなかった。生殖腺に関しては、孵化後6ヵ月には、生殖腺上皮に陥入がみられるタイプと、陥入がないタイプの2型の生殖腺が観察された。この上皮の陥入は卵巣分化の開始を意味することから、孵化後6ヵ月前後が生殖腺の形態的性分化開始期であると考えられた。

以上の結果から、性分化以前からのエストロゲン処理は雌化および卵巣形成ばかりではなく、初期卵成長（ウナギでは卵径約100 μ mまで）促進効果があることが示唆された。一方、前卵黄形成期の卵母細胞の成長（ウナギでは卵径約150 μ m）はアンドロゲン処理により促進されることが確認された。雌化養成ウナギにおいては、卵径約100 μ mから約150 μ mまでは短期間（数か月）で進行するが、チョウザメではこの時期の卵成長（卵径約100 μ mから約400 μ mまで）には数年あるいは10数年を要する。すなわち、この時期の卵成長はエストロゲンあるいはアンドロゲン依存ではなく、体成長依存であることが示唆された。従って、この時期の卵成長促進に、エストロゲンおよびアンドロゲン投与は、FSHおよびLH発現誘導はするものの、効果的ではないことが明らかになった。現在のところ、この時期の卵成長促進には、高水温下での飽食給餌による体成長促進しか方法がなく、より効果的な方法の開発が課題として残された。少なくともチョウザメにおいては、数年に及ぶ成長ホルモン投与やその他ペプチドホルモン投与は現実的ではなく、画期的な方法の開発が望まれる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

① Kazeto Y, Kohara M, Miura T, Miura C, Yamaguchi S, Trant JM, Adachi S, Yamauchi K., Japanese eel follicle-stimulating hormone (Fsh) and luteinizing hormone (Lh): production of biologically active recombinant Fsh and Lh by Drosophila S2 cells and their differential actions on the reproductive biology. Biol Reprod, 査読有, 79, 2008, 938-946.

② Katsu Y., Kohno S., Hyodo S., Ijiri S., Adachi S., Hara A., Guillette L. J. Jr. and Iguchi T., Molecular cloning, characterization and evolutionary analysis of estrogen receptors from phylogenetically ancient fish., Endocrinology 査読有, 149, 2008, 6300-6310.

③ Kayaba, T., Sasaki, N., Adachi S. and Yamauchi K., Effects of pituitary glycoprotein hormones and thyroid hormones on in vitro vitellogenin incorporation into organ-cultured oocytes in Japanese eel, *Anguilla japonica.*, Zool. Sci., 査読有, 25, 2008, 334-343.

[学会発表] (計21件)

① 白瀧将人・井尻成保・足立伸次他3名, ア

ムールチヨウザメの生殖腺形成過程における生殖細胞の特定，平成21年度日本水産学会北海道支部会，2009年11月28日，函館

② 佐野裕章・安部智貴・登坂亮太・井尻成保・足立伸次，雌化ニホンウナギのエストラジオール17β投与による初期卵成長促進効果，平成21年度日本水産増殖学会，2009年10月31日，下関

③ 鈴木初美・山田憲・井尻成保・足立伸次，アムールチヨウザメ (*Acipenser schrenckii*) の *dmrt1* および *foxl2* 遺伝子のクローニングと発現解析，平成21年度日本水産学会秋季大会，2009年10月2日，盛岡

④ 山下勝正・井尻成保・足立伸次他8名，北海道沿岸で捕獲された天然チヨウザメ交雑種の人為繁殖，平成21年度日本水産学会秋季大会，2009年10月2日，盛岡

⑤ 足立伸次・井尻成保・荒井克俊・山内皓平他12名，絶滅種ミカドチヨウザメ *Acipenser mikadoi* の人為繁殖，平成21年度日本水産学会春季大会，2009年3月28日，東京

⑥ 山下勝正・井尻成保・足立伸次他5名，ミカドチヨウザメの生殖関連器官形成過程，平成21年度日本水産学会春季大会，2009年3月28日，東京

⑦ Dong-Hwan Shin, Shigeho Ijiri, Shinji Adachi and Kohei Yamauchi 他5名，Immunolocalization of growth hormone in pituitary gland of sturgeon, Hokkaido University 21st COE Program The 7th International Symposium, November 18, 2008, Sapporo

⑧ Tomoki Abe, Shigeho Ijiri, Katsutoshi Arai, Shinji Adachi and Kohei Yamauchi 他12名，The early development of kaluga sturgeon, *Huso dauricus*, Hokkaido University 21st COE Program The 7th International Symposium, November 18, 2008, Sapporo

⑨ Ryota Tosaka, Yukinori Kazeto, Shigeho Ijiri, Shinji Adachi, Kohei Yamauchi, Seasonal changes in ovarian development and reproductive hormones in cultured Japanese eel (*Anguilla japonica*), 5th World Fisheries Congress, October 22, 2008, Yokohama

⑩ Hatsumi Suzuki, Satoshi Yamada, Shigeho Ijiri, Shinji Adachi, Kohei Yamauchi, Molecular cloning of *dmrt1* and *foxl2* of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*), 5th World Fisheries Congress, October 22, 2008, Yokohama

⑪ Ryota Tosaka, Yukinori Kazeto, Shigeho Ijiri, Shinji Adachi, and Kohei Yamauchi, Previtellogenic oocyte growth in feminized Japanese eel (*Anguilla japonica*), International Symposium on Sex Determination and Gametogenesis in Fish: Current Status and Future Directions, May 31, 2008, Honolulu, Hawaii

⑫ 登坂亮太・風藤行紀・井尻成保・東藤孝・足立伸次・山内皓平，雌化養成ウナギの卵巣および生殖関連ホルモンの周年変化，平成20年度日本水産学会春季大会，2008年3月28日，静岡

⑬ 足立伸次・井尻成保・荒井克俊・山内皓平他12名，ダウリアチヨウザメ *Huso dauricus* の人為繁殖，平成20年度日本水産学会春季大会，2008年3月28日，静岡

⑭ 鈴木あゆ・風藤行紀・井尻成保・足立伸次・山内皓平，アムールチヨウザメ成長ホルモンのcDNAクローニング，平成19年度日本水産学会秋季大会，2007年9月26日，函館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 伸次 (ADACHI SHINJI)
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
研究者番号：40231930

(2) 研究分担者

井尻 成保 (IJIRI SHIGEHO)
北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授
研究者番号：90425421

東藤 孝 (TODO TAKASHI)
北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授
研究者番号：60303111
(H19 → H20 連携研究者)