

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580204

研究課題名（和文） 新規脳内成熟制御因子を用いた革新的種苗生産技術の開発

研究課題名（英文） Development of techniques for seed production using new brain factors related to reproduction

研究代表者

香川 浩彦（KAGAWA HIROHIKO）

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：60169381

研究成果の概要（和文）：新規脳内生殖関連因子を利用した新たな成熟誘起技術の開発を目的に研究を行い、ウナギやカンモンハタのキスペプチン及びキスペプチン受容体の遺伝子を単離し、これらの遺伝子がウナギの成熟やカンモンハタの性転換に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、非産卵期の未熟なカンモンハタを生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン投与もしくは高水温・長日処理により成熟誘導することに成功した。

研究成果の概要（英文）：To develop new techniques for induction of sexual maturation using brain neuroendocrine factors related to reproduction, we newly isolated genes of kisspeptin and their receptors (GPR54) from brains of eels and honeycomb groupers and demonstrated that these genes play critical roles on the sexual maturation in the eel and the sex change in the grouper. Moreover, treatments of gonadotropin-releasing hormone analogue or of long photoperiod with high water temperature to sexually immature female grouper induced sexual maturation at period of non-breeding season.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学分野

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：ウナギ、ハタ科魚類、人為催熟、種苗生産、キスペプチン、キスペプチン受容体

1. 研究開始当初の背景

水産有用魚種の養殖や栽培漁業にとって、種苗生産技術はその根幹をなす重要な技術である。我々はこれまで魚類の卵子や精子形成に係わる内分泌機構を分子・遺伝子レベルで解明し、これらの基礎的な知見をもとにマダイやウナギでホルモン投与による成熟誘起技術の開発や種苗生産技術の開発を行い、世界で初めてシラスウナギの生産に成功し

た。しかし、これまでのホルモン投与による成熟誘起技術では、良質の卵や精子をいつでも欲しいときに生産するという養殖業や栽培漁業にとって理想的な種苗生産技術の開発には至っていないのが現状である。このためには、性的に全く未熟な親魚を任意の時期に成熟誘導するこれまでにない新たな技術開発が必須となる。この問題を解決する上で、画期的とも言える重要な発見が最近鳥類で

なされた。それは、生殖中枢である視床下部において生殖腺刺激ホルモン抑制ホルモン (GnIH) が発見されたことである。このウズラで発見された GnIH は生殖腺刺激ホルモンや生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンなどの生成・分泌を抑制し、成熟を抑制しているというこれまでにない新しい発見であった。一方で、魚類でもキンギョやヒメマスにおいて GnIH 様分子が同定されているが、興味深いことに、魚類ではウズラとは逆に生殖腺刺激ホルモンの生成・分泌を促進することが報告されている。しかし、それ以外の魚類での報告はなく、この分子が魚類の成熟誘起に利用された実績は全くない。また、最近、新規脳内ペプチドとして、キスペプチンが発見された。キスペプチンも GnIH と同様、哺乳類では GnRH の生成・分泌を介して、生殖腺刺激ホルモンの生成・分泌を制御し、春機発動 (初めての成熟開始) に関与していると考えられている。魚類でも、2 種類のキスペプチンが発見されているが、それらの生理的な役割については不明な点が多い。今後 GnIH やキスペプチンの研究が進展すれば、これらの知見をもとに、新たな成熟誘起技術や種苗生産技術が開発されるものと期待される。

2. 研究の目的

本研究では、水産重要魚種であるウナギやハタ科魚類を用いて良質卵や精子を欲しいときにいつでも生産できる成熟誘起技術を開発することを目的に、新規脳内成熟因子 (GnIH、キスペプチン など) の同定や動態及び生理機能を分子・遺伝子レベルで明らかにするとともに、これを用いた新たな成熟誘起技術を開発し、いつでも欲しいときに種苗生産できる革新的な技術の開発に資することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) GnIH 及びキスペプチンのクローニング

キンギョやウズラで報告された GnIH の遺伝子情報からプライマーを設計し、ウナギの脳から抽出した RNA を用いて、PCR 法や RACE 法をにより cDNA のクローニングを試みた。

また、キスペプチンのクローニングには、ハタ科魚類やマサバなどのキスペプチンの遺伝情報からプライマーを設計し、カンモンハタおよびウナギの脳から抽出した RNA を用いて、GnIH で用いた方法でキスペプチンをクローニングした。

(2) ウナギ脳内におけるキスペプチン様ニューロンの分布

これまで明らかになっているシーバスのキスペプチンのアミノ酸配列をもとに、キスペプチンペプチドを人工合成し、このペプチドに対する抗体を作成し、免疫組織化学的方法を用いて、ウナギ脳内のキスペプチン様ニューロンの分布

や発生・発育に伴う変化について研究を行った。

(3) カンモンハタの新規成熟誘起技術の開発

非産卵期のカンモンハタの成熟を誘起することを目的に、ウナギで新たに開発した徐放的ホルモン投与方法 (オスモティックポンプ法) を用いて、生殖腺刺激ホルモン類似体を投与し、非産卵期のカンモンハタの成熟誘起を試みた。

4. 研究成果

(1) GnIH 及びキスペプチンのクローニング

ウナギの脳から、これまで報告されたキンギョやウズラの GnIH 遺伝子の情報から作成したプライマーを用いてクローニングを行ったところ、目的とする GnIH は得られなかった。インドウナギを用いて行った実験でも同様の結果であった。従って、ウナギでは、これまで報告されたような GnIH の分子種が存在しない可能性も考えられた。そこで、GnIH と分子構造や生理機能が似ているキスペプチン及びその受容体である GPR54 のクローニングを PCR 法や RACE 法を用いて行った。その結果、ウナギの脳からキスペプチン2と思われる遺伝子断片を得ることができ、現在全長配列をクローニング中である。ウナギのキスペプチン受容体遺伝子 (GPR54) のクローニングに成功し、その生理的意義について検討中である。さらに、カンモンハタにおいて初めて2種類のキスペプチン (キスペプチン1とキスペプチン2) およびその受容体である GPR54 のクローニングに成功した。カンモンハタのキスペプチンと GPR54 の生理的役割を解明するために、この遺伝子情報をもとに GPR54 遺伝子の測定系を開発し、カンモンハタの成熟や性転換に伴うキスペプチンと GPR54 の動態を観察したところ、雌から雄への性転換時に GPR54 の遺伝子発現が増加することが明らかとなり、性転換にキスペプチンが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

今後、ウナギのキスペプチン2と思われるペプチドやこれまで報告のあった GnIH 及びハタ科魚類、マサバなどのキスペプチン分子を人工合成し、これらのペプチドが生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンや生殖腺刺激ホルモンの生成に及ぼす影響を明らかにする予定である。

(2) ウナギ脳内におけるキスペプチン様ニューロンの分布

ウナギ脳内のキスペプチンニューロンの分布を明らかにする目的で、シーバスのキスペプチンに対する抗体を作成し、免疫組織化学的方法を用いて観察したところ、キスペプチンニューロンは、視床前核、終神経節、及び脳室周囲核などに分布することが明らかとなり、ウナギでキスペプチンが存在することや生殖に関わっている可能性が初めて明らかとなった (図1と図2)。また、

キスペプチンニューロンはふ化後0日目から30日目までのレプトケファルス幼生では観察されず、208日目になって初めて終神経節と脳室周囲核 (NPPv) に出現した。シラスウナギから性分化前までは、終神経節とNPPvに加えて脳室周囲核 (NLTp) や視索前野でも少数の免疫陽性細胞が観察された。性分化後の雌雄のウナギでは終神経節、視索前野、NPPvおよびNLTpで免疫陽性細胞が観察され、免疫陽性細胞数も成魚とほぼ同じになった (図3)。このことから、キスペプチンニューロンネットワークの基本構造は、シラスウナギにおいて完成し、性分化後までには細胞数や軸索が発達し、成魚とほぼ同じ構造になることが明らかになった。以上の免疫組織化学的な観察結果から、ウナギ脳内にもキスペプチンが存在し、性成熟に係わっている可能性が示唆された。

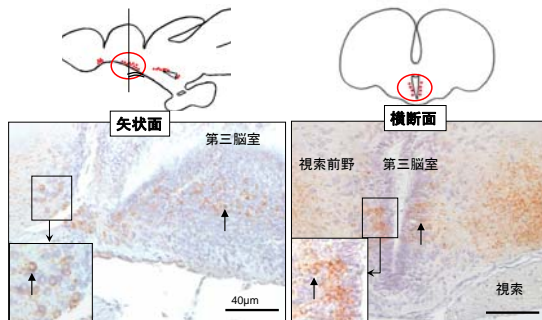
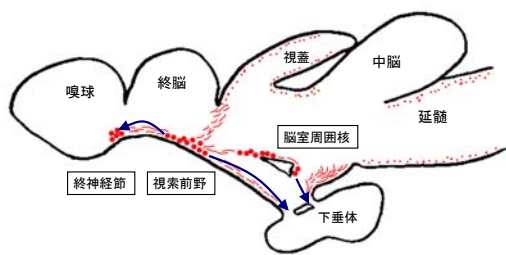


図1 ウナギ脳内視索前野におけるキスペプチン様ニューロンの分布。矢印はニューロンの細胞体を示す。



●:免疫陽性細胞 —:免疫陽性軸索

図2 ウナギ脳内キスペプチン様ニューロンの分布

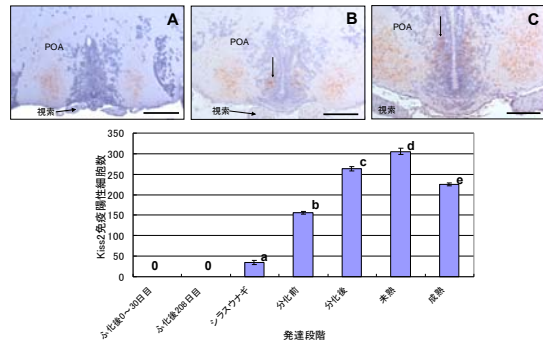


図3 ウナギの発生・成長に伴う視索前野におけるキスペプチン様ニューロンの分布 (上段)と細胞数の変化。異なるアルファベットは統計的に有意な差があることを示す。A:シラスウナギ、B:性分化前のウナギ、C:未熟なウナギ

3. カンモンハタの新規成熟誘起技術の開発

新たに開発した徐放的なホルモン投与方法 (オスモティックポンプ法) を用いて、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンを投与し、非産卵期のカンモンハタの成熟誘起に初めて成功した (図4と表1)。また、高水温・長日処理により、非産卵期のカンモンハタを成熟誘導することに成功した (図4と表1)。高水温又は長日のみの処置を行った群では対照群と比較して GSI の有意な増加が見られず、カンモンハタの環境因子による成熟誘導には高水温と長日の両方の処置が必要であることが示唆された。また、自然環境下で生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンを投与するよりも高水温長日下で生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン投与を投与した方が、成熟がより促進された。

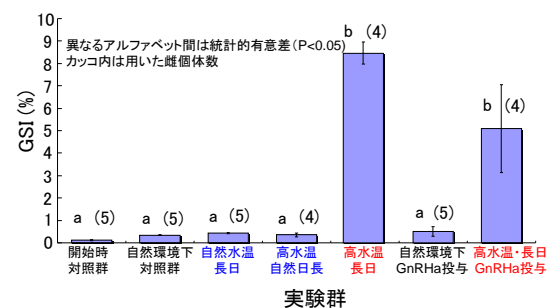


図4 環境因子の調節及び生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン投与がカンモンハタの生殖腺体指数 (GSI) に及ぼす影響

表1 環境因子の調節及び生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン投与がカンモンハタの卵母細胞の発達に及ぼす影響

	個体数	周辺 仁期	油球 期	卵黄形成 前期	卵黄形成 後期	核移 動期	成熟 期	卵黄球期 退行卵	雄
開始時 対照群	5	5							
自然環境下 対照群	5	5							3
自然水温 長日	5	4	1						
高水温 自然日長	4	3			1				1
高水温・長日	4				4				2 2
自然環境下 GnRH投与	5	3		1			1		2
高水温・長日 GnRH投与	4			3		1			2 4

縦の欄は、実験条件を示す。また、横の欄は卵母細胞の発達段階を示す。

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4件)

Kagawa H, Kishi T, Gen K, Kazeto Y, Tosa ka R, Matsubara H, Matsubara T, Sawaguchi, S. Expression and localization of aquaporin 1 b during oocyte development in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Reproductive Biology and Endocrinology*, 査読有、9、2011、DOI:10.1186/1477-7827-9-71

Kagawa H, Sakurai Y, Kazeto Y, Gen K, Im aizumi H, Masuda Y. Mechanism of oocyte maturation and ovulation, and its application to seed production in the Japanese eel. *Fish Physiology and Biochemistry*, 査読有、20 12、DOI: 10.1007/s10695-012-9607-3

Kanemaru T, Nakamura M, Murata R, Kuroki K, Horie H, Uchida K, Senthilkumaran B, Kagawa H. Induction of sexual maturation of the female honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, in the nonbreeding season by modulating environmental factors with GnRH analogue implantation. *Aquaculture*, 査読有、358/359 巻、2012、85-91.

Kagawa H, Fujie N, Imaizumi H, Masuda Y, Oda K, Adachi J, Nishi A, Hashimoto H, Teruya K, Kaji S. Using osmotic pumps to deliver hormones to induce sexual maturation of female Japanese eels, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 査読有、388/391 巻、2013、30-34.

[学会発表] (計5件)

堀内怜生、今泉均、増田賢嗣、橋本博、小田憲太朗、照屋和久、金丸竜也、増田洋亮、櫻井雄太、香川浩彦 ウナギの卵成熟・排卵や卵質に及ぼすサケ脳下垂体抽出液および生殖腺刺激

ホルモン放出ホルモンの効果 日本水産学会秋季大会 2010年9月23日 京都大学

金丸竜也、村田良介、中村将、Mohammad Alam、香川浩彦 非産卵期カンモンハタ*Epinephelus merra*の成熟に及ぼす環境因子調節及びGnRH投与の効果 日本水産学会秋季大会 2010年9月23日 京都大学

Kagawa H, Sakurai Y, Kazeto Y, Gen K, Im aizumi, H, Masuda Y. Mechanism of oocyte maturation and ovulation, and its application to seed production in the Japanese eel. 9th International Symposium Reproductive Physiology of Fish 2011年8月10日 Cochin, India

堀江ひかり、B. Senthilkumaran、今泉均、増田賢嗣、神保忠雄、香川浩彦 ウナギの脳内におけるキスペプチン様ペプチドの分布に関する免疫組織学的研究 平成24年度日本水産学会秋季大会 2012年09月15日、独立行政法人水産大学校

堀江ひかり、B. Senthilkumaran、今泉均、増田賢嗣、神保忠雄、香川浩彦 ウナギの発生・成長に伴う脳内キスペプチン様ペプチドの分布に関する免疫組織学的研究 平成25年度日本水産学会春季大会 2013年03月29日、東京海洋大学

[図書] (計1件)

香川浩彦、他、築地書館、うなぎ 謎の生物、2012、288 (108-161)

[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

香川 浩彦 (KAGAWA HIROHIKO)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：60169381

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

内田 勝久 (UCHIDA KATSUHISA)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：50360508