

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450312

研究課題名(和文) 温帯性多回産卵魚のモデル生物・マミチヨグを用いた水温刺激による成熟促進反応の解析

研究課題名(英文) Analysis of the maturational process caused by temperature stimuli using an adequate model fish, the mummichog

研究代表者

清水 昭男 (Shimizu, Akio)

国立研究開発法人水産総合研究センター・中央水産研究所・グループ長

研究者番号：90371830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：マミチヨグにおいて、水温上昇刺激に対する生殖内分泌系の応答を調べるため、2月上旬より8℃-11L、16℃-11Lの条件下で6週間飼育した。8℃区においては成熟がほとんど進まず、16℃では雌雄とも完熟状態に達していた。脳下垂体中FSH mRNAは常にある程度の発現量を示したが、水温による差は小さかった。LH mRNAは実験開始時には低かったが、3週目以降、16℃区の方が8℃区よりも著しく高かった。血中FSH濃度は水温上昇後4及び6週目に増加したが、LH濃度は水温による差は認められなかった。以上のことから、FSHとLHは水温上昇による成熟促進反応について、異なった役割を示すと考えられた。

研究成果の概要(英文)：To examine temperature effects on mummichog (*Fundulus heteroclitus*) reproduction, adult fish were kept under low (8C) or moderate (16C) temperature conditions. After 6 weeks, both females and males were fully matured in the 16C group, whereas maturity was unchanged in the 8C group. Amounts of FSH β -mRNA showed considerable value throughout the experiment, and showed little difference between the two temperatures. Amounts of LH β -mRNA was very low at the beginning of the experiment, and showed very high values in the 16C group in the latter part of the experiment. Plasma FSH levels showed high values in the 16C group in the latter part of the experiment, while plasma LH levels did not show distinct changes. These results indicate that FSH and LH have different roles for stimulating the maturation caused by the elevation of water temperature.

研究分野：魚類生殖生理

キーワード：マミチヨグ FSH LH GnRH 成熟 水温

1. 研究開始当初の背景

ヒトや大型動物等、実験的解析が不可能または困難な生物の生体機能を知る上で、適切なモデル生物を用いた解析を行うことは極めて重要かつ有用である。魚類のモデル生物としてはゼブラフィッシュが有名であり、脊椎動物の分子遺伝学、発生遺伝学研究に最適なモデルとして広く用いられている。生殖生物学分野に関しても、生殖腺形成、性分化等生殖現象の初期過程の研究において、多大な貢献をなしている。しかしながら、それ以降の生殖現象の研究の材料としては必ずしも適当な実験材料とは言えない。まず、非常に小型であるので採血によるホルモン濃度の測定がほぼ不可能であり、組織採取にも困難が多い。また、環境変化に乏しい熱帯原産の魚類であるため、環境条件による成熟現象の制御機構に関する研究には用いることが出来ない。

温帯に棲む動物の成熟現象は一般的に日長等の環境条件によって制御されている。鳥類や哺乳類等の恒温動物では日長が主要な環境条件となり、その制御機構の内分泌学的分子メカニズムについても解明が進んでいる。一方、魚類は変温動物であり、繁殖生態も著しく多様性に富んでいる。産卵期に関しては、春～夏産卵型、秋産卵型、冬産卵型等の様式があり、それぞれについて異なった環境条件の支配を受けていると考えられる。秋産卵型のアユやサケマス類等においては日長が成熟現象制御の主要な環境要因であり、鳥類等と類似した分子メカニズムが想定されている。一方、温帯性魚類の大部分を占め、水産上重要な魚種を数多く含む春～夏産卵型魚類においては、一般に水温条件が最も重要であるが¹⁾、温度条件が成熟に及ぼす影響は恒温動物では研究出来ないため、これらの魚類に関しては、脳 脳下垂体 生殖腺系において生体情報がいかなるメカニズムによって伝達されるのかを、独自の研究によって明らかにすることが必要である。

ゼブラフィッシュ等には前記の弱点があることから、従来より成熟現象のモデルとして盛んに使われてきた魚種はサケマス類であるが、この仲間、春～夏産卵型多回産卵魚とは生殖特性が大きく異なっており、成熟に及ぼす水温の影響も不明瞭である。

マミチヨグ *Fundulus heteroclitus* は北米原産のカダヤシ目広塩魚であるが、春夏産卵型に分類され、産卵盛期にはほぼ毎日産卵する多回産卵魚である。本種の生殖年周期と環境条件については、申請者らによって詳しく調べられており、産卵期に先立つ急激な生殖腺発達と秋から冬にかけて起こる生殖腺の初期発達がいずれも主として水温により制御されていることが明らかとなっている²⁾。

本種に関してはさらに、Linら³⁾を初めとする研究によって生殖現象に関する内分泌因子の分子生物学的研究が急速に進んでお

り、現在、2種類の生殖腺刺激ホルモン(FSH及びLH)及びその受容体、GnRH及びその受容体、各種ステロイド合成酵素等が遺伝子クローニングされ、発現解析が可能となっている。それに加えて、本種はFSH及びLHが精製された唯一の小型実験魚であるとともに最近になってELISA法を用いた血中FSH及びLH濃度が測定可能となり、この両者が大きく異なった変動パターンを示すことがサケ科魚類以外では初めて明らかとなった⁴⁾。生殖内分泌系の理解には生殖現象の中枢をなす生殖腺刺激ホルモンの血中濃度の測定が不可欠であり、これらの解析を実験的に詳しく行えるのは温帯性多回産卵魚では事実上マミチヨグのみである。

2. 研究の目的

本研究においては、マミチヨグを用いて生殖周期の異なる時期において水温変化の刺激を与え、高い頻度でサンプリングを行って各種生体分子のmRNA定量及び血中ホルモン濃度の測定を行うことにより、脳 脳下垂体 生殖腺系における生体分子情報を解析する。各組織における各種情報伝達物質及びその受容体の発現誘導の時系列を解析することにより、水温刺激に起因する生体情報の流れを明らかにし分子機構を推定する。

これらをもとに、温帯性多回産卵魚における、水温刺激-生殖腺発達過程の内分泌学的分子情報伝達モデルの骨格を構築し、将来の実験的検証に使用可能なものにすることが基本的な目標である。これに加えて、組織片の生体外培養によるホルモン効果の検証実験等によるモデルの妥当性の向上を図るとともに、生殖内分泌系のトランスクリプトーム解析を行い、将来の本格的なディファレンシャル解析による新規分子機構探索の基盤とする。

このように、生殖周期の詳細とその環境条件による制御が明らかになっている魚を用いて、精密な環境条件コントロールのもと、水温条件による脳 脳下垂体 生殖腺系の分子内分泌学的制御機構を明らかとする試みは世界でも本研究がほとんど唯一であり、脊椎動物の成熟現象制御機構解明の基礎的な価値のみならず、応用的にも親魚養成のために非常に有益である。

本研究の結果、温帯性多回産卵魚の成熟過程における分子モデルの原型が出来れば、すでにゲノム情報が得られているクロマグロ等において各生体分子のホモログ情報を得ることは容易である。これらの発現解析を通じて、クロマグロ等、マミチヨグと同様の生殖特性を持つが、親魚の取り扱いが困難であるとともに、成熟に長い年数を要する魚において、ホルモン処理、環境条件処理、選抜による遺伝的早期成熟群の作製等による早期成熟の達成に貢献するところが大きい。

3. 研究の方法

(1) マミチヨグにおいて、水温上昇刺激に対する生殖内分泌系の応答を調べるため、自然条件で飼育した成魚を、産卵期前の低水温期より、低温に保つ群と水温上昇群の二群に分ける。これらについて、細かな時間的間隔でサンプリングを行い、脳、脳下垂体、生殖腺の各組織について、mRNA 測定用のサンプルを採取するとともに、ホルモン濃度測定用の血液サンプルを採取する。これを水温上昇群が完熟状態に達するまで継続する。採取したサンプルについては、後日、脳における GnRH 等の生殖関連脳ホルモン遺伝子、脳下垂体における生殖腺刺激ホルモンサブユニット遺伝子 (FSH、LH、GtH)、生殖腺における、生殖腺刺激ホルモン受容体遺伝子 (FSHR、LHR) 等について mRNA 定量を行い、血液中の生殖腺刺激ホルモン (FSH 及び LH) 濃度を測定する。

(2) マミチヨグにおいて、産卵終了後の未熟期における水温下降刺激に対する生殖内分泌系の応答を調べるため、自然条件下で飼育した成魚を、産卵期終了時の高温 - 短日域より、高温に保つ群と水温低下群とに分ける。これらについて、同様に時系列的サンプリングを行って組織及び血液サンプルを採取し、後日、同様にリアルタイム PCR による mRNA 量の測定と ELISA による血中ホルモン量の測定とを行う。

(3) さらに、組織片の生体外培養によるホルモン効果の検証実験等を行うとともに、次世代シーケンサーを用いて、生殖内分泌中枢の発現遺伝子を網羅的に解析してカタログ化を行い、将来の本格的なディファレンシャル解析を行う基盤とする。

4. 研究成果

(1) 本種は主として春の水温上昇によって成熟が促進され、産卵期が始まることが明らかにされている。自然条件で飼育した成魚を、2月上旬より 8⁻11L、16⁻11L の条件下で 6 週間飼育した。6 週間飼育後、8 区においては成熟がほとんど進まなかったが、16 区においては、雌雄ともほとんどの個体が完熟状態に達していた。脳下垂体における生殖腺刺激ホルモン mRNA のリアルタイム PCR による測定結果において、FSH mRNA 量は常にある程度の発現量を示すとともに水温による差が小さく、4 週目のみ 16 の方が有意に高かった。一方、LH mRNA の発現量は実験開始前には著しく低かったが、16 の実験区では 1 週目から高い傾向を示し、3 週目以降は 16 の方が 8 よりも著しく高かった。ELISA 法による血中生殖腺刺激ホルモン量の測定結果において、FSH 濃度は水温上昇後 4 週目と 6 週目に増加したが、LH 濃度には水温による明らかな差は認められなかった。以上のことから、FSH と LH は水温上昇刺激に対する反応について大きな差があり、水温上昇による成

熟促進反応について著しく異なった役割を示すことが分かった。マミチヨグを用いた様々な実験の結果から、FSH はごく初期を含めた生殖腺の発達に、LH は生殖腺発達の後期過程と配偶子の最終成熟に働くことが示唆されているが、本実験の結果もそれを支持するものとなった。また、生殖腺刺激ホルモンの血中濃度変化と下垂体中 GnRH mRNA 量の変化は大きく異なることが明らかとなった。さらに、脳の GnRH1 mRNA のリアルタイム PCR による測定結果は LH mRNA の発現量の変化に類似し、GnRH と LH との密接な関連が示唆された。

(2) 本種は産卵終了後の未熟な状態から、主として秋の水温低下によって初期段階の生殖腺発達が促進されることが明らかになっている。9 月下旬の未熟期より、マミチヨグ成魚を 16⁻11L、28⁻11L の両条件下で 6 週間飼育した。この間、1 週間ごとにサンプリングを行った。6 週間飼育の結果、16 区においては初期段階の生殖腺発達が認められたが、28 区においてはほとんど生殖腺発達が起こらなかった。血中生殖腺刺激ホルモン量を ELISA 法により調べたところ、FSH 濃度、LH 濃度ともに、水温による明らかな変化は認められなかった。水温が直接生殖腺に影響している可能性もあり、初期段階の生殖腺発達における生殖内分泌系の関与においては、さらなる検討が必要と思われる。

(3) マミチヨグ脳下垂体の生体外培養によって、生殖腺刺激ホルモンの合成と分泌に及ぼす GnRH の影響を調べた。その結果、産卵期においては、GnRH は FSH と LH 双方の合成と分泌を促進することが明らかとなった。中でも LH の分泌に対する促進効果が顕著であり、これは非産卵期でも明瞭であった。さらに、マミチヨグ脳より RNA を採取し、逆転写して得た cDNA を次世代シーケンサーによる解析にかけ、生殖内分泌系関連の遺伝子同定を試みた。Kiss2、GnIH、GnRHR2 等の重要な遺伝子を同定することが出来、部分配列が判明した。

< 引用文献 >

- 清水昭男 (2010), 環境条件による魚類生殖周期の制御機構. 水産海洋研究, 74, 58-65.
- Shimizu (2003), Effect of photoperiod and temperature on gonadal activity and plasma steroid levels in a reared strain of the mummichog (*Fundulus heteroclitus*) during different phases of its annual reproductive cycle. General and Comparative Endocrinology, 131, 310-324.
- Lin, Y.-W. P., Rupnow, B. A., Price, D. A., Greenberg, R. M., and Wallace, R. A. (1992). *Fundulus heteroclitus*

gonadotropins. 3. Cloning and sequencing of gonadotropic hormone (GTH) I and II b-subunits using the polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 85, 127-139.

Shimizu, A., Ohkubo, M., Hamaguchi, M. (2012). Development of non-competitive enzyme-linked immunosorbent assays for mummichog *Fundulus heteroclitus* gonadotropins - examining seasonal variations in plasma FSH and LH levels in both sexes. *General and Comparative Endocrinology*, 178, 463-469.

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)

Tohru Kobayashi, Yoshifumi Horie, Akio Shimizu, and Shinji Adachi, Expression and localization of gonadotropic hormone subunits (Gpa, Fshb, and Lhb) in the pituitary during gonadal differentiation in medaka, *General and Comparative Endocrinology*, 査読有, Vol.204, 2014, 173-180.

Akio Shimizu, Reproductive physiology of the mummichog *Fundulus heteroclitus* - an excellent experimental fish, *Aqua-BioScience Monographs*, 査読有, Vol. 7, 2014, 79-116.

DOI:10.5047/absm.2014.00703.0079

M. P. D. Yorio, D. I. P. Sirkin, T. H. Delgadin, Akio Shimizu, Kazuyoshi Tsutsui, G. M. Somosa, and P. G. Vissio, Gonadotropin-inhibitory hormone in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*: structure, brain distribution and differential effects on the secretion of gonadotropins and growth hormones, *Journal of Neuroendocrinology*, 査読有, Vol. 28, 2016, in press.

[学会発表](計 5 件)

大久保 誠、清水昭男、マミチヨグ GTH 受容体の発現解析、日本水産学会春季大会、2014 年 3 月 28 日、北海道大学水産学部(函館)

大久保 誠、清水昭男、マミチヨグ *Fundulus heteroclitus* における GnRH-GnRHR 系の機能解析、日本水産学会秋季大会、2014 年 9 月 20 日、九州大学(福岡)

大久保 誠、清水昭男、マミチヨグ *Fundulus heteroclitus* における GnRH 及び GTH の年周変化、日本水産学会秋季大会、2014 年 9 月 20 日、九州大学(福岡)

清水昭男、マミチヨグ *Fundulus heteroclitus* GTH 免疫陽性細胞の発生及び雌の生殖年周期に伴う変化、日本水産学会春季大会、2015 年 3 月 28 日、東京海洋大学(東京)

大久保 誠、清水昭男、マミチヨグ FSH 及び LH に対する GnRH アナログの作用、日本水産学会春季大会、2016 年 3 月 27 日、東京海洋大学(東京)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 昭男 (SHIMIZU, Akio)

国立研究開発法人水産総合研究センター・中央水産研究所・水産遺伝子解析センター・グループ長

研究者番号: 90371830

(2)研究分担者

筒井 和義 (TSUTSUI, Kazuyoshi)

早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授
研究者番号: 20163842

(3)連携研究者

馬久地 みゆき (MEKICHI, Miyuki)

国立研究開発法人水産総合研究センター・中央水産研究所・水産遺伝子解析センター・研究員

研究者番号: 40594007

安池 元重 (YASUIKE, Motoshige)

国立研究開発法人水産総合研究センター・中央水産研究所・水産遺伝子解析センター・研究員

研究者番号: 20604820