

平成30年6月15日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292109

研究課題名(和文) ティラピア生殖腺の性分化開始機構の解明とその応用

研究課題名(英文) Studies on molecular mechanism of gonadal sex differentiation and its application for aquaculture in Nile tilapia

研究代表者

井尻 成保 (IJIRI, SHIGEO)

北海道大学・水産科学研究院・准教授

研究者番号：90425421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：まず、雄選抜に実用的に利用できるDNAマーカーを開発した。よって、超雄偽雌(Y雌)作製が可能となり、商業的に利用できる安定的超雄(Y雄)大量生産技術を確立した。卵巣分化では、fshシグナルの関与は限定的であり、転写因子foxl2、アロマトラーゼ発現、雌性ホルモン産生の直線的シグナルによって開始されることが示唆された。精巣分化では、精巣誘導因子gsdfは転写因子dmrt1の下流因子ではなく、それぞれが平行に発現することで精巣分化が開始されることを示唆した。gsdfがエストロゲン産生系に影響を与えないことから、性決定因子が雌性ホルモン産生を抑制することで精巣分化が誘導されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study developed DNA makers which enable to select genetic male Nile tilapia. Using DNA maker, YY females were produced, resulting establishment of a method to produce all YY population. This method enable stable production of all male population as industrial useful level. In the tilapia ovarian differentiation, roles of fsh signal seemed limited and linear signaling through foxl2, cyp19a1a and estrogen production seemed sufficient signal for triggering ovarian differentiation. In the testicular differentiation, gsdf was not suggested to locate below dmrt1 signal. The fact that gsdf seemed not to affect estrogen production pathway may suggest tilapia sex differentiating factor have a role to inhibit estrogen synthesis pathway, which resulted in gsdf and dmrt1 expression that lead to trigger the testicular differentiation.

研究分野：魚類生殖生理学

キーワード：ティラピア 性分化 性統御

1. 研究開始当初の背景

魚類の性決定・性分化の様式は多様であり、種苗の性統御技術開発にはそれぞれの種ごとに多大な時間と労力を要し、しかも技術開発は難しい。難しい理由として、1 つには一部の魚種を除いて遺伝的性を知る術がないこと、2 つには性分化開始メカニズムが未だによく解っていないことにある。

本研究グループは長年ナイルティラピアをモデルに生殖腺の性分化をコントロールする分子メカニズムを調べ、生殖腺の性分化開始に関わる数々の因子を特定してきた。その中で、遺伝的雄 (XY) と雌 (XX) の未分化生殖腺において、XX 個体では孵化後 5 日目に foxl2 の発現を介して cyp19a1a (アロマターゼをコードする遺伝子) の発現が誘導され、アロマターゼにより雌性ホルモン (E2) の産生が始まり、E2 が卵巣分化を誘導すること、また、XY 個体では、E2 は産生されず、孵化後 6 日目に dmrt1 の発現が上昇し、精巣分化が開始されることを示した。さらに、XY 未分化生殖腺優勢的発現遺伝子からは新たに精巣分化誘導因子として gsdf を同定し、他方、XX 未分化生殖腺優勢的発現遺伝子からは濾胞刺激ホルモン受容体 (fshr) を新たに同定した。このように、数多くの因子が性分化開始に関与していることを明らかにしたものの、それぞれの因子がどのように作用し合って卵巣または精巣への分化開始の引き金をひくのかは解っていなかった (図 1)。

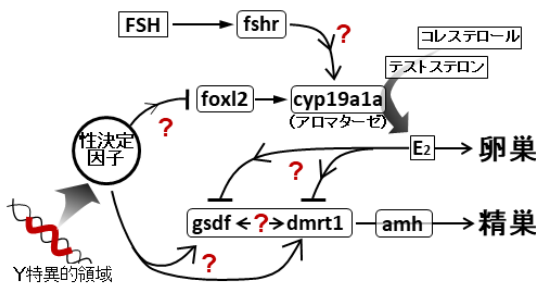


図 1. ナイルティラピア生殖腺の性分化開始に関わる因子群

一方、養殖業に目を向けると、世界中で大規模に養殖されているティラピアでは雄が大型化するため全雄生産が主流である。しかしその方法は粗野であり、主に稚魚期にステロイドであるメチルテストステロンを給餌することで全雄種苗を生産する方法が採られている。ステロイド処理魚を食用にすることが適当でないだけでなく、露地池に処方されるメチルテストステロンは環境に流出し、野生魚の内分泌を攪乱する。そのため、早期に超雄偽雌 (YY 雌) を作出し、ステロイドを使用しない大量全雄作出技術を養殖産業に普及させる必要がある。

また、水産養殖産業において性統御技術開発の要望が極めて高い魚種はティラピア以外にも少なくない。例えば、キャビアが高価なチョウザメでは全雌生産の技術開発が切望されている。人工種苗生産技術の開発が進

んでいるウナギでは、飼育個体はほぼ全て雄になるため、採卵親魚の作出にはやはりステロイド処理が必須である。これら魚種の性統御技術確立のためにも、それぞれの性分化機構の解明が必要であるが、全く分かっていないのが現状である。

2. 研究の目的

水産増養殖において、種苗の性統御は重要な課題であるがその技術開発は困難である。魚類における性の研究の難しさは、性決定因子が魚種ごとに多様であることに加え、その後の生殖腺の性分化メカニズムを一貫して説明できるモデルがないことにある。本研究では、遺伝的に性が安定しているナイルティラピアをモデルにその性決定から生殖腺の性分化開始機構を解明する。その情報を基に、超雄偽雌 (YY 雌) を作出することでティラピアの安定的全雄生産システムを確立する。加えてティラピア研究で培った研究アプローチにならぬ、他魚種においても、生殖腺性分化開始の分子機構の解明に向けた研究に着手する。

3. 研究の方法

ティラピア性分化開始機構の解明と性統御技術開発の確立のため、以下の研究課題を行う。

(1) ナイルティラピア遺伝的雌雄未分化生殖腺の包括的 RNA 解析により、Y 特異的発現遺伝子を探索し、雄特異的 DNA 配列を、可能な性決定遺伝子を同定する。(2) 性決定因子が同定され、それが分泌因子であった場合、組換え性決定因子を作製し、分子的性分化期の稚魚腹腔に顕微注射することで、foxl2 抑制を通じた雌化抑制に働くのか、gsdf または dmrt1 発現誘導を通じた雄化誘導に働くのか、その作用機序を調べる。(3) fsh fshr シグナル系が cyp19 発現誘導に働くのか、または、gsdf 発現抑制に働くのか、その卵巣分化における役割を解明する。(4) E2 による gsdf および dmrt1 の抑制機序を解明する。(5) gsdf が精巣分化開始に関わる作用機序を、特に、dmrt1 発現との前後関係に焦点を当てて解明する。(6) 雄特異的 DNA 配列を指標にティラピア超雄偽雌を作製し、商業化に耐えうる安定的大量超雄生産システムを確立する。(7) ティラピアの研究で特定された性分化関連遺伝子群について、ニホンウナギやチョウザメ類でも分子的性分化に関わるかどうかを調べ、これらの性分化開始分子機構解明の研究に着手する。

4. 研究成果

(1) ナイルティラピア雄特異的 DNA 配列の同定。

孵化後 4 および 5 日目の XX および XY 未分化生殖腺の mRNA を次世代シーケンサーを用いて網羅的にシーケンスし、得られたリードから 447,503 配列のコンティグを再構築した。

Y 特異的配列を選抜するため、これらコンティグに XX のリードを戻しマッピングし、マッピングされたコンティグを除外し、さらにナイルティラピア XX ゲノムドラフト配列に対して相同性検索を行い、90%以上相同性を示すコンティグをさらに除外した。その結果、103 配列のコンティグが選抜された。この 103 コンティグに特異的な PCR プライマーを作製し、XX、XY および超雄 (YY) のゲノムを鋳型に PCR スクリーニングを行い、XX ゲノムからは増幅されない 4 つのコンティグを選抜した。86% (24/28) の XY からこれらコンティグが増幅されたことから、Y 染色体を持つ個体の選抜に実用的に利用できる DNA マーカー配列を初めて得ることができた。つまり、後の超雄偽雌の作出を可能にする道具を得ることができた。しかし、100%でないことは Y 染色体領域に近いながら、性決定領域由来の配列ではないことを示しており、性決定遺伝子の同定までは至らなかった。

### (2) 性決定因子の役割

ナイルティラピア性決定遺伝子については、2015 年に中国西南大学のグループが AMHy を極めて高い可能性のある候補因子として報告した。AMH 遺伝子は雌雄双方のゲノムに存在するが、それぞれ 1 塩基 (1 アミノ酸) 異なる遺伝子をコードしており、XX の AMHx はその機能損失により精巢分化が妨げられることを示唆している。本研究では、AMHx および AMHy がセルトリ細胞系列ではなく、間充織細胞に特異的に発現することを示している。AMHy が性決定遺伝子であるならば、間充織細胞から精巢分化が制御されるという予想外の結果である。また、AMHy のみが機能を持つ性決定遺伝子であるなら、組換え AMHy を分子的性分化期の XX 稚魚に投与すれば、cyp19a1a の発現は抑えられ、gsdf および dmrt1 の発現が上昇すると考えられ、AMHx にはその機能はないということになる。さらに、cyp19a1a と gsdf および dmrt1 の AMHy 投与後の発現変化が経時的に分かれれば、AMHy が卵巢分化を抑えることで精巢分化を誘導するのか、直接精巢分化を誘導する役割を持つのかを明らかにすることができる。現在、AMHx と AMHy および AMH (Y 特異的機能欠損重複 AMH) の組換えタンパクを哺乳類細胞大量培養系を利用して作製しており、それら機能解明を急いでいる。

### (3) fsh シグナル系の卵巢分化への関与

我々は以前に、性分化期のティラピア下垂体における fsh (濾胞刺激ホルモン) の発現は雌雄間で異なるものの、分子的性分化期の未分化生殖腺における fshr (その受容体) が XX でのみ高く発現することを見だし、fsh シグナル系が卵巢分化開始に役割を持つことを示唆した。もし、そうであれば fsh シグナル系は cyp19a1a 発現の上昇に関わると予想された。この仮説を検証するために、

fsh シグナルのノックダウン実験と、組換え FSH の投与実験を行った。

ノックダウン実験: fsh と fshr の翻訳が抑制されるように設計したモルフォリノオリゴを XX 受精卵に顕微注射した。免疫組織化学的には孵化後 8 日目まで下垂体で fsh タンパクは認められず (通常 XX では孵化後 3 日目から検出される) 10 日目以降で発現が認められた。このことは、8 日目まではモルフォリノによる発現抑制効果が持続することを示している。しかし同時に、10 日目の未分化生殖腺においては免疫組織化学的にアロマトラーゼ (cyp19a1a 産物) の陽性細胞が認められ、fsh シグナルが抑えられてもアロマトラーゼは発現することが示唆された (図 2)。

### ティラピア組換え FSH の作製と稚魚への投与

稚魚へ組換え FSH を投与するためには、in vivo で速やかに分解されないように脊椎動物の細胞を利用して組換えタンパクを作製する必要がある。本研究では、FSH サブユニット配列を分泌シグナルを除いた サブユニット配列とリンカー配列でつないだ発現プラスミドを構築し、哺乳類由来の HEK293F 細胞に組み込み大量発現させ、培養液から 2.8mg の組換え FSH を精製することができた。次に、この組換え FSH が生物活性を持つか否かを調べるために、2 つの検証を行った。まず、ティラピア fshr および cAMP 応答配列にルシフェラーゼ遺伝子を連結したプラスミドを導入した HEK293T 細胞に、組換え FSH を添加して培養し、培養後ルシフェラーゼ活性を調べた。その結果、添加した組換え FSH の濃度依存的にルシフェラーゼ活性は高まった。次に、ティラピア未成熟精巢片に組換え FSH を添加して培養したところ、11-ケトテストステロンが産生され、また、その合成に関わる cyp11c1 (ステロイド 11-水酸化酵素) mRNA の発現が上昇した。これらの結果から、組換え FSH が生物活性を持つことが証明された。次に、組換え FSH を孵化後 9 - 10 日目のティラピア稚魚腹腔内に顕微注射することで性分化関連遺伝子の発現に及ぼす影響を調べた。XY 稚魚への投与では、hsd17b1 を除くステロイド合成酵素群とその発現に関与する転写因子、ad4bp/sf1 および foxl2 の転写が高まり、卵巢分化時に見られる遺伝子発現系が活性化された。他方 XX 稚魚への投与ではそれら遺伝子発現は対照群よりも高まるということではなかった。これは、10 日目の XX 未分化生殖腺ですでにこれら遺伝子発現は活性化されており、FSH の刺激でさらに高まることはないことを示していると考えられた。

以上、ノックダウン実験と組換え FSH 投与実験の結果から、FSH の卵巢分化への関与は限定的であることが示唆された。つまり、XX では FSH シグナルの刺激がなくてもアロマトラーゼは発現して卵巢分化は進むものの、アロ



マターゼ発現に対して副次的な転写活性化作用を持つものと考えられた。

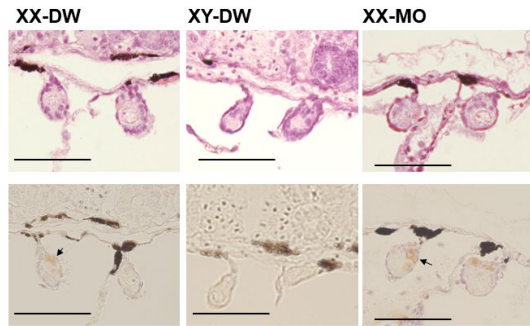


図2. fsh と fshr ダブルノックダウン XX 個体の孵化後 10 日目の未分化生殖腺におけるアロマターゼの発現. XX-DW: XX 受精卵に蒸留水を顕微注射した個体, XY-DW: XY 受精卵に蒸留水を顕微注射した個体, XX-MO: XX 受精卵に fsh と fshr の翻訳抑制モルフォリノオリゴを顕微注射した個体. 上段: ヘマトキシリン・エオシン染色、下段: 抗ティラピアアロマターゼ抗体を用いた免疫組織化学的組織像. 矢印はアロマターゼ陽性細胞. Bars=50 μm

(4) E2 による *gsdf* および *dmrt1* の抑制機序  
 孵化後 4 - 10 日目の間、低濃度の 300ng/ml の E2 で XY 仔魚を暴露した結果、*gsdf* 遺伝子発現は高まらないものの、*dmrt1* 遺伝子発現は一旦上昇した後遅れて減少することを示した。この結果から、通常 XX 雌では E2 が *dmrt1* ではなく *gsdf* の発現抑制を通して精巢分化を抑制することが示唆された。

(5) 精巢分化開始に関わる *gsdf* の作用機序、特に *dmrt1* 発現との前後関係について

2016 年に海外のグループからティラピアの精巢分化において、*gsdf* は *dmrt1* の下流で発現上昇制御されるという報告がなされたが、本研究の結果は、今までのところそれを支持しない。

*gsdf* と *dmrt1* の発現のタイミングと局在

まず、XY 未分化生殖腺のワンステップ定量 RT-PCR 解析および *in situ hybridization* 解析の結果から、*gsdf* は孵化後 4 日目には既に発現上昇が始まり、*dmrt1* が発現上昇する 6 日目よりも早いことが分かった。つまり、発現の順序から考えると、*dmrt1* が *gsdf* の発現を誘導しているとは考えにくい。また、精巢におけるダブル *in situ hybridization* 解析の結果から、*dmrt1* は細胞分裂中の精原細胞および精子形成中の精母細胞を取り囲むセルトリ細胞に発現し、細胞分裂していない A 型精原細胞を取り囲む体細胞での発現は必ずしも認められない。対して、*gsdf* の発現はほぼ細胞分裂していない A 型精原細胞を取り囲む体細胞に限られる(図3)。つまり、両遺伝子発現は常に共局在していない。

ティラピア組換え *GSDF* の作製と稚魚への投与

組換え FSH と同様の方法でティラピア組換え *GSDF* を作製し、孵化後 9 - 10 日目の XX 稚魚に投与した。投与後未分化生殖腺における関連遺伝子発現量を定量 PCR 法で測定したところ、ステロイド合成酵素系および関連転写因子の発現には影響を及ぼさないものの、*dmrt1* の発現がやや高まる傾向を示した。この結果は、*GSDF* が *dmrt1* の発現活性化にポジティブに関わる可能性を示すものの、ダブル *in situ hybridization* 解析の結果を併せて考えると、*dmrt1* の発現は *gsdf* のみによって活性化されるものではないことも示している。

以上の結果から、海外グループから報告されたように、*gsdf* は *dmrt1* の下流発現遺伝子であるというはおそらく誤りで、両者は他の因子によってパラレルに発現制御されているのではないかということが、本研究からは強く示唆された。

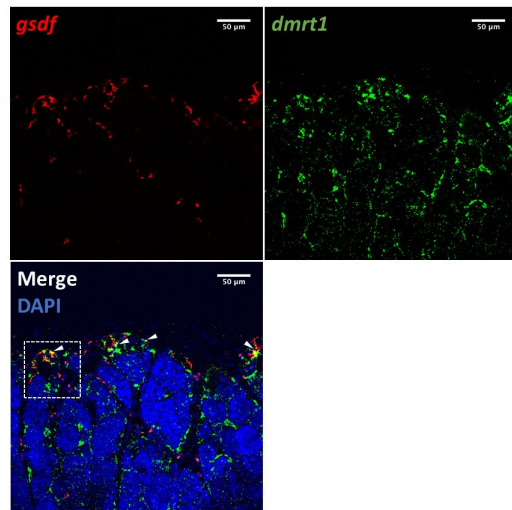


図3. ナイルティラピア精巢同一切片上における *gsdf* および *dmrt1* のダブル *in situ hybridization* 像. 左上: *gsdf* mRNA 陽性細胞, 右上: *dmrt1* mRNA 陽性細胞, 下: 重ね合わせ画像, 青は DAPI 染色を示す.

以上、(1) ~ (5) の結果を総括すると、以下の仮説が新たに構築された。XX では、おそらく AMHy と考えられる性決定因子が存在しないことで、*foxl2* *cyp19a1a* が発現し、E2 が合成されることで卵巣分化が開始される。XY では、*gsdf* がエストロゲン産生系に影響を与えないことから、AMHy がおそらく、*foxl2* または *cyp19a1a* の発現を抑制することで E2 が産生されず、E2 が存在しないことで *gsdf* と *dmrt1* がパラレルに発現し、精巢分化が開始されると考えられる。組換え AMHy と AMHx が作製され、XX 稚魚に顕微注射することによって未分化生殖腺中の関連遺伝子発現がどのように変化するのが明らかにさ

れば、ティラピア生殖腺の性分化開始機構の全体図を描くことができると考えられる。

(6) 商業的に利用しうる安定的大量超雄生産システムの確立

本研究(1)において、Y染色体保有個体の9割近くを判別できるDNAマーカーの開発に成功したが、その後、AMHyを含む性決定領域が特定されたことから、性決定領域をDNAマーカーの指標として超雄偽雌(YY雌)の作出に取り組んだ。まず、E2投与によって作出した偽雌(XY雌)の卵に超雄(YY)の精子をかけあわせ、得られた稚魚40尾に1.6μg/mlの高濃度E2処理を施した。その結果、1尾のYY雌が得られた。次に、YY雌から得られた卵にYY雄の精子をかけあわせ、得られた稚魚のゲノムを鋳型に性決定領域特異的プライマーを用いてPCR検定を行ったところ、全てがYY遺伝子型を示した(図4)。現在この稚魚に高濃度E2処理を施しており、40尾以上のYY雌の作出に成功している。これによって、安定的YY雌作出法が確立され、YY雄とかけあわせることで安定的に大量YY雄を作出する技術を確認した。現在、東南アジアのある大手水産企業にYY雄を導入し、メチルテストステロン処理を施さない全雄種苗作出の産業利用を進めている。本研究の成果を社会的にも還元し、世界の健全な水産養殖業の発展に貢献することを目指している。

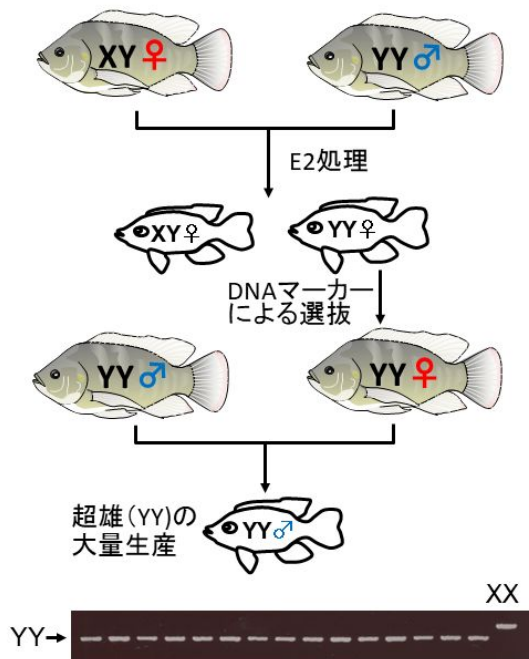


図4. ナイルティラピア超雄(YY)個体の大量生産法の確立。上段：超雄偽雌(YY雌)を作出した流れ，下段：超雄と超雄偽雌をかけあわせた子孫の遺伝子型，右端は通常XX個体。

(7) ニホンウナギやチョウザメの性分化開始分子機構解明

最後に、ティラピアの研究で特定された生殖腺の性分化開始に関わる因子群の解析をニホンウナギおよびチョウザメ類でも行った。ロシアチョウザメおよびアムールチョウザメにおいて、雌優勢的発現遺伝子 *foxl2*、*cyp19a1a*、*hsd17b1* と、雄優勢的発現遺伝子 *gsdf* の発現を複合的に調べることで、未分化生殖腺の将来の性を予測できることが示唆された。これにより、未分化生殖腺における雌雄間の遺伝子発現パターンの違いを明らかにするための礎を築くことができた。ウナギでは未分化生殖腺における個体間の関連遺伝子発現2型性は明瞭ではなく、形態的性分化直前まで遺伝子発現の性差が現れないのではないかと考えられた。チョウザメとウナギの分子的性分化機構に関しては未だに分らないことが多く、現在、ティラピアの研究により得られた知見と手法を基にしての解析を推進している。

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)

1. Ijiri S, Shibata Y, Takezawa N, Kazeto Y, Takatsuka N, Kato E, Hagihara S, Ozaki Y, Adachi S, Yamauchi K, Nagahama Y. 17-HSD type 12-like is responsible for maturation-inducing hormone synthesis during oocyte maturation in masu salmon. *Endocrinology*, 査読有, 158: 627-639. (2017) doi:10.1210/en.2016-1349
2. Okada H, Hagihara S, Yamada S, Yamashita K, Ijiri S, Adachi S. Expression pattern of *foxl2* and *dmrt1* in gonad of Amur sturgeon *Acipenser schrenckii* in relation to sex differentiation. *Aquaculture*, 査読有, 479:712-720 (2017) doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.020
3. Horie Y, Myosho T, Sato T, Sakaizumi M, Hamaguchi S, Kobayashi T. Androgen induces gonadal soma-derived factor, *Gsdf*, in XX gonads correlated to sex-reversal but not *Dmrt1* directly, in the teleost fish, northern medaka (*Oryzias sakaizumii*). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 査読有, 436, 141-149. (2016) doi:10.1016/j.mce.2016.07.022.
4. Kaneko H, Ijiri S, Kobayashi T, Izumi H, Kuramochi Y, Wang DS, Mizuno S, Nagahama Y. Gonadal soma-derived factor (*gsdf*), a TGF-beta superfamily gene, induces testis differentiation in the teleost fish *Oreochromis niloticus*. *Molecular and Cellular Endocrinology*,

査読有, 415, 87-99. (2015)  
doi:10.1016/j.mce.2015.08.008

5. Su T, Ijiri S, Kanbara H, Hagihara S, Wang DS, Adachi S. Characterization and expression of cDNAs encoding P450c17-11 (cyp17a2) in Japanese eel during induced ovarian development. *General and Comparative Endocrinology*, 査読有, 221, 134-143. (2015)  
doi:10.1016/j.ygcen.2015.01.026.

〔学会発表〕(計 7件)

1. 井尻成保, ティラピア、チョウザメ、ウナギの性分化, 平成 30 年度日本水産学会秋期大会, シンポジウム「魚類の性決定・性分化・性転換 -これまでとこれから-」, 2018 年 9 月 18 日, 広島大学, 東広島市
2. Aranyakanont C, Ijiri S, Hasegawa Y, Adachi S, 17 $\alpha$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 12 is responsible for maturation-inducing steroid synthesis during oocyte maturation in Nile tilapia, 11th International symposium on reproductive physiology of fish, 2018 年 6 月 5 日, Manaus, Brazil
3. Baroiller JF, Sissao R, Barbarini M, Dugué R, Cochet C, Canonne M, Toguyeni A, Mélard R, Ijiri S, D' Cotta H., Amh, a necessary gene for male differentiation but not sufficient for sex determination in all the Nile tilapia populations?, 18th International Congress of Comparative Endocrinology (ICCE18), 2017 年 6 月 8 日, Chateau Lake Louise, Alberta, Canada
4. 稲葉駿, 松谷紀明, 井尻成保, 足立伸次, ニホンウナギの生殖腺性分化に及ぼす低密度および単独飼育の影響, 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 2017 年 3 月 28 日, 東京海洋大学, 品川区
5. 井尻成保, 金子裕代, 泉ひかり, 倉持有希, 水野翔太, 足立伸次, 長濱嘉孝, Gonadal soma-derived factor はティラピアの精巢分化を誘導する, 平成 27 年度日本水産学会秋期大会, 2015 年 9 月 23 日, 東北大学, 仙台市
6. 井尻成保, 水産重要魚種, ウナギとチョウザメの増養殖研究における NGS の利用, NGS 現場の会 第四回研究会, 海と大地と NGS: 農林水産分野の新展開 (招待講演), 2015 年 7 月 3 日, つくば国際会議場, つくば市
7. 水野翔太, 井尻成保, 西澤朋実, 足立伸次, ナイルティラピアにおける gonadal soma-derived factor (gsdf) の機能解析, 日本動物学会北海道支部大会, 2014 年 8 月 23 日, 函館国際水産・海洋総合研究センター, 函館市

〔図書〕(計 1件)

矢部衛, 桑村哲生, 都木靖彰 編, 魚類学, 第 14 章 生殖, pp.155-178(全 377pp), 2017 年, ISBN: 978-4-7699-1610-9

〔産業財産権〕 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井尻 成保 (IJIRI, Shigeho)

北海道大学・水産科学研究院・准教授

研究者番号: 90425421

(2) 研究分担者

小林 亨 (KOBAYASHI, Tohru)

静岡県立大学・環境化学研究所・教授

研究者番号: 30221972

足立 伸次 (ADACHI, Shinji)

北海道大学・水産科学研究院・教授

研究者番号: 40231930