

平成30年6月28日現在

機関番号：88003

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21717

研究課題名（和文）大型板鰓類の生殖状態を反映した繁殖生理特性の理解とその応用

研究課題名（英文）Understanding of reproductive physiological characteristics reflecting reproductive status in large elasmobranchs

研究代表者

野津 了 (Nozu, Ryo)

一般財団法人沖縄美ら島財団（総合研究センター）・総合研究センター 動物研究室・研究員（移行）

研究者番号：70774397

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：大型板鰓類の多くは国際的な保護対象種とされており、今後は飼育下における持続的な繁殖が重要になると想定される。効率的な繁殖には、個体ごとの生殖状態を把握することが重要となる。本課題では、血液を利用し大型板鰓類の各生殖状態における繁殖生理特性を明らかにし、繁殖に適した個体の判別指標を確立することを目指した。

成熟した雌トラフザメの卵胞サイズの周年変化および産卵期、血中の性ステロイドホルモン量の変動を明らかにした。これらの結果から血中の性ステロイドホルモンの変動が卵胞発達や繁殖期の予測指標となることを示した。加えて、サメ類においてもビテロジェニンが卵胞発達の指標になりうることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Many large elasmobranchs are regarded as global conservation species. Therefore, their sustainable breeding in captivity will become more important in future. To breed these species effectively, it is important to determine the reproductive status of each individual. The aim of this study was to establish an indicator to characterize suitable individuals for breeding by using blood samples to assess reproductive physiology and reproductive status. Mature female zebra sharks in captivity showed annual variation in the follicle size, spawning period, and sex steroid hormone level. These results indicate that changes in the sex steroid hormone serve as a predictor of follicular development and the breeding season. In addition, it is suggested that vitellogenin could be an indicator of follicular development in sharks.

研究分野：魚類生殖生理学

キーワード：大型板鰓類 飼育下繁殖 性ステロイドホルモン ビテロジェニン 超音波画像診断

## 1. 研究開始当初の背景

大型板鰓類の多くは IUCN のレッドリストに登録されており、世界的な保護対象種とされている。近年の生物保全機運の高まりから今後は大規模な保護計画の策定が予想される。加えて、積極的に増やす技術の確立に向け、板鰓類の繁殖生物学的知見の蓄積や飼育下繁殖の重要性が増大すると考えられる。板鰓類は卵生から胎生(母体内での栄養供給にも複数の様式がある)まで多様な繁殖様式を示すことが知られており、繁殖生物学的な研究対象としても非常に興味深い。しかしながら、大型板鰓類の飼育には巨大な飼育設備を要するといった問題や、取り扱いが難しいことから世界的にも飼育下繁殖の成功例は限られている。その上、致命的なサンプリングを敬遠する傾向にあり、飼育下繁殖の成功に重要となる繁殖生理学的な知見は断片的なものに留まっている。

## 2. 研究の目的

大型板鰓類は性成熟に時間を要し、また繁殖周期が複数年にまたがることもあるため、飼育下における効率的な繁殖には、個体ごとに生殖状態を把握することが重要となる。特に雌の場合、外部形態から生殖状態を判別することが難しいため、有用な判別指標の確立が急務である。そこで、非致死的で経時的に採取が可能な血液を利用することで、雌の大型板鰓類の各生殖状態における繁殖生理特性を明らかにし、繁殖に適した個体の判別指標を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

大型板鰓類の繁殖研究の対象種としてジンベエザメは非常に魅力的ではあるものの、世界を見渡しても飼育数が少なく、沖縄美ら海水族館のジンベエザメを含め飼育下において性成熟した雌はこれまで確認されていない。そこで、将来的にジンベエザメへの応用を念頭に置き、ジンベエザメと最も近縁なトラフザメ(テンジクザメ目トラフザメ科、卵生種)とオオテンジクザメ(テンジクザメ目コモリザメ科、胎生種)に着目した。沖縄美ら海水族館では両種の成熟雌を複数個体飼育しており、これらの個体は飼育下において、交尾、産卵または出産したことが観察されている。加えて、定期採血が可能であることおよび超音波画像診断装置(エコー)による生殖器官の観察が可能であることが検証済みである。そこで、両種に対して周年を通して以下の解析を実施した。

(1) エコーによる卵巣および子宮の観察  
各個体の生殖状態を確認するため、月に一度、卵巣および子宮のエコー画像を取得し、卵巣内の卵胞径を計測し、子宮内の卵殻卵の有無または妊娠の有無を確認した。加えて、トラフザメに関しては毎日水槽内の産卵数(産卵した個体が識別できないため、1日の産卵数の合計)を記録した。

(2) 血中性ステロイドホルモン量の測定  
エコー画像の取得と同時に採血を実施し、ELISA法を用いて血中のエストラジオール17β(E2)、テストステロン(T)およびプロゲステロン(P4)量を測定した。

(3) 血中卵黄タンパク前駆物質(ピテロジェニン)を指標とした卵胞サイズの推定  
サメ類の抗ピテロジェニン抗体の作製  
公開されているサメ類のゲノム配列を参照し、ピテロジェニン(Vg)の共通のアミノ酸配列部分を抗原(合成ペプチド)としVg抗体を作製した。雌トラフザメおよび雌雄トラフザメ血漿をウェスタンブロッティングに供し作製した抗体の特異性を検証した。

雌トラフザメの血中 Vg 量の季節変動の検出

雌トラフザメ血漿をウェスタンブロッティングに供し、血中 Vg 量の季節変動を調べた。その結果とエコー観察により明らかにした卵胞サイズの季節変化と比較し、血中 Vg 量を指標とした卵胞サイズの推定が可能か否かを検討した。

## 4. 研究成果

(1) 飼育下における雌トラフザメの生殖状態と生理特性

エコー観察の結果、卵胞サイズは11月から1月にかけて上昇し、発達した卵胞は6まで維持されていた(図1)。産卵は2月下旬から始まり、7月下旬まで断続的に観察された(図1)。これらの結果から、トラフザメは飼育下において1年の繁殖周期を示すことが明らかとなった。

血中 E2 濃度は卵胞サイズが増大する2ヶ月前となる9月頃から1月にかけて上昇し、4月まで高い値が維持されていた。その後、産卵期の終りとなる7月にかけて急激に低下した(図2)。以上の結果から、血中の E2 量が卵胞発達の予測指標となることが示唆された。また、興味深いことに血中 E2 量は水温と強い負の相関を示しており、水温調節により生殖状態を制御できる可能性が窺われた。

血中 T 濃度は2月から6月の間、高い値を示し、産卵期の終わりとなる7月にかけて急激に低下した(図3)。その後低値で維持

されていた。この変動パターンは産卵期と非常に一致しており、血中T量が産卵期の指標となることが強く示された。

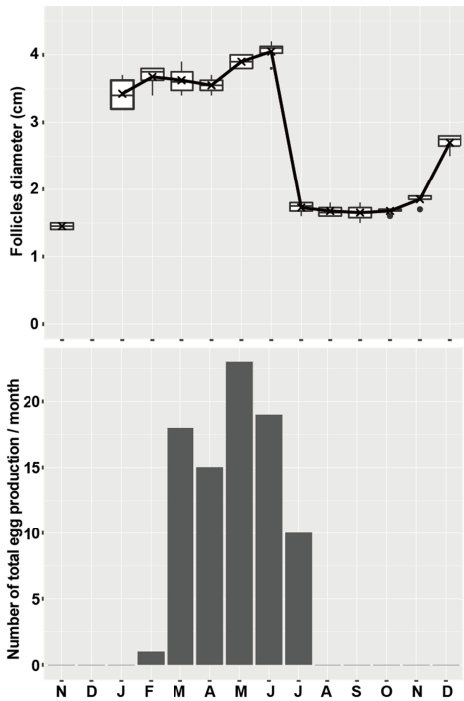


図1．トラフザメの月別の卵胞サイズ変化と月別産卵数

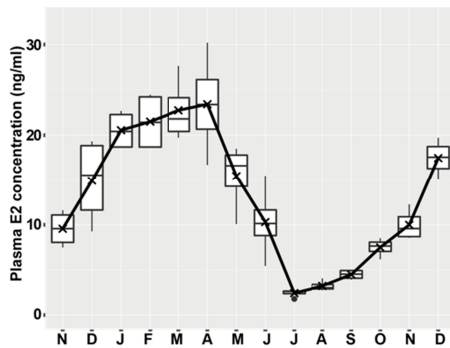


図2．トラフザメの血中E2量の月別変化

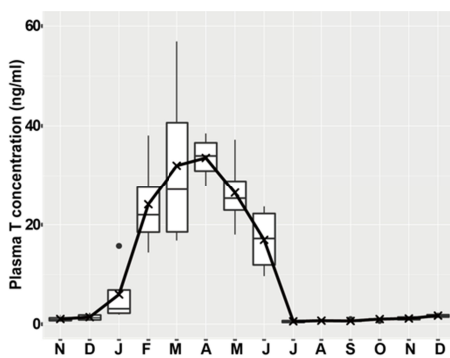


図3．トラフザメの血中T量の月別変化

血中 P4 量は産卵期に高い値が認められたが(図4)、個体間差が大きいため、繁殖イベントとの関連を見出すことができなかった。ホルモンによっては繁殖イベントに対しパルス的に上昇し作用していることも考えられる。繁殖における P4 の役割について

は、より短い間隔での経時的なサンプリングが必要になると考えている。

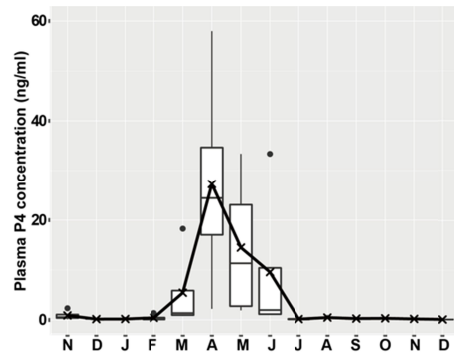


図4．トラフザメの血中P4量の月別変化

### (2) 飼育下における雌オオテンジクザメの生殖状態と生理特性

本課題では沖縄美ら海水族館で飼育されている8個体のオオテンジクザメ成熟雌をモニタリングした。エコー観察の結果、月別平均卵胞径は1.49~2.01 cmで変動しており、7月から9月に掛けて上昇傾向を示していた。また、8個体中7個体が3月から6月までに子宮内に卵殻卵を有し始めることが確認された。残りの一個体は観察期間中に子宮内に卵殻卵が認められなかった。このことから、本個体は観察期間中に排卵していなかったことが予想された。さらに、7月と9月には1個体ずつ妊娠していることが確認され、観察期間終了時の12月まで胎子の成長が観察された。

興味深いことに、オオテンジクザメでは妊娠の有無に関わらず、血中の性ステロイドホルモンの変動パターンが類似していた(図5)。この結果は血中性ステロイドが妊娠の診断指標には適さないことを示唆している。また、排卵が起きていないと予想される個体は、周年を通じて性ステロイドホルモンが基底レベルから変動していなかった。このことから、排卵や卵殻形成といった卵殻卵の供給に性ステロイドホルモンが影響を及ぼしている可能性が考えられた。

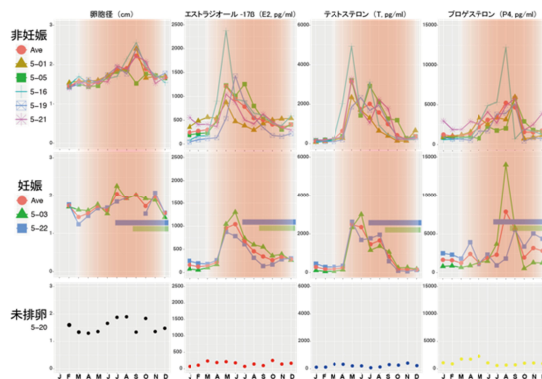


図5．オオテンジクザメ各個体の月別卵胞サイズおよび性ステロイドホルモン濃度の変化

(3) サメ類の抗 Vg 抗体は雌血漿と特異的に反応する

作製した抗 Vg 抗体を用いて、トラフザメ雌雄血漿をウェスタンブロッティングに供したところ、シグナルが雌特異的にかつ予想される分子量に認められた。また、抗体吸収試験によってシグナルが消失した。これらの結果から本抗体はピテロジェニンを認識していると結論づけた。

各季節のトラフザメの血漿をウェスタンブロッティングに供したところ、卵胞が発達している4月にシグナルが検出された一方で、卵胞サイズが縮小し産卵期が終了した8月にはシグナルが消失した。卵胞サイズが増大し始める前の11月(E2濃度が上昇中)に微かにシグナルが検出された。これらの結果から、サメ類においてピテロジェニンが卵胞発達の指標になる可能性が示唆された。今後、例数を増やし詳細に条件を検討することで、卵胞サイズの推定方法として確立していき、将来的には板鰓類全般へと適用を目指す。

#### 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 2 件)

Nozu, R., Murakumo, K., Yano, N., Furuyama, R., Matsumoto, R., Yanagisawa, M., Sato, K. Changes in sex steroid hormone levels reflect the reproductive status of captive female zebra sharks (*Stegostoma fasciatum*). General and Comparative Endocrinology (in press). 査読あり  
DOI : 10.1016/j.ygcen.2018.03.006

Nozu, R., Murakumo, K., Matsumoto, R., Matsumoto, Y., Yano, N., Nakamura, M., Yanagisawa, M., Ueda, K., Sato, K. High-resolution monitoring from birth to sexual maturity of a male reef manta ray, *Mobula alfredi*, held in captivity for 7 years: changes in external morphology, behavior, and steroid hormones levels. BMC Zoology, 2:14 (2017). 査読あり  
DOI : 10.1186/s40850-017-0023-0

[学会発表](計 4 件)

野津 了、卵食型オオテンジクザメの繁殖過程における性ホルモンの関与、平成 30 年度日本水産学会春季大会、2018 年 3 月

Ryo Nozu, Seasonal changes in sex steroid hormones and follicle size in the zebra shark, *Stegostoma fasciatum*. 18th International Congress of Comparative Endocrinology. 2017 年 6 月

野津 了、飼育下における雌オオテンジクザメの性ホルモンの周年変化 卵食型の生殖内分泌機構の解明に向けて、平成 29 年度日本水産学会春季大会、2017 年 3 月

Ryo Nozu, Monitoring for reproductive status of aquarium-raised female zebra sharks using molecular markers. the Joint meeting of the 22nd International Conference of Zoology & the 87th meeting of the Zoological Society of Japan, 2016 年 11 月

[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

<http://churashima.okinawa/ocrc/21>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

野津 了(NOZU, Ryo)

一般財団法人沖縄美ら島財団・総合研究センター・研究員

研究者番号：70774397

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

松本 瑠偉(MATSUMOTO, Rui)

村雲 清美(MURAKUMO, Kiyomi)

矢野 渚(YANO, Nagisa)