

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07911

研究課題名(和文)ココナッツ油を利用したトラフグ初回成熟の早期誘発

研究課題名(英文) Puberty control of Japanese pufferfish (Takifugu rubripes) by intraabdominal injection of coconut oil

研究代表者

山口 明彦 (Yamaguchi, Akihiko)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：10332842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：中・大型魚種は初回成熟までの期間が長いため、早期成熟のための技術開発が求められている。本研究ではトラフグをモデルに用い植物性油脂投与による早期成熟効果について検討した。その結果、ココナッツ油を代表とするラウリン酸・ミリスチン酸に富む中鎖脂肪酸含量の多いヤシ抽出物が、生殖腺でT-DHT(ジヒドロテストステロン)変換酵素5AR(5型還元酵素)を阻害し、テストステロン(T)ブースターとして作用し、結果として下垂体へのTフィードバック回路を活性化させ、黄体形成ホルモン(LH)細胞の増殖を誘導することを示した。ヤシ油に含まれる中鎖脂肪酸は魚類の早期成熟促進効果があると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりトラフグのTフィードバック回路の詳細が明らかになった。下垂体はTをE2に変換するアロマターゼ(CYP19)活性が高いことが知られるが、トラフグでは雌雄共にCYP19細胞がLH細胞と同一であることを証明することができた。ココナッツ油投与により増加した血中Tは下垂体へフィードバックしCYP19/LH細胞の増殖に関与する可能性が強く示された。またサプリメントとして販売される5AR阻害効果をもつノギリヤシ抽出物は、魚類でも哺乳動物と同様の作用を示すことを初めて示した。本研究成果はヤシ油に含まれる中鎖脂肪酸の魚類への有効性を初めて示し、早期成熟に有効な配合飼料の開発に役立つものである。

研究成果の概要(英文)：Coconut oil (CO) is known to be neutral fatty acid rich fruit and may be beneficial for the prevention and treatment for benign prostatic hyperplasia by inhibition of 5alpha-reductase activity as well as saw palmetto extracts in human. We focus on the effect of coconut oil to the Japanese food fish, Takifugu rubripes for investigation of the sex-steroid feedback system and puberty initiation. Plants oil (palm, palm kernel, sunflower, and coconut oil) were implanted into the abdomen of the one year-old pre-vitellogenic female fish. Feedback effect was evaluated as the occupation area of aromatase (cyp19a1b) positive cells, which is identical to luteinizing hormonal (LH) cells, of the pituitary. The high occupancy level was detected in CO group in accordance with increase of serum testosterone level with significant ovarian growth. Taken together, we conclude coconut oil works as a prominent initial testosterone booster to promote ovarian maturation in T. rubripes.

研究分野：魚類生殖生物学

キーワード：アロマターゼ 5-alphaリダクターゼ 中鎖脂肪酸 下垂体 フィードバック テストステロン ノギリヤシ ココナッツオイル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

動物はある一定のサイズに成長するまでは初回成熟しない“生物学的最小形”をもつため、初回成熟までの期間の長い魚種(トラフグ 2-3年、ウナギ・クロマグロ・チョウザメ 5-10年)の早期産卵技術の開発にはその解明が不可欠である。これらの魚種では初回成熟まで生殖腺刺激ホルモン(濾胞塩素ホルモン FSH, 黄体形成ホルモン LH)の合成が長期間抑制される特徴があり、人工的な早期成熟の誘導にはその解除が不可欠と考えられる。下垂体は生殖腺性ステロイドホルモンの標的組織として知られる。生殖腺で合成されるテストステロン(T)は、成熟期の脂肪代謝によるエネルギーの配分調節とフィードバックによるため黄体形成ホルモン(LH)の合成・分泌に深く関わっている。またテストステロンはエストロゲン(E2)の前駆物質であるため、様々な組織に存在するT→E2変換酵素であるアロマターゼ(CYP19)の局所的エストロゲン合成を介しての作用(Intracrine control)が知られる。

一方、Tはジヒドロテストステロン(DHT)の前駆物質でもある。T→DHT(5 $\alpha$ DHT)変換酵素(5 $\alpha$ リダクターゼ: 5AR)はヒト男性における前立腺肥大、男性型脱毛症等の疾病への関与が報告されており、その対策として5AR阻害効果を持つ天然物質の探索が行われてきた。ココナッツ油やノコギリヤシ抽出物に含まれるに代表される植物性(ヤシ)油脂には中鎖脂肪酸が多く含まれ、活性を抑制する効果をもつことが報告されているが、一般には認知されていない。また中鎖脂肪酸は肝臓でケトン体を生成しエネルギー効率が良いと考えられており、ヒトでは病院食としても利用されている。

ココナッツ油はステロイドホルモンの溶媒として多くの魚類生理の研究で使用されている。脂肪酸は配合飼料にも含まれているが、その多くは炭素数の多い不飽和脂肪酸であり、中鎖脂肪酸含量の多いココナッツ油等に代表される食用油の魚類への効果についてはほとんど行われていなかった。そこで本研究では哺乳動物で5AR阻害効果を持つと報告されていたココナッツ油、ノコギリヤシ抽出物等を未成熟トラフグに投与し、テストステロンフィードバックの活性化による成熟促進効果を調査することにした。

### 2. 研究の目的

本研究ではココナッツ油を魚類の腹腔内に投与し血清Tのフィードバックを増進させることにより早期成熟促進効果を検討した。具体的には、5AR阻害効果の報告のある植物性油脂を未成熟期トラフグへ投与することによりT代謝経路を操作し、脂肪代謝とLH合成経路を活性化させ、更に光・温度等の環境因子下流で放出される生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)制御下にあるLH放出機構を共役させ、他魚種へも応用可能な早期成熟技術の基盤を開発することを目指した。本研究ではフィードバックTの合成・作用機構について、次の2点に焦点を絞って解析を行った。

(1) 哺乳動物で確認されているココナッツ油を代表とする複数の植物油脂および5AR阻害剤を魚類(未成熟雌トラフグ)へ投与することにより、投与油脂のテストステロンブースター効果を調査するとともに成熟促進効果(卵巣発達等)を評価する。

(2) 血清テストステロンの下垂体へのフィードバック効果の評価法を確立するとともに、T→E2への変換を担うトラフグ下垂体CYP19発現細胞の特徴を調査する。

### 3. 研究の方法

#### 植物油脂・性ステロイド腹腔内投与実験

##### <実験1>

親魚雌雄1対1で交雑した遺伝的性判別可能なトラフグ受精卵を九州大学水産実験所で自然水温・自然日長下で飼育・管理した。20ヶ月野外水槽で飼育した後、STR解析により雌雄に分け屋内水槽で馴化させた。1トンパンライト水槽に未成熟雌3匹(n=3, BW 700-800g)の条件で飼育し、2週間ごとに計4回、植物油を(1mL/500g BW)21ゲージ針で腹腔内へ投与した。植物油脂 [ココナッツ油, (CO); パーム油, (PO); パーム核油, (PK); ヒマワリ油, (SF)] は一般に購入できるものを利用して、脂肪酸組成はガスクロマトグラフィーにより分析した。またミネラル油(鉱物油:MO)とPBS投与個体をコントロールとして準備した。2ヵ月後、体長(BL)・体重(BW)を測定後、血液を採取し血清をステロイドホルモン測定のために-30°Cで保存した。血清性ステロイドホルモン(T・E2)の測定にはELISA法(Cayman)を用いた。またフェノキシエタノール麻酔後、下垂体・生殖腺を摘出しブアン固定後パラフィン切片を作製した。

下垂体切片は*in situ* hybridization(ISH)と蛍光免疫組織化学法(IHC)を用い解析した。生殖腺はヘマトキシリンエオシン染色法により発達ステージを確認した。ISHのプロンプにはトラ

フグ脳型アロマターゼ, *cyp19a1b*; 生殖腺刺激ホルモン GTH 共通  $\alpha$  サブユニット (*cga*); FSH- $\beta$  サブユニット, (*fsh-b*); LH- $\beta$  サブユニット, (*lh-b*); 甲状腺刺激ホルモン  $\beta$  サブユニット, (*tsh-b*); 成長ホルモン (*gh*) cDNA から転写した DIG 標識 anti-sense mRNA を用いた。発色はアルカリフォスファターゼ結合抗 DIG 抗体を用い NBT/BCIP 発色により検出した。得られた画像はタイリング処理を行った後、画像解析ソフトによって GH 細胞に囲まれた下垂体主葉主部領域 (PPD および神経葉 (NL) 領域、CYP19 発現面積を計測し、CYP19 発現面積率 (CYP19 発現面積/PPD-NL) を各脂肪酸投与群で比較し分析した。IHC の解析には抗トラフグアロマターゼ (CYP19) 抗体によりホルモン遺伝子転写産物の発現量・細胞の局在解析を行った。

#### <実験 2>

STR 解析により性別判別した雌個体 (21 ヶ月齢; n=4; BW, 650–800g) を用い、上記と同様の条件でココナッツ油 (CO), ノコギリヤシ抽出物 (SPLE), フィナステリド (FIN; 5 $\alpha$ R 阻害剤), ミネラルオイル (MO) を腹腔内投与した。下垂体は摘出し mRNA 抽出後 qRT-PCR 解析に利用した。生殖腺は固定後 HE 染色でステージを確認した。また、雄 (21 ヶ月齢: 700g–800g, 成熟初期) は生殖腺切除実験のため使用した。切開縫合手術で精巣を除去した個体は室内水槽で 1 ヶ月間回復させた後、同様に CO, FIN, MO の投与を行った。2 回の投与後 (計 3 週間)、下垂体は摘出し RNA-later 保存液にいれ qRT-PCR 解析のため -30°C で保存した。切除前、投与前、3 週間後のサンプリング時に血液の採取を行い、性ステロイドホルモンの測定に使用した。

#### <実験 3>

性ステロイドのフィードバック特異性を確認するため、未成熟雌 (20–22 ヶ月齢) および生殖腺を切除した雌雄個体 (OVX, ORX) を準備し、各 3 個体にアンドロゲン (11-KT, DHT, 0.1  $\mu$ g/ml; T, 0.01–1  $\mu$ g/ml) とエストロゲン (E2, 0.1  $\mu$ g/ml) を 2 週間おきに計 4 回投与した。下垂体は ISH 法を用いホルモン遺伝子 (*cyp19a1b*, *lh-b*) の発現変化を調査した。

## 4. 研究成果

(1) ココナッツ油による T の合成と下垂体 CYP19 発現領域の増加実験 1 の植物油投与群のうち、投与後固形化しないヒマワリ油投与群では顕著に内臓脂肪の蓄積が確認された。また炭化水素群を含むミネラルオイルでも同様の現象が見られた。一方融点の高い他のヤシ油投与群では脂肪塊は確認できなかった。血清テストステロン濃度は中鎖脂肪酸含有率の高いココナッツ油 (CO) > ヤシ核油 (PK) > ヤシ油 (PO)・ヒマワリ油 (SF)・ミネラルオイル (MO) の順で高かった。ココナッツ油投与群は PK を除く他の脂肪酸投与群に比べ優位に高い血清テストステロン値を示した (図 1 A)。一方エストロゲン量は未成熟卵巣の状態の低い値を全ての群で維持していた。この結果は、ラウリン酸やミリスチン酸含量の高い油脂がテストステロンの合成に効果的に作用したことを示している。一方 E2 値は低いままであり、卵黄形成期に卵濾胞組織で発現する卵巣型アロマターゼ (CYP19a1a) 活性は誘導していないことを示唆している。本研究の成果としてトラフグ下垂体のアロマターゼは LH 細胞と同一であることが明らかになった (成果 3 参照)。すなわち CYP19 細胞は LH 前駆細胞と考えられる。そこで、下垂体への T フィードバック効果の指標として、CYP19 細胞の占有面積率を調査した。各脂肪酸群の下垂体主葉主部 (PPD) に占める CYP19 発現細胞領域の面積率を示す (図 1 B)。有意差はみられないが、ココナッツ油投与により高

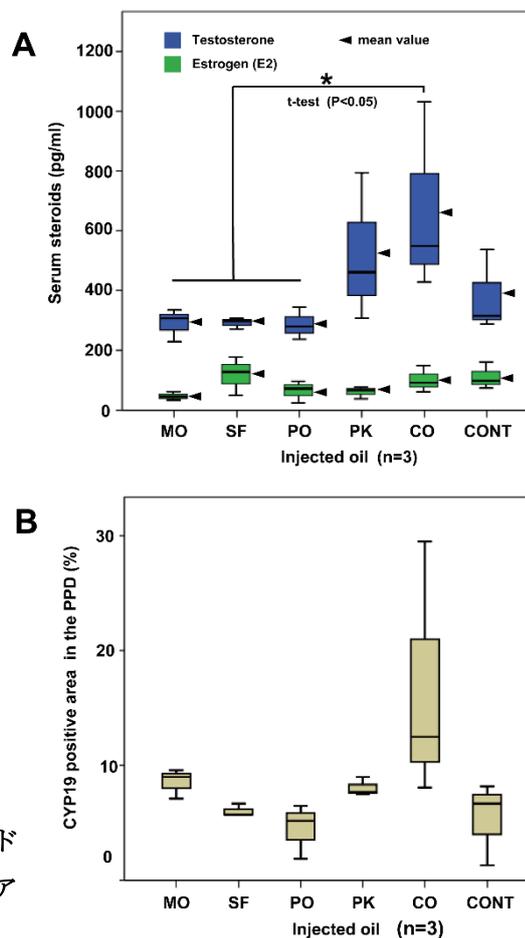


図 1 植物油脂の投与による血清ステロイドホルモン量の測定 (A) と主葉主部 (PPD) 内のアロマターゼ発現陽性領域の定量解析 (B)

いテストステロン値を得た個体は CYP19 発現細胞の占有面積率が著しく高かった。初回成熟開始前の LH 細胞の増殖は必須のプロセスである。従ってココナッツ油投与によるフィードバック T の増加はと下垂体 CYP19 陽性細胞数は正の相関があると考えられた。また全ての個体で LH の合成は確認できなかった。

(2) 5AR 阻害効果物質[ノコギリヤシ (SPLE) 抽出物・フィナステリド (FIN) ]の投与効果

実験 2 では T→DHT 抑制効果をもつと考えられているノコギリヤシ抽出物 (SPLE) および 5AR 阻害剤 (FAD) を用い、ココナッツ油 (CO) のテストステロン促進効果を比較した。CO、SPLE、FAD 投与群は全て投与前に比べ血清テストステロン値の増加が見られた。特にココナッツ油投与群は投与前に比べ有意に増加が確認できた。(図 2 A)。下垂体アロマトラーゼ (*cyp19a1b*) の遺伝子発現量を定量 PCR 法で解析した結果、CO、SPLE、FAD 投与の 3 群はともに *cyp19a1b* 遺伝子の発現量ははコントロール群 (PBS) に比べ有意に増加していた(図 2B)。また GTH ホルモンの共通  $\alpha$  サブユニット (CGA) の発現量増加を確認した。一方、濾胞刺激ホルモン (FSH-b) および黄体形成ホルモン (LH-b) の遺伝子発現に有意差は見られなかった(図 2B)。また、実験 3 から結晶テストステロン (0.1-1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を投与した個体では生殖腺の有無にかかわらず LH の発現が見られたことから、ココナッツ油の単独投与では血清フィードバック T 濃度が閾値レベルまで到達できないことが LH の合成が誘導できなかった理由として考えられた。

各投与群の卵径サイズ 100 個 (n=4) を測定した結果、平均卵径はココナッツ油投与群が一番大きく ( $0.24 \pm 0.03$ )、コントロール ( $0.20 \pm 0.04$ ) と有意差 (t-test,  $p < 0.01$ ) が確認できた。ココナッツ油投与群では 0.1 mm の卵母細胞の割合は少なく全体的に成長が進んでおり、一部では卵黄胞内に顆粒様の構造が確認され卵黄形成の初期ステージに到達していた。また卵巣切片の観察により、ココナッツ油、SPLE 投与群では核外 rRNA の増幅が確認でき、活発なタンパク質合成が行われていることが示唆された。しかし、通常の初回成熟期に見られる 0.6 mm 以上の卵径をもつ明瞭な卵黄顆粒の蓄積をもつ卵母細胞の出現は確認できなかった。

5AR をコードする遺伝子はトラフグでは 3 種類存在し、そのうち *srd5a(1,2)* は全組織で発現していた。そこで精巣切除個体を準備しココナッツ油および 5AR 阻害剤 (FIN) の投与を行い生殖腺以外でのテストステロン合成の可能性を検討した。切除個体ではココナッツ油・阻害剤ともに血清テストステロンの上昇は確認できなかったことから、ココナッツ油により促進される主要なテストステロン合成組織は生殖腺であると結論できた。以上の結果からココナッツ油の標的は卵巣であり濾胞の  $5\alpha$  リダクターゼ (5AR) を阻害することで血清テストステロン値を増加するとともに、ココナッツ油に含まれる成分 (中鎖脂肪酸) が卵母細胞の成長を促進したと考えるのが妥当である (図 3 参照)。

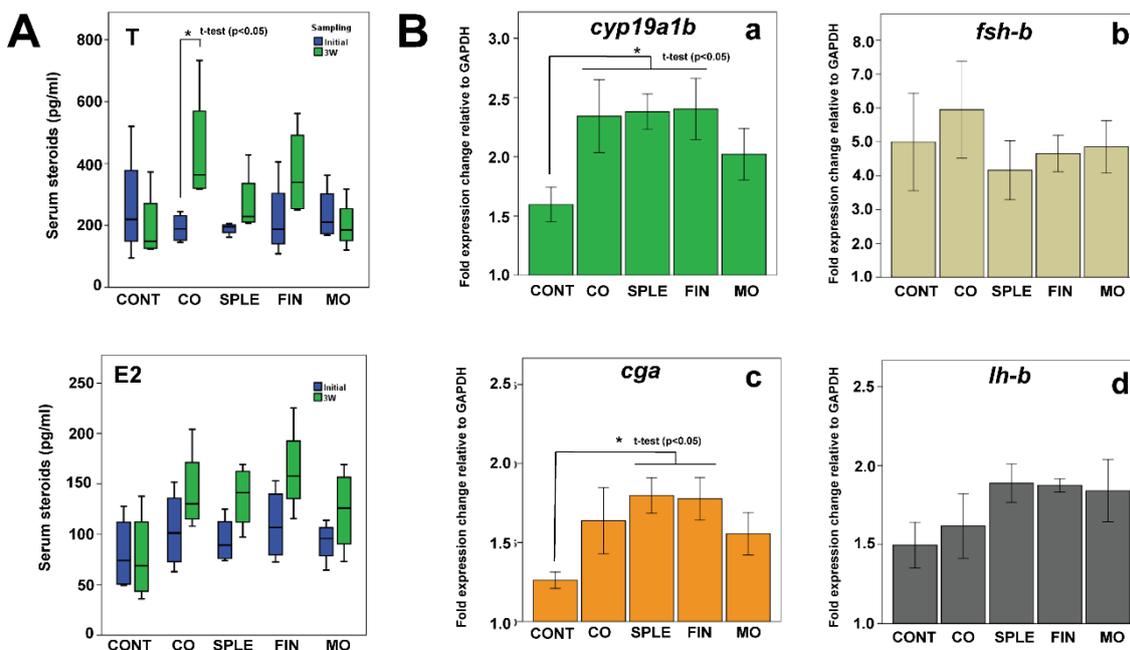


図 2 5AR 阻害効果報告のある植物油脂(CO, SPLE)と 5AR 阻害物質(FIN)の投与前・投与後の血清ステロイドホルモン量の変化 (A) とホルモン遺伝子の発現量解析 (B) (各群 n=4)

### (3) トラフグ初回成熟時のアロマトラーゼ発現陽性細胞の組織化学的解析

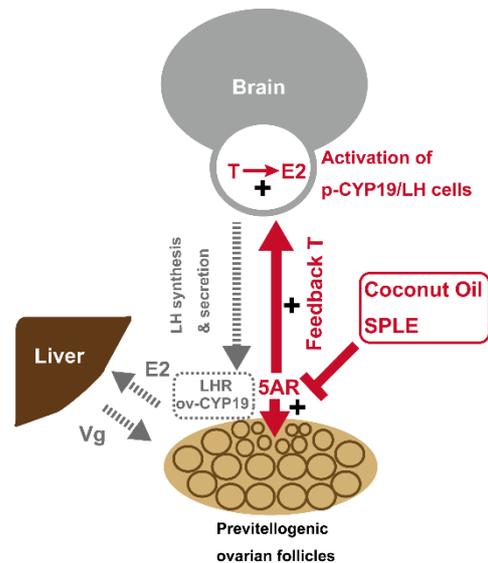
本研究を進めるにあたり、フィードバックテストステロンの標的である下垂体アロマトラーゼ (CYP19) がどのホルモン細胞で発現しているのかが疑問であった。そこで各ホルモン遺伝子プローブと抗体を駆使し ISH および IHC の組織化学解析法を用いアロマトラーゼ発現細胞とホルモン細胞の比較同定をおこなった。その結果、雌雄共に LH 産生細胞はアロマトラーゼ発現細胞であることを証明できた。成熟期にはアロマトラーゼ発現細胞のみで LH は合成される。一方 FSH を含めた他のホルモン細胞には CYP19 の発現は見られなかった。このことから CYP19 細胞は LH 前駆細胞であり、下垂体の局所エストロゲン合成を司る唯一の細胞であることが明らかになった。またトラフグ CYP19 細胞にはエストロゲン受容体 ESR2b が特異的に発現しており、下垂体全ホルモン細胞に普遍的に発現する ESR1 と LH 細胞の核に共局在することを魚類で初めて示すことが出来た。(Yamaguchi et al. 投稿中)。

### 考察とまとめ

本研究では、ココナッツ油投与による魚類での性成熟促進効果を初めて示すことができた。血清テストステロン値の増加は下垂体へのフィードバックシグナルとして作用すると考えられる。トラフグではアロマトラーゼできないジヒドロテストステロンや 11 ケトテストステロン 等のアンドロゲンが黄体形成ホルモンの合成促進はできなかった(実験3)。初回成熟期には、雌ではエストロゲンに先立ってテストステロンが上昇する。また雄ではエストロゲン合成量は少なく成熟期でも変動が乏しい。これらの結果からトラフグではテストステロンは雌雄共通のフィードバックステロイドであり、成熟初期のテストステロンの上昇は初回成熟開始の合図として下垂体へ直接作用すると考えられる。ココナッツ油により下垂体でアロマトラーゼ陽性領域の増加が確認できた。アロマトラーゼ細胞は黄体形成ホルモン (LH) 産生細胞と同一であることから、テストステロンのフィードバック効果は LH 細胞の増殖に関与する可能性がある。しかしココナッツ油のみではビテロゲンタンパク質 (VG) の合成に不可欠な卵濾胞のエストロゲン合成やゴナドトロピン受容体等の準備が進行していないことも示された。今後早期成熟を目指すためには、新たな手法による濾胞組織の発達の活性化も必要である(図3参照)。

ココナッツ油によるテストステロンの合成は下垂体のアロマトラーゼ (*cyp19a1b*) の遺伝子転写量により評価できることが明らかになった。LH 合成を誘導できない濃度の血清テストステロン値でも下垂体で十分にアロマトラーゼ活性を上昇させ、T→E2 の変換によりローカルエストロゲンを合成できると推測できる。エストロゲン受容体の ESR1 は下垂体の全ホルモン細胞に発現している。また、ESR2b、GPR30(GPER1)はそれぞれ細胞特異的な発現が見られるため、血清テストステロンは下垂体内でエストロゲンに置換することで、生殖腺の成熟具合(シグナル)はホルモン細胞特異的エストロゲン受容体を介してシグナルを伝達すると考えられる。ココナッツ油により適正な時期に補助的に血清テストステロンを上昇させることにより、効率的な成熟誘導が可能となる。

本研究により哺乳動物で知られる 5AR 阻害効果をもつノコギリヤシ抽出物 (SPLE) が海産魚でも効果があることを初めて証明できた。ココナッツ油やノコギリヤシ抽出物はミリスチン酸、ラウリン酸などの中鎖脂肪酸含量が高い特徴を持つ。哺乳動物においても中鎖脂肪酸の 5AR 阻害機構は不明な点が多いため、今後魚類への効果を詳細に研究する必要がある。最近、カプリン酸・カプリル酸等の炭素数の短い中鎖脂肪酸がヒトの健康に有効な食用油として宣伝されている。今後配合飼料への混合などで成熟促進に効果のある飼育技術の開発が望まれる。



### 図3 本研究のまとめ

ココナッツ油やノコギリヤシ抽出物 (SPLE) は卵巣濾胞組織で 5AR を阻害しフィードバック T を上昇させるとともに、初期濾胞を発達させる効果がある。フィードバック T は下垂体アロマトラーゼ (p-CYP19) の発現を促進しローカル E2 の合成に関与しており、下垂体ホルモン細胞へ初回成熟開始のシグナルを伝達する。しかし 5AR 阻害のみでは初回成熟に見られる未成熟卵巣での E2 合成に引き続く卵黄蓄積回路(破線)を十分に活性化できなかったため、これらの過程の誘導法の確立が今後の課題として示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口明彦*・石井義真・古谷泰平
2. 発表標題 ココナッツ油投与によるトラフグ下垂体へのフィードバック効果
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会 2019年10月（大阪市立大学）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口明彦*
2. 発表標題 トラフグ下垂体アロマターゼ発現細胞の特徴とローカルエストロゲンの役割
3. 学会等名 第34回日本下垂体研究会学術集会 2019年8月（島根・松江市）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井義真・古谷泰平・山口明彦*
2. 発表標題 トラフグ腹腔内へのココナッツ油投与によるテストステロンフィードバック回路の活性化
3. 学会等名 三学会合同長崎大会 2019年6月（長崎大学）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀之内麻実*・山口明彦
2. 発表標題 トラフグへの植物性脂肪酸投与によるテストステロンフィードバック回路の活性化
3. 学会等名 日本動物学会第88回大会 2017年9月（富山県民会館）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山口 明彦*
2. 発表標題 下垂体アロマトーゼ発現細胞が担うトラフグ初回成熟機構の役割
3. 学会等名 日本動物学会第88回大会 2017年9月（富山県民会館）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 堀之内麻実*・山口 明彦
2. 発表標題 トラフグへの植物性脂肪酸投与によるテストステロンフィードバック回路の活性化
3. 学会等名 日本動物学会中国・四国地区、九州地区合同研修会 2017年9月（下関）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山口 明彦*
2. 発表標題 下垂体アロマトーゼ発現細胞が担うトラフグ初回成熟機構の役割
3. 学会等名 日本動物学会中国・四国地区、九州地区合同研修会 2017年9月（下関）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山口 明彦*
2. 発表標題 下垂体アロマトーゼ発現細胞から読み解くトラフグ初回成熟機構
3. 学会等名 三学会合同大分大会2017 5月（大分大学）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	望岡 典隆  (Mochioka Noritaka)		