

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07952

研究課題名(和文)雄ウナギ催熟技術高度化のための組換えウナギ生殖腺刺激ホルモン作用機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of recombinant eel gonadotropin actions for the improvement of artificial maturation methods in male eels

研究代表者

尾崎 雄一(Ozaki, Yuichi)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・主任研究員

研究者番号：10734030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：雄ニホンウナギ催熟技術高度化のため、組換えニホンウナギ濾胞刺激ホルモン(reFsh)および黄体形成ホルモン(reLh)の雄ウナギ成熟への作用機構を調べた。reLhはライディッヒ細胞における11-水酸化酵素および11-水酸基脱水素酵素タイプ2の発現誘導を介することにより、reFshに比べ11-ケトテストステロン産生をより急速に誘導し、精子形成を速く進行させることが明らかになった。加えて、培養実験の結果、ニホンウナギ輸精管が17,20-ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン産生能を有すること、精子の運動能には精漿中のカリウムイオンが不可欠であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、組換えニホンウナギ濾胞刺激ホルモン(reFsh)および黄体形成ホルモン(reLh)の成熟への作用機構の詳細、特にその差異の一部が明らかになった。今後、これらの結果をもとに、reFshおよびreLhを用いたニホンウナギ催熟技術の高度化が確実に進み、さらには産業規模でのニホンウナギ人工種苗生産技術の確立にも繋がると考えられる。また、魚類では明確になっていないFshおよびLhの作用の違いを明らかにしたことは学術的にも意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We examined mechanisms of recombinant Japanese eel follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone (reFsh and reLh) actions for the improvement of artificial maturation methods in male eels. It was appeared that reLh induced 11-ketotestosterone production and subsequent spermatogenesis more rapidly compared with reFsh through the up-regulation of 11-hydroxylase and 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expressions in Leydig cells. In vitro experiments showed that eel sperm ducts had a potential to produce 17,20-dehydroxy-4-pregnen-3-one. Additionally, it was showed that potassium ions in seminal plasma were essential for the sperm motility.

研究分野：魚類生殖生理

キーワード：精子形成 ニホンウナギ 濾胞刺激ホルモン 黄体形成ホルモン セルトリ細胞 ライディッヒ細胞 輸精管 ステロイドホルモン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ニホンウナギは非常に経済価値の高い養殖魚であるが、未だその種苗は100%天然のシラスウナギ資源に依存しており、産業規模での人工種苗生産技術を確認するための研究開発が行われている。ニホンウナギは雌雄共に飼育環境下では成熟せず、受精可能な精子および卵を得るためには外因性のホルモン投与が不可欠である。現在、雌の場合はサケ脳下垂体抽出液、雄の場合はヒト絨毛性性腺刺激ホルモンなど他種の生殖腺刺激ホルモン(Gth)等を投与することにより成熟し配偶子を得ているが、健全な孵化仔魚を得られる確率は非常に低い。

(2) 魚類においても哺乳類同様、脳下垂体から分泌される2種のGth、濾胞刺激ホルモン(Fsh)および黄体形成ホルモン(Lh)が成熟を制御する主要な因子である。哺乳類ではFshおよびLhの作用機構に関する研究は進んでおり、その作用は明確に分かれている。雄の場合、Fshはセルトリ細胞の発達やセルトリ細胞における成長因子の発現制御等、Lhは主にステロイドホルモン産生を制御している。一方、魚類ではFshおよびLhの作用機構、特にその差異の殆どが未だ不明である。

### 2. 研究の目的

ニホンウナギ成熟技術の高度化のため、他種のGthではなく、組換えニホンウナギFsh(reFsh)および組換えニホンウナギLh(reLh)を用い、両ホルモンの雄ウナギ成熟への詳細な作用機構を特にその差異に着目し明らかにすることを目的とする。まず、reFshおよびreLhにより誘導される精子形成過程での生殖細胞および精巣内体細胞の動態、生殖関連遺伝子の発現変化を明らかにする。次に、reFshおよびreLh投与により成熟したニホンウナギの輸精管の形態および精液の組成の違いを明らかにし、精子の運動能に係わる因子を同定する。

### 3. 研究の方法

(1) reFshおよびreLhを週1回、500 μg/kg-体重の濃度で腹腔内に投与することにより雄ニホンウナギを成熟し、各発達段階の精巣および成熟後の輸精管を摘出した。精巣は免疫組織化学的観察、リアルタイムPCRによる生殖関連遺伝子の発現解析および培養実験に供し、輸精管は組織学的観察および培養実験に用いた。培養実験後、培養液中のステロイドホルモン量を時間分解蛍光免疫測定法により調べた。また、reFsh投与により成熟したニホンウナギから精液を搾出し、精子の培養実験を行った。reLh投与により成熟したニホンウナギからも同様に精液を搾出し、その精漿を精子の培養実験に用いた。

(2) ニホンウナギ未熟精巣をコラゲナーゼ処理した後、percollを用いた密度勾配遠心法および細胞培養プレートに対する接着特異性により、セルトリ細胞、ライディッチ細胞および生殖細胞を分離した。分離したセルトリ細胞およびライディッチ細胞に、reFsh、reLhおよび雄性ホルモンである11-ケトテストステロン(11-KT)を添加し3日間培養した。培養後、各細胞の生殖関連遺伝子の発現量をリアルタイムPCRにより調べた。さらに、培養したセルトリ細胞を次世代シーケンサーによるRNA-seq解析に供し、各ホルモンの作用によりセルトリ細胞で発現が変化する遺伝子を網羅的に調べた。

### 4. 研究成果

(1) reFshおよびreLh投与により雄ニホンウナギを成熟し、適時精巣のサンプリングを行った。ニホンウナギ精巣においても精母細胞マーカーとしての有用性を確認した抗ゼブラフィッシュSYCP3抗体を用いた精巣の免疫組織化学的観察の結果、reFsh投与個体では投与開始4週目まで精母細胞が観察されなかったのに対し、reLh投与個体では2週目で精母細胞が出現した個体が認められ、reFsh投与に比べreLh投与により成熟した個体では精子形成が速く進行することが明らかになった。さらに、各種生殖関連遺伝子の精巣での発現変化をリアルタイムPCRにより調べた結

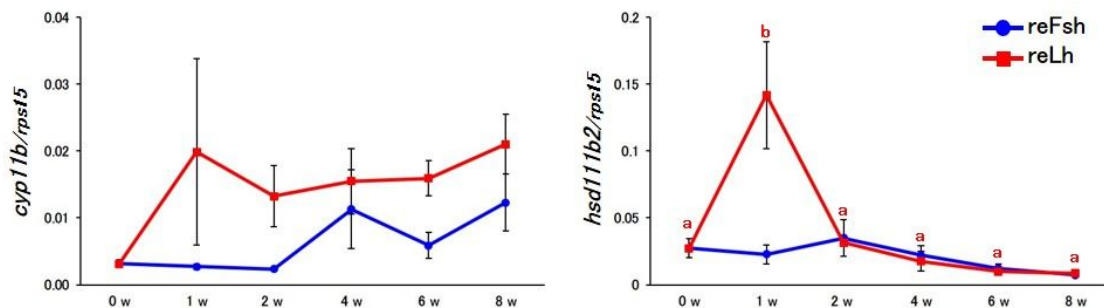


図1. 成熟に伴うcyp11bおよびhsd11b2の精巣中の発現変化  
内部標準遺伝子 rps15 に対する相対値。異なるアルファベットは投与開始後の週(w)の間の有意差を示す(p<0.05)。

果、ステロイド代謝酵素の一つである11 $\beta$ -水酸化酵素遺伝子 (*cyp11b*) の発現が、11-KTの血中量と同様に、reFsh投与個体では投与開始から8週目まで徐々に増加したのに対し、reLh投与個体では1週目で急激に増加した。また、reFsh投与個体では11 $\beta$ -水酸化酵素遺伝子タイプ2遺伝子 (*hsd11b2*) の発現に顕著な変化が認められなかったのに対し、reLh投与個体では1週目に著しく増加した (図1)。これらの結果から、Cyp11bおよびHsd11b2が11-KT合成の律速酵素であること、並びにその11-KT合成量が精子形成の進行速度に関与していることが示された。

(2) reFshおよびreLh投与により催熟したニホンウナギから抽出した成熟精巣を3日間培養した結果、どちらのホルモンで催熟した場合の精巣においても、培養液に添加したreLhの濃度依存的に培養液中の11-KTおよび黄体ホルモンである17 $\beta$ , 20 $\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン (DHP) 量が増加した。培養後の精巣をリアルタイムPCRによる生殖関連遺伝子の発現解析に供した結果、培養液中の11-KTおよびDHP量と同様、添加したreLhの濃度依存的に*cyp11b*、*hsd11b2*および17 $\beta$ -水酸化酵素/C17-20側鎖切断酵素タイプ2遺伝子の発現量が増加し、reLhがこれらのステロイド代謝酵素の発現誘導を介して11-KTおよびDHP合成を促進させることが明らかになった。

(3) reFshおよびreLh投与により催熟したニホンウナギの輸精管の組織学的観察の結果、輸精管の内腔側に一層の上皮細胞が認められ、投与したホルモンの違いによる顕著な形態学的差は認められなかった。一方、予備実験によりその上皮細胞にステロイド側鎖切断酵素 (Cyp11a) が局在していること、reFsh投与により催熟した個体から得た精漿に比べ、reLh投与により催熟した個体から得た精漿中にはDHPが高濃度に含まれていたことから、ニホンウナギ輸精管のステロイドホルモン産生能を調べた。reFshおよびreLh投与開始16週後のニホンウナギから輸精管を抽出し24時間培養した後、培養液中のステロイドホルモン量を測定した。どちらのホルモン投与で催熟した個体から得た輸精管においても、ステロイドホルモンの基質であるプレグネノロンを添加した群では未添加群に比べ、DHP産生量が高値を示した (図2)。以上の結果、ニホンウナギ輸精管がDHP産生能を有することが明らかになった。

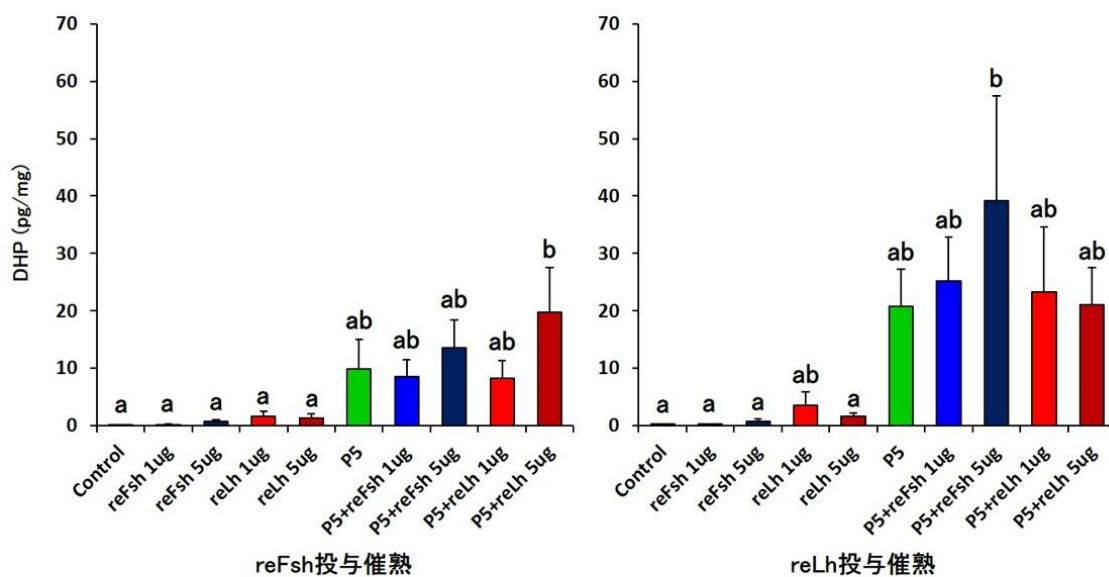


図2. 輸精管1 mg当たりのDHP産生量  
P5, プレグネノロン。異なるアルファベットは群間の有意差を示す (P<0.05)。

(4) reFsh投与により催熟した場合に比べ、reLh投与により催熟したニホンウナギから得た精液中の運動精子の割合が著しく高値を示したことから、reLh投与個体から得た精漿 (Lh精漿) によるreFsh投与個体から得た精子 (Fsh精子) の活性化を試みた。その結果、Fsh精子を自身の精漿で24時間培養した場合に比べ、Lh精漿中で培養した場合の運動精子の割合は約3倍に増加した。また、Lh精漿を脱塩処理した場合はその活性化効果は認められなかったが、脱塩後、塩化カリウムを加えることによりその効果が回復したことから、精漿中のカリウムが精子の運動能に不可欠であることが明らかになった (図3)。

(5) 密度勾配遠心法および細胞培養プレートに対する接着特異性を利用することにより、ニホンウナギ未熟精巣からセルトリ細胞、ライディッヒ細胞および生殖細胞を高純度かつ大量に分離することに成功した。分離したセルトリ細胞およびライディッヒ細胞に、reFsh、reLhおよび11-KTを添加し培養した後、生殖関連遺伝子の発現を調べた結果、11-KTがセルトリ細胞およびライディッヒ細胞中のFsh受容体遺伝子および*hsd11b2*の発現を増加させることが明らかになった。加えて、Lhがライディッヒ細胞におけるLh受容体遺伝子、ステロイド産生急性調節因子遺伝子、*cyp11a*、17 $\beta$ -水酸化酵素/C17-20側鎖切断酵素遺伝子、*cyp11b*の発現を増加させることが示され

た。さらに、次世代シーケンサーを用いたRNA-seq解析により、各ホルモンを添加し培養したセルトリ細胞の遺伝子発現を網羅的に解明した。

以上の結果、雄ニホンウナギ成熟へのreFshおよびreLhの作用機構の詳細、特にその差異の一部が明らかになった。今後、これらの結果をもとに、reFshおよびreLhを用いたニホンウナギ催熟技術の高度化が確実に進み、さらには産業規模でのニホンウナギ人工種苗生産技術の確立にも繋がると考えられる。

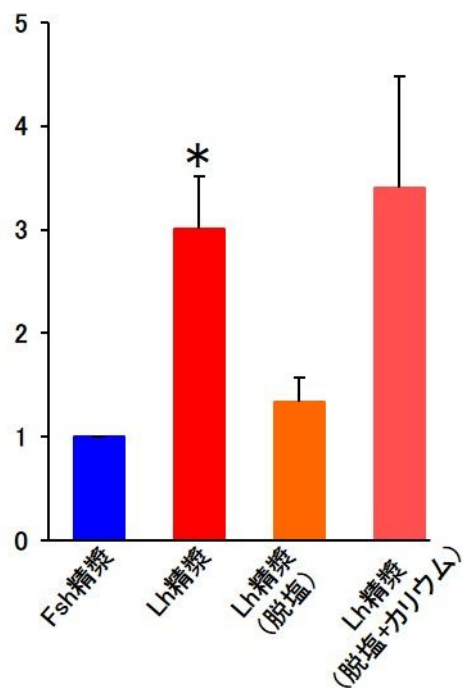


図3. 培養Fsh精子の運動精子の割合自身の精漿 (Fsh精漿) 群との相対値。  
\*はFsh精漿群との有意差を示す ( $P<0.05$ )。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 尾崎雄一、鈴木博史、風藤行紀
2. 発表標題 Expressional regulation of steroidogenic enzyme genes in the testis of Japanese eel matured by recombinant eel gonadotropin injections
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木博史、尾崎雄一、風藤行紀
2. 発表標題 ニホンウナギ成熟精巣におけるステロイドホルモン産生に及ぼす組換え生殖腺刺激ホルモンの影響
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾崎雄一、鈴木博史、野村和晴、風藤行紀
2. 発表標題 組換えニホンウナギ生殖腺刺激ホルモン投与により催熟した雄ウナギの輸精管のステロイドホルモン産生能
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2018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
連携研究者	風藤 行紀  (Kazeto Yukinori)  (60399996)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・グループ長    (82708)	