

機関番号：33501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580214

研究課題名（和文） 魚類生殖腺の性的可塑性に関する研究

研究課題名（英文） Sexual plasticity of fish gonad

研究代表者

平井 俊朗 (HIRAI TOSHIAKI)

帝京科学大学・生命環境学部・准教授

研究者番号：30238331

研究成果の概要（和文）：魚類生殖腺の性的可塑性維持機構について機能形態学的、分子生物学的に検証した。卵巣においては性分化後も潜在的精巣分化能が維持されており、生殖腺体細胞由来因子（GSDF）がこれに関わっている可能性が示唆された。GSDFは性転換魚における性転換（精巣分化）開始にも関与していることが明らかとなった。一方、精巣分化過程においては特定の時期に潜在的卵巣分化能が消失することが明らかとなり、精巣固有の組織構築に関連している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Sexual plasticity of fish gonad was addressed by morphological and molecular biological approaches. In maturing ovary of common carp, special regions retain a potential to be differentiated into testicular tissue. Gonadal soma derived growth factor (GSDF) is expressed in the regions, suggesting its involvement in the sexual plasticity. This growth factor is shown to exert a crucial role in the protogynous sex change (from ovary to testis) in wrasse. Meanwhile, estrogen administration to genetic male of common carp showed that sexual plasticity regressed as testicular tissue architecture was formed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成21年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成22年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：生殖腺、性分化、可塑性、水産学、発生・分化

## 1. 研究開始当初の背景

(1)魚類では生殖腺性分化（精巣または卵巣への分化決定）以前は性ホルモン投与により遺伝的性とは反対の性（性転換）を誘導することが可能で、この時期の未分化生殖腺は雌雄何れの性へも分化可能な「性的可塑性（性的

両能性）」を持っている。

(2)雌雄異体の魚類では一旦性が確定した後は生殖腺の性的可塑性は失われると信じられてきたが、雌雄異体魚類の雌において雌性ホルモンの合成阻害によって分化後の卵巣

から精巣組織が誘導できることが明らかになった。つまり雌の生殖腺では性分化後も性的可塑性が維持されている。

(3)これに対して雄では雌性ホルモン投与による卵巣への性転換には臨界期が存在し、それ以降は性転換が誘導されることはなく、精巣分化の過程で性的可塑性が失われると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、このような魚類生殖腺における性的可塑性の機構について、機能形態学的、分子生物学的にアプローチし、性統御個体群作出や、希少種や優良系統の保存のための配偶子確保に向けた基礎的知見の集積を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 遺伝的雌へのアロマターゼ阻害剤投与により、卵巣内における精巣組織出現の詳細を機能形態学的手法により調べ、併せて精巣分化関連分子の出現を追跡し、卵巣内における精巣組織分化の発端を探った。

(2) いくつかの魚種において性的未分化期に卵巣の精巣化を誘導することが知られている高温飼育によって分化後の卵巣でも性転換が誘導されるか否かを形態学的に検証した。

(3) 遺伝的雄への雌性ホルモン投与実験を実施し、性的可塑性が消失する臨界期を形態学的、分子生物学的に検証した。

(4) 精巣と卵巣の間で遺伝子差し引き（サブトラクション）法による精巣特異的、卵巣特異的な新規遺伝子の単離を行った。

(5) 成魚においても性的可塑性が高く維持されていると考えられる雌雄同体魚種において性転換に関連する遺伝子の探索を行った。

(6) 遺伝的性統御群を用いたゲノム比較法により、性特異的遺伝マーカーの探索を行った。

## 4. 研究成果

(1) すでに卵巣分化が終了したコイ遺伝的全雌群過年魚に対する雌性ホルモン合成阻害剤持続投与実験を実施した。その結果、従来確認されていた未熟魚に加えて成熟途上（卵黄形成期）の個体においても投与開始6ヶ月において卵巣内に精巣組織が誘導され、その発端と思われる組織学的兆候が投与開始4ヶ月ころより卵巣縁辺部の特定の領域に現れることを確認した。このことは成熟卵巣においてもその一部に性的可塑性（精巣に分化

しうる能力）を保持した組織（微小環境）が残存し、通常は新たな卵原細胞の供給源として機能しているものの、雌性ホルモンの欠如により精巣組織が誘導されることを示している。この成果は他のグループによる同様の研究とあいまって、雌雄異体魚の性的可塑性維持が普遍的な事象であることを示しており、魚類性分化機構の研究において新たな概念を提案することとなった。

(2) コイ遺伝的全雄群に対して孵化後さまざまなタイミングで6ヶ月間の雌性ホルモン投与実験を行い、生殖腺の卵巣化について精査した。異なる2つの同腹群で実験を行ったところ、片方では投与開始時期が孵化後5ヶ月齢と6ヶ月齢の場合で卵母細胞出現率の顕著な低下が確認されたのに対して、他方では孵化後9ヶ月齢からの投与開始においても周辺期卵母細胞の誘導が確認された。両群の間には体成長速度に違いが見られ、精巣分化に特徴的な組織学的所見はいずれも前者の方が早い時期に確認された。これらのことからコイでは精巣分化とそれにともなう性的可塑性（雌性ホルモン感受性）の低下が個体の成長と関連していることが示唆された。また、これらの実験では投与終了後12ヶ月後に経過観察を行ったところ、雌性ホルモンにより誘導された卵巣組織上に精巣組織が発達するという「性の逆戻り現象」が観察された。別群を用いた3ヶ月齢からの投与実験ではこのような逆戻り現象は観察されず「真の卵巣化」が確認された。これらの結果は遺伝的雄において、雌性ホルモン合成能獲得のための臨界期は卵母細胞誘導のための臨界期より早い段階で消失することを示しており、生殖細胞と生殖腺体細胞の間で性的可塑性の保持に違いがあることが明らかとなった。

(3) メダカにおいて性分化期における高温飼育により遺伝的雌魚において精巣分化が誘導され、これはストレスにより産生されたコルチゾールがアロマターゼの発現を抑制することで雌性ホルモン合成が低下することによることが明らかとなった（熊本大学との共同研究）。同様の現象が性分化後においても起こりうるのかを調査するためにコイ雌1年魚に対するコルチゾール継続投与を実施したところ、6ヶ月間投与で卵巣組織崩壊の兆候は確認され、12ヶ月間投与では生殖腺の部分的精巣化が確認された。しかし、高温ストレス負荷実験（36℃、3ヶ月）では生殖腺の精巣化は確認できなかった。この成果により、ストレスが魚類の性分化に影響を及ぼす機構が初めて明らかとなり、「環境ストレスによる性のゆらぎ」が注目されるようになった。

(4)雌雄生殖腺で発現に差が見られた遺伝子のうち、性的可塑性に関連する分子の候補として、始原生殖細胞および精原細胞の増殖ならびに性分化への関与が示唆されている生殖腺体細胞由来増殖因子 (GSDF) に着目した。コイより2種類のGSDF完全長cDNAをクローニングし、*in situ* ハイブリダイゼーション法により生殖腺性分化との関連性について検討した。全般的にKoiGSDF1の方がKoiGSDF2よりも高い発現を示したが、両者の局在はほぼ重複していた。形態的雌雄差が現れた直後である4ヶ月齢では、雌雄ともに生殖腺で強い発現が認められたが、すでに発現強度、発現分布に雌雄差が見られた。一方、16ヶ月齢では、雄では精原細胞の近傍に強い発現が認められたのに対して、雌では卵巣縁辺部に存在する卵原細胞の周囲においてのみ強い発現が確認された。その領域はコイ遺伝的雌過年魚(卵巣分化後)において雌性ホルモン合成阻害剤持続投与により精巣組織が誘導される部位(性的可塑性保持領域)に酷似していた。したがって、GSDFは卵巣内における性的可塑性の局所的維持に関与している可能性が示唆された。

(5)雌性先熟性転換魚であるミツボシキウセンにおいてもGSDFのcDNAクローニングに成功し、性転換時における発現動態を解析した(琉球大学との共同研究)。その結果、卵巣から精巣への性転換過程において、極めて早い時期より発現の上昇が確認され、性転換の開始に関わっている可能性が初めて示された。この成果は魚類における性転換機構解明の発端となりうる重要な知見をもたらした。

(6)メダカにおいて濾胞刺激ホルモン受容体(FSHR)の発現上昇が卵巣分化に必要であることを明らかにした(熊本大学との共同研究)。一方、雌性先熟性転換魚(ハタ類、ベラ類)からもFSHRのcDNAクローニングを行い、性転換時における発現変動を明らかにした(琉球大学、九州大学との共同研究)。これらの成果により、従来から成熟への関与のみが知られていた濾胞刺激ホルモンの性分化、性転換への関与という、新たな局面を提示することが出来た。

(7)コイ遺伝的超雄(YY)と遺伝的雌(XX)との間において、ゲノム比較法により性特異的ゲノムマーカー候補領域のクローニングに成功した(東北大学との共同研究)。今後これらと性との連鎖を確認し、性特異的遺伝子マーカーとして遺伝的性の検証に利用するだけでなく、水産養殖の現場における早期雌雄判別などへの応用も視野に入れて研究

を展開する予定である。

(8)本研究の成果により、雌の選択的生産が望まれているにもかかわらず、これまで効果的な人為性統御技術開発に成功していないニシキゴイについて、性分化機構を解明する上で重要な多くの基礎知見を得ることが出来た。これらを踏まえて研究協力機関である新潟県内水面水産試験場において平成23年度より新規事業としてニシキゴイ全雌生産技術開発に向けた実用化研究を開始することとなった。

#### 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6件)

- ① Kitano, H., Irie, S., Ohta, K., Hirai, T., Yamaguchi, A. and Matsuyama, M. (2011) *Gen. Comp. Endocr.* 172, 268-276. 査読有
- ② Hayashi, Y., Kobira, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, E., Yazawa, T., Hirai, T., Kamei, Y. and Kitano, T. (2010) *Mol. Reprod. Dev.* 77, 679-686. 査読有
- ③ Alam, M.A., Kobayashi, Y., Hirai, T. and Nakamura, M. (2010) *Comp. Biochem. Physiol. A*, 156, 364-371. 査読有
- ④ Mittelholzer, C., Andersson, E., Consten, D., Taranger, G.L., Hirai, T., Senthilkumaran, B., Nagahama, Y. and Norberg, B. (2009) *Gen. Comp. Endocrinol.* 160, 47-58. 査読有
- ⑤ Alam, M.A., Kobayashi, Y., Horiguchi, R., Hirai, T. and Nakamura, M. (2008) *Gen. Comp. Endocrinol.* 157, 75-85. 査読有
- ⑥ Ogawa, S., Akiyoshi, M., Higuchi, M., Nakamura, M. and Hirai, T. (2008) *CYBIUM International Journal of Ichthyology*, 32suppl, 102-103. 査読有

[学会発表] (計12件)

- ① T.Uchikawa, H.Kobira, T.Hirai and T.Kitano (2011年8月) Analysis of regulational mechanism of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) expression using FSHR-GFP transgenic medaka. 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (Cochin, India)
- ② T.Fujimoto, T.Ohmae, S.Sato, R.Horiguchi, Y.Nagahama and T.Hirai (2011年8月) Molecular cloning of

- common carp gonadal soma derived growth factor (GSDF). 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (Cochin, India)
- ③ 藤本孝史、大前貴俊、平井俊朗 (2010年11月) コイ (Cyprinus carpio) 生殖腺体細胞由来増殖因子 (GSDF) の cDNA クローニング第 35 回日本比較内分泌学会大会 (静岡)
- ④ T.Uchikawa, H.Kobira, T.Hirai and T.Kitano (2010年6月) Regulatory mechanism of follicle-stimulating hormone receptor expression in medaka (*Oryzias latipes*). 第 43 回日本発生生物学会大会 (京都)
- ⑤ 林裕輝、小平博史、山口寿哉、白石絵史、平井俊朗、北野健 (2010年3月) メダカの温度依存性性決定におけるコルチゾルの関与平成 22 年度日本水産学会大会 (藤沢)
- ⑥ 小平博史、平井俊朗、北野健 (2009年12月) メダカ濾胞刺激ホルモン受容体の発現制御機構の解析第 34 回日本比較内分泌学会大会 (大阪)
- ⑦ H. Kataura, H. Ichimaru, E. Shiraishi, A. Kanamori, T.Hirai and T.Kitano (2009年6月) Functional analyses of follicle-stimulating hormone (FSH) and FSH-receptor in early gonadal differentiation in medaka (*Oryzias latipes*). 16th International Congress of Comparative Endocrinology (香港)
- ⑧ S. Ogawa, M. Higuchi, S. Sato, M. Nakamura and T.Hirai (2009年6月) Sexual Plasticity in the gonads of common carp (*Cyprinus carpio*). 16th International Congress of Comparative Endocrinology (香港)
- ⑨ H. Kataura, H. Ichimaru, E. Shiraishi, A. Kanamori, T.Hirai, and K. Kitano (2009年5月) Functional analysis of follicle-stimulating hormone using sycp1-GFP/olvas-DsRED double transgenic medaka line (*Oryzias latipes*) 第 42 回日本発生生物学会大会 (新潟)
- ⑩ 小川智史、小松加苗、樋口正仁、中村將、平井俊朗 (2009年3月) コイ雄生殖腺の性的可塑性についての研究 成長と性分化の関連性平成 21 年度日本水産学会春季大会 (東京)
- ⑪ 小川智史、樋口正仁、中村將、平井俊朗 (2008年12月) コイ雌生殖腺の性的可塑性 卵巣内における精子形成の誘導 第 33 回日本比較内分泌学会大会 (広島)
- ⑫ S. Ogawa, M. Akiyoshi, M. Higuchi,

M.Nakamura and T.Hirai (2008年5月) Sexual Plasticity in the ovary of common carp (*Cyprinus carpio*). International Symposium on Sex Determination and Gametogenesis in Fish: Current Status and Future Directions. (Hawaii, USA)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平井 俊朗 (HIRAI TOSHIAKI)  
帝京科学大学・生命環境学部・准教授  
研究者番号：30238331

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

