

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21339

研究課題名（和文）海産魚で初めての成熟関連フェロモンの同定と水産養殖への応用展開

研究課題名（英文）Identification of maturation-related pheromones in marine fish and the application of pheromone substances to aquaculture

研究代表者

征矢野 清（Soyano, Kiyoshi）

長崎大学・海洋未来イノベーション機構・教授

研究者番号：80260735

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、フェロモンを用いた新しい種苗生産技術の開発の基盤形成を目的として、カンモンハタの成熟フェロモンの同定を目指した。本種雄の尿において、成熟期にはバルブアルブミンが特異的に出現することが分かった。しかし、尿中に特異的に出現する遊離アミノ酸は確認できなかった。尿中の脂質分子種を解析したところ、雄の尿に含まれている脂質分子種のうち、特に高濃度で存在し雌で検出されなかった分子種が9種確認された。これはフェロモンの候補と考えられる。また、雄の尿を曝露した雌の嗅上皮のクリプト細胞において、尿に対する陽性反応するが確認され、雌が雄の尿中の匂い物質を感受することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類の成熟関連フェロモンは、いくつかの魚種で物質の同定が行われているに過ぎない。しかもその物質は構造的に多岐にわたる。本研究は魚類の繁殖において重要な役割を担うフェロモンの機能解明に向けた研究基盤構築としての意義が大きい。また、本研究は雄から放出される成熟関連フェロモンを「産卵を同調させる成熟誘導剤」として活用するというこれまでにない水産養殖技術の開発につながる画期的なアイデアを含んでいる。これが成功すればハタ類の種苗生産の作業効率の軽減と、より健全な種苗の生産に大いに貢献できる。本研究で得られた海産魚類のフェロモンに関する成果は、これらを実現する上で欠くことのできない知見である。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted to identify and elucidate the role of maturation-related pheromones in marine fish. In this study, we detected proteins that appear during the maturation phase in the urine of male honeycomb grouper. As a result, it became clear that parvalbumin was present as a characteristic protein. The composition of free amino acids in urine was also analyzed, but no specific amino acids were found. Lipidomics analysis was performed to detect the most abundant lipid molecular species (LMS) in male urine. Among the LMS found in male urine, nine were classified as molecular species that were present at particularly high concentrations and were not detected in females. These were selected as pheromone candidates. Immunohistochemical examination of the response in the olfactory epithelium of females exposed to male urine revealed a positive response in crypt cells present in the olfactory epithelium of females. This indicates that females respond to odorants in male urine.

研究分野：魚類生殖生理学

キーワード：成熟関連フェロモン 成熟関連ホルモン 成熟誘導 種苗生産技術

1. 研究開始当初の背景

ハタ類は高級魚として扱われており、我が国の次世代水産業を支える魚種の一つとされているが、種苗生産が難しいこと、成長が遅いことなどが主原因となっており、ハタ類の養殖は停滞を余儀なくされている。しかし、中国をはじめとする海外では、ハタ類の急激な消費の拡大に伴い、再び種苗生産および養殖技術の開発に注目が集まっている。このように、ハタ類の養殖への期待は大きいものの、その基盤となる種苗生産技術は多くの課題を抱えている。最も問題とされるのは、「雄が不在あるいは極めて少ない環境では、雌の卵母細胞の最終成熟（卵母細胞が受精可能な卵となるための変化）が進行せず排卵が起こらない」という特性に依存する課題である。これは雌を雄と一緒にすれば解決できる問題であるが、ハタ類は雌として産卵を複数年経験したのち雄となる「雌性先熟型性転換魚」であることから、雄は大型で個体数が少なく、種苗生産に必要な雄親魚を確保・管理するのが困難であることが多い。

我々の研究グループは、これまでの研究から産卵直前となると雌の成熟を誘導するフェロモンが雄から放出され、これによって雌の卵母細胞の最終成熟から排卵までの一連の生理変化が惹起されることを明らかにした (Amagai et al, 2022)。雄の不在が雌の成熟を妨げる原因は、このフェロモンによる雌雄間のコミュニケーションが成立しないことにある。また、雄の存在が少ない場合は、フェロモンを因子として起こる雌の成熟の同調が損なわれる。そのため、雄が不在あるいは極めて少ない環境においても雌の最終成熟・排卵を誘導する技術の開発が求められていた。このことからフェロモンを雌の成熟誘導剤として活用すれば、これまでになかった画期的な養殖種苗の生産技術を生み出すことができるとの考えに至った。これまでテラピア *Oreochromis mossambicus* では、成熟した雄の尿がメスの排卵誘導と産卵の同調に重要な役割を担っていることが知られている (Huertas et al, 2014)。雄の尿にさらされると雌では最終成熟誘起ホルモンである 17,20 -dihydroxypregn-4-en-3-one (DHP) が急増し、それによって最終成熟から排卵までの一連の過程が進行する。しかし、海産魚類において、雄の成熟を誘導するフェロモンは知られていないものの、雌の最終成熟や排卵を誘起するフェロモンの存在は明らかにされてこなかった。雄由来のフェロモンを雌の成熟誘導剤とするためには、情報の少ない中で物質の同定とその機能解析を進めなければならない。

* 雄の成熟を誘導する研究は、比較的進んでおり、物質の同定も進んでいる。ニジマス *Oncorhynchus mykiss* では、成熟した雌の尿に、雄の生殖腺刺激ホルモン LH と最終成熟誘起ホルモン DHP の産生を高め、精液量を増加させる物質が含まれることがわかっている (Scott et al, 1994; Vermeirssen et al, 1997)。また、タイセイヨウサケ *Salmo salar* では、雌の卵巣腔液、尿、プロスタグランジン $PGF2\alpha$ が血中の DHP を増加させること、また卵巣腔液に $PGF2\alpha$ が多く含まれることが知られている (Olseán et al, 2001)。このように雄の成熟に関わる生理変化を誘導するフェロモンは、雌の生殖腺由来であり、尿を一つの放出経路として雄に影響を与えている。

2. 研究の目的

本研究が最終的に目指すものは、フェロモンを雌の成熟誘導剤とした新たな成熟・排卵方法によるハタ類の新たな種苗生産技術の確立である。そのために、ハタ類の雌の成熟誘導に関わるフェロモン物質の同定とフェロモンを用いたハタ類の成熟・排卵制御による新たな種苗生産システムの基盤構築に主眼を置いて、以下の研究を実施した。これらは、新たな養殖技術を創出するという水産学的意義を有するのみならず、海産魚におけるフェロモンの役割を解明する生物学的意義を併せ持つ重要な研究である。

(1) フェロモン物質の同定および標的分子の絞り込み：成熟関連フェロモンの同定や機能解析は様々な生物で行われているが、海産魚ではメバルなどで成熟関連フェロモンの存在を疑わせるわずかな報告があるに過ぎず、それ以上の研究は進んでいない。また、フェロモンの存在が知られている淡水魚でも、物質の同定に至った魚種は数種ほどである。我々の研究グループは月周産卵魚カンモンハタにおいて雌は雄からのフェロモンを産卵直前に受け取ることを明らかにしたことから (Amagai et al, 2022) 本研究ではこの実験系を用いてフェロモン物質が放出される時期の雄からフェロモン物質の同定を目指した。特に、フェロモンの放出経路である尿に着目し、尿中のタンパク質および脂質の分析を試みた。

(2) 雄の尿に対する雌嗅上皮の応答*：雌の嗅上皮におけるフェロモンの感受の有無を明らかにするために、尿を曝露したカンモンハタの嗅上皮を摘出し、匂い物質に対する応答を免疫組織化学的に検出することによって、フェロモンの感受の有無を確かめることを目指した。この実験は、尿等を用いた物質解析によりフェロモン候補としての選ばれた複数の物質を対象とし、それがフェロモンとしての機能を有するかをスクリーニングするために必要である。当初の研究計画には無かったものの、研究期間中に得た情報から、候補物質が成熟期の雌においてフェロモンとして機能しているか否かを確認する方法として有効であることから実施した。

* 研究当初は精巢及び尿の抽出物を分子画分にわけた後、雌に曝露させてその生物応答（脳下垂体における生殖腺刺激ホルモンの一つである黄体形成ホルモン（LH）の遺伝子の発現の誘導）を確認する予定であった。しかし、コロナ禍における実験の制限のため、この実験は実施せず、雌の嗅上皮を用いた免疫組織化学的手法によるフェロモンの応答の観察に切り替えた。

上記研究が順調に進んだ場合には、飼育系を用いてフェロモン物質の生理活性の確認を行うとともに、対象物質の人工合成を行い、合成物質のフェロモンとしての有効性を検討したのち、新たな種苗生産技術の確立に向けた実用試験に入る予定であった。しかし、コロナ感染拡大の影響も受け、供試魚の収集、学外での実験等が十分に実施できなかったことから、本研究期間内での実施を断念し、今後の研究課題として継続実施することとした。

3. 研究の方法

(1) フェロモン物質の同定および標的分子の絞り込み：カンモンハタは月周産卵魚であることから、生殖腺発達は月の満ち欠けに沿って進行し、満月の数日後に約3日間連続産卵する(Soyano et al, 2003)。雌は雄の飼育水に反応し、雄が不在でも最終成熟を引き起こすが、それは満月の直後から産卵までの数日間に限られることから、この時期の雄からフェロモン物質が放出されていると考えられる。また、飼育実験により雄の尿に弱いながらも成熟誘導能力があることが分かった。そこで、産卵から産卵までを一つの周期として、フェロモン物質の放出経路と考えられる泌尿系を標的としたタンパク質と脂質成分の分析を実施した。

タンパク質の解析：異なる成熟状態の雄（産卵直前の成熟個体と産卵期後の個体）から膀胱を摘出し、注射筒を用いて体液等の混入がないように尿のみ採取した。これを遠心分離し、混入する膀胱の組織編等の浮遊物を除去した。これをポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）にかけ、構成タンパク質を分子量ごとに分けるとともに、その存在量を明らかにした。SDS-PAGEはゲル濃度を5%とし常法に従い実施した。産卵直前の成熟雄では分子量約100kDaと11kDaのタンパク質画分が特異的に出現した（図1）。そこで、フェロモン物質は低分子であると想定し、11kDaのタンパク質画分を電気泳動のゲルより切り出し質量分析に供した。また、合わせて成熟期の雄尿全体の質量分析も実施した。続いて、尿中のアミノ酸組成も大切であることから、雄の尿をTCAにより除タンパク質処理したものを資料として、遊離アミノ酸の組成分析を実施した。これらの分析は、北海道大学グローバルファシリティーセンター機器分析受託部門に依頼した。

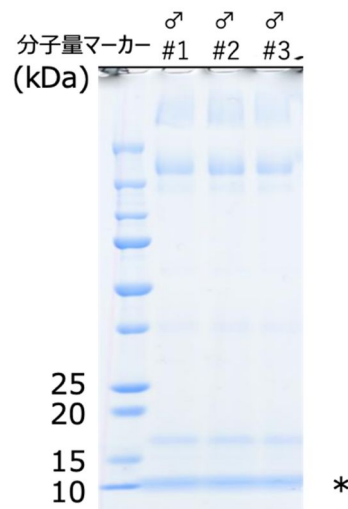


図1 雄尿中のタンパク質組成
繁殖期の雄を複数個体分析したところ、同様のパターンが確認された。
このうち、フェロモンとして可能性のある低分子のバンド（*）を切り出して質量分析に供した。

脂質の解析：尿中に多く存在する脂質分子に注目し、リポミクス解析を実施した。産卵期の雌雄の尿を試料とし、これらをメタノールおよびクロロホルムにて処置し、液体クロマトグラフ-質量分析計で解析した。これらの分析は、一般財団法人化学物質評価研究機構に依頼した。

(2) 雄の尿に対する雌嗅上皮の応答：成熟期の雌に雄の尿を曝露し、20分後に雌の嗅上皮を摘出して4%パラホルムアルデヒド(PFA)固定を行った後に免疫組織化学に供する組織切片作成した。免疫組織化学染色は神経活動マーカーである ribosomal protein S6 (pS6) を標的とした抗体を用いて行った。

4. 研究成果

(1) フェロモン物質の同定および標的分子の絞り込み：

タンパク質の解析：本研究では、カンモンハタの雄の尿において、成熟期に出現するタンパク質を検索したところ、特徴的なタンパク質としてパルプアルブミンを検出した。しかし、それ以外に成熟期の雄に特異的と判断できるタンパク質は確認できなかった。そこで、尿中におけるアミノ酸組成が重要であると考えアミノ酸組成を分析したところ、非繁殖期の雄ではタウリン、グルタミン酸などが高濃度で検出された。しかし、繁殖期の雄ではタウリン以外の他のアミノ酸は極めて低値であった。サクラマス *Oncorhynchus masou* では、雌の尿中に存在するキヌレニン（アミノ酸の1種であるトリプトファンの代謝物）が雄を誘因する（Yambe et al., 2006）。また、キヌ

レニンあるいはその代謝物は、雄の DHP を上昇させる働きを合わせ持つ (Yambe et al., 2007)。このように、アミノ酸あるいはその代謝物がフェロモンとしての働く可能性は海産魚類でも考えられる。しかし、繁殖期のカンモンハタ雄において増減するタンパク質およびアミノ酸は存在するものの、フェロモンとして機能する特異的な物質を明らかにすることはできなかった。本研究の結果から、ハタ類の最終成熟と排卵誘導において、タンパク質あるいはアミノ酸がフェロモン物質である可能性は低いと考える。

脂質の解析: 雄の尿中の多く存在する脂質分子に注目しリピドミクス解析を実施した。試料にメタノールおよびクロロホルム処理を施し、これを液体クロマトグラフ-質量分析計で分析した。リピドミクス解析の結果、カンモンハタの尿から雌雄合わせて 116 種類の脂質分子種が検出された。さらに、雄のみで検出されたのは 97 種類、雌雄ともに検出されたのは 19 種類であり、雌のみで検出された脂質分子種は認められなかった。雄の尿中に含まれている脂質分子種の種類が多かったため、雄の尿中で特に高濃度で存在し、かつ、雌で検出されなかった分子種を分類したところ、9 種 (検出物質番号 C57H104N2O21, C65H118N2O21, C44H80NO8P, C46H82NO8P, C43H78NO8P, C43H78NO7P, C47H83O13P, C47H81O13P, C46H82NO10P) をフェロモンの候補として選定することができた。残念ながら、それぞれの物質のフェロモンとして生理活性の確認までは至らなかった。

これまでに雄が放出するフェロモンによる雌の排卵誘発効果はゼブラフィッシュ *Danio rerio* で知られており、雄の飼育水、精巣ホモジネート、およびステロイドグルクロニドを含む精巣画分を雌に曝露すると排卵が起こる (van den Hurk et al, 1987)。また、ステロイドよりグルクロン酸抱合を外すことによって排卵能力を消失させることができる。このことから、ステロイドグルクロン酸抱合体が排卵誘起フェロモンであることが示された。このようにステロイドをはじめとする脂質分子や、プロスタグランジン (PGF₂) (Olseán et al, 2001) やフグ毒として知られるテトロドトキシン (TTX) (Matsumura, 1995) など、タンパク質やアミノ酸分子以外のものがフェロモンとして機能する例が非常に多い。本成果をもとに今後より詳細な物質の同定を進める必要がある。

(2) 雄の尿に対する雌嗅上皮の応答: 免疫組織化学により pS6 に対する陽性反応が確認されたのは、嗅上皮表面に存在するクリプト細胞であった (図 2)。先行研究では魚類においてクリプト細胞がフェロモンの受容に関与することが知られている (Suzuki et al., 2022)。本研究の結果、雄の尿中に存在する生体分子に雌の嗅上皮は応答することが分かった。尿中には様々な物質が含まれていることから、フェロモン物質との関連を述べることは難しいものの、成熟期の雄の尿に成熟期の雌の嗅上皮が反応することは、雌の最終成熟・排卵における雌雄間のコミュニケーションが匂い物質を介して行われている可能性を強く示すものである。また、雌が応答する物質がこの時期の雄の尿に含まれていることは、ハタ類の成熟機構を考える上で重要な知見である。この結果をもとに、免疫陽性細胞において発現している嗅覚受容体遺伝子を調べることで、雄尿中のフェロモンの絞り込みが可能である。

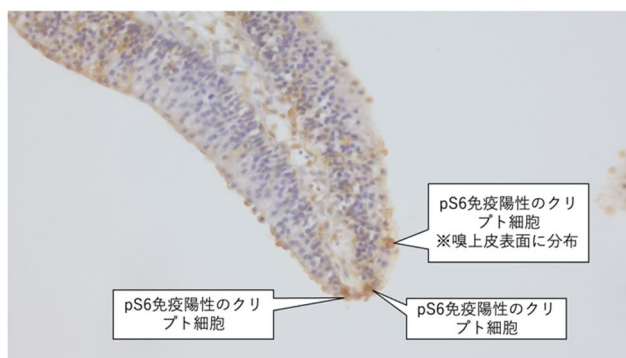


図 2 pS6を用いた雌嗅上皮の免疫組織化学の結果
雄の尿を曝露した雌の嗅上皮では、匂い分子の感受マーカーとなるpS6の陽性反応が、嗅上皮表面に分布するクリプト細胞で観察された。

<引用文献>

Amagai, T., Izumida, D., Murata, R., Soyano, K. Male pheromones induce ovulation in female honeycomb groupers (*Epinephelus merra*): a comprehensive study of spawning aggregation behavior and ovarian development. *Cells*, 2022, 11, 484, doi.org/10.3390/cells11030484

Huertas, M., Almeida, O. G., Canário, A. V. M., Hubbard, P. C. Tilapia male urinary pheromone stimulates female reproductive axis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 196, 106–111, 2014

- Matsumura, K. Tetrodotoxin as a pheromone. *Nature*, 378, 563–564, 1995
- Olseán, K. H., Bjerselius, R., Mayer, I., Kindahl, H. Both ovarian fluid and female urine increase sex steroid hormone levels in mature Atlantic salmon (*Salmo salar*) male parr. *J. Chem. Ecol.*, 27, 2337–2349, 2001
- Scott, A. P., Liley, N. R., Vermeirssen, E. L. M. Urine of reproductively mature female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), contains a priming pheromone which enhances plasma levels sex steroids and gonadotrophin II in males. *J. Fish Biol.*, 44, 131-147, 1994
- Soyano, K., Masumoto, T., Tanaka, H., Takushima, M., Nakamura, M. Lunar-related spawning in honeycomb grouper, *Epinephelus merra*. *Fish Physiol. Biochem.*, 28, 447–448, 2003
- Suzuki, T., Nakahigashi, R., Adachi, M., Nishikawa, T., Abe, H. Green spotted puffers detect a nontoxic TTX analog odor using crypt olfactory sensory neurons. *Chem. Senses*, 47, 1-10, 2022
- Van den Hurk, R., Schoonen, W. G. E. J., Van Zoelen, G. A., Lambert, J. G. D. The biosynthesis of steroid glucuronides in the testis of the zebrafish, *Brachydanio rerio*, and their pheromonal function as ovulation inducers. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 68, 179–188, 1987
- Vermeirssen, E. L. M., Scott, A. P., Liley, N. R. Female rainbow trout urine contains a pheromone which causes a rapid rise in plasma 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one levels and milt amounts in males. *J. Fish Biol.*, 50, 107-119, 1997
- Yambe, H., Kitamura, S., Kamio, M., Yamada, M., Matsunaga, S., Fusetani, N., Yamazaki, F. L-Kynurenine, an amino acid identified as a sex pheromone in the urine of ovulated female masu salmon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 15370-15374, 2006
- Yambe, H., Munakata, A., Kitamura, S., Aida, K., Fusetani, N. Methyltestosterone induces male sensitivity to both primer and releaser pheromones in the urine of ovulated female masu salmon. *Fish Physiol. Biochem.*, 28, 279-280, 2007

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Amagai Takafumi、Izumida Daisuke、Murata Ryosuke、Soyano Kiyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Male Pheromones Induce Ovulation in Female Honeycomb Groupers (Epinephelus merra): A Comprehensive Study of Spawning Aggregation Behavior and Ovarian Development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11030484	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Soyano Kiyoshi、Amagai Takafumi、Yamaguchi Tomofumi、Mushirobira Yuji、Xu Wen-Gang、Pham Nhan Thanh、Murata Ryosuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Endocrine Regulation of Maturation and Sex Change in Groupers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11050825	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------