

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580263

研究課題名(和文) アブラハヤの排卵に伴う吻部伸長における生殖腺刺激ホルモンの役割

研究課題名(英文) Involvement of gonadotropin in snout extension in the Japanese minnow during ovulation

研究代表者

千葉 洋明 (CHIBA, hiroaki)

北里大学・海洋生命科学部・准教授

研究者番号：50236816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：コイ科魚類のアブラハヤ雌が排卵時に吻部が伸長し潜砂行動により産卵を行い、その現象には生殖腺刺激ホルモン(GTH)が関与する可能性をin vivoおよびin vitro投与実験によって示した。吻部の上皮組織内の結合組織は、繊維芽細胞と非定形物質で構成され、排卵雌の繊維芽細胞の密度は低くなり、結合組織に占める非定形物質の割合が高くなることが判明した。吻部の含水率の測定より、組織中の水分が増加していることからこの非定形物質は水分を主成分としていることが示唆された。以上のことから、排卵時に分泌されるGTHが直接吻部に作用し、吸水現象を介して吻部の伸長を促していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, to elucidate the mechanism of snout extension in the Japanese minnow, we examined the morphological changes during oocyte maturation and ovulation, both in vivo and in vitro. Fish injected with Human Chorionic Gonadotropin (HCG) ovulated and showed an increase in the rate of extension of snout length. Histological observation indicated that HCG-induced snout extension was accompanied by a marked expansion of irregular material in the connective tissue. Wet and dry weight measurements indicated that water accumulation during ovulation was the major factor contributing to the increase in snout volume. HCG also caused an increase in the weight of snout fragments in vitro. The results suggest that GTH induces extension of snout length through absorption of water in the connective tissue, the offering new insights into the function of GTH in reproduction.

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：アブラハヤ 排卵 吻部 生殖腺刺激ホルモン 結合組織 受容体

1. 研究開始当初の背景

魚類の繁殖は、他の脊椎動物と同様に視床下部一下垂体-性腺系組織系のペプチドホルモンの強い支配下にある。とりわけ生殖腺の発達と成熟は下垂体生殖腺刺激ホルモン (GTH) の影響を受けていることがよく知られている。一般に魚類には2種類のGTHが存在し、卵黄形成期には濾胞刺激ホルモン (FSH) が、卵成熟期には黄体形成ホルモン (LH) が卵巣に作用することがサケ科やコイ科魚類で示されている。さらに、サケ科魚類では、アマゴから上記2種類のGTHに対応する受容体のcDNAが単離され、mRNAの発現組織は雌では卵巣に限局していることが明らかになっている。しかし、このGTHの機能に関する研究は、生殖腺の発達に限定されており、その他の機能についての知見は殆どない。

アブラハヤは東日本の河川に一般的に生息する小型のコイ科魚類で、ウグイ、カジカなどと並び、有用な淡水生態系の環境生物指標として知られている。しかし、その繁殖特性については、繁殖期が水温の14-16℃に上昇する4月～6月であること以外知られていない。申請者らは岩手県内陸部の遠野市近郊を流れる足洗川におけるアブラハヤの生殖の繁殖生態を調べてきた。これまでに、生殖腺は雌雄ともに水温と日長の上昇および血中性ホルモンの上昇とともに発達し5～6月に産卵期を迎えること、オスは砂礫質の産卵場で産卵群を形成し、メスが産卵群を訪れて産卵することを明らかにした。また、産卵に適した底質環境 (砂礫) でアブラハヤのオスは、他のオスを誘引するフェロモンを放出すること、産卵環境が産卵群形成を誘引するフェロモン放出の必要因子であることを明らかにした。さらに興味深い現象としてメスは排卵時に吻部が急激に伸長し砂利に潜って産卵するが、*in vivo* 投与実験および吻部組織の*in vitro* 培養実験によりヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン (hCG) が吻部組織の増大を促すことを確認した。このことはGTH特にLHが排卵時に吻部にある受容体を介して、吻部組織量を増加させ、潜砂する産卵行動に寄与することを示唆している。

2. 研究の目的

魚類の生殖腺の発達と成熟は下垂体生殖腺刺激ホルモン (GTH) の強い支配下にあることがよく知られているが、産卵に伴う他の生理現象におけるGTHの関与については不明な点が多い。申請者らは、コイ科魚類のアブラハヤ雌の排卵時にGTHが吻部にある受容体を介して、吻部組織量を増加させ、潜砂する産卵行動に寄与する可能性を*in vivo* および*in vitro* 実験により示してきた。本研究ではGTHによる形態変化機構を解明する研究の一環として、排卵雌およびhCG投与によって

人為的に伸長を誘起された雌吻部の組織構造と成分含量の変化を調べる。さらに、アブラハヤの排卵時の吻部伸長における最終成熟誘起ホルモン (MIH) の同定およびGTHの受容体をクローニングし、その局在部位と発現動態を調べることによりGTHの生殖腺以外の産卵に伴う諸現象に関わる新たな機能解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) アブラハヤの卵成熟誘起ホルモン (MIH) の同定と作用

前述の通り、吻部の組織培養を用いた*in vitro* 実験より、GTHが直接的に吻部伸長に働いていることが示唆されたが、排卵時にはLH (黄体形成ホルモン) 系GTH (GTH-II) の刺激により卵濾胞よりMIHが合成され、これが吻部組織の増加に関与している可能性がある。そこで、これまでに同定されているプロゲステンである $17\alpha, 20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン ($17, 20\beta$ -P) の血中量を時間分解蛍光免疫測定法 (TR-FIA) 法により測定するとともに、排卵前の卵を用いた*in vitro* 実験で当該ホルモンの最終成熟誘起効果を検証し、MIHを決定する。

(2) 排卵時における吻部伸長と結合組織内細胞質の変化

①組織学的観察：産卵期 (5-7月) に未排卵雌および排卵雌のアブラハヤ成魚を野外より採集した。吻部の組織切片を作製し、HE染色およびマッソントリクローム染色を施し、光学顕微鏡下で吻部の結合組織にある繊維芽細胞の密度を算出した。

②含水率の測定：排卵前後の吻部を105℃に設定した恒温器内に18時間静置し、乾燥前後の重量差から水分量を算出した。

(3) GTH投与が吻部伸長と結合組織内細胞質の変化に及ぼす影響

産卵期 (5-7月) に未排卵雌および排卵雌のアブラハヤ成魚を野外より採集した。未排卵雌のうち、十分に卵黄蓄積した卵を持つ雌にヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン (hCG) の*in vivo* 投与実験を行い、投与前と投与24時間後に吻部をブアン氏液で固定した。吻部の組織切片を作製し、上記と同様に光学顕微鏡下で観察を行った。また、投与前後の個体群の吻部結合組織中の含水率も測定した。

(4) LH受容体のcDNAと遺伝子のクローニ

ング

アブラハヤの卵巢から調整した一本鎖 cDNA を鋳型とし、既知の硬骨魚類の LH 受容体の塩基配列を基に保存性の高い領域で設計した縮重プライマーを用いた PCR により cDNA 断片を増幅した。決定した塩基配列を基にプライマーを作製し、LH 受容体の 5' および 3' 領域 cDNA を RACE 法により増幅した。増幅 cDNA をプラスミドベクターに挿入し、塩基配列分析に供した。

4. 研究成果

(1) アブラハヤの卵成熟誘起ホルモン (MIH) の同定と作用

排卵時の血中ホルモン量の測定および排卵前の卵を用いた *in vitro* 最終成熟誘起実験より、アブラハヤの MIH は $17\alpha, 20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン ($17, 20\beta$ -P) であることが判明した。しかし、この $17, 20\beta$ -P を排卵前の吻部とともに培養しても、吻部の伸長を促さなかったことから、MIH は吻部の伸長には関与しないことが示された。

(2) 排卵時における吻部伸長と結合組織内細胞質の変化

①吻部の上皮組織には、排卵の有無による違いは観察されなかった。吻部の上皮組織内の結合組織は、繊維芽細胞と非定形物質で構成され、排卵雌の繊維芽細胞の密度は低くなり、結合組織に占める非定形物質の割合が高くなることが判明した (図 1)。排卵雌の繊維芽細胞の密度は、未排卵雌と比較して有意に低く、結合組織に占める非定形物質の割合が高くなった (図 2)。

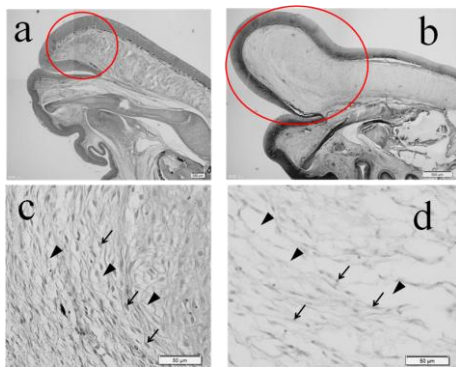


図 1. 排卵に伴う吻部伸長の組織写真 a) 未排卵 (吻部伸長前)、b) 排卵中 (吻部伸長後)、c) a) の結合組織拡大図、d) b) の結合組織拡大図、矢印は繊維芽細胞、矢じりは細胞質

② 吻部の水分含量は、排卵雌で未排卵雌より高かった。これらの結果から、結合組織内の非定形物質は水分と推察された (図 3)。

(3) GTH 投与が吻部伸長と結合組織内細胞質の変化に及ぼす影響

hCG の投与実験により吻部伸長を誘起された個体においても上記と同様に吻部の結合組織内の非定形物質の増大および繊維芽細胞密度の低下が観察された (図 2)。さらに、吻部の成分分析より、組織中の水分が増加していた (図 3)。

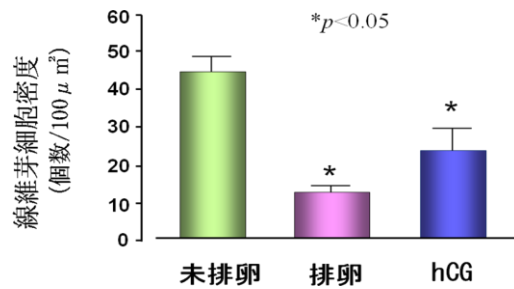


図 2. 排卵前後および hCG 投与による吻部結合組織中の繊維芽細胞密度の変化

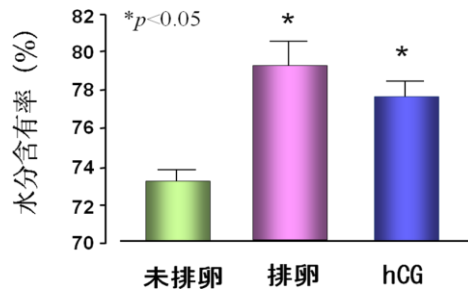


図 3. 排卵前後および hCG 投与による吻部結合組織中の水分含量の変化

(4) LH 受容体の cDNA と遺伝子のクローニング

卵巢から得られたクローンの塩基配列の解析を行った結果、既知の魚類 (タイセイヨウダラ, ニホンウナギ, オオクチバス他) の LH 受容体の塩基配列とそれぞれ 86~92% の高い相同性を示した。

以上の結果から、排卵雌の吻部伸長は GTH の刺激によって引き起こされる結合組織内の水分量の増加によることが示唆された。

今後、アブラハヤの GTH およびその受容体遺伝子のクローニングで得られた成果を活用

し、生殖腺の発達に伴う吻部における GTH 受容体遺伝子の局在を示すことにより魚類の配偶子形成における GTH の新しい生理的調節機構の一端を明らかにすることが期待される。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 千葉洋明、藤本康文 アブラハヤの排卵に伴う吻部伸長における生殖腺刺激ホルモンの役割 シンポジウム：性徴・性分化と内分泌 日本下垂体研究会 第 28 回 学術集会 2013 (8.8) 8/7-9 (花巻)
- ② Chiba H, Nishi T, Takeda K, Fujimoto Y Involvement of gonadotropin in snout extension in the Japanese minnow during ovulation The 17th International Congress of Comparative Endocrinology 2013 July 15-19 (July16) Barcelona, Spain
- ③ Palstra A, Fukuya K, Chiba H, Planas J, Ueda H Smell to spawn: Olfaction and the reproductive axis in homing chum salmon *Oncorhynchus keta* The 17th International Congress of Comparative Endocrinology 2013 July 15-19 (July16) Barcelona, Spain
- ④ 千葉洋明、西 拓也、武田圭介、藤本泰文 アブラハヤの排卵時における吻部伸長と結合組織内細胞質の変化 平成 25 年度 日本水産学会春季大会 (東京) 2013. 3. 29

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 洋明 (CHIBA, Hiroaki)
北里大学・海洋生命科学部・准教授
研究者番号：50236816

(2) 研究分担者

森山 俊介 (MORIYAMA, Shunsuke)
北里大学・海洋生命科学部・教授
研究者番号：50222352