

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370028

研究課題名(和文)成魚の雌雄生殖腺の性的可塑性の分子機構に関する研究

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of sexual plasticity in adult medaka gonads

研究代表者

長濱 嘉孝(NAGAHAMA, Yoshitaka)

愛媛大学・南予水産研究センター・特定教員(教授)

研究者番号：50113428

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文): ヒトも含めて雌雄異体の全ての脊椎動物では、受精時に決定した性は生涯にわたり変わらないと考えられてきた。本研究では、メダカを用いて、成魚の雌雄生殖腺の性的可塑性について解析した。成熟雌魚の卵巣エストロゲン合成を阻害すると、卵巣部分は退化して精巣が形成され、精子形成が進行して妊性のある精子が作られた。一方、生後3か月の成熟途上にある雄魚をエストロゲン処理すると、精巣部分は退化して卵巣が形成され、妊性のある成熟卵が作られた。これら雌雄成魚の生殖腺周辺部には、生殖幹細胞とそれを取り囲む未分化生殖腺体細胞が存在し、これらがエストロゲンの有無に反応して生まれつきとは異なる性の生殖腺となると結論された。

研究成果の概要(英文): In all gonochoristic vertebrates, the sexual plasticity of the gonads is not retained after the completion of sex differentiation. Here, we studied whether medaka gonads maintain sexual plasticity until adulthood. The depletion of estrogen resulted in a functional female-to-male sex reversal in sexually mature females. The sex-reversed fish showed a typical male pattern of estrogen levels, secondary sex characteristics, and male-like sex behavior. On the other hand, estrogen treatment in adult males undergoing spermatogenesis induced male-to-female sex reversal, producing fertile eggs. In situ hybridization of medaka gonads during female-to-male and male-to-female sex reversals indicated that cysts on the periphery portions of adult gonads are the origins of germ cells and their surrounding somatic cells in the newly formed testicular and ovarian tissues. Gonochoristic fish maintain their sexual plasticity until adulthood and estrogen plays critical roles in maintaining phenotypic sex.

研究分野：生殖生物学

キーワード：雌雄異体魚 メダカ成魚 性的可塑性 性転換 生殖幹細胞 生殖腺体細胞 エストロゲン 芳香化酵素阻害剤

1. 研究開始当初の背景

研究代表者である長濱らはこれまで、メダカ (*Oryzias latipes*) (遺伝学が確立したメダカは性研究に最適な研究材料であり、日本ではこの魚を用いて古くから性の生物学に関する研究が活発に行なわれてきた) などの雌雄異体魚 (哺乳類などと同様に、発生初期に決定された性は生涯にわたって変わらない魚類、ほとんどの魚類がこの生殖様式である) を用いた性決定/分化の研究に加えて (Matsuda et al., Nature, 2002)、性の可塑性に関する研究についても、中村将教授 (当時琉球大学) 等と協力しながら先駆的な研究を行ってきた。なかでも、ハワイ産ベラ (*Thalassoma duperrey*) や両方向性転換魚であるオキナワベニハゼ (*Trimma okinawae*) を用いた主として内分泌学的研究から、これらの魚における雌から雄への性転換にエストロゲン産生量の低下が重要な役割を果たすことを見出していた (Devlin & Nagahama, 2002)。さらに、これらの性転換魚をモデルとした研究から得られた成果を雌雄異体魚にも応用することにより、これまで成魚では性転換が起こらないと考えられてきたメダカやテラピア (*Oreochromis niloticus*) 等の雌雄異体成熟魚でも、性転換魚の性転換時に起こるステロイドホルモン変動、即ち、卵巣におけるエストロゲン産生を抑制させることにより性転換 (生殖線、性行動) を誘導できることをはじめて示唆した。一方で、これまで、成体の生殖線における性的可塑性に関する研究がまったく行なわれてこなかった哺乳類でも、成体の生殖線における性的可塑性に関する研究が俄かに注目されるようになっていた。これらの研究では、成熟マウスの卵巣で卵巣分化に関わる遺伝子 (*Foxl2*) を機能破壊すると顆粒膜細胞がセルトリ細胞へと (Uhlenhaut et al., Cell, 2009) また精巣で精巣分化に関わる遺伝子 (*Dmrt1*) を機能破壊するとセルトリ細胞が顆粒膜細胞へと (Matson et al., Nature, 2011) 生殖線の体細胞が分化転換することが示されていた。マウスで得られたこれら2つの研究成果は、少なくとも成熟した哺乳類の雌雄生殖線の体細胞でも性的可塑性が保持されていることを示しており、今後さらに、哺乳類も含めた雌雄異体脊椎動物の配偶子や性行動の性的可塑性に向けた分子レベルの研究が活発に行なわれると予想された。

2. 研究の目的

脊椎動物ではこれまで、受精時に性染色体の組合せにより遺伝的に決定された性は生涯にわたって変わらないと考えられてきた。ところが、研究代表者の長濱らは、上述した中村将教授らとの共同研究で、2種の雌雄異体魚 (メダカとテラピア) を用いて、卵巣内のエストロゲン産生を抑制することにより成熟卵巣から成熟精巣へと機能的な生殖腺性転換を誘導できることを示し、性的可塑性

が雌雄異体魚の成熟卵巣でも保持されていることを脊椎動物ではじめて示唆した。そこで本研究では、これらの新規知見を基盤として、成魚の生殖腺 (卵巣と精巣) に保持されていると考えられる性的可塑性の分子機構について、主として形態学的研究手法を駆使して、細胞・遺伝子レベルで明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究の特徴は、性決定/分化の研究が進んでいるメダカを研究対象に選び、研究代表者らの研究成果を基盤として、当初ほとんど研究が進んでいなかった成魚の生殖線における性的可塑性の分子機構について、in situ hybridization 法、免疫組織化学法、イメージング法等の研究手法を駆使して、性転換時における生殖腺の各種細胞種の動態を詳細に追跡することにより明らかにするところにある。これが可能なのは、研究代表者がこれまでにメダカで同定してきた各種の性決定/分化の遺伝子マーカーが豊富に使用できるからである。また、性的可塑性の鍵因子としてエストロゲンに焦点をあて、エストロゲンそのものやその合成阻害剤 (芳香化酵素阻害剤、AI) である exemestane を用いて実験を組み立てている点も特徴といえる。

4. 研究成果

本研究では主にメダカの雌雄成魚 (成熟途上魚と成熟魚) を実験対象として、雌魚 (XX) には芳香化酵素阻害剤、雄魚 (XY) にはエストロゲンを処理して後の生殖腺の変化を細胞・遺伝子レベルで解析することにより、成魚の生殖腺における性的可塑性の有無を解析した。一部、比較のためにテラピアも使用した。

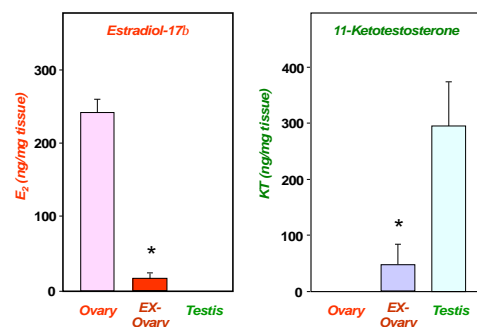


図1. 芳香化酵素阻害剤処理 (100 μg/l) の有無による卵巣と精巣のエストロゲン量とアンドロゲン量

(1) 成熟雌メダカ (XX) に対する芳香化酵素阻害剤処理

AI 処理開始前の成熟雌メダカの卵巣は多くの卵黄形成途上の卵胞 (卵母細胞 + 体細胞) を含み、ほぼ毎日点灯直後に産卵を繰り返した。これらのメダカに AI 処理を開始すると直ぐに産卵を停止したが、AI を含まない飼育水中で飼育した対象群の雌

では引き続き産卵が継続した。血中のステロイドホルモン量を調べることを計画したが、メダカは小型のため困難であるので、ここでは生殖腺中のホルモン量を ELISA 法で測定した(図1)。AI 処理後に卵巣のエストロゲンが著しく減少し、かわってアンドロゲン(多くの魚類のアンドロゲンは11-ケトテストステロン)量が上昇した。一方、対象群ではホルモン量のこのような変化は認められなかった。AI 処理後には、性行動も雄型となり、正常の XX 個体を追尾するのがしばしば観察された。

AI 処理を開始して15-30日間の卵巣では、卵胞(卵母細胞)の退行がみられ、60日間処理群の生殖腺のほとんどは精巣組織で占められ、多量の精子が認められた。これらの成熟精巣を有する性転換 XX メダカを正常成熟雌(XX)とペアにして双方の性行動を観察したところ、性転換雄は正常な成熟雄でみられる追尾行動を行なった。しかし、追尾された雌は興味を示さず、産卵行動を行わなかった。そこで、AI 処理により成熟した性転換雄の精巣から精子を取り出し、正常の XX 雌の卵巣から得られた排卵成熟卵と受精したところ、正常な稚魚が得られた。これらの稚魚のゲノムにはメダカ性決定遺伝子である *Dmy* は含まれていなかった。AI 処理開始後に、雌特異的遺伝子の *Foxl2* が減少し、かわって雄特異的遺伝子(*Gsdf* や *Sox9a2*)の発現は著しく促進された。

(2) 成熟途上及び成熟雄メダカ(XY)に対するエストロゲン処理

前述したように、これまでいかなる脊椎動物においても、成熟した雄をエストロゲン処理により機能的性転換を起こさせた研究は皆無であった。そこで本研究では、精巣の発達状態が異なる2つのグループ、即ち生後3か月の成熟途上群(精巣には種々の精子形成過程を示すシストが観察されたが精子はほとんど観察されない)と生後5か月の成熟群(精巣には多量の精子が観察される)に対してエストロゲン処理(1 µg/l)を行なった(図2)。

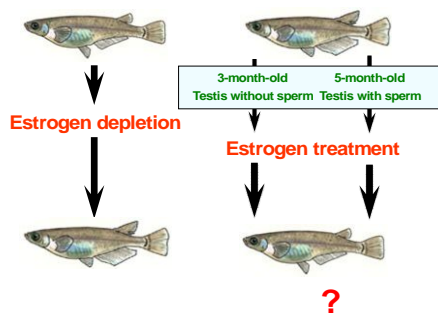


図2 .エストロゲンの有無による雌雄メダカ成魚生殖腺の性的可塑性の解析実験系

生後3か月の XY 魚で処理を開始して3週間後に精巣卵、7週間後に卵黄形成を開始した卵胞が出現した。E2 処理をさらに1週間続けた後に、E2 無添加の飼育水中でさらに30日間飼育したところ、卵黄形成を完了した卵胞が多数観察され、中には卵巣腔に排出された卵も観察された(図3)。また、これらの性転換 XY 雌魚を正常の成熟 XY 雄魚と交配させたところ、正常の受精卵が得られた。E2 処理開始後に *Gsdf* 遺伝子(精巣関連遺伝子)の発現が減少したが、かわって *R-spondin1* (卵巣関連遺伝子)の発現が著しく上昇した。一方、生後5か月の成熟 XY 雄魚を用いた実験では、E2 処理5週間後に精巣卵が、8週間後に卵巣腔が出現したが、その後30日間 E2 無添加飼育水中で飼育しても成熟卵は得られなかった。

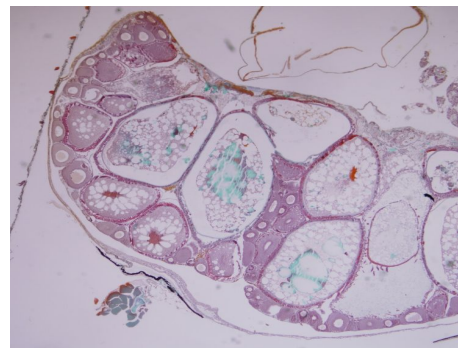


図3 .エストロゲン処理によるメダカ雄成魚の雌(卵巣)への性転換

(3) 成体メダカの雌雄生殖線に存在する生殖幹細胞と未分化体細胞

卵巣(図4)

メダカの成熟卵巣には、成熟卵が排出される場である卵巣腔(ovarian cavity)が観察される。この卵巣腔に接する側の生殖上皮(germinal epithelium)に単独もしくはクラスターをなして生殖幹細胞(germ-line stem cells)の特徴を備えた、*Vasa* 遺伝子(生殖細胞マーカー)陽性の生殖細胞が存在する。また、これらの生殖細胞を取り囲む体細胞は *Sox9a2* に陽性であり、*Gsdf* (メダカでは精巣セルトリ細胞に特異的に発現する)に陰性である。従って、これらの体細胞はまだセルトリ細胞には分化していないと判断された。これら2種の細胞はシストの中に存在する。AI 処理開始30日後にはこれらのシストは大きさを増し、精原細胞で占められるようになった。ここで重要なことは、この時期には *Sox9a2* 陽性細胞に *Gsdf* が発現するようになることである。したがって、これらの体細胞はセルトリ細胞に分化したものと判断された。AI 開始40日後までにはこれらのシスト中で精子形成が進行するとともに、シスト内体細胞の *Gsdf* 遺伝子の発現はさらに強さを増した。

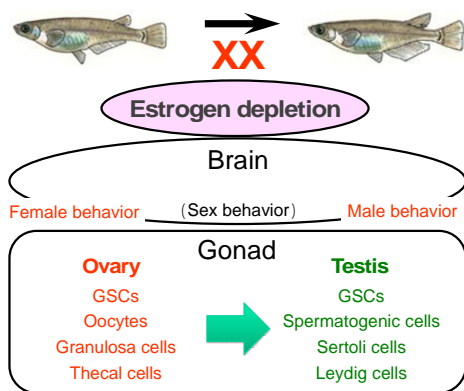


図4 . エストロゲン合成阻害によるメダカ成熟雌 (XX) の雄 (精巢) への性転換

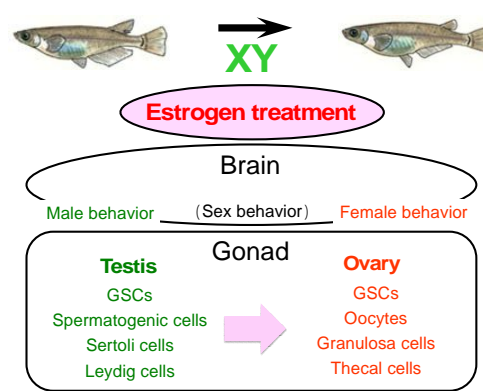


図5 . エストロゲン処理によるメダカ雄 (XY) 成魚の雌 (卵巣) への性転換

精巢 (図5)

生後3か月の雄成魚にE2処理を開始して3日後には、雌生殖線のマーカー遺伝子である*Fig1a*の発現が上昇を示したが、雄マーカーである*Gsd*fや*Sox9a2*などの遺伝子の発現は減少した。また、未分化幹細胞マーカーである*Klf*, *Sal4*, *Oct4*, *Nanog*等の遺伝子の発現は減少し、かわって細胞分化マーカーである*Gfr1α*や*Notch*等の遺伝子発現は上昇した。

一方、処理開始3日後から40日後まで精巢周辺で生殖細胞の増殖が起こった。この時、細胞分裂マーカーであるBRDUの発現は、E2処理開始前には散在的な発現を示したが、E2開始20日から40日後には、上記の精巢中の生殖細胞に限って強い発現が観察された。この間、E2処理によってBRDU陽性のクラスター数は変化せず、陽性細胞数のみが増加した。また、これらの細胞では、GFR1αタンパク質が上昇し、OCT4タンパク質は減少することが免疫細胞学的解析で明らかになった。次いで、これらの生殖細胞群をGFR1α coated magnet beadsを用いて単離して、細胞培養を行なった。その結果、これらの生殖細胞はE2処理を開始することにより細胞分裂を開始し、上記の幹細胞としての細胞特性を失う(*Oct4*遺伝子の発現が減少し、逆に*Vasa*遺伝子の発現が上昇する)ことが明らかになった。これらの結果を総合すると、上記の精巢周辺に局在する生殖細胞は生殖幹細胞の特性を有し、E2処理により雌生殖細胞へと分化する生殖幹細胞であると結論される。現在、これらの単離生殖幹細胞を生殖細胞欠如雌雄生殖線に移植して卵や精子へと成熟するかを調べている。

(4) まとめ

ごく最近まで、雌雄異体の脊椎動物では、遺伝的に決定された性は生涯にわたり変わることはないと考えられていた。その一方で、研究代表者らは、サンゴ礁に生息して、社会的要因により成魚でも雌から雄に性転

換するペラなどを用いた研究から、エストロゲンが卵巣の維持に重要な役割を果たしていることを見出していた。そこで、性転換魚で特徴的にみられるこのような成魚の生殖腺の性的可塑性が、雌雄異体魚のテラピアやメダカの成魚にもみられるのではないかと考えたのが本研究の発端である。エストロゲンの有無を人為的に作りだすことによって、雌雄異体魚の生殖腺の性転換を誘起することができるのではないかと考え、そのことを確認するための実験を組み立て、解析することにした。その結果、雌成魚ではエストロゲン合成を抑制することで卵巣から精巢への性転換、雄成魚では外因性のエストロゲンを与えることにより精巢から卵巣への性転換、を起こすことができたのである。雌雄異体魚であるメダカの成魚の雌雄生殖腺に性的可塑性が保持されていることが実証された。本研究ではまた、成魚の性行動などにも性的可塑性がみられることも明らかになった。

成魚生殖腺の性的可塑性に関する今後の研究では、卵巣から精巢、精巢から卵巣への両方向の性転換の分子メカニズムの詳細を明らかにする必要がある。本研究では、この問題に関しても重要な予備的研究成果が得られたと考えている。メダカ成魚の雌雄生殖腺の周辺部に局在する生殖幹細胞と未分化体細胞が鍵である。これらの細胞群がエストロゲンの有無に反応して生来の性とは逆の性を持つ生殖腺を構築することに大きく貢献すると推察される。一方、マウス成体では、生殖腺体細胞の分化転換(transdifferentiation)が起こることが報告されており、この点も含めて、メダカを用いた性的可塑性の研究の進展が期待される。

最後に、本研究を遂行するにあたり終始協力いただいた元琉球大学・中村 将教授(現沖縄美ら島財団総合研究センター)に心から感謝する。なお、本研究の一部(エストロゲン処理実験)は、愛媛大学南予水産研究センターのTapas Chakraborty博士研究員との共同研究であることを申し添える。

<引用文献>

Matsuda, M. et al. *Dmy* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 417, 559-563 (2002).

Devlin, R.H. and Nagahama, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208, 191-364 (2002).

Uhlenhaut, N.H. et al. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, 139, 1130-1141 (2009).

Matson, C.K. et al. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature*, 101-104 (2011).

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2件)

Sun, I.N., Jiang, X.L., Xie, Q.P., Yuan, J., Huang, B.F., Tao, W.J., Shou, L.Y., Nagahama, Y. and Wang, D.S. (2014). Transdifferentiation of differentiated ovary into functional testis by long-term treatment of aromatase inhibitor in Nile tilapia. *Endocrinology*, 155, 1476-1488 (2014), 10.1210/en.2013-1959, 査読有.

Paul-Prasanth, B., Bhandari, R.K., Kobayashi, T., Horiguchi, R., Kobayashi, Y., Nakamoto, M., Shibata, Y. and Nagahama, Y. Estrogen oversees the maintenance of the female genetic program in terminally differentiated gonochorists. *Scientific Reports*, 10.1038/srep02862, 1-10 (2013), 査読有.

[学会発表](計8件)

Nagahama, Y. Genetic and endocrine regulation of reproduction in fish. International Symposium on Reproductive and Comparative Endocrinology in Fish. February 25, 2015, Banaras Hindu University, Varanasi, India.

Nagahama, Y. Genetic and hormonal control of sexual development and plasticity in fish. ISAEN and JSCE Joint International Symposium. November 8, 2014, National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan.

Nagahama, Y. Regulation of ovarian development and oocyte maturation in fish. 7th Intercongress Symposium of Asia Oceania Society of Comparative Endocrinology. March 20, 2014, Keelung, Taiwan.

長濱嘉孝. 多細胞における卵成熟誘起機構 Comparative to General. 第38回日本

比較内分泌学会大会及びシンポジウム. 2013年10月26日, 宮崎市民プラザ, 宮崎.

Nagahama, Y. Genetic and hormonal control of sexual development and plasticity in fish. 17th International Congress of Comparative Endocrinology. July 19, 2013, Barcelona, Spain.

Nagahama, Y. Genetic and hormonal control of sexual development and plasticity in fish. 5th International Symposium of Integrative Zoology. June 5, 2013, Beijing, China.

Nagahama, Y. Genetic and hormonal regulation of gonadal development and sexual plasticity in fish. The Society for Integrative and Comparative Biology (SICB) (USA). January 5, 2013, San Francisco, USA.

長濱嘉孝. 魚類の性決定・分化と性的可塑性の分子メカニズム, 第83回日本動物学会. 2012年9月14日, 大阪大学, 大阪.

6. 研究組織

(1)研究代表者

長濱嘉孝 (NAGAHAMA, Yoshitaka)

愛媛大学・南予水産研究センター・特定教員(教授)

研究者番号: 50113428