

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：33501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580285

研究課題名(和文) 魚類生殖腺性分化に及ぼす成長の影響

研究課題名(英文) Relationship between sexual plasticity and body growth in Koi carp

研究代表者

平井 俊朗 (HIRAI, Toshiaki)

帝京科学大学・生命環境学部・教授

研究者番号：30238331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：水産対象種における効率的な性統御技術確立のために、ニシキゴイをモデルとして、これまで詳細な調査なされていない性分化に対する体成長の影響について検討した。異なる成長速度に制御された、同腹の遺伝的全雌または遺伝的全雄に対して、それぞれアロマターゼ阻害剤または雌性ホルモンを投与し、生殖腺形成に対する影響を調査した。その結果、性分化の初期過程も体成長による影響を受け、雄では精巣分化に伴って急激に、雌では卵巣分化に伴って緩やかに性的可塑性が失われていくことが明らかとなった。以上の成果をもとに体長を基準とした効率的な雄化誘導プロトコルを提案した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the relationship between sexual plasticity and body growth to provide a basis for workable methods for sex control in aquaculture. Genetically controlled female (all-XX) or male (all-XY) populations of Koi carp with different growth rate were fed a diet containing an aromatase inhibitor (AI) or estradiol respectively on serial treatment schedules, and their gonads were subjected to histological analysis. The results demonstrate that the emergence of sexual dimorphism is closely related with body growth, and thereafter, sexual plasticity declines with the progression of gonadogenesis rapidly in male and gradually in female. Finally, we have presented an improved protocol for masculinization applicable in Koi carp aquaculture.

研究分野：生殖生物学

キーワード：性分化 生殖腺 遺伝子 成長 ニシキゴイ

1. 研究開始当初の背景

- (1). わが国の水産業の国際競争力強化に資するため、水産増養殖技術の更なる革新が求められている。その一つとして種苗生産技術におけるより高度な性統御技術の確立が望まれている。
- (2). ニシキゴイはわが国発祥の代表的な観賞魚であり、海外で人気が高いため、新潟県など主要な産地の内水面漁業において輸出対象魚として重要な位置を占めている。
- (3). ニシキゴイでは一般に雌が高価とされることから、全雌種苗生産技術の確立が待望されている。すでに新潟県内水面水産試験場などにより雌性発生、雄性発生による性統御にはすでに成功しているが、成績が安定せず奇形魚も多く出現するために実用化には至っておらず、性転換魚を用いた自然交配が必要であると考えられている。
- (4). 魚類の性分化に関する研究はメダカ、テイヤピアなど個体発生・成長がほぼ同調的に進行する限られた種をモデルとして進められており、これらでは孵化後の時間経過を基準とした処理によって安定的にほぼ完全に性転換を誘導することができる。
- (5). 全雌生産には遺伝的雌 (XX) 魚の雄性化が重要となるが、低率に出現する性転換魚を利用することで十分である食用魚とは異なり、高率の性転換が必要となる観賞魚では実用化に耐えない。ニシキゴイでは実験的に性転換を誘導することには成功しているがその効率は安定しない。
- (6). コイは同腹稚魚間でも初期成長に大きなバラツキが出ることが知られており、このことが従来の孵化後の時間経過を基準とした人為性転換処理による低い性転換効率の原因であると推定した。しかし、性分化の進行 (性的可塑性の減退) と体成長との関連性についての基礎的知見は極めて乏しい。

2. 研究の目的

- (1). 本研究では、生産現場で効率的な性統御技術の開発が望まれているニシキゴイを主要対象として不明な点が多い個体成長と性分化との関連性について基礎的知見の集積を行うことを目的とした。
- (2). その中から事業レベルへの応用を目指した効率的性転換技術の可能性を探ることとした。具体的には、これまで用いられてきた孵化後の時間経過を基準とした性転換処理に替わって体成長を基準とした処理プロトコルの提案と実証試験を目指した。

3. 研究の方法

- (1). ニシキゴイ 遺伝的雄および遺伝的全雌の同腹稚魚について、低密度高給餌による高成長群と高密度低給餌による低成長群を作成した。
- (2). 各成長速度群について経時的にサンプリングを行い、生殖腺形成過程の組織学的観

察を行い、雌雄差の出現時期と体成長との関連を調べた。

- (3). 各成長速度群について複数の異なる時期からアロマターゼ阻害剤またはメチルテストステロン (遺伝的全雌群) またはエストラジオール (遺伝的全雄群) を一定期間投与し、生殖腺の性転換状況を調査した。また処理終了後、通常餌による飼育を継続し、性転換生殖腺の事後変化も追跡した。
- (4). 養殖現場での実用化を見据えて、新潟県内水面水産試験場において事業レベルの実証試験を行なった。
- (5). 他種で知られている精巣分化、卵巣分化関連分子について、人為性転換処理における消長を調査し、性転換過程の評価に適切な分子プローブの探索を行った。

4. 研究成果

- (1). 同腹の卵に偽雄 (XX) または超雄 (YY) 由来の精子を授精して得られた遺伝的全雌 (XX) および遺伝的全雄 (XY) 群について高成長群、低成長群を作成し、生殖腺形成過程の経時的变化を追跡した。その結果、先に遺伝的全雌で卵巣腔形成、生殖細胞増殖の順に、性特異的变化が観察され、それらは孵化後の時間経過ではなく、体長と密接に関連することが明らかとなった。また、最初の性特異的な組織構築である卵巣腔の形成は頭部側から始まり、尾部側へと進行していることが明らかとなった。一方、遺伝的全雄における精巣形成はそれよりも成長が進んでから生じ、その鍵となる最初の組織学的変化は精小囊 (seminal lobule) という区画の形成であることが明らかとなった。本成果は魚類の性分化進行に及ぼす体成長の影響を明確に示した初めての知見であると考えられる。
- (2). 成長速度を変えた同腹の遺伝的全雌群に孵化後 2, 3, 4, 6 ヶ月より、4, 8, 12 ヶ月間初期体重あたりの投与量が等しくなるようにアロマターゼ阻害剤を含む餌を与えた。処理終了直後、12 ヶ月後に生殖腺の組織学的観察を行った。高成長群では早い時期の処理開始区ほど完全に精巣化した個体が多く観察され、その後処理開始時期の遅れに連れて、卵巣組織の残存 (雌雄同体化) が顕著になっていった。低成長群ではすべての処理開始区で完全に精巣化した個体が観察されたが、早い時期の処理開始区では不妊化個体も確認され、精巣化個体でも生殖腺の発達と比較的悪かった。投与期間が長くなるほど精巣化の傾向は高まったが、処理開始が遅い実験区ほど卵巣組織残存や生殖腺奇形 (嚢胞形成など) の出現頻度が高まった。処理終了 12 ヶ月後においても精巣組織は発達したまま維持されていた。以上のことより、遺伝的全雌の生殖腺は体成長に伴って卵巣への分化を進行させ、それとともに徐々に性的可塑性が消失していくことが明らかとなった。また、雌性ホルモン合成阻害による精巣化誘導は、処理開始時期が早すぎると (低体長での処理開

始) 生殖腺の不妊化を招くことから、効率的な性転換誘導のためには体長を基準とした薬剤処理が有望であることが示唆された。

(3). 成長速度を変えた同腹の遺伝的全雄群に孵化後 1, 2, 3, 6, 8 ヶ月より、6, 12 ヶ月間初期体重あたりの投与量が等しくなるようにエストラジオールを含む餌を与えた。処理終了直後、12 ヶ月後に生殖腺の組織学的観察を行った。高成長群では、処理終了時、終了 12 ヶ月後ともに、いずれの実験区においても精巣が発達し、排精が確認される個体が多発した。低成長群では、処理終了時に多くの個体で卵巣腔の形成が確認された。しかし、その多くは未発達であり、不妊化が伺われた。一方で、早期の処理開始区を中心として低率ではあるが卵巣化が確認された。処理終了 1 年後においては、不妊化に加えて未発達の卵巣上に精巣組織が発達している生殖腺が多く観察されたが、低率ではあるが完全な卵巣を持つ個体を確認された。以上の結果から、雌性ホルモン投与により遺伝的雄の機能的性転換が可能であることが示された。しかし、雄化処理と比較して性転換効率は極めて低く、遺伝的雄の生殖腺では成長に伴って急激に性的可塑性が消失していくことが明らかとなった。従来の研究ではコイ遺伝的雄の雌化処理については成功例が報告されていないが、今回低率ではあるが雌化処理に成功したことは、今後雌化処理技術を開発する上で大きな手がかりになるものと期待する。

(4). 実用化を見据えた実証試験として、新潟県内水面水産試験場において遺伝的全雌 (XX) 群に体長 6 センチ前後 (孵化後 1.5 ヶ月) より、メチルテストステロンまたはアロマトーゼ阻害剤を含む餌を 6 ヶ月間与え、孵化後 13, 18 ヶ月に生殖腺の組織学的観察を行った。その結果、約 60% の個体で成熟した精巣が確認された。現在、これらの性転換雄の精子を用いて交配試験を行なうことで、種苗の全雌化を確認中である。従来試験では水槽実験とは異なり投与条件の制御が難しいため、雄化が成功していなかったが、今回、体長を基準とした新たな薬剤投与プロトコルの採用により、事業レベルでの全雌生産につながる成果を得ることができた。さらに、同様の雄化処理を新潟県内水面水産試験場にて作出された新品種「黄白」通常交配 (雌雄混合) 群についても実施したところ、約 80% の個体で精巣化が確認され、性比が有意に雄に偏っていた。したがって、本研究で提案した薬剤投与プロトコルは品種間を越えて共通に適用可能であることが示唆された。現在、性別判定のための遺伝マーカーを探索中で、これを用いた遺伝子性判別が可能になれば、既存の雄 (XY) 親魚からの性転換雄作出へ道が拓かれるため、より事業レベルへの展開に近づけるものと期待する。

(5). 他種において精巣分化、卵巣分化の関連分子として知られている DMRT1、GSDF、MIS、FoxL2 についてコイの相同遺伝子の単

離と生殖腺内での消長を調査した。その結果、精巣化の指標として GSDF (gonadal soma-derived growth factor) が有望であることが判明したため、この分子に対する特異抗体を作成し、蛋白質レベルでの消長を調査した。その結果、精小嚢 (seminal lobule) 形成時に支持細胞 (セルトリ細胞) の内腔側に強い陽性反応が確認された。同様の現象は遺伝的雌の人為性転換過程でも観察され、GSDF が精巣分化過程の鍵と目される精小嚢形成に重要な役割を果たすと考えられることが示唆された。精巣分化過程における GSDF の蛋白質レベルでの消長については知見が乏しく、今回の結果は今後、本分子の機能を明らかにしていく上で重要な手がかりになると期待される。

(6). 本研究を遂行する過程で従来は血液学の細胞診断等で用いられてきたギムザ染色を応用することにより、卵巣化の組織学的指標となる初期周辺二期卵母細胞を選択的に染色できることを見出した。これまで用いられてきたヘマトキシリン・エオジン染色などに比べて、初期卵母細胞に対する染色性が極めて特異的であるため、性転換過程の組織学的評価の簡便化につながることを期待される。本法を複数の他魚種についても試用したところ、同様の結果を得ることができたため、少なくとも魚類において共通に適用可能であると思われる。

(7). 熊本大学との共同研究により、メダカにおいて濾胞刺激ホルモン受容体 (FSHR) の遺伝子欠損によって卵巣の発達不全とそれともなう精巣化が生じることが明らかとなった。卵巣組織の維持に脳下垂体・生殖腺内分泌系が重要であり、その一部は精巣組織分化抑制に関与していることが明らかとなった。

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 2 件)

Norikazu Murozumi, Ryo Nakashima, Toshiaki Hirai, Yasuhiro Kamei, Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Takeshi Todo, Takeshi Kitano, Loss of follicle-stimulating hormone receptor function causes masculinization and suppression of ovarian development in genetically female medaka, *Endocrinology*, 査読有, vol.155, 2014, 3136-3145, <http://dx.doi.org/10.1210/en.2013-2060>

小川智史、佐藤将、兵藤則行、中村将、平井俊朗、ニシキゴイの生殖腺発達過程に関する組織学的観察、帝京科学大学紀要、査読有、掲載決定、2015、<http://www.ntu.ac.jp/research/publi>

〔学会発表〕(計 12 件)

小川智史、井熊孝男、佐藤将、堀口涼、中村将、長濱嘉孝、平井俊朗、コイ精巢分化過程における GSDF (Gonadal Soma Derived Factor) 蛋白質の局在、第 37 回日本比較内分泌学会大会、2012 年 11 月 30 日～2012 年 12 月 01 日、福井大学文京キャンパス(福井県・福井市)
三田瑛祐、小川智史、大前貴俊、井熊孝男、佐藤将、平井俊朗、コイ (*Cyprinus carpio*) R-spondin1 (RSP01) 関連遺伝子の生殖腺における発現、第 37 回日本比較内分泌学会大会、2012 年 11 月 30 日～2012 年 12 月 01 日、福井大学文京キャンパス(福井県・福井市)
Satoshi Ogawa, Eisuke Mita, Takao Ikuma, Shoh Sato, Ryo Horiguchi, Masaru Nakamura, Yoshitaka Nagahama, Toshiaki Hirai, Immunohistological analysis of gonadal soma derived factor (GSDF) in gonadogenesis of common carp, 17th International Congress of Comparative Endocrinology (ICCE2013)、2013 年 07 月 15 日～2013 年 07 月 19 日、Barcelona(Spain)
Taku Uchikawa, Hiroshi Kobira, Toshiaki Hirai, Takeshi Kitano, Down-regulation of follicle-stimulating hormone receptor expression by gonadal somaderived growth factor in medaka, 17th International Congress of Comparative Endocrinology (ICCE2013)、2013 年 07 月 15 日～2013 年 07 月 19 日、Barcelona(Spain)
Norikazu Murozumi, Ryo Nakashima, Toshiaki Hirai, Yasuhiro Kamei, Tomoko Ishikawa, Takeshi Todo, Takeshi Kitano, Loss-of-function of follicle-stimulating hormone receptor causes suppression of ovarian development in medaka (*Oryzias latipes*), 17th International Congress of Comparative Endocrinology (ICCE2013)、2013 年 07 月 15 日～2013 年 07 月 19 日、Barcelona(Spain)
内川拓、小平博史、平井俊朗、北野健、メダカ性分化における gonadal soma-derived growth factor による濾胞刺激ホルモン受容体の発現制御、第 38 回日本比較内分泌学会大会、2013 年 10 月 24 日～2013 年 10 月 26 日、宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)
小川智史、三田瑛祐、近藤伸一、佐藤将、中村将、平井俊朗、コイ雌生殖腺の性的可塑性と体成長の関連、平成 26 年度日本水産学会春季大会、2014 年 03 月 27 日～2014 年 03 月 31 日、北海道大学水産

学部(北海道・函館市)
室積典和、中島良、平井俊朗、亀井保博、石川智子、藤堂剛、北野健、性分化時期における濾胞刺激ホルモン受容体機能欠損メダカの表現型解析、平成 26 年度日本水産学会春季大会、2014 年 03 月 27 日～2014 年 03 月 31 日、北海道大学水産学部(北海道・函館市)
内川拓、小平博史、平井俊朗、北野健、メダカ gonadal soma-derived growth factor による濾胞刺激ホルモン受容体の発現抑制機構の解析、平成 26 年度日本水産学会春季大会、2014 年 03 月 27 日～2014 年 03 月 31 日、北海道大学水産学部(北海道・函館市)
Satoshi Ogawa, Eisuke Mita, Shin-ichi Kondo, Shoh Sato, Masaru Nakamura, Toshiaki Hirai, Relationship between sexual plasticity and body growth in the ovary of koi carp (*Cyprinus carpio*), 10th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, 2014 年 5 月 25 日～2014 年 5 月 30 日、Olhão(Portugal)
Taku Uchikawa, Hirishi Kobira, Toshiaki Hirai, Takeshi Kitano, Gonadal soma-derived growth factor suppresses the expression of follicle-stimulating hormone receptor in medaka, 10th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, 2014 年 5 月 25 日～2014 年 5 月 30 日、Olhão(Portugal)
Satoshi Ogawa, Noriyuki Hyodo, Shoh Sato, Masaru Nakamura, Toshiaki Hirai, A simple and novel histostaining method for evaluation of gonadal status in teleosts, 第 39 回日本比較内分泌学会大会・第 8 回国際両生類爬虫類神経内分泌学会 合同大会、2014 年 11 月 07 日～2014 年 11 月 09 日、岡崎コンフェレンスセンター(愛知県・岡崎市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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・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：