

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：35403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450285

研究課題名(和文)生殖腺由来成長ホルモンの機能に関する研究

研究課題名(英文)The study on the functions of hormones in the gonad.

研究代表者

三浦 智恵美(Miura, Chiemi)

広島工業大学・環境学部・教授

研究者番号：90518002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞の個体成長への役割は不明である。本研究では、ニホンウナギ成長の雌雄差、配偶子形成、成長関連因子の脳下垂体、肝臓、生殖巣での発現量を調べた。その結果、雌雄とも成長が進行した個体では成熟が進み、また成長関連因子の発現量との関係性が示された。更に生体外卵巣培養系で性ホルモンにより成長関連因子の発現が変化したことから、性ホルモンは雌の成長制御因子の一つであることが示唆された。モザンビークティラピアの卵巣除去は成長を疎外するが、エストロゲンの投与により、その成長は回復する傾向にあった。また性ホルモンの成長への影響は、生殖腺の発達段階により異なる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Relationship between somatic growth and germ cells are unknown. In this study, we checked the growth in male and female Japanese eels, and the expression of growth control factor in pituitary gland, liver and gonad. The results showed that, in both sexes, the maturity progressed with somatic growth. Also, a correlation with the expression of the growth control factor was shown.

In addition, the results suggested a possible role for the sex hormone, 17 β -estradiol as one of the growth control factors, because the expression of growth control factor in the ovary varied with sex hormone in an in vitro experiment. The removal of gonad of the tilapia affected its growth. Treatment of gonadectomized fish with sex hormone influence its growth, and these effects are dependent on the stage of the gonad.

研究分野：水産学一般

キーワード：配偶子形成 成長 成長ホルモン エストラジオール17

1. 研究開始当初の背景

成長ホルモン (Gh) は、脳下垂体ホルモンで体成長の制御に重要な役割を果たしている。また、一般に性成熟の開始は、成長の早い個体の方が成長の遅い個体よりも早く始まる。このことは、成長に関わる内分泌因子である成長ホルモンが性成熟過程に重要な働きをする可能性が高いことを示している。サケ科魚類では、配偶子形成の開始や性成熟に伴い成長率が増大していき、この成長効果は、血漿中のインシュリン様成長因子 (Igf) の値による事が示されている (Campbell *et al.* BOR 2003, 2006)。しかしながら成長ホルモンの性成熟への詳細な作用機構は、何れの生物種でも明らかとなっていない。

我々は、これまでニホンウナギを用いて魚類配偶子形成の制御機構を分子レベルで解析してきた。ニホンウナギの配偶子形成は、生殖腺刺激ホルモンを個体に投与することで容易に誘起する事が出来るため実験系として優れている。このニホンウナギの精子形成過程では、成長ホルモンのレセプター (*ghr1*, 2) の発現が精原細胞に認められること (Ozaki *et al.* Com. Bio. Phy. 2005)、また、Gh と Igf1 は、生殖腺に作用しステロイドホルモンの産生を促す事が示されていること (Schulz *et al.* Gen. com. Endocrin. 2010) から、精巣中の Gh に着目し実験を行った。その結果、精巣中の体細胞であるセルトリ細胞で Gh が生産されている事を明らかにした。更に、精巣器官培養系により、Gh が精原細胞の増殖に促進的に働く事を明らかにした (Manal *et al.* Biol. Reprod. 1999, Miura *et al.* Reproduction 2011)。また、卵形成と成長因子に関しては、ブリ、及びティラピアの組織化学的な実験では、脳下垂体において Gh 及び Gh 産生因子であるグレリン等の成長制御に関わる因子が mRNA のみならずタンパクレベルでも生殖腺で発現していることが明らかとなった。更に、排卵後の卵巣には Gh が発現していない事から、

卵形成の特定のステージに何らかの作用をしている事が考えられた。このように精子形成・卵形成ともに、成長因子が配偶子形成に関与し重要な働きをする事が我々の研究により明らかとなって来た。

更に、我々は Gh を産生している生殖腺が、成長に直接関与しているか否かを、ティラピアを用いた生殖腺の外科的除去実験により調べた。その結果、雌雄とも生殖腺を除去した群は著しく成長が阻害され、除去した生殖腺を皮下へ再移植した群では、この成長阻害が回復した。この研究では、生殖腺が産生する成長ホルモン等の内分泌因子が魚体の成長を直接コントロールしている事を明らかにした (Bhatta *et al.* PNAS 2012)。生殖腺と成長の関係は、新しい仮説としてサイエンス電子版でもとりあげられた (Science Shot 28 June 2012)。

2. 研究の目的

動物は、個体発生の初期に配偶子形成が開始し、個体の成長とともに配偶子形成が進行する。このように個体の成長と生殖とは対をなして考えられるべきものであるが、この両者の相互作用の分子メカニズムは不明である。魚類では、初期成熟と体成長の間に有意な相関関係を示す種、雌雄で著しい成長差を示す種も多数認められるが、このような魚種は、配偶子形成あるいは性と成長との関係を解析するのに適していると考えられる。本研究では、雌の成長が早いウナギ (*Anguilla japonica*)、雄の成長が早いモザンビークティラピア (*Oreochromis mossambicus*) の配偶子形成と体成長との相互作用を分子レベルで詳細に解析し、世代を超えて生命を連続する役割を持つ生殖細胞が、その個体の成長に深く関与する事で、どのような役割を果たしているのかという生殖細胞の新たな機能を追求することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、ニホンウナギを実験モデルとして生殖腺での成長関連因子群の発現に着目し、生体内外の実験系を駆使し、成長と成熟の関係を細胞・分子レベルで明らかにした。更に、ザンピークティラピアの生殖巣除去個体の成長への影響、生殖巣除去個体へのホルモン投与実験などを行い成長に関わる因子の詳細な作用機序を解析した。

4. 研究成果

ニホンウナギは、産卵に向けて川から海へと河川を下降して行く。この下りウナギのうち魚体の大きい個体は雌であることが多い。これらのウナギの成長と雌雄および配偶子の発達段階を調べ、更にリアルタイム PCR 法により成長制御関連因子の成長ホルモン (Gh)、インスリン様成長因子 (Igf-1, 3) の発現量を脳下垂体、肝臓、生殖巣で調べた。雌雄間の成長では、雄よりも雌の方が成長することが確認され、成長が遅滞した群では性成熟も遅滞していた。また卵原細胞から卵黄球期までの卵形成過程の卵径と体成長との関連を明らかにすることができた。各組織での成長関連因子 (*gh*, *igf-1*, *igf-3*) の発現量は、成長の早い個体の方が高い傾向が認められた。また生殖腺での成長ホルモン (Gh) 産生細胞を特定するために、抗ウナギ Gh 抗体による免疫組織化学染色を行ったところ、Gh の局在は雌雄ともに生殖細胞を取り囲む支持細胞で確認された。

生体外培養系を用いた成長制御に関わる因子の細胞間相互関係の解明では、ニホンウナギの生殖腺培養系により、精子形成および卵形成に Gh およびその関連した因子が作用するのかを検討した。ウナギの雌雄の成長差について調べた結果、雄よりも雌のほうが大きくなることが確認されたことから、主に雌性ホルモンであるエストラジオール17β (E2) に着目し、卵巣を雄性ホルモンである11-ケトテ

ストステロンおよび E2 で暴露させた結果、成長関連因子である *gh*, *igf-1* の発現量が変化した。このことから性ホルモンは卵形成での成長制御因子のひとつであることが示唆された。更に生殖細胞と生殖細胞を取り囲む支持細胞をコラゲナーゼやプロナーゼ等による酵素処理やステンレスメッシュによる物理的に卵を除く方法などにより効率的に分取して、成長関連因子の発現量を調べた。その結果、分取した体細胞では、*gh* および *igf-3* の遺伝子発現量が高い値を示した。以上よりウナギの生殖腺は成長制御に重要な役割を果たし、生殖細胞を取り囲む支持細胞で産生される Gh が成長に関与している可能性が示された。また、成長関連因子の魚体への移植による成長制御の解析に向けて、繁殖が容易であり、実験操作を直接行なう事が簡単にできるモザンブークティラピアの実験系を用いてブサルファンにより生殖細胞を化学的に除去し、その成長への作用を調べたところ、生殖細胞の除去された個体では成長が阻害される事が明らかとなった。更に、ティラピアに外科手術を施し生殖腺除去を行い、その後、ウナギで成長との関連性が示唆された性ホルモン E2 の体内への投与実験を行い成長阻害回復が可能であるかを調べた。その結果、卵巣除去は成長を疎外するが、E2 の投与により、その成長は回復する傾向にあった。しかしながら生殖腺を除去した個体が成長阻害を示す場合と示さない場合があること、また生殖腺除去により成長阻害が認められ場合も、E2 投与によるそれらの成長阻害の回復が認められない場合と回復が認められる場合が示され、個体の除去前の生殖腺の発達段階により成長阻害と E2 の作用が微妙に異なっているのではないかと考えられた。このことから E2 の成長への作用は生殖腺の発達段階に依存している可能性が示唆された。魚の生殖腺のステージを細かく確認しながら、どの時期に E2 の成長への作用が最も顕著に示されるかを明らかにする

必要があると考えられた。さらにティラピアの生殖巣培養系では、成長関連因子グレリンが濃度100nM、培養24時間の短期間で、Ghの分泌を誘導する結果も得られた。また、サケ科魚類のアマゴを用い、ニホンウナギと同様に培養系でのE2暴露実験を行ないgh遺伝子の発現を解析した。その結果は、ニホンウナギで行なった結果と異なっていた。このことから性ステロイドホルモンの成長や成長関連因子の発現に及ぼす影響は魚種により異なっている可能性も示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計16件)

【査読有】(No.1-9)

1. Kondo, F., Ohta, T., Iwai, T., Ido, A., Miura, C., Miura, T.: Effect of the squid viscera hydrolysate on growth performance and digestion in the red sea bream *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.*43:1543-1555 (2017).
2. 近藤史崇, 岩井俊治, 三浦智恵美, 坂田潤弥, 太田史, 井戸篤史, 入江奨, 岡松一樹, 角正浩一, 三浦猛: エクストルーデッドペレット飼料が養殖クロマグロの消化と成長に与える影響. *日本水産学会誌* 82: 923-933 (2016).
3. Ohta, T., Kusano, K., Ido, A., Miura, C. and Miura, T.: Silkrose: A novel acidic polysaccharide from the silkworm that can stimulate the innate immune response. *Carbohydr. Polym.* 136: 995-1001 (2016).
4. Ido, A., Iwai, T., Ito, K., Ohta, T., Mizushige, T., Kishida, T., Miura, C. and Miura, T.: Dietary effects of housefly (*Musca domestica*) (Diptera: Muscidae) pupae on the growth performance and the resistance against bacterial pathogen in red sea bream (*Pagrus major*) (Perciformes: Sparidae). *Appl. Entomol. Zool.* 50: 213-221 (2015).
5. Iwai, T., Takahashi, M., Ido, A., Miura, C. and Miura, T.: Effect of gender on Akoya pearl quality. *Aquaculture* 437: 333-338 (2015).
6. Ohta, T., Ido, A., Kusano, K., Miura, C. and Miura, T.: A novel polysaccharide in insects activates the innate immune system in mouse macrophage RAW 264 cells. *PLoS ONE* 9 (12): e114823 (2014).
7. Miura, C., Yoshihara, Y., Shimizu-Yamaguchi, S., Hayashi, D., Hamada, K., Takeda, Y., Miura, M., Miura, T.: Controlled feeding alleviates the reduced growth associated with spawning in farmed yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture* 424-425: 10-17 (2014).
8. Fukushima, E., Iwai, T., Miura, C., Fritzie, C., Urasaki, S. and Miura, T.: A xenograft mantle transplantation technique for producing a novel pearl in an Akoya oyster host. *Mar. Biotechnol.* 16: 10-16 (2014).
9. 水野かおり, 三浦智恵美, 三浦猛: カワハギおよびウマズラハギの成長と水温の関係. *水産増殖* 62: 31-35 (2014).

【査読無】(No.10-16)

10. 三浦猛, 井戸篤史, 橋爪篤史, 三浦智恵美: 昆虫由来免疫賦活化物質「シルクロース®」の魚類養殖への利用. *アクアネット*20 (5): 48-54 (2017).
11. 三浦猛, 井戸篤史, 橋爪篤史, 高橋隆行, 三浦智恵美: 機能性多糖「シルクロース」による養殖魚介類の免疫機能向上と肉質改善. *養殖ビジネス* 54(10): 37-39 (2017)
12. 三浦猛, 滝本敦史, 三浦智恵美: 活魚輸送がマダイの生理状態および肉質に与える影響. *アクアネット*20 (3): 26-31 (2017).
13. 三浦猛, 三浦智恵美: 養殖クロマグロにおけるEP飼料の消化性. *アクアネット*20 (3): 44-49 (2017).
14. 三浦 猛, 太田史, 三浦智恵美, 高橋隆行, 井戸篤史: 魚粉に代わる養魚飼料原料 昆虫ミールの可能性と機能性. *養殖ビジネス* 52(3): 35-39 (2015).
15. 三浦猛, 太田史, 近藤史崇, 三浦智恵美, 高橋隆行, 井戸篤史: 脱カドミウム(Cd)イカ内臓溶解液の養殖魚に対する飼料効率改善効果. *養殖ビジネス*52(2): 61-64 (2015).
16. 三浦 猛, 三浦智恵美: 魚の生殖腺は成長コントロールの司令塔? *バイオサイエンスとインダストリー* 72 (5): 373-379 (2014)

〔学会発表〕(計21件)

1. Miura, C., Iwai, T., Konishi, T., Oguro, Y., Ido, A. and Miura, T.: Environmental conditions of water body is the important

- factors in the growth of Akoya pearl oyster (*Pinctada fucata*), The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, (2017).
2. Ido, A., Hashizume, A., Miura, C. and Miura, T.: The difference in substitution for fish meal with mealworm (*Tenebrio molitor*) in diet for red seabream (*Pargus major*) and amberjack (*Seriola quinqueradiata*). The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, (2017).
 3. Thiaw, S., Hashizume A., Ido, A., Takahashi, T., Miura, C. and Miura, T.: Potential of housefly larva (*Musca domestica*) in sole replacement of fish meal; ingredient analysis and feeding trial in young red seabream (*Pargus major*). The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, (2017).
 4. Ali, M., Kameda, K., Kondo, F., Hashizume, A., Iwai, T., Miura C. and Miura, T.: Protection mechanism of silkrose for bacterial pathogen infection in medaka (*Oryzias latipes*) by comprehensive gene analysis The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, (2017).
 5. Yasin, I., Ohta, T., Hashizume, A., Ido, A., Miura, C. and Miura, T.: Silkrose is effective for vibriosis of Japanese tiger prawn (*Marsupenaeus japonicas*): evidence from challenge study. The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, (2017).
 6. Miura, C., Iwai T. and Miura, T.: Hemocytes play important roles in the pearl sac formation. The 14th International Symposium on Biomineralization (BIOMIN XIV), (2017).
 7. 三浦猛, 太田史, 井戸篤史, 三浦智恵美: カイコ由来免疫賦活化多糖「シルクロース」の単離. 平成28年度日本水産学会秋季大会, (2016).
 8. Miura, T., Iwai, T., Wakaki, R. and Miura, C.: Tidal current is one of the most important factors in the growth of Akoya pearl oyster. The 87th Meeting of the Zoological Society of Japan, (2016).
 9. Miura, C., Iwai, T. and Miura, T.: Analysis of the relationship of the hemocytes and epithelial cells of pearl oyster in pearl sac formation. The 87th Meeting of the Zoological Society of Japan, (2016).
 10. Iwai, T., Takahashi, M., Mulyana, J. S., Miura, C. and Miura, T.: Bidirectional sex changes in Akoya pearl oyster. The 87th Meeting of the Zoological Society of Japan, (2016).
 11. 北村脩, 三浦智恵美, 太田史, 三浦猛: ニホンウナギの雌雄の成長差と生殖腺の相互関係. 平成 26 年度日本水産学会春季大会, (2015).
 12. 三浦 猛, 三浦智恵美, 太田 史, 井戸篤史: 昆虫由来免疫賦活化物質に関する研究. 平成 26 年度日本水産学会春季大会, (2015).
 13. 三浦智恵美, 太田史, 草野希枝, 井戸篤史, 三浦猛: 天蚕サナギから得られた新規物質シルクロース. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, (2014).
 14. 林大地, 岩井俊治, 三浦智恵美, 三浦猛: 養殖ブリにおける性成熟と骨との関係. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, (2014).
 15. 近藤史崇, 岩井俊治, 三浦智恵美, 角正浩一, 三浦猛: 養殖クロマグロの配合飼料に対する消化特性. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, (2014).
 16. 太田史, 草野希枝, 井戸篤史, 三浦智恵美, 三浦猛: ウリミバエサナギ由来免疫賦活化酸性多糖 Dipterose の単離・同定. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, (2014)
 17. 井戸篤史, 岩井俊治, 近藤史崇, 太田史, 三浦智恵美, 三浦猛: 脱 Cd イカ内臓の養殖魚に対する飼料効率改善効果の生理学的解析. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, (2014).
 18. Miura, T., Ido, A., Ohta, T., Iwai, T., Kusano, K., Kobayashi, S., Kishida, T. and Miura, C.: The benefits of using insects as fish and animal feed. Insect to Feed the World, (2014).
 19. Ido, A., Ohta, T., Iwai, T., Kishida, T., Miura, C. and Miura, T.: Positive effects of dietary housefly (*Musca domestica*) pupa for fish and mammal. Insect to Feed the World, (2014).
 20. Miura, C., Yoshihara, Y., Hayashi, D. and

Miura, T.: Controlled feeding rescues the growth reduction associated with spawning in farmed yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). 10th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, (2014).

21. Miura, T., Miura, C., Iwai, T. and Batta, S.: The role of gonads for growth in teleosts. 10th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, (2014).

〔図書〕(計1件)

1. 三浦 猛, 三浦智恵美: 魚類生殖腺の成熟 . 「ホルモンから見た生命現象と進化」シリーズ 第4巻 成長・成熟・性決定-継-(伊藤道彦・高橋義明編) pp59-75. 裳華房 (2016) .

〔産業財産権〕

出願状況 (計3件)

名称: 成長又は摂餌促進剤、飼料、及び食品
発明者: 三浦猛, 三浦智恵美, 近藤史崇, 青木良太

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2018-028338

出願年月日: 2018年2月21日

国内外の別: 国外

名称: 成長促進剤及び飼料

発明者: 三浦猛, 三浦智恵美, 近藤史崇

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2017-034205

出願年月日: 2017年2月25日

国内外の別: 国内

名称: 組成物、及び組成物の製造方法

発明者: 三浦猛, 三浦智恵美, 太田史, 橋爪篤史

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2016-113379

出願年月日: 2016年6月7日

国内外の別: 国外

取得状況 (計1件)

名称: 多糖類、多糖類を含む組成物、及び免疫賦活剤

発明者: 三浦猛, 三浦智恵美, 太田史, 岩井俊治, 高橋隆行

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 6019505

取得年月日: 2016年10月14日

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 智恵美 (MIURA, CHIEMI)

広島工業大学・環境学部・教授

研究者番号: 90518002

(4) 研究協力者

北村 脩 (KITAMURA, Shu), 林大地 (HAYASHI, Daichi) (大学院生)