

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870391

研究課題名(和文) 雌性先熟魚キジハタの性的可塑性の実態：性転換過程における生殖細胞と体細胞の挙動

研究課題名(英文) Physiological studies on sex change in the protogynous redspotted grouper (Epinephelus akkara): Behavior of germ cells and somatic cells during sex change.

研究代表者

小林 靖尚 (Kobayashi, Yasuhisa)

岡山大学・理学部・助教

研究者番号：10643786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ハタ科魚類のキジハタは、メスからオスへと性転換する繁殖様式を持つ。本研究では、キジハタの性転換の生理機構を明らかにするため、脳下垂体に着目した。最初にキジハタの雌雄の脳下垂体を用いてRNA-seqを行い、脳下垂体で分泌されるホルモン数種(糖タンパクホルモン、GH/PRLファミリー)の遺伝子配列を単離した。その後、生殖腺の組織学的観察によって、キジハタの性転換ステージを四段階に分類し、各種ホルモンの遺伝子発現量をqPCRにより測定した。その結果、糖タンパクホルモンの内、FSH beta遺伝子の発現が性転換初期に急激に上昇することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Groupers of the genus Epinephelus are one of the most important aquaculture species in the world. Due to the economical and biological importance of groupers, physiological and endocrinological data are eagerly needed for improvement aquaculture. However, the endocrinological mechanism of sex change is not clearly understood. In this research, we focused on the pituitary. First, we had carried out RNA-seq by using grouper pituitary. Based on the data, we successfully isolated several genes of hormones. Second, we quantified hormone gene expressions during sex change in grouper. Finally, we have identified that key regulatory factor underlying sex change is FSH.

研究分野：魚類生殖生理学

キーワード：性転換 ハタ科魚類 精巣 卵巣 脳下垂体 ホルモン

1. 研究開始当初の背景

ハタ科魚類は、雌から雄へ性転換する雌性先熟型の生殖様式をもつ魚で、本州中部以南からインド方面まで広く生息する。ハタ科魚類は美味であることから、市場価格(5,000-8,000 円/kg)が非常に高く「超高級魚」あるいは「幻の魚」とされている。そのためハタ科魚類の資源の増大は、漁業者から強く望まれている。

本研究で対象とするキジハタ (*Epinephelus akaara*) は、瀬戸内海に多く生息し、ハタ科魚類の中で最も早く種苗生産の技術開発研究が開始された(昭和 58 年)。長年の研究の蓄積により、現在、西日本各地でキジハタ種苗の量産化体制が整いつつある。加えて東南アジアにおいてもキジハタの種苗生産が活発に行われている。そのためキジハタは、ハタ科魚類の中で最も食用に供されている種である。しかしながら現在、この活発に行われているキジハタの種苗生産を減速させる新たな「親魚の性」に関する問題が浮上している。具体的には、キジハタの親魚を生産に適した性比(例えば、雄:雌=1:9)で飼育しても、養育中に多くの親魚がサイズ・年齢に関わらず雌から雄へと性転換する問題である。そのため現場では最終的に、親魚の性比が雄に大きく偏る(雄:雌=1:0)。当然ながら種苗の生産量は雌の数に依存するため、結果として現場では親魚を三年ごとに更新する必要に迫られる。この問題を解決するためには、キジハタの性転換機構を詳細に調べ「養育中にキジハタ親魚は、なぜ性転換するのか?」を理解し、「親魚の性転換を抑制する方法」を開発することが必要となる。しかし、キジハタに限らずハタ科魚類の性転換機構に関する研究は少なく、どの個体が、どんな状況で性転換するのかさえハッキリしていない。

そこで、私はこれまでハタ科魚類の性転換機構を理解するために、南方性の小型のハタ科魚類であるカンモンハタ (*E. merra*) をモデルに用いた研究に取り組んできた。これまでに、ハタ科魚類の性転換は視床下部-下垂体-生殖腺軸 (HPG 軸) によって制御されている事を明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究では、キジハタをモデルに性転換を制御する HPG 軸の中心にある下垂体に着目し、性転換に伴う遺伝子の発現変化を網羅的に解析する事で、性転換の分子基盤を構築する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) キジハタ下垂体の RNA-sequence (RNA-seq)

前述の通りハタ科魚類に関する研究は限られている。当然ながらゲノムは解析されておらず、遺伝子登録数も数えるほどである。そこで本研究では、最初に、近年発達の著し

い次世代シーケンサーを用いてキジハタ下垂体の RNA-seq を行い、ハタ科魚類の分子基盤を構築することを目指した。

(2) 性転換に伴う下垂体内の遺伝子変化：前葉ホルモンに関して

RNA-seq によりキジハタ下垂体のリファレンス遺伝子ライブラリーを構築することができた。これらリファレンスの内、本研究では下垂体前葉で発現するホルモン分子に着目した。

具体的には RNA-seq で得られたデータを元にトランスクリプトーム解析を行い、リファレンス配列を構築した。次に local blast を立ち上げ、種々の前葉ホルモン(下記)分子をコードする遺伝子を釣り上げ、RT-PCR およびサングァーシーケンスにより塩基配列を確認した。[解析したホルモン：卵濾胞刺激ホルモン (FSH), 黄体形成ホルモン (LH), 甲状腺刺激ホルモン (TSH), 成長ホルモン (GH), プロラクチン (PRL), ソマトラクチン (SL)] 次に、得られた配列を元に qPCR 測定系を立ち上げた。その後、香川県観音寺沖にて採取されたキジハタの生殖腺状態を調べ、性転換のステージを4つに分類した(図1)。最後に、性転換に伴うホルモン遺伝子の発現変化を解析した。

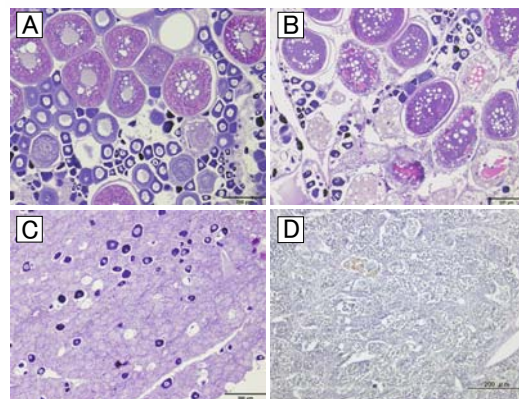


図 1. キジハタの性転換に伴う生殖腺の変化。

- A) メス (Female). 活発な卵形成が観察される。
- B) 性転換初期 (ET: Early transitional). 卵形成が停止し、成熟した卵母細胞が崩壊する。
- C) 性転換後期 (LT: Late transitional). 精巣組織が増大し、周辺期の卵母細胞が観察される。
- D) オス (Male). 活発な精子形成が観察される。

4. 研究成果

(1) キジハタ下垂体の RNA-seq とトランスクリプトーム解析

イルミナ社の Miseq を用いてキジハタの雌雄それぞれの下垂体の RNA-seq を行い、生データをトリミングおよびフィルタリングに供した(表 1)。

表 1. フィルタリングおよびトリミング後のキジハタ下垂体の RNA-seq データ.

	Female	Male
Read Pairs	457, 751	372, 211
Single Reads	1, 774, 232	1, 548, 206

その後、雌雄のデータを混ぜて *de novo* アセンブルを行い、キジハタ下垂体の遺伝子リファレンスを構築した(contig 数: 108, 552. N50: 3140 bp. 平均 contig 長: 1904bp)。アセンブルには velvet assembler (ver1.1) を使用した。

キジハタ下垂体の遺伝子リファレンス配列の中には、ホルモン分子、およびその産生に関与する転写調節因子などが含まれていた。

(2) 性転換に伴う下垂体内の遺伝子変化：前葉ホルモンに関して

得られたキジハタ下垂体のリファレンス配列に、雌雄それぞれの RNA-seq データを当て、性特異的に発現する遺伝子群を同定しようと試みたが、データ量が不足しており、解析出来なかった。そこでリファレンス配列の中で前葉ホルモンをコードする遺伝子に着目し、性転換に伴う発現変化を qPCR により解析した。

・プロラクチン/成長ホルモンファミリーの性転換に伴う変化

キジハタの性転換に伴う成長ホルモン(GH)、プロラクチン(PRL)およびソマトラクチン(SL)の発現変化を図2に示す。

プロラクチンの発現がオスで有意に低かったことを除き、性転換の初期/後期に有意に変化する遺伝子は見られなかった。これらの結果から、PRL/GH ファミリーは性転換には関与していないと考えられた。

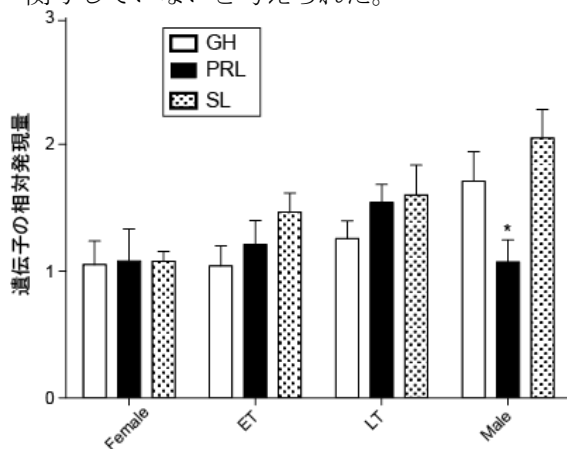


図 2. キジハタの性転換に伴う下垂体内の成長ホルモン(GH)、プロラクチン(PRL)およびソマトラクチン(SL)の遺伝子発現変化

・糖タンパクホルモンの性転換に伴う変化
キジハタの糖タンパクホルモンをコードする遺伝子の性転換に伴う発現変化を図3に示す。

測定の結果、FSHB 遺伝子が性転換初期に急激に上昇し、それが維持されることが明らかになった。この結果は、これまで私がカンモンハタで見出した遺伝子の発現変化によく似ている(Kobayashi et al., Biology of Reproduction, 2010)。そのためハタ科魚類ではメスからオスへと性転換する際に、下垂体から放出される FSH が重要な働きを持つと考えられる。今後は、ハタ科魚類の FSH の発現調節について解析を進めることで、ハタの性転換に関して理解が深まると予想される。

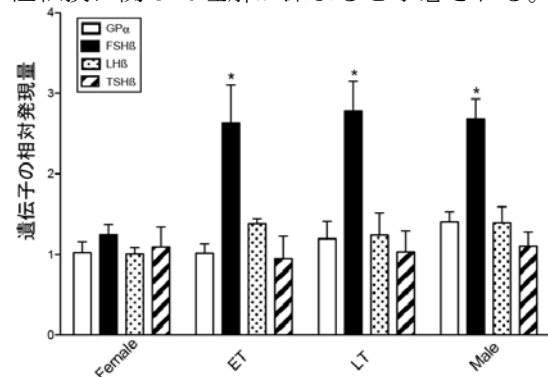


図 3. キジハタの性転換に伴う下垂体内の糖タンパクホルモンの遺伝子発現変化

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 1 件)

- ① Murata R, Kobayashi Y, Karimata H, Kishimoto K, Kimura M, Nakamura M. Transient sex change in the immature Malabar grouper, *Epinephelus malabaricus*, androgen treatment. *Biology of Reproduction*, 査読有, 91, 2014, 1-7. DOI: 10.1095/biolreprod.113.115378.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 小林靖尚 (2014 年 3 月 27 日) ハタ科魚類の繁殖機構 -配偶子形成・性転換のメカニズム-. 日本水産学会 春季大会, 函館, 北海道大学 (招待講演)
- ② 小林靖尚 (2015 年 8 月 20 日) 性を換える魚の生理学的研究. 日本進化学会第 17 回大会, 東京, 中央大学 (招待講演)

[図書] (計 2 件)

- ① 泉田大介, 小林靖尚, 征矢野清. 恒星社厚生閣. ハタ科魚類における生殖の科学. 「水産学シリーズ 181: ハタ科魚類の水産研究最前線」 2015, 9-20.

- ② 小林靖尚, 中村將. 裳華房. 魚類の性転換.
「ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ III. 成長・成熟・性決定 -継-」 2016,
92-105

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 靖尚 (KOBAYASHI YASUHISA)

岡山大学・理学部・助教

研究者番号：10643786