平成 20 年度水産学奨励賞

魚類の性転換研究のためのモデル種構築とその生理・分子機構

太 田 耕 平^a

ハワイ大学

Study of the physiological and molecular mechanisms of sex change
in fish using a novel model systemKOHEI OHTA^a*Institute for Biogenesis Research, Department of Anatomy, John A. Burns School of Medicine,
University of Hawaii, Honolulu, HI 96813, USA*

魚類の性転換は系統分類上の多岐にわたる種で報告されており、マダイやハタ科魚などの漁業対象種も数多く含まれる。これらの中にはメスからオス、またはオスからメスへの一方向へ転換する魚の他に、雌雄双方向へ性転換できる魚も存在する。また、性転換の際には生殖腺のみならず、行動や体色をダイナミックに換える魚も多い。このような性転換の方向や時期は個々の生態と密接に関連しており、性転換の誘因は年齢や成長、あるいは社会環境など多様である。これまでの潜水観察等による生態研究の結果から、様々な魚種について繁殖行動や社会構造が明らかにされると共に、適応的意義に基づいた性転換の有効性が論じられてきた。^{1,2)} 一方で、このように多種多様な性転換魚も、解剖学的・組織学的にみた場合、生殖腺の全体または大部分で卵巣組織と精巣組織が入れ換わるという点では共通しており、その生理メカニズムに関しても普遍性が高いと考えられる。実際に、性転換魚の個体内では、性に応じて配偶子形成が卵形成と精子形成との間で適切にコントロールされていることから、性転換のメカニズムを詳細に明らかにすることができれば、性転換魚の性統御に関する基礎的知見のみならず、魚類に共通する雌雄の配偶子形成や性分化機構の理解にも繋がると考えられる。加えて、魚類全体や脊椎動物としての枠組みでみた場合、性転換魚にみられる個体・器官・細胞の各レベルでの高い性的可塑性がどのような仕組みで成立しているのか？ 雌雄異体とはどのように異なるのか？ という性的可塑性に関するメカニズムの普遍性や多様性を明らかにしていくことは、脊椎動物における性の仕組みを理解する上でも有益な情報になる

と期待される。しかしながら、性転換のメカニズムを詳細に解析するための実験系は極めて少なく、対象種も熱帯・亜熱帯域の一部の魚種に限られていた。³⁾ そこで本研究では国内で容易に採集可能なホシササノハベラを研究対象種として選定し、性転換のメカニズムを解析するための実験系を構築すると共に、その生理・分子機構について解析した。

1) 性転換研究のための実験系構築

a) ホシササノハベラはいつ、どのように性転換するか？

スズキ目ベラ科のホシササノハベラは西日本の岩礁域に広く生息しており、通常メスからオスへ性転換を行い、その際に体色が大きく変わる。また、産卵期の10、11月には、体長の比較的大きなオスがなわばりを作り、そのなわばり内に入出入りする複数の小さなメスとそれぞれペア産卵を行う、なわばり訪問型複婚の配偶システムをもつことが知られている。²⁾ ところで、性転換のメカニズムを効率的かつ詳細に解析するためには、研究対象魚が十分に確保でき、飼育環境下でも計画的に性転換が再現できることが望ましいと考えられる。ホシササノハベラは採集が比較的容易である一方、性転換に関する情報はほとんど無かった。そこでまず、性転換の時期とそれに伴う生殖腺および体色の変化を明らかにするため、調査艇や貸しボート等を利用した大量採集法を整備し、年間を通して各月毎に個体採集を行った。計329個体（全長98～230 mm）について解析した結果、性転換個体は産卵期の10、11月を除く12月から翌9月まで

の各月に出現しており、全長 114~189 mm の幅広い範囲で性転換が認められた。すなわち、本種の性転換が非産卵期の間いつでも起こり、それらの体長範囲が広いことから、性転換の誘因が単なる成長や年齢ではないと考えられた。一方、生殖腺組織を観察した結果、卵母細胞と雄性生殖細胞の発達段階から、性転換の進行度を 4 つのステージに分けることができた。さらに、体色変化を画像解析法により数量化することに成功し、卵巣から精巣への転換に伴って各部分の体色が換わり、中でも尻ビレの色相値が黄（メス型）から赤（オス型）へと著しく変化することを明らかにした。すなわち、尻ビレの色相を指標として性転換の進行度を簡便に判定することが可能となった。⁴⁾

b) 飼育環境下での双方向性転換の実験系構築

次に、飼育環境下で性転換を再現するために、様々な条件で飼育実験を行った。メスの大小の 2 個体で飼育した際には性転換は起こらなかったが、同居個体数の増加と共に性転換が起こるようになり、最終的にメス 6 個体の同居飼育により、相対的に最も大きな個体が雄へ確実に性転換した。すなわち、ホシササノハベラは水槽内の社会性、特に個体数と相対的な体長差により性が換わる。また興味深いことに、オス 5 個体を同居飼育することにより最小個体がメスへ逆方向の性転換をした。⁵⁾ 以上の結果から、飼育環境下で双方向へ性転換を誘導する実験系が構築された。ちなみに雌雄双方向の性転換に関してはそれまで、一夫一妻と一夫多妻の配偶システムを持つ魚種のみで知られており、雌雄共に複婚の配偶システムを持つ魚種での報告はなかった。加えて、本種は性転換の際に大きな体色変化を伴うため、メスからオスへの不可逆な転換であると信じられていたが、本研究により、両方向への性転換能を持つことが明らかとなり、配偶システム等に関わらず多くの性転換魚において雌雄双方向の性転換能を有している可能性が示された。

2) 性転換の生理・分子機構

a) 性ステロイド合成経路の解析

脊椎動物において、雌雄の配偶子形成はそれぞれ視床下部-下垂体-生殖腺の内分泌系により適切に調節されている。そこでまず、生殖腺で分泌されて配偶子形成を直接的に制御し、性転換にも関与していると考えられる性ステロイドホルモンの合成機構について解析を行った。ステロイド合成産物の薄層クロマトグラフィー解析と、酵素免疫測定法（ELISA）による血中動態の解析により、雌雄の生殖腺で合成される主要なステロイドを全て同定し、それらの合成経路を明らかにした。^{6,7)} その結果、エストロゲンとアンドロゲンの合成に雌雄差がみられ、卵濾胞組織では脊椎動物の代表的なエストロゲンである Estradiol-17 β が、精巣組織では魚類特有のアンド

ロゲンである 11-ketotestosterone が最終産物として合成されていた。また、Estradiol-17 β の合成経路は、サケ科魚、キンギョ、メダカなどの雌雄異体魚で明らかにされていた Testosterone を経る合成経路とは異なり、Estrone を経由して合成される新奇の経路であった。⁶⁾ 後に同手法を用いて、同じく性転換するベラ科魚のキュウセン、幼時雌雄同体のマダイ、さらに雌雄異体のブリについて Estradiol-17 β 合成経路の解析を行った。その結果、ブリではサケ科魚などと同様の Testosterone を経る合成経路であったのに対し、性転換が報告されているキュウセンとマダイではホシササノハベラと同様の Estrone を経る経路であったことから、Estrone 経路の性転換への関連が強く示唆された。^{8,9)}

b) 性ステロイドによる双方向性転換の誘導

そこで、精巣組織で産生されるアンドロゲン（11-ketotestosterone またはその中間代謝物の Testosterone）をメスに、卵濾胞組織で産生されるエストロゲン（Estradiol-17 β またはその中間代謝物の Estrone）をオスに、それぞれシリコンチューブを用いて徐放的に投与した結果、各アンドロゲンはメスからオスの、各エストロゲンはオスからメスの性転換をそれぞれ誘導した。また、アンドロゲンの投与により血中の Estradiol-17 β 量が減少する一方、エストロゲン投与により血中 11-ketotestosterone 量の低下がみられた。以上の結果から、エストロゲンとアンドロゲンとの著しいステロイド合成系の転換（シフト）が卵形成と精子形成の転換を誘導し、生殖腺の性を換えていることが明らかとなった。また、本種の Estrone を経る Estradiol-17 β 合成経路はメスの時期に生殖腺での過剰な Testosterone 合成を回避し、11-ketotestosterone の合成やそれに続くオスへの性転換を抑えることに有効であると考えられた。⁵⁾

c) 性ステロイド合成系の転換に関わるステロイド代謝酵素の特定

次に、ステロイド合成系のシフトに関わる遺伝子の特定を目的として、アンドロゲンおよびエストロゲンの合成に関わる全てのステロイド代謝酵素遺伝子をクローニングし、性転換に伴う発現パターンを解析した。その結果、卵巣から精巣への転換の際に卵巣型 aromatase と 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 の発現量が著しく減少し、換わって 11 β -hydroxylase と 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 の発現量が増加した。すなわち、これら 4 つの遺伝子の著しい発現変化によりステロイド合成系のシフトがもたらされると結論づけた。加えて、本種の生殖腺では 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 の他に、type 5 や 7 など、複数タイプの 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 遺伝子の発現が認められた。そこで、培養細胞に各遺伝子を強制発現させて酵素活性の解析を行った結果、17 β

-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 に Estrone に対する高い基質特異性が認められたことから、本酵素が卵巣特異的に発現して Estrone 経由のエストロゲン合成に関与していることが明らかとなった。¹⁰⁾

d) 性分化関連遺伝子の発現解析

ところで最近、哺乳類などにおいて発生初期の生殖腺の性分化に関与する転写因子等が次々と明らかにされており、いくつかの因子に関しては雌雄異体の魚類においても性分化に関与していることが示唆されている。そこで、これら各種因子について、ステロイド合成系のシフトや生殖腺組織の性転換に関与するかどうかを調べるために、各遺伝子を単離すると共にその発現変動を解析した。各種転写因子について調べた結果、メスからオスへの性転換の際に、foxl2 の急激な減少が起こる一方、dmrt1, sox9, および ad4bp の上昇が認められた。また、性腺ホルモンの一つとして知られ、TGF- β ファミリーに属するミュー管抑制因子 (amh または mis) も生殖腺で発現しており、精巣組織への転換に伴い著しく増加したことから、これらの各因子が性分化のみならず、性転換にも関与していることが強く示唆された (太田未発表)。

e) *in vitro* における性転換実験系

さらに、生殖腺の性転換について分子・細胞レベルで詳細な解析を行うため、生殖腺組織の器官培養系を確立した。大変興味深いことに、*in vitro* において卵巣組織を培養し、アンドロゲン処理を行うことにより、精巣組織への転換が起こり、精子形成を誘導することに成功した。一方、精巣組織に対し、エストロゲンやアンドロゲン阻害剤を処理することにより、精巣を完全に退行させると共に、卵母細胞や卵巣の顆粒膜細胞の分子マーカーがそれぞれ確認され、精巣組織から卵巣組織方向への転換が誘導できたと考えられた。以上の結果から、本種の生殖腺では卵子と精子のどちらにも分化可能な生殖細胞とそれを支持する体細胞が常に存在し、性ステロイドに応じて分化誘導されと考えられる。今後、生殖細胞や生殖腺体細胞の動態、遺伝子発現、さらにはエピジェネティックな変化を詳細に解析し、生殖腺における器官および細胞の性的可塑性に関するメカニズムの詳細を明らかにできると考えている。

f) 生殖腺刺激ホルモンの分泌パターン

一方で、個体レベルでは、生殖腺でのステロイド合成系のシフトや各種細胞の転換は脳下垂体ホルモンなど上位からのシグナルにより制御されていると考えられる。なかでも濾胞刺激ホルモン (FSH) と黄体形成ホルモン (LH) の 2 種の生殖腺刺激ホルモンは、魚類においても性ステロイド合成などを介して性成熟を促進することが知られている。これらのホルモンは生殖腺の受容体を介して作用するが、実際にホシササノハベラでも

FSH, LH それぞれの受容体が、卵巣、性転換過程にある両性生殖腺、さらには精巣のいずれの時期にも認められた。加えて近縁の下垂体ホルモンである甲状腺刺激ホルモン (TSH) の受容体も発現していた。そこで FSH, LH, および TSH の下垂体における遺伝子発現について、ノーザンブロット法などを用いて詳細に調べた結果、3 種のホルモンの日周発現パターンが雌雄で明瞭に異なることを性転換魚で初めて見出した。¹¹⁾ すなわち、脳下垂体の内分泌系も性に応じて転換していることが明らかとなった。今後の研究により、実際に分泌パターンの違いが生殖腺の性転換の引き金になるかどうかを含め、社会環境の変化から生殖腺でのステロイド合成系のシフトに至るまでの情報伝達のメカニズムを明らかにし、個体レベルでの性的可塑性の実態を解明していく必要がある。

性転換現象は自然条件下で自在に性を換えるという我々哺乳類には無い能力と、生殖腺や行動、さらには体色等にみられる変化のダイナミックさから、その特異性が注目されがちであるが、実際にメカニズムに関して調べてみると、雌雄異体魚と極めて共通点が多いことに驚かされる。すなわち、性転換魚は魚類共通の生理・分子メカニズムをベースに、性転換魚特有のごく僅かな特異的機能を駆使して個体・器官・細胞での性転換を完結させているものと考えられる。今後さらに詳しく研究を行うことで、性転換魚の魚類としての普遍性や特異性が次々と明らかになり、魚類の性の仕組みの理解が進むことが期待される。また一方で、これらの研究の中で得られる *in vivo* および *in vitro* での技術や知識を駆使・発展させることにより、性転換魚のみならず雌雄異体魚においても、性分化・性転換・性成熟の統御などに応用できると考えられる。魚類や水棲生物の中にはまだまだ未知の現象や機能が多く、解明すべき点は多く残されている。今後、さらに研究に精進し、新たな実験モデルを構築しながら、水産業に貢献できるよう努力していきたい。

謝 辞

学部および大学院時の指導教官であり、本研究を始めに際して丁寧にご指導下さった九州大学農学研究院海洋生物学分野の松山倫也教授、ならびに博士研究員として受入れ下さり、本研究の発展に多大なるご指導とサポートを賜った自然科学研究機構基礎生物学研究所生殖生物学研究部門の長濱嘉孝教授に、この場を借りて厚くお礼申し上げます。また、両研究室のスタッフ、先輩、後輩の方々には様々なご助言やご協力を頂いた。さらに、*in vitro* での性転換実験は琉球大学熱帯生物圏研究センターの中村将先生との共同研究、下垂体ホルモン受容体遺伝子やステロイド代謝酵素遺伝子については、それぞ

れ帝京科学大学の平井俊朗先生と熊本大学理学部の北野健先生に技術指導頂いた。独立行政法人水産総合センター養殖研究所の田中秀樹先生、東京農業大学の松原創先生には実験魚の採集等に際して多大なるご協力を頂いた。マダいのステロイド合成経路に関しては、当時養殖研究所で現宮崎大学の香川浩彦先生のチームとの共同研究の成果である。また、大量採集法を整備するにあたり、九州大学附属水産実験所のスタッフの方々に多大なるご協力を頂いた。特に故七田康治氏による操船技術等のご指導がなければ、十分な実験魚の確保は不可能であった。心より深く感謝申し上げる。本研究は日本学術振興会特別研究員および海外特別研究員制度による援助のもとで行われたものである。

文 献

- 1) Munday PL, Buston PM, Warner RR. Diversity and flexibility of sex-change strategies in animals. *Trends Ecol. Evol.* 2006; **21**: 89–95.
- 2) 中園明信, 桑村哲生編. 「魚類の性転換」東海大学出版会, 神奈川. 1987.
- 3) Devlin RH, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 2002; **208**: 191–364.
- 4) Ohta K, Hirano M, Mine T, Mizutani H, Yamaguchi A, Matsuyama M. Body color change and serum steroid hormone levels throughout the process of sex change in the adult wrasse, *Pseudolabrus sieboldi*. *Mar. Biol.* 2008; **153**: 843–852.
- 5) Ohta K, Sundaray JK, Okida T, Sakai M, Kitano T, Yamaguchi A, Matsuyama M. Bi-directional sex change and its steroidogenesis in the wrasse, *Pseudolabrus sieboldi*. *Fish Physiol. Biochem.* 2003; **28**: 173–174.
- 6) Ohta K, Matsuyama M. Steroidogenic pathways to 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and 17,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in the ovarian follicles of the bamboo wrasse, *Pseudolabrus sieboldi*. *Fish. Sci.* 2002; **68**: 41–50.
- 7) Ohta K, Mine T, Yamaguchi A, Matsuyama M. Steroidogenic pathway to estradiol-17 β synthesis in the ovarian follicles of the protogynous wrasse, *Pseudolabrus sieboldi*. *Zool. Sci.* 2001; **18**: 937–945.
- 8) Rahman MA, Ohta K, Chuda H, Nakano S, Maruyama K, Matsuyama M. Gonadotropin-induced steroidogenic shift towards maturation-inducing hormone in Japanese yellowtail during final oocyte maturation. *J Fish Biol.* 2001; **58**: 462–474.
- 9) Ohta K, Yamaguchi S, Yamaguchi A, Gen K, Okuzawa K, Kagawa H, Matsuyama M. Biosynthesis of steroids in ovarian follicles of red seabream, *Pagrus major* (Sparidae, Teleostei) during final oocyte maturation and the relative effectiveness of steroid metabolites for germinal vesicle breakdown *in vitro*. *Comp. Biochem. and Physiol. B* 2002; **133**: 45–54.
- 10) Ohta K, Sundaray JK, Kitano T, Shibata Y, Matsuda M, Yamaguchi A, Matsuyama M, Nagahama Y. Involvement of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the sex change of a protogynous wrasse, *Pseudolabrus sieboldi*. *J. Exp. Zool. A* 2006; **305A**: 164.
- 11) Ohta K, Mine T, Yamaguchi A, Matsuyama M. Sexually dimorphic expression of pituitary glycoprotein hormones in a sex-changing fish, (*Pseudolabrus sieboldi*). *J. Exp. Zool. A* 2008; **309A**: 534–541.