

学 位 論 文 題 名

ウナギ卵巣のステロイドホルモン合成機構および
卵成長の人為的制御に関する研究

学位論文内容の要旨

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) は、水産養殖上極めて重要な魚種であるが、種苗生産技術は確立していない。現在、サケ脳下垂体 (SPH) を雌魚に毎週1回連続投与することにより受精可能な卵を得ることができるが、受精率や仔魚の生存日数にばらつきが大きく、シラスウナギにまで達した個体は得られていない。従って、現行の人為催熟法を改良し、良質卵を得るためには、ウナギ卵巣の発達機構をより詳細に調べることが必要である。

一般に、硬骨魚類の卵黄形成および卵成熟（最終成熟）は、脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモンの作用のもと卵濾胞組織で各種ステロイド合成酵素により合成、分泌される性ステロイドホルモンにより制御されている。卵黄形成はエストロゲンであるエストラジオール-17 β (E2) に、卵成熟は卵成熟誘起ステロイドに制御されている。一方、雄魚特有のアンドロゲンと考えられていた11-ケトテストステロン (11-KT) は、数種の雌魚の血中にも比較的高濃度で存在することが最近報告されたが、雌魚における11-KTの機能、合成組織および標的組織はほとんど判っておらず、卵形成への関与については全く不明である。

これまで、人為催熟されたニホンウナギにおいては、11-KT以外のステロイドホルモン量の変化について、週単位での動態が調べられているが、日単位でどのように変化しているかは明らかではない。さらに、催熟に伴う卵巣の各種ステロイド合成酵素遺伝子の発現量やステロイド合成酵素活性の変化について詳細に解析した例はなく、その両者の関連性も不明である。また、ニホンウナギでは卵

黄形成初期より成熟段階の進んだ卵母細胞を有する個体が捕獲された例はなく、天然条件下での性成熟過程は全く不明である。一方、ニュージーランドウナギ *Anguilla dieffenbachii* では、卵母細胞が卵黄形成中期に達した下りウナギが捕獲されており、天然での性成熟過程がある程度調べられている。従って、天然ニュージーランドウナギと人為催熟ニホンウナギの性成熟過程を比較することは、人為催熟法の問題点を知る上で極めて有効である。そこで本研究では、人為催熟ニホンウナギについて、卵巣のステロイド合成機構に関するより詳細な知見の集積を行うとともに、天然ニュージーランドウナギにおけるそれと比較することで問題点を明らかにし、それらの情報をもとに人為催熟法を改良することを目的として以下の実験を行った。

先ず、人為催熟ニホンウナギ雌の血中ステロイド量が日単位でどのように変化しているかを調べた。その結果、各種ステロイド量は、SPH 投与後 2 - 4 日目に高値を示し、その後減少する傾向を示した。従って、この各種ステロイド量の変化は内因性リズムではなく、SPH 投与による変化であることが示唆された。また、これら性ステロイドのうち E2 は、卵成長後期に急激に増加した。さらに、11 - KT も E2 と同様の変化を示したことから、11 - KT が卵成長に関与している可能性が考えられた。次に、卵巣の発達段階ごとの 5 種のステロイド合成酵素 (P450_{scc}、P450_{c17}、3 β - HSD、17 β - HSD - I および P450_{arom}) 遺伝子の発現量を定量した。その結果、E2 合成酵素である P450_{arom} は、卵黄形成中期に最高値を示し卵黄形成中期以降減少する傾向が認められた。しかし、自発産卵を行う他魚種において卵成長後期に血中 E2 量が高値を示す例はないため、人為催熟ニホンウナギのエストロゲン合成は正常ではないことが示唆された。さらに、これら 5 種のステロイド合成酵素の発現は、異なったステージで卵径が同じサイズの卵群間で差異が認められた。このことから、人為催熟魚の卵濾胞におけるステロイド合成が正常に行われていないことが推察された。

次に、ニホンウナギ雌の 11 - KT 合成部位および合成機構について調べた。各組織における 11 - KT 合成酵素の一つであるステロイド 11 β - 水酸化酵素 (P450_{11 β}) の発現を調べた結果、脳、脳下垂体、頭腎および卵巣で発現が認められた。また、P450_{11 β} の発現が認められた組織と 11 - KT の合成能を比較した

結果、11 - KT は主に卵巣で合成されていることが判明した。卵巣における P45011 β mRNA の発現および活性変化を調べたところ、mRNA 発現および活性ともに卵黄形成後期に最高値を示し、その後わずかに減少した。この変化は血中 11 - KT 量の変化に類似していた。従って、P45011 β mRNA の発現および活性は血中 11 - KT 量の変化を反映していることが示された。しかし、卵濾胞における P45011 β mRNA の発現量は、異なったステージで卵径が同じサイズの卵群間で差異が認められ、卵濾胞における 11 - KT 合成が正常に行われていないことも示唆された。また、11 - KT の受容体である 2 種の AR mRNA の卵巣における発現を調べたところ、AR β は AR α よりも高い発現をみせた。従って、卵巣では AR β が主要な AR であることが示唆された。AR β mRNA 量は卵黄形成中期まで増加し、その後減少した。この動態は血中 11 - KT 量に反映していなかったが、AR β は再利用されている可能性が考えられた。このようにウナギ雌の卵巣において、11 - KT が合成され、その受容体である AR の発現が認められたことから、11 - KT が卵巣においてなんらかの作用を担っていると思われる。

さらに、天然ニュージーランドウナギと人為催熟ニホンウナギとで血中ステロイドホルモン量と卵巣のステロイド合成酵素 mRNA 量を比較した。その結果、人為催熟開始直後のニホンウナギの血中 E2 量および卵巣の P450arom の mRNA 量はニュージーランドウナギに比べ有意に高値を示した。これらの結果、人為催熟ニホンウナギの E2 と P450arom mRNA の発現は、ニュージーランドウナギに比べ過剰に発現していることが示唆された。そこで、卵成長後期に過剰合成される E2 を抑制するために、P450arom 阻害剤であるファドロゾール投与実験を行った。その結果、血中 E2 量の上昇を抑制することができ、天然状態に近いと思われる囲卵腔の広い受精卵を得ることができた。従って、人為催熟法を改良する手段の一つとしてファドロゾール投与が有効であると思われる。

最後に、先述の結果を受け、未成熟ニホンウナギ雌に 11 - KT を投与し、卵母細胞に及ぼす影響を調べた。ホルモン投与 1 ケ月後の卵母細胞は、11 - KT 投与群ではコントロール群や E2 投与群に比べ油球の蓄積が多く認められた。一方、内因性の E2 の作用が除外される 11 - KT とファドロゾール複合群の卵母

細胞でも、コントロール群や E2 群に比べ油球の蓄積が多く認められた。従って、11-KT は、油球期の卵母細胞の成長を促進することが示された。また、11-KT による卵母細胞への油球の蓄積促進は、極めて低い濃度でも認められた。さらに 11-KT により初期卵成長が進行した個体では、SPH 投与により高い確率で成熟を誘起することができた。このように未熟な雌に 11-KT を投与する方法は、これまでに全く行われていなかった新しい早期成熟技法である。

以上本研究において、人為催熟ニホンウナギの卵巢におけるエストロゲン合成の異常を指摘するとともに、アンドロゲン合成部位が卵巢であることを初めて明らかにした。また、アンドロゲン投与による初期卵成長の促進およびフィドロソール投与による卵成長後期のエストロゲン合成の抑制が、現行の人為催熟法を改良する手段として有効であることを提唱した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山内	皓平
副査	教授	原	彰彦
副査	教授	荒井	克俊
副査	助教授	足立	伸次
副査	助教授	東藤	孝

学位論文題名

ウナギ卵巣のステロイドホルモン合成機構および

卵成長の人為的制御に関する研究

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) は水産養殖上極めて重要な魚種であるが、種苗生産技術は確立していない。現在、サケ脳下垂体 (SPH) を雌魚に毎週1回連続投与することにより受精可能な卵を得ることができるが、受精率や仔魚の生存日数にばらつきが大きく、シラスウナギにまで達した個体は得られていない。安定した種苗生産を可能とする最適な催熟技術の確立には、卵質の向上が不可欠である。

硬骨魚類の卵黄形成はエストラジオール-17 β (E2) に、卵成熟は卵成熟誘起ステロイドに制御されている。従って、ウナギの卵形成過程を理解して統御し良質な卵を得るためには、卵濾胞組織におけるステロイド合成機構に関する詳細な研究が必要である。しかし、ニホンウナギ卵巣におけるステロイド合成については不明な点が多い。そこで本研究では、人為催熟ニホンウナギ卵巣のステロイド合成機構に関するより詳細な知見の集積を行うとともに、天然ニュージーランドウナギ *Anguilla dieffenbachii* におけるそれと比較することで問題点を明らかにし、それらの情報をもとに人為催熟法を改良することを目的として実験を行った。

先ず人為催熟ニホンウナギ雌の血中ステロイド量の変化を調べたところ、E2 は卵成長後期に急増した。次に、卵巣の発達段階ごとの5種のステロイド合成酵素遺伝子の発現量を定量した。その結果、E2合成酵素である P450arom は、卵黄形成中期に最高値を示し、卵黄形成中期以降は減少する傾向が認められた。しかし、自発産卵を行う他魚種において卵成長後期に血中 E2 量や P450arom mRNA 量が高値を示す例はないため、人為催熟ニホンウナギのエストロゲン合成は正常ではないことが示唆された。また、雄魚特有のアンドロゲンと考えられていた11-ケトテストステロン (11-KT) も雌血

中に検出され、E2と同様の変化を示したことから、11-KTが卵成長に関与している可能性が考えられた。

次に、ニホンウナギ雌の各組織における11-KT合成酵素であるステロイド11 β -水酸化酵素(P45011 β)の発現を調べたところ、脳、脳下垂体、頭腎、卵巢で認められた。また、それらの組織と11-KTの合成能を比較した結果、11-KTは主に卵巢で合成されていることが判明した。そこで卵巢におけるP45011 β のmRNA量および活性の変化を調べたところ、mRNA量および活性ともに卵黄形成後期に最高値を示し、その後わずかに減少した。この変化は血中11-KT量の変化に類似していた。従って、P45011 β のmRNA発現および活性は血中11-KT量の変化を反映していることが示された。また、11-KTの受容体である2種のアンドロゲン受容体(AR)mRNAの卵巢における発現を調べたところ、AR β はAR α よりも高い発現をみせた。従って、卵巢ではAR β が主要なARであることが示唆された。このようにウナギ雌の卵巢において、11-KTが合成され、その受容体であるARの発現が認められたことから、11-KTが卵巢においてなんらかの作用を担っていると考えられた。

さらに、天然ニュージーランドウナギと人為催熟ニホンウナギとで血中ステロイドホルモン量と卵巢のステロイド合成酵素mRNA量を比較した。その結果、ニホンウナギのE2量およびP450arom mRNA量はニュージーランドウナギに比べ有意に高値を示した。これらの結果、人為催熟ニホンウナギのE2とP450arom mRNAの発現はニュージーランドウナギに比べ過剰に発現していることが示唆された。そこで、卵成長後期に過剰合成されるE2を抑制するために、P450arom阻害剤であるファドロゾール投与実験を行った。その結果、血中E2量の上昇を抑制することができ、天然状態に近いと思われる囲卵腔の広い受精卵を得ることができた。従って、人為催熟法を改良する手段の一つとしてファドロゾール投与が有効であると考えられた。

最後に、先述の結果を受け、未成熟ニホンウナギ雌に11-KTを投与し、卵母細胞に及ぼす影響を調べた。ホルモン投与1ヶ月後の卵母細胞は、11-KT投与群ではコントロール群やE2投与群に比べ油球の蓄積が多く認められた。従って、11-KTは油球期の卵母細胞の成長を促進することが示された。また、11-KTによる卵母細胞への油球の蓄積促進は、極めて低い濃度でも認められた。さらに11-KTにより初期卵成長が進行した個体では、SPH投与によって高い確率で成熟を誘起することができた。このように未熟な雌に11-KTを投与する方法は、これまでに全く行われていなかった新しい早期催熟技術である。

上記のように、本論文では人為催熟ニホンウナギの卵巢におけるエストロゲン合成の異常を指摘するとともに、アンドロゲン合成部位が卵巢であることを初めて明らかにした。また、アンドロゲン投与による初期卵成長の促進およびファドロゾール投与による卵成長後期のエストロゲン合成の抑制が、現行の人為催熟法を改良する手段として有効であることを提唱した。これらの結果は、現行のニホンウナギ人為催熟法を

改良するばかりではなく、魚類の増養殖技術開発における重要な基礎的知見を提供したものと高く評価され、本論文が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。