

学位論文題名

Physiological Studies of the
Serial Sex Changing Fish, *Trimma okinawae*

(両方向性転換魚オキナワベニハゼの生理学的研究)

学位論文内容の要旨

脊椎動物の性は、基本的には配偶子の遺伝情報により決定される。その後胚発生あるいは初期発生の過程で生殖腺の性分化が起こる。一般的に、一旦分化した性は異なる性に転換されることはない。しかし魚類の中には性転換し、一生の間に両性を経験するものが少なくない。魚類の性転換は様々な様式が報告されているが、性転換の開始及びその進行には共通した因子やメカニズムが存在すると考えられる。しかし、これまでは、生態学、行動学的見地からの研究が多く、生理学的知見の収集は遅れている。これらの情報を得ることは、魚類の性転換のメカニズムの解明ばかりではなく、脊椎動物の性分化機構解明のためにも重要であると考え本研究を開始した。

本研究には両方向の性転換様式を持つオキナワベニハゼ (*Trimma okinawae*) を用いた。両方向の性転換様式は、今まで報告されている雌性先熟、雄性先熟の性転換様式と比べ、同一個体において繰り返し性転換を再現できることから魚類の性転換や生殖腺の性分化の機構を研究する上で優れたモデルになると考えられる。

1) 両方向性転換の時間軸の決定:

オキナワベニハゼの性転換は、社会構造の変化が直接となり起こることが明らかにされているが、どのような時間経過で起こるのかについては明らかされていない。そこで、本研究ではまず、飼育実験により両方向性転換を誘導し、性転換時の行動変化と性転換に要する期間を調べた。その結果、性行動は性転換の方向にかかわらず、およそ30分で変化することがわかった。また、条件が整ってから(雌から雄への性転換は大小雌のペア、雄から雌への性転換は大小雄のペア)最初の産卵が起こることを指標とした場合に、雌から雄へは性転換5日間、一方雄から雌へは10日間で完了することが明らかになった。

2) 芳香化酵素 (Cytochrome P450 aromatase, P450arom) 遺伝子の両方向性転換過程における発現変化:

エストロゲン生成の鍵酵素である P450arom が性転換に重要な役割を果たすことが他の性転換魚で明らかにされつつある。本研究では両方向性転換における P450arom の役割を明らかにする目的で、2種類の P450arom をクローニングし、性転換過程における卵巣内での発現変化を調べた。その結果、主に卵巣に強く発現する P450arom (P450aromA) は正常

産卵雌の卵形成期に高い発現を示すとともに、性転換過程においては常に高い発現を維持することがわかった。一方、主に脳に強く発現する P450aromB は、卵形成期には常に低い発現を示したが、性転換期には低値ながら、明らかな変化を示した。また、いずれの P450arom 遺伝子の 5' 上流域にも TATA、CRE、ERE 配列が認められたが、P450aromA 遺伝子にのみ Ad4 配列が存在した。以上の結果より、P450aromA は他の魚類と同様に卵黄形成に重要な役割を果たしていると考えられる。一方、性転換期を通じての卵巣での P450aromA の高い発現は、本種における P450aromA の性転換時における主な役割が卵巣維持であることを強く示唆する。しかし、性転換時における P450aromB の低値での変動についての生理的意味は現在ところの不明である。また、P450aromA の発現は Ad4BP/SF-1 で制御されている可能性が示唆された。

3) 転写調節因子 Ad4BP/SF-1 の発現変化：

P450arom の発現制御機構を調べるために、ステロイド代謝酵素遺伝子群の転写調節因子の一つとして知られている Ad4BP/SF-1 遺伝子をクローニングするとともに、この遺伝子の卵形成期及び性転換過程における卵巣内での発現変化を調べた。その結果、Ad4BP/SF-1 遺伝子の発現は卵形成期に高値を示すとともに、性転換時には発現量が変動し、雌期に高く、雄期に低かった。以上のことから、Ad4BP/SF-1 は卵形成期の卵巣における P450aromA 遺伝子の発現を制御していることが示唆された。また、Ad4BP/SF-1 の発現が社会構造の変化による刺激で調節されており、そのことが卵巣の活性化に何らかの作用を及ぼしているのではないかと考えられた。

4) 性転換時における生殖腺刺激ホルモン受容体の役割：

下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン (gonadotropin、GtH) は、受容体を介して生殖腺の機能/発達を調節している。しかし、精巣と卵巣を同時に持つオキナワベニハゼでの GtH の作用機構は不明である。そこで 2 種類の GtH 受容体 (FSHR、LHR) をクローニングし、生殖腺での発現を調べた。その結果、2 種類の GtH 受容体はいずれも、雄として機能している時には、精巣に強く発現し、卵巣での発現はきわめて低かった。逆に、雌として機能している時には、精巣での発現は低く、卵巣で強く発現していた。一方、性転換時生殖腺での発現は、性転換の方向に従って急速に変動することが初めて明らかになった。すなわち、雌から雄への性転換時には、卵巣から精巣、雄から雌への性転換時には精巣から卵巣へとその発現部位が急速 (1 日以内) に切り替わった。以上の結果より、ベニハゼの GtH の作用は受け手側である受容体により調節されており、その発現局在は性転換によって明確に切り替わることが示された。これらの結果は、GtH/GtH 受容体系がオキナワベニハゼの両方向性転換に重要な役割を果たすことを強く示唆する。

これまでの性転換に関する研究は、一過性で不可逆的な性転換を行う種を用いての解析が多く、可逆的な両方向の性転換を行う種での研究は行われていなかった。本研究で得られた結果は、魚類性転換のメカニズムの解明に役立つものと考えられる。また、初期発生期に起こる生殖細胞の分化、成長、成熟機構等の研究の発展にも寄与するものと期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	鈴木	範男
副査	教授	高橋	孝行
副査	教授	浦野	明央
副査	助教授	清水	隆
副査	助教授	田中	実

学位論文題名

Physiological Studies of the Serial Sex Changing Fish, *Trimma okinawae*

(両方向性転換魚オキナワベニハゼの生理学的研究)

魚類の生殖様式は様々なものが報告されている。その多くが雌雄異体で一旦決定された性が変わることは無いが、雌雄同体で、一生の間に性転換を行う種が少なからず報告されている。その性転換の開始及び進行には共通したメカニズムが存在することが考えられる。しかし、報告されている多くの性転換様式が一過性で不可逆的なものであることから、その解析は遅れている。近年、同一個体が両方向に繰り返し性転換出来る新たな性転換様式がオキナワベニハゼ (*Trimma okinawae*)において見いだされた。このことは魚類の性転換機構を解明する上で優れたモデルになると考えられる。

本学位論文は、魚類の性転換機構の解明を目的として、オキナワベニハゼを用い両方向性転換過程における生理変化を解析したものである。

学位論文は4章からなり、第1章では、両方向性転換時の行動変化及び性転換に要する日数を明らかにした。第2章では、性転換に重要な働きを持つと考えられている芳香化酵素 (P450 aromatase, P450arom) の性転換時における卵巣内での発現挙動を解析した。その結果、2種類のP450aromがクローニングされ、そのうちP450aromAは他の魚類と同様に卵形成盛期の卵巣で強い発現がみられ、性転換時にも常に高い発現を示した。一方、P450aromBは脳に強く発現し、性転換時の卵巣で低値ながらも変動を示した。また、いずれのP450arom遺伝子の5'上流域にもTATA、CRE、ERE配列が認められたが、P450aromA遺伝子にのみAd4配列が存在した。これらの結果から、P450aromAが卵巣の機能、特に卵形成促進、さらには性転換期における卵巣の維持に働くことが考えられた。第3章では、ステロイド代謝酵素遺伝子の転写調節因子の一つであるAd4BP/SF-1のcDNAを単離し、その性転換に伴う卵巣内での発現挙動を解析した。その結果、Ad4BP/SF-1の発現は、性転換の雌期では高く、雄期では低い発現量を示した。これらの結果は、性転換の刺激により、Ad4BP/SF-1の発現が調節され、そのことが卵巣の活性化に繋がるのではないかと考えられた。第4章では、脳-生殖腺の関係を調べるため、生殖腺内での生殖腺刺激ホルモン受容体遺伝子の発現を調べた。その結果、FSHRとLHRともに、雌期には卵巣に、雄期には精巣に強い発現が見られた。また、いずれの受容体の発現も、雄から雌への性転換時には精巣から卵巣へ、雌から雄への性転換時には卵巣から精巣へと1日以内に急速に変化した。このことは、ベニハゼのGtHは受け手側である受容体により作用調節されており、この2種のGtH受容体遺伝子の発現のオン、オフが性転換時に重要な役割を果たしていることが考えられた。

以上の研究結果は、魚類性転換機構の新たな理解に資するものである。よって著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認める。