

学位論文題名

Studies on pre-and early vitellogenic oocyte growth
in Japanese eel, *Anguilla japonica*

(ニホンウナギ, *Anguilla japonica* の初期卵成長に関する研究)

学位論文内容の要旨

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) は日本の養殖業において重要な魚種であり、人工種苗生産技術の確立が強く求められている。ニホンウナギは飼育環境下では成熟しないため、サケ脳下垂体抽出物 (SPE) を投与することで卵黄形成を誘導し、核移動期に達した個体に卵成熟誘起ステロイドを投与することで成熟卵を得ている。しかし、人為催熟により成熟まで達する雌の割合は安定せず、また、得られる卵の卵質が悪いことが多く、孵化率と仔魚の生残率が安定しない。従って、ニホンウナギの人工種苗生産技術を確立するためには、催熟法の改善が不可欠である。そのためには、ニホンウナギの卵形成機構について詳細に理解し、人為的に統御する必要がある。

魚類の卵形成は生殖腺刺激ホルモン (GTHs: Fsh, Lh) -性ステロイド系によって制御されている。卵成長期は第一次成長期と第二次成長期 (油球期および卵黄形成期) に大別される。魚類に特有なアンドロゲンである 11-ケトテストステロン (11KT) は、雌の血中に高濃度で存在し、油球期の卵成長を促進することが解かっている。しかし、生体内において油球期を含む前卵黄形成期の卵成長がどのように制御されているかについてはほとんど解かっていない。

ニホンウナギの人為催熟には、稚魚期にエストラジオール-17 β (E2) を投与し、淡水中で養成した雌化ウナギが主に用いられている。雌化ウナギの卵巣の発達は油球期後期で停止する。一方、天然の河川で捕獲される産卵回遊を開始した銀ウナギの卵巣の発達ステージは卵黄形成初期である。催熟時の成熟率は、催熟開始時の卵巣の発達ステージの影響を受け、卵径が約 180 μ m (油球期後期) に達したウナギは SPE の投与により成熟まで達することが解かっている。従って、催熟時の成熟率が安定しない原因の一つは、雌化ウナギの卵巣の発達ステージが未熟であることによると考えられる。しかし、これらの詳細は調べられていない。

そこで本研究では、まず、(1) 淡水中で養成した雌化ウナギの卵成長、生殖関連ホルモンおよび卵形成関連因子の周年変化を詳細に調べた。次に、(2) 雌化ウナギの卵巣の発達ステージと生殖関連ホルモンの発現に及ぼすアンドロゲンの投与、水温、塩分の影響を調べた。さらに、ウナギの卵形成における 11KT の作用機構を明らかにするために、(3) 各発達ステージの卵巣におけるアンドロゲンレセプター (*ar*) の発現を解析した。

(1) 雌化ウナギの卵成長、生殖関連ホルモンおよび卵形成関連因子の周年変化

雌化ウナギの卵巢の発達ステージは養成1年後には油球期初期であったが、夏にかけて多くの個体が油球期後期へと成長した。体重が小さい個体は卵成長が遅れる傾向があった。卵黄形成は9月に開始した。9月までは、Fsh β サブユニット (*fshb*) の発現は高値を維持した。Lh β サブユニット (*lhb*) の発現は体成長、卵成長に伴い増加したのに対し、成長ホルモン (*gh*) の発現は低下した。血中11KT量は比較的低値を示し、明確な変化はなかった。秋から冬にかけて水温を低下させて飼育した結果、9月以降には卵巢が顕著に発達し、11月から翌年の2月にかけてピーク(卵黄形成初期)に達した。9月から11月には *fshb*、*lhb* の発現は高く、また、血中11KT量が顕著に高まった。血中E2量は12月までは明確な変化は認められなかったが、1月以降にわずかに上昇した。1月から2月には、*fshb*、*lhb* 発現が減少し、1月下旬から3月にかけて、主に卵黄形成初期の卵母細胞からなる先頭卵群の退行がみられた。この卵巢の退行の原因はGTH発現の減少によると推察された。1月から4月には卵巢のFsh受容体 (*fshr*) の発現が減少する傾向がみられた。4月には、卵巢中に卵黄形成初期の卵母細胞が占める割合が低下した個体が出現した。

上記の結果より、ウナギの油球期から卵黄形成初期の卵成長におけるGTH-11KT系の重要性が示された。また、雌化ウナギの催熟は、卵巢ステージが油球期後期に達し、卵黄形成が開始する養成2年目の9月以降に行うのが適切であると考えられた。さらに、翌年の1月以降には卵巢が退行し、春季には卵巢中の卵群組成が変化すること、また、卵巢の *fshr* の発現が低下することは催熟時の成熟率、卵質に悪影響を与えると推察された。

(2) 雌化ウナギの卵巢ステージと生殖関連ホルモンの発現に及ぼすアンドロゲンの投与、水温、塩分の影響

養成2年目の5月と9月に雌化ウナギに11KTを投与した結果、5月の実験では効果がみられなかったのに対し、9月の実験では11KTの投与により卵成長が促進されたことから、11KTの卵成長促進作用には季節による差があることが解かった。この結果を踏まえ、6月から9月にかけて雌化ウナギに合成アンドロゲンである17 α -メチルテストステロン (MT) の経口投与を行った結果、顕著な卵成長が認められ、すべての個体が人為催熟可能な卵徑に達した。この結果は、雌化ウナギにMTの経口投与を行うことで、卵巢の発達ステージが油球期後期に達するまでの養成期間を短縮でき、多くの個体を人為催熟に用いることができることを示している。

また、養成2年目の9月から飼育水温を低下させた雌化ウナギでは、血中11KT量が顕著に上昇し、油球期後期以降の卵成長が起こるのに対し、高水温で飼育した群ではこれらの変化は起こらなかった。このことから、ニホンウナギにおける秋季の血中11KT量の上昇を引き起こす外部環境要因は水温の低下であり、その結果、油球期後期以降の卵成長が起こり、淡水飼育下でも卵巢の発達ステージが卵黄形成初期に達することが解かった。

さらに、雌化ウナギを冬季に海水中で蓄養した結果、春季の卵巢は淡水中で蓄養したウナギに比べて発達しており、海水で蓄養したウナギの卵母細胞でのみ卵黄球が認められた。また、海水中で蓄養したウナギの脳下垂体の *lhb* 発現は淡水中で蓄養したウナギに比べて顕著に高値を示した。このことから、塩分はウナギの卵成長に影響を及ぼす外部環境要因の一つであり、冬季に雌化ウナギを海水中で蓄養することで、春季にも卵巢が発達したウ

ナギが得られることが示された。

(3) 卵巣の *ar* の発現解析

各発達段階の卵巣と成熟卵の *ar* 発現を調べた結果、*ar* mRNA 量は油球期後期から卵黄形成期に高値を示した。成熟卵では *ar* mRNA はほとんど検出されなかった。また、*ar* mRNA は油球期初期の卵巣では濾胞細胞と卵原細胞で、それ以降のステージでは主に濾胞細胞で発現していた。このことから、11KT は主に油球期から卵黄形成期に濾胞細胞の Ar を介して卵成長促進作用を及ぼすと考えられた。

以上、本研究では、催熟前の雌化ウナギの淡水飼育環境下での卵巣ステージと生理状態の周年変化の詳細を明らかにした。淡水で養成した雌化ウナギの卵巣の発達ステージが銀ウナギの卵巣に相当する卵黄形成初期に達したのは初めての報告である。これらの知見により、雌化ウナギを用いた人為催熟の成績が変動する原因の一部を明らかにできた。また、ニホンウナギの人為催熟法の効率を高める効果的なアンドロゲンの投与法が確立された。さらに、雌化ウナギの卵巣ステージと生殖関連ホルモンの発現に及ぼす水温と塩分の効果が明らかになり、雌化ウナギの効果的な養成法を確立するための基礎的知見を提供した。さらに、卵巣発達に伴う *ar* 発現の詳細が卵生脊椎動物で初めて明らかになった。これらの結果はニホンウナギの卵形成機構の解明と人為催熟法の改善のための重要な基礎的知見になることが期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	足立伸次
副査	教授	原彰彦
副査	准教授	東藤孝
副査	准教授	井尻成保
副査	助教	平松尚志

学位論文題名

Studies on pre-and early vitellogenic oocyte growth in Japanese eel, *Anguilla japonica*

(ニホンウナギ, *Anguilla japonica* の初期卵成長に関する研究)

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) は日本の養殖業において重要な魚種であり、人工種苗生産技術の確立が求められている。ニホンウナギは飼育環境下では成熟しないため、サケ脳下垂体抽出物 (SPE) を投与することで卵黄形成を誘導し、核移動期に達した個体に卵成熟誘起ステロイドを投与することで成熟卵を得ている。しかし、人為催熟により成熟まで達する雌の割合は安定せず、また、得られる卵の卵質が悪いことが多く、孵化率と仔魚の生残率が安定しない。従って、ニホンウナギの人工種苗生産技術を確立するためには、催熟法の改善が不可欠である。そのためには、ニホンウナギの卵形成機構について詳細に理解し、人為的に統御する必要がある。

ニホンウナギの人為催熟には、稚魚期にエストロゲン (女性ホルモン) 経口投与された雌化ウナギが主に用いられている。人為催熟前の雌化ウナギの卵巢は個体により発達度が異なっているが、卵巢発達に影響する因子およびその作用機構は全く不明であった。そこで本研究では、先ず、(1) 雌化ウナギの卵成長、生殖関連ホルモンおよび卵形成関連因子の周年変化を詳細に調べた。次に、(2) 雌化ウナギの卵巢の発達ステージと生殖関連因子の発現に及ぼすアンドロゲン (男性ホルモン) の投与、水温および塩分の影響を調べた。さらに、(3) 各発達ステージの卵巢におけるアンドロゲン受容体 (*ar*) の発現を解析した。

(1) 淡水中で養成した雌化ウナギの卵成長、生殖関連ホルモンおよび卵形成関連因子の周年変化を解析した結果、養成2年目の夏にかけて、多くの個体の卵巢ステージは SPE の投与による人為催熟が可能になる油球期後期 (卵径約 180 μm) へと成長した。体重が

小さい個体は卵成長が遅れる傾向があった。卵黄蓄積は9月に開始した。9月までは、濾胞刺激ホルモンβサブユニット (*fshb*) の発現は高値を維持した。黄体形成ホルモンβサブユニット (*lhb*) の発現は体成長、卵成長に伴い増加した。血中11-ケトテストステロン (11KT) 量は比較的低値を示し、明確な変化はなかった。秋から冬にかけて水温を低下させた結果、9月以降には卵巢が顕著に発達し、11月から翌年の1月にかけてピーク (卵黄形成初期) に達した。9月から11月には *fshb*、*lhb* の発現は高く、また、水温の低下により血中11KT量が顕著に高まった。1月から2月には、*fshb*、*lhb* 発現が減少し、1月下旬から3月にかけて、先頭卵群の卵母細胞の退行がみられた。この卵母細胞の退行の原因は生殖腺刺激ホルモン (GTHs) 発現の減少であると推察された。また、1月から4月には卵巢の Fsh 受容体 (*fshr*) の発現が減少する傾向がみられた。

上記の結果より、ウナギの油球期後期から卵黄形成初期の卵成長における GTHs-11KT 系の重要性が示された。さらに、1月以降には卵巢が退行すること、また、卵巢の *fshr* の発現が低下することは、人為催熟時の成熟率、卵質に悪影響を与えると推察された。

(2) 養成2年目の6月から9月にかけて雌化ウナギに合成アンドロゲンである 17α -メチルテストステロン (MT) の経口投与を行った結果、顕著な卵成長が認められ、すべての個体の卵巢は人為催熟が可能な発達ステージに達した。この結果は、雌化ウナギに MT の経口投与を行うことで、卵巢の発達ステージが油球期後期に達するまでの養成期間を短縮でき、多くの個体を人為催熟に用いることができることを示している。

さらに、雌化ウナギを冬季に海水中で蓄養した結果、春季の卵巢は淡水中で蓄養したウナギに比べて発達しており、海水で蓄養したウナギの卵母細胞でのみ卵黄球が認められた。また、海水中で蓄養したウナギの脳下垂体の *lhb* 発現は淡水中で蓄養したウナギに比べて顕著に高値を示した。このことから、飼育水の塩分がウナギの卵成長に影響を及ぼす外部環境要因の一つであることが示された。

(3) ウナギの卵形成における 11KT の作用機構を明らかにするために、各発達段階の卵巢と成熟卵の *ar* 発現を調べた結果、*ar* mRNA 量は油球期後期から卵黄形成期に高値を示した。成熟卵では *ar* mRNA はほとんど検出されなかった。また、*ar* mRNA は油球期初期の卵巢では濾胞細胞と卵原細胞で、それ以降のステージでは主に濾胞細胞で発現していた。このことから、11KT は主に油球期から卵黄形成期に濾胞細胞の Ar を介して卵成長促進作用を及ぼすと考えられた。

以上、本研究では、淡水飼育された雌化ウナギの卵巢ステージは周年変化することを明らかにした。また、飼育水の塩分やアンドロゲン投与が卵成長を促進することを明らかにした。さらに、ウナギの卵巢発達に伴う *ar* 発現の詳細が初めて明らかになった。これらの結果はニホンウナギの卵形成機構の解明と人為催熟法の改善のための重要な基礎的知見を

提供したものと高く評価され、審査員一同は申請者が博士（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。