

受賞者総説

魚類の性分化と生殖に関する内分泌学的研究*1

(平成 11 年度日本水産学会賞進歩賞受賞)

中 村 將*2

帝京大学法学部一般教育

1. はじめに

一般に魚類では、発生の途上で生殖腺の原基が形成される。次いで、卵巣、精巣への分化が始まる。未熟な時期を経て、その後、性成熟へと向かう。このうち成熟期の生殖腺発達の内分泌調節機構の詳細については明らかにされてきているが、¹⁾ 性分化期および未熟期の生殖腺発達の内分泌調節機構についての知見は乏しい。著者は、主にティラピア類およびサケ科魚類を用いて生殖腺の性分化、および未熟な時期の生殖腺発達の内分泌調節機構を、実験形態学的、微細構造学的、免疫細胞化学的および分子生物学的手法により明らかにしてきたので概説する。

2. 魚類性分化の形態

硬骨魚類の生殖腺の性分化の形態的特徴を明らかにするために、ティラピア *Oreochromis mossambicus*, サクラマス *Oncorhynchus masou*, シロサケ *Oncorhynchus keta*, アメマス *Salvelinus leucomaenis*, キンギョ *Carassius auratus*, メダカ *Oryzias latipes*, カダヤシ *Gambusia affinis* の生殖腺分化過程を組織学的に調べた。²⁻⁶⁾ 硬骨魚の性的未分化期の生殖腺原基は、両生類以上の脊椎動物で見られるような起源の異なる体細胞組織の二層構造(髄層、皮層)は見られず、体腔上皮由来の体細胞からなる単一構成で、基本的に同一性の性分化過程を見せる。この時期のティラピアの生殖腺の生殖原細胞の数は40個足らずと少ない。卵巣の分化は、卵原細胞の急速な分裂、増殖と減数分裂前期への卵母細胞への移行により明らかとなる。生殖細胞の変化に加えて、ティラピア、キンギョでは体細胞の卵巣腔の形成への挙動も卵巣分化開始の指標となった。一方、精巣の生殖細胞は変化に乏しく生殖細胞から精巣分化を明らかにすることは困難であるが、生殖腺の体細胞組織中での輸精管原基の形成やそれに付属する血管系の分化をもってその指標とな

しうることを明らかとした。また、メダカとカダヤシでは、生殖腺基部に体細胞の顕著な集塊の形成が精巣分化の開始を示していた。この様に精巣の形態的分化の開始は、生殖腺の体細胞要素の種に特徴的な形態分化により明らかとなる。

3. 性ホルモン処理による人為的性の統御

Yamamoto⁷⁾ がメダカで性分化期の性ホルモン処理により人為的性転換を誘導することが可能であることをはじめ証明して以来、数多くの魚種で性ホルモンによる性転換が試みられてきた。これらの結果は、すでにくつかの総説としてまとめられている。⁸⁻¹⁰⁾ 著者も魚類性分化の特質を明らかにするため、ティラピア類およびサケ科魚類を用いて性ホルモン処理により性転換を誘導する上で最も有効な適期を検討してきた。^{2,6,11-14)} ティラピア *O. mossambicus* の性分化は孵化後20日に卵巣、精巣ともに形態的に明らかになる。エストロジェンのエチニールエストラジオールで経口処理すると、完全な雌化は孵化6日から25日までの性的未分化期から性分化が完了するまでの期間処理した群で得られた。性的未分化期、あるいは性分化期だけの処理では性分化への影響は認められなかった。両時期を10日に渡って処理した群で間性個体が出現した。このことから、ティラピアの外因性性ホルモンに対して最も感受性の強い時期は孵化後10日から25日にあると結論された。アンドロジェンのメチルテストステロン(MT)および11-ケトテストステロン処理においても、孵化後7日から25日までの処理が雌化に有効な期間であることを明らかにした。これらの実験結果から、形態的性分化に先立ちすでに生理的性分化を引き起こしている可能性がうかがわれた。性ホルモンにより完全かつ機能的性転換を誘導するには処理を生理的性分化期前から始め形態的性分化が完了するまで継続しなければならないことを明らかにした。この結

*1 Endocrinological Studies on Sex Differentiation and Reproduction in Fish.

*2 Masaru Nakamura (Faculty of Jurisprudence, General Education, Teikyo University, Otsuka 359, Hachioji, Tokyo 192-0352, Japan).

果を基礎にして、ティラピア *O. niloticus* の MT による雄化の実用化法を開発した。¹⁵⁾

遺伝的に性を統御したアマゴ *Oncorhynchus rhodurus* 全雌を用いて、孵化 20-25 日目の性分化期を中心とした様々な時期に MT (400 $\mu\text{g}/\text{l}$) 2 時間だけの浸漬処理を行い雄化に有効な時期を検討した。¹⁶⁾ 孵化後 17 日目の形態的性分化期直前に処理した群において他の時期の処理群よりも高率で雄化する時期があることを明らかにした。

4. 性分化とステロイドホルモン産生細胞

Yamamoto⁸⁾ はメダカを用いて仔魚期の性ホルモンを含む種々のステロイドホルモン処理を行った結果、エストロジェンが雌化を、アンドロジェンが雄化を特異的に誘導することから、性分化時に遺伝的雌の生殖腺ではエストロジェン(様物質)が分泌され、遺伝的雄ではアンドロジェン(様物質)が分泌されそれぞれ卵巣と精巣へと誘導するとする性ホルモンの性分化誘導物質説を唱えた。しかし、性分化期の生殖腺は著しく小さくこの時期に性ホルモンが合成されているかを証明するのは困難であった。性ホルモンは生殖腺ではステロイドホルモン産生細胞 (SPC) により合成、分泌されている。ティラピア *O. niloticus* を用いて性分化に伴う SPC の分化、発達について微細構造学的に調べた。^{17,18)} その結果、成熟した卵巣、精巣にある SPC の形態的特徴を持つ SPC は性分化期の生殖腺ですでに分化していることを明らかにした。アマゴ (*O. rhodurus*) でも同様に SPC は卵巣分化時に分化することを確認した。¹⁹⁾ この様に性分化期の生殖腺に SPC が認められることから、ステロイドホルモンが合成され性分化に関係している可能性を明らかにした。ティラピアの卵巣では、その後分化に伴い SPC は、血管周辺で徐々に増殖する。その後集塊をなして卵巣薄板の中心部分へと移動して発達した周辺期の卵母細胞を取り囲み莢膜細胞となることを明らかにした。²⁰⁾ 一方、精巣では、分化後の SPC の増殖は緩やかで、精子形成直前の精原細胞が増加する時期と一致して急激な増加が見られた。¹⁸⁾ これらの観察過程で SPC の細胞表面に神経終末が終わっていることを明らかにし、神経によるステロイドホルモン産生調節の可能性を示唆した。^{21,22)}

5. 性分化とステロイド代謝酵素の発現

性分化期に出現する SPC でどのようなホルモンが合成、分泌されているかは不明であった。ステロイドホルモンの生合成には種々のステロイド代謝酵素が関与している。最近、魚類のステロイド代謝酵素をコードする cDNA がクローニングされ、塩基配列が決定された。²³⁾

演繹されたアミノ酸配列を基に合成ペプチドを作成し、これらを抗原として 4 種類のステロイド代謝酵素 (コレステロール側鎖切断酵素, 3β -水酸基脱水素酵素, 17α -水酸化酵素, アロマターゼ) のポリクロナール抗体が作成された。この抗体を用いてティラピア *O. niloticus* の性分化に伴う生殖腺の免疫細胞化学的方法 (ICC) により酵素の発現を調べた。その結果、雌雄混合群では、性分化前の魚の半数個体の生殖腺にアロマターゼを含む 4 種類の抗体に免疫陽性反応を示す大型の細胞が見られた。性分化前の生殖腺ですでにステロイドホルモンの合成が始まっていることを明らかにした。しかし、残りの半数個体の未分化生殖腺では全く反応は見られなかった。卵巣の分化時、分化後で 4 種類の抗体に強い免疫陽性反応を示すのに対して、精巣では性分化時には反応は全く見られず分化後しばらくしてアロマターゼ以外の 3 種類で弱い反応が見られる様になった。強い反応は精子形成が活発となる直前の精巣で現れた。このことから、性分化前に酵素群が発現しホルモンの合成が始まるのは遺伝的雌の生殖腺で、発現がないのが遺伝的雄の生殖腺であると考えられた。このことを確かめるために、遺伝的雌を MT により性転換させ偽雄 (XX) を作り正常な雌 (XX) との交配により全雌群を作成して同様に調べたところ、性分化直前の全ての個体の生殖腺には 4 種類の抗体に陽性反応を示す細胞が見られた。更に、性的未分化期の生殖腺でのアロマターゼ mRNA をインサイチュウハイブリダイゼーション法により検出した結果、発現が確認された。この様に、遺伝的雌の未分化な生殖腺ではエストラジオール- 17β の産生に必要な 4 種類のステロイド代謝酵素群が発現していることから、エストロジェンが合成され卵巣分化の誘導に働いている可能性が強く示唆された (Fig. 1)。²⁴⁾ 一方、精巣の分化過程でステロイド合成酵素の発現が見られないことから、アンドロジェンを含むステロイドホルモンは合成されず精巣分化に直接関与しないと考えられた (Fig. 1)。性ホルモンの欠如がむしろ精巣分化に重要であることを示しているものとして注目される。

6. アロマターゼ阻害剤と性転換

ステロイド代謝酵素の抗体を用いた免疫組織学的結果からエストロジェンが卵巣分化に重要な役割を果たすことが推測された。エストラジオール- 17β の生合成にアロマターゼが重要な働きをすることが知られている。ヒト乳ガンの発達を抑制するためにアロマターゼの酵素活性を阻害し内因性エストロジェンの産生を抑制するアロマターゼ阻害剤 (AI, フェドロゾール) が開発された。ティラピア *O. niloticus* 全雌群を用いて性分化期のエストロジェン産生を AI 処理により抑制させ卵巣分化に及

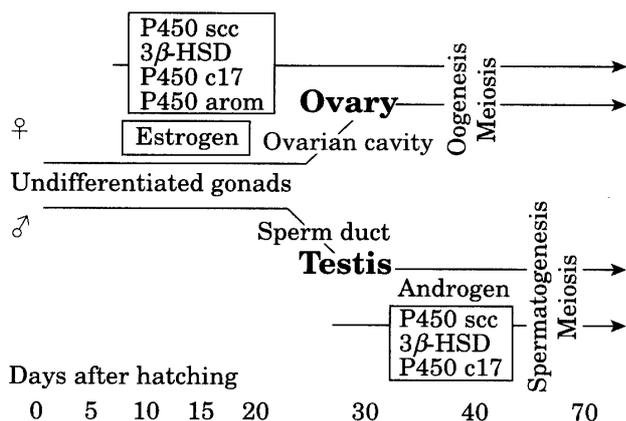


Fig. 1. ティラピア *Oreochromis niloticus* の性分化にともなうステロイド代謝酵素の発現

ばず影響を調べた。その結果、AI (200, 500 $\mu\text{g/g}$ 餌料) の遺伝的全雌群は全て正常な精巣を持つ雄へと性転換した。このことは、エストロジェンが卵巣分化誘導に直接関係していることを示している。エストロジェンの欠如が精巣分化を誘導するものとする。AI 処理による性転換過程におけるアロマターゼを含むステロイド代謝酵素群の発現を ICC 法により調べた。その結果、全ての酵素の発現が見られた。このことは、エストロジェンを合成するための酵素は作られるが AI によりエストロジェンの合成が抑制されて性転換したことを示している。更に、全雌群を用いて AI (500 $\mu\text{g/g}$ 餌料) とエストラジオール- 17β (250 $\mu\text{g/g}$ 餌料) 同時処理を行った結果、全て卵巣へと分化した。このことは、内因性のエストロジェンの合成は抑制されるが、外因性のエストロジェンにより卵巣分化が誘導されることを示した。

AI によって雄化した個体をその後成熟まで育てたところ、雄特有の行動である縄張り作りおよび正常雌との産卵行動を正常に行った。産まれた子供は全て雌であることが確かめられ、AI が完全かつ機能的な性転換をもたらすことを魚類で初めて証明した。

7. 性ホルモンと性転換

ティラピアの性分化過程のステロイド代謝酵素 4 種類の抗体を用いた ICC の結果から、精巣分化にはアンドロジェンを含むステロイドホルモンが関与しないと考えられるが、外因性のアンドロジェンは遺伝的雌の生殖腺を精巣へと転換させる。この理由は不明であった。ティラピア *O. niloticus* 全雌群を用いて MT (50 $\mu\text{g/g}$ 餌料) により精巣を持つ雄へと性転換させ、その過程のステロイド代謝酵素群の発現を ICC で調べた。その結果、性転換過程には酵素群の発現は見られなかった。このことから、外因性のアンドロジェンは直接的又は間接的に酵素群の発現を抑制し、内因性エストロジェンの産生を

低下させる。その結果、精巣への分化の転換が起こったと考えられる。アンドロジェンおよびアロマターゼ阻害剤はともに遺伝的雌を精巣へと性転換させるが、両者の性転換誘導の作用機序が異なることが示唆された。今まで雄へと性転換させる場合経験的にアンドロジェンが使われてきたが、その作用機序の科学的根拠を明らかにすることが出来た。

8. 終わりに

以上のようにステロイドホルモンは、生殖腺原基形成間もない未分化生殖腺で合成、分泌され性分化、未熟生殖腺の発達に決定的な役割を果たしていることを明らかにすることが出来たと考えている。性ホルモン処理による性転換の誘導実験から形態的性分化期以前に生理的性分化期があることを予見した。その後の性分化過程のステロイド代謝酵素の発現の研究から生理的性分化とは、性ホルモンの合成が始まり実際の分化が開始する時期であると考えられる。今後、性分化の研究は、ステロイド代謝酵素遺伝子群発現の調節機構、エストロジェンにより発現する卵巣分化に関連する遺伝子群の発現およびエストロジェンの欠如により発現する精巣分化に関連する遺伝子群の発現、更に性ホルモンのレセプターの発現に関する基礎研究への発展が期待される。

水産学における性分化に関連する研究は多岐に渡っている。本文にも述べた性ホルモンによる性の統御は、多くの魚で試みられてきたが必ずしも成功した例ばかりではない。⁸⁻¹⁰⁾ その失敗の原因については未解決の部分も多い。最近、種々の魚種で温度が性分化期の生殖腺に影響を与えることが報告されてきている。ステロイドホルモンを使うことのない性の統御方法として期待されるが、温度の性分化に及ぼす作用機序については全く魚類では分かっていない。今後水産増養殖の拡大に伴い性ホルモン、温度調節による性の統御が多くの魚種で試みられると考える。

魚類で多く見られる雌雄同体现象、いわゆる成体で見られる性転換の機構についての基礎的研究は乏しい。筆者もベラ *Tharassoma duperrey*、ハマクマノミ *Amphiprion frenatus* を用いて性転換の生理的調節機構の基礎研究を行ってきた。²⁵⁻²⁷⁾ 雌雄同体魚の性転換は、卵巣、精巣組織の分化、発達、退化が同時に進行することにより起こる複雑多様な現象である。この性転換の複雑な機構を解析するには、雌雄異体魚の性分化機構を明らかにし、性分化と関連づけて理解することが必要であると考えられる。雌雄同体魚には、水産学増養殖上重要な魚種であるハタ類、タイ類等が含まれている。これらの魚種の種苗生産の際の性転換の制御が今後重要となると考える。

最近、ヒトの作りだし化学物質が自然界に流失してホルモン様働きをして野生生物の主に生殖に悪影響を及ぼすことが欧米で報告されてきた。筆者らもこの内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）問題を取り上げ多摩川に棲息するコイの野外調査を行いその結果を報告した。^{28,29)}この環境ホルモンは主に生殖腺の分化期に働き、性ホルモンと同様に不可逆的、致命的影響をもたらすもの考えられているがその詳細については今後の研究が待たれている。

以上述べた性分化に関連する水産学上の重要研究課題が魚類性分化の基礎研究を土台としてより一層発展することを期待する。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、長年に渡り御指導を賜った北海道大学高橋裕哉名誉教授、有益なる御助言と貴重な抗体の使用の快諾を戴いた基礎生物学研究所長濱嘉孝教授、終始励ましを戴いた北海道大学山内皓平教授に心から感謝申し上げる。本研究のいくつかは共同研究により行った、協力を戴いた多くの方々に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 長濱嘉孝：生殖、配偶子形成の制御機構、「魚類生理学」（板沢靖男，羽生 功，編），恒星社厚生閣，東京，pp. 242-286, (1981).
- 2) M. Nakamura and H. Takahashi: Gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica*, with special regard to the time of estrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., **24**, 1-13 (1973).
- 3) 中村 将，高橋裕哉，広井 修：サクラマス (*Oncorhynchus masou*) の生殖腺の性分化過程，北海道さけ，ます孵化場報告，**28**, 1-8 (1974).
- 4) M. Nakamura: Morphological and experimental studies on sex differentiation of the gonad in several teleost fish. 北海道大学学位論文，PP. 1-115, Plate 1-38 (1978).
- 5) M. Nakamura: Gonadal sex differentiation in whitespotted char, *Salvelinus leucomaenis*. Japan J. Ichthyol., **28**, 431-436 (1982).
- 6) M. Nakamura: Effects of estradiol-17 β on gonadal sex differentiation in two species of salmonids, the masu salmon, *Oncorhynchus masou* and the chum salmon, *O. keta*. Aquaculture, **43**, 83-90 (1984).
- 7) T. Yamamoto: Artificial induction of functional sex-reversal in genotypic males in medaka (*Oryzias latipes*). J. Exp. Zool., **123**, 571-594 (1953).
- 8) T. Yamamoto: Sex differentiation. In: Fish Physiology. W. S. Hoar and D. J. Randall, eds., Academic Press, New York and London, Vol. III, pp. 117-175 (1969).
- 9) F. Yamazaki: Sex control and manipulation of fish. Aquaculture, **33**, 329-354 (1983).
- 10) G. A. Hunter and E. M. Donaldson: Hormonal sex control and its application to fish culture. In: Fish Physiology. by W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson, eds. Academic Press, New York. Vol. IXb, pp. 223-291 (1987).
- 11) M. Nakamura: Dosage-dependent changes in the effect of oral administration of methyltestosterone on gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica*. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., **26**, 99-108 (1975).
- 12) M. Nakamura: Effects of 11-ketotestosterone on gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica*. Bull. Jap. Soc. Fish., **47**, 1323-1327 (1981).
- 13) M. Nakamura: Feminization of masu salmon, *Oncorhynchus masou* by oral administration of estradiol-17 β . Bull. Jap. Soc. Fish., **47**, 1529 (1981).
- 14) M. Nakamura and H. Takahashi: Sex control in cultured tilapia (*Tilapia mossambica*) and salmon (*Oncorhynchus masou*). Current Trends in Comparative Endocrinology (eds, B. Lofts and W. Holmes). Hong Kong, Hong Kong University Press, 1255-1260 (1985).
- 15) 中村 将，岩橋正雄：ティラピア (*Tilapia nilotica*) の雌性ホルモン処理による雄化の実用化試験，日本誌，**48**, 763-769 (1982).
- 16) M. Nakamura: A study of susceptibility of sex reversal after a single 2-hour treatment of androgen in amago salmon. Fisheries Sci., **60**, 483-484 (1994).
- 17) M. Nakamura and Y. Nagahama: Steroid producing cells during ovarian differentiation of the tilapia, *Sarotherodon niloticus*, Dev. Growth and Differ., **27**, 701-708 (1985).
- 18) M. Nakamura and Y. Nagahama: Differentiation of Leydig cells and, and changes of testosterone levels during testicular differentiation in tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish. Physiol. Biochem., **7**, 211-219 (1989).
- 19) M. Nakamura and Y. Nagahama: Ultrastructural study on the differentiation and development of steroid-producing cells during ovarian differentiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*. Aquaculture, **112**, 237-251 (1993).
- 20) M. Nakamura, J. L. Specker, and Y. Nagahama: Ultrastructural analysis of the developing follicle during early vitellogenesis in tilapia, *Oreochromis niloticus*, with special reference to the steroid-producing cells. Cell Tissue Res., **272**, 33-39 (1993).
- 21) M. Nakamura and Y. Nagahama: Innervation of testes in the tilapia *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, **135**, 41-49 (1995).
- 22) M. Nakamura, J. L. Specker, and Y. Nagahama: Innervation of steroid-producing cells in the ovary of tilapia *Oreochromis niloticus*. Zool. Sci., **13**, 603-608 (1986).
- 23) Y. Nagahama, M. Yoshikuni, M. Yamashita, T. Tokumoto, and Y. Katsu: Regulation of oocyte growth and maturation in fish. Curr. Top. Dev. Biol., **30**, 103-145 (1995).
- 24) M. Nakamura, X. T. Chang, T. Kobayashi, and Y. Nagahama: Gonadal sex differentiation in fish. J. Exp. Zool., **281**, 1-13 (1998).
- 25) M. Nakamura, T. Hourigan, K. Yamauchi, Y. Nagahama, and G. E. Grau: Histological and ultrastructural evidence for the role of gonadal steroid hormones in sex change in the protogynous wrasse *Thalassoma duperryi*. Envir. Biol. Fish., **24**, 117-136 (1989).
- 26) 中村 将：性転換の生理と組織，「魚類の性転換」（中藪明信，桑村哲生，編），東海大学出版会，東京，pp. 48-76 (1987).
- 27) M. Nakamura, T. Mariko, and Y. Nagahama: Ultrastructure and in vitro steroidogenesis of the gonads in the protandrous seaanemonefish *Amphiprion frenatus*. Japan. J. Ichthyol., **41**, 47-56 (1984).
- 28) 中村 将，井口泰泉：多摩川に見る魚類の異変。岩波科学，**7**, 515-517 (1998).
- 29) 中村 将：性分化と環境。海洋，**31**, 304-312 (1999).