

戦略的創造研究推進事業  
発展研究（SORST）

研究終了報告書

研究課題「性的可塑性の分子メカニズム」

研究期間：平成 17 年 11 月 1 日～  
平成 23 年 3 月 31 日

長濱嘉孝  
（自然科学研究機構・基礎生物学研究所、  
特任教授）

## 1. 研究課題名

### 「性的可塑性の分子メカニズムに関する研究」

## 2. 研究実施の概要

脊椎動物における生殖腺と脳の性的可塑性の保持に関する知見はきわめて少ない。この主な原因の一つは適当な実験モデルが欠如していることがあげられる。本研究の大きな特徴は、脊椎動物のなかでも、性的可塑性がもっとも高いと考えられる魚類、特に自然環境下でも成体（魚）が性転換を行う性転換魚をも実験材料に含むことである。本研究は、このような実験材料としての魚類の利点を最大限に生かし、これまで解析が遅れている脊椎動物の性的可塑性について、生殖腺と脳（性行動）における性的可塑性の有無、さらにはその分子メカニズムを明らかにすることを目的として計画された。

性的可塑性の分子メカニズムの研究には実験材料の選択が重要である。本研究の開始にあたって、主要な実験魚として2種の雌雄異体魚、メダカ（*Oryzias latipes*）とティラピア（*Oreochromis niloticus*）を選択した。そのうちメダカは近年発生研究のモデル生物として特に注目されているばかりでなく、我々のグループによって2002年に性決定遺伝子 *Dmy* が同定されているので、魚の本来の（遺伝的な）性を知ることができることが大きな利点である。一方、ティラピアでは全雌群、全雄群が作出されているので性にかかわる研究には有効である。雌雄異体魚に加えて2種の性転換魚、ミツボシキューセン *Halichoeles trimaculatus*、オキナワベニハゼ *Trimma okinawae* 等を実験材料としたことも本研究のユニークな点である。また、平成21年度から吉崎悟朗氏（実験魚としてニジマス、*Oncorhynchus mykiss*）を使用）が新たなメンバーとして加わるとともに、大久保範聡氏（実験魚としてメダカを使用）が班員として再び加わった。したがって、本研究班では、魚類を実験対象とする4つの生殖研究グループが協力しあい、胚・稚魚と成熟成魚の生殖腺と脳における性的可塑性の分子メカニズムについて研究を展開した。これまでに得られた研究成果の概要を以下に述べる。

先のクレスト研究で、ティラピアの精巣分化に *Dmrt1*、卵巣分化に *Cyp19a1* と *Foxl2* が主要な働きをすることを明らかにしたが、メダカについては性決定遺伝子 *Dmy* を脊椎動物で2番目の性決定遺伝子として同定した以外には *Dmy* の有無によって起こる生殖腺の性分化カスケードの実態は不明であった。そこで本研究では、遺伝子サブトラクションやマイクロアレイを用いて新たな性分化関連遺伝子の単離を試みた。まず、得られる遺伝子の機能を調べる上で欠如していた長期間にわたって遺伝子破壊効果が持続できる RNAi によるノックダウン法を新たに開発した。これらの方法を駆使することにより、まず、メダカがマウスなどの哺乳類に比べて性的可塑性が高いことの基本的理由の一つは、X染色体とY染色体との著しい類似性にあることを、メダカの性決定遺伝子 *Dmy* を遺伝子導入したXX雄の表現型解析から明らかにした。次いで、遺伝子の発現解析、機能欠失実験（ノックダウン）、及び機能獲得実験（過剰発現）などにより、精巣分化に *Gsdf*、卵巣分化にエストロゲン受容体β2（*ERβ2*）と R-spondin 1（*Rspo1*）が重要な役割を果たすことを明らかにした。このうち特に *Gsdf* に関しては、ノックダウンや過剰発現の結果、及び性分化時や性転換時における発現解析から、*Dmy* の直下に作動する遺伝子である可能性が強く示唆された。さらに、*Dmy* に関してもノックダウン効果は著しく、性分化期のXYメダカで雄特異的遺伝子群の発現を強く抑制することに加え、雌特異的遺伝子群の発現を強く促進した。これらの新知見を基盤として、胚・稚魚期と成魚期における生殖腺の性的可塑性について解析した。

## 雌雄異体魚（メダカ、ティラピア、ニジマス）を用いた研究

胚・稚魚期では、稚魚期の臨界期生殖腺が高い性的可塑性を示すのは、この時期の雌雄生殖腺の体細胞が性ホルモン処理等に対して高い感受性を有するためであることを明らかにした。このことは、性分化期の雌雄生殖腺の体細胞で性特異的に発現する遺伝子群 (*Dmrt1*, *Gsdf*, *Rspo1*, *ERβ2*, *Foxl2* など) をノックダウンすると性ホルモンを処理しなくても完全な両方向への性転換が誘起されることから証明された。一方、成魚期では、これまで性転換は起こらないとされてきた雌雄異体魚（ティラピア、メダカ）の雌成熟成魚を芳香化酵素阻害剤（AI）で長期間処理することにより卵巣内のエストロゲン合成を抑制することで、機能的な雌から機能的な雄に性転換させることに成功し、雌雄異体種の成体でも性的可塑性が保持されていることを脊椎動物ではじめて実証した。さらに、AI 処理を開始する前のティラピアやメダカの成熟卵巣には卵巣腔の周辺に未分化生殖幹細胞（GSC）と *Sox9a2* を発現する体細胞とから構成されるシストが存在し、エストロゲンの低下にともなってこのシスト中の体細胞で *Gsdf* が発現するようになることでセルトリ細胞に分化し、さらに GSC が精原細胞となり、増殖を経て精巣組織が発達し、精子へと分化することが明らかになった。

生殖細胞の性的可塑性に関してはニジマスを用いて解析を行い、卵原細胞は、生殖腺体細胞の性に依存して雄の生殖細胞に変換しうることを明らかにした。さらに、卵原細胞と精原細胞の分子レベルでの差異を明らかにするため、マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析を行った。その結果、精原細胞と卵原細胞は、両者と始原生殖細胞の距離よりも近い関係にあり、極めて類似した細胞であることを示した。しかし、精原細胞と卵原細胞の間では明瞭に発現パターンの異なる遺伝子も存在していた。とくにプロタキニン は始原生殖細胞では全く発現していないが、精原細胞へと分化することで発現が開始することが明らかとなった。

## 性転換魚（ミツボシキウセン、クマノミ、オキナワベニハゼ）を用いた研究

ミツボシキウセンなどの性転換魚を用いた研究から、社会構造の変化にともない起こる雌から雄への性転換は卵巣におけるエストロゲン合成の低下が引き金となって誘起されることが明らかとなった。また、GSC とそれらを取り囲む体細胞から構成されるシストが成熟雌の卵巣全体に分布し、エストロゲン低下の直後にこの体細胞で *Gsdf* の発現が起こり精巣組織の発達へと続くことが示された。ただこの場合には、*Cyp19a1* の発現は減少するものの、雌雄異体魚では卵巣特異的な遺伝子である *Foxl2* は精巣組織にそのまま残存していることが特徴である。

## 脳の性的可塑性に関する研究

脳における性的可塑性の分子メカニズムに関する研究では、まず雌雄の成熟メダカを性ホルモン（雌にはメチルテストステロン、雄にはエストラジオール-17β, E2）で処理することで、処理 2-4 日以内に逆の性行動が誘起されることを見出し、メダカでは成体でも脳の性的可塑性が保持されていることを示した。次に、雌雄の成体メダカの脳に発現する遺伝子群をサブトラクションやマイクロアレイで探索することにより、14 個の性特異的発現を示す遺伝子群を同定した。そのうち、脳型芳香化酵素遺伝子 (*Cyp19a2*) が成魚の視蓋最内層領域で雌脳に特異的に発現することを見出した。この視蓋での *Cyp19a2* の発現は雄魚における E2 処理で雄行動の抑制時に出現し、雌魚における 11-ケトテストステロン (11-KT、アンドロゲン) 処理による雄行動の誘導時に抑制された。また、芳香化酵素阻害剤処理で 10 日間処理された雌魚での雄行動の誘導時に *Cyp19a2* の発現が完全に抑制されることがわかった。これらの結果から、メダカの視蓋領域に局在する *Cyp19a2* は雌行動（雄の受け入れ）を促進し、雄行動を抑制する作用があると推察された。また、双方性転換魚のオキナワベニハゼでも、脳の *Cyp19a2* の発現は雌ステージから雄ステージへの転換時に減少し、雄ステージから雌ステージで増えることがわかった。

これらの結果から、雌雄異体魚でも胚・稚魚期のみならず、成熟魚でも生殖腺や脳の性的可塑性が維持されていることがはじめて明らかになった。また、このような成魚での高い性的可塑性は成熟卵巣に常に存在する未分化生殖幹細胞と生殖腺体細胞によるものであることが実証された。

## 各グループの研究実施の概要

### 長濱グループ：

脊椎動物においてこれまでほとんど研究がなされてこなかった生殖腺と脳の性的可塑性の分子メカニズムについて、雌雄異体魚のメダカを主な実験魚として研究を行った。まず、サブトラクションやマイクロアレイなどを用いて性的可塑性の研究に不可欠な性分化を制御する遺伝子群を単離した（精巣分化に *Gsdf*、卵巣分化に *ERβ2* と *Rspo1*）。また、新たに得られたこれら遺伝子の機能解析のために、遺伝子破壊効果が生涯にわたって持続する RNAi 法による遺伝子ノックダウン法を開発した。これらの方法を駆使することにより、胚・稚魚期（性分化期）において生殖腺が高い性的可塑性を示すのは、この時期の雌雄生殖腺の体細胞が性ホルモン処理等に対して高い感受性を有するためであることを明らかにした。また、これまで性転換は起こらないとされてきた雌雄異体（ティラピア、メダカ）成魚でも、生殖腺におけるエストロゲン合成を低下させることにより雌から雄への機能的性転換を誘起できることを示した。また、この際の精巣組織の起源は、生殖腺（卵巣）周辺部間質組織に常に存在するシスト（未分化生殖幹細胞とそれを取り囲む体細胞とからなる）であることを示した。また、エストロゲン低下が引き金となって起こる性転換の初期過程はシスト内体細胞における *Gsdf* 遺伝子の発現開始であることを示した。さらに、数種の雌雄異体魚や性転換魚においても、エストロゲン生成の低下が成熟卵巣から成熟精巣への性転換の引き金となることを示し、成魚の生殖腺における性的可塑性は魚類に広く共通であることを示唆した。成魚の脳の性的可塑性に関しては、雌雄の成熟メダカを性ホルモン（雌にはメチルテストステロン、雄にはエストラジオール-17β）で処理することで、処理 2-4 日以内に逆の性行動が誘起されることを示した。したがって、メダカでは成体でも脳の性的可塑性が保持されていると考えられた。また、脳型芳香化酵素遺伝子が雌成魚脳の視蓋最内層に特異的に強く発現することを見出すとともに、性ホルモン依存性の性行動の制御に重要な役割を果たしていることを示唆した。以上の結果から、雌雄異体魚では胚・稚魚期のみならず成熟個体でも生殖腺と脳の性的可塑性が保持されていることがはじめて明らかとなった。

### 中村グループ：

魚類では性転換する種がサンゴ礁域に多く生息している。性転換は多様でクマノミでは雄から雌へ、ベラでは雌から雄へ、ハゼの間では雄雌どちらの方向に性転換することが知られている。これらの性転換魚は、性的可塑性の研究には格好の実験対象となる。ベラは雄から雌に性転換する種であるが、この種で起こる卵巣から精巣への転換過程の生殖細胞と体細胞の起源について調べた。卵巣を構成する体細胞に特異的に発現する *Foxl2* は性転換中および性転換後の精巣を構成する体細胞にも同様に発現していることが明らかとなった。細胞死であるアポトーシスは性転換開始時の発達した卵母細胞しか見られなかった。このことから、卵巣を構成する体細胞は細胞自殺することなく転換後の精巣に残存し、機能していることが示唆された。一方、性転換後の精子の起源となる生殖幹細胞は性転換初期に卵巣にあった細胞に由来することが明らかになった。卵巣の生殖幹細胞に密着する体細胞には精巣分化に重要な役割を持つ *Gsdf* や *Dmrt1* 遺伝子の発現が無いが、性転換開始とともに生殖幹細胞を取り囲むセルトリ細胞に *Gsdf* がはじめて発現し、その後、精子形成に伴い *Dmrt1* も強く発現した。このことから、卵巣中の性的可塑性をもつ生殖幹細胞は、性

転換開始直後にセルトリ細胞で発現する *Gsdf* により雄性生殖細胞へと分化することが強く示唆された。

以上の結果から、エストロゲンは性転換魚に限らず雌雄異体魚においても卵巣維持に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。雌のエストロゲンの低下は、性転換魚のみならず雌雄異体魚の卵巣にある性的可塑性を持つ生殖細胞と体細胞を精巣分化へと誘導し、性転換の引き金となる。性転換魚では精巣組織が卵巣全体から出現することから可塑性を持つ細胞は卵巣全体に均一に分布しているものと考えられる。一方、雌雄異体魚の卵巣では成熟の進行に伴い精巣組織の出現場所は限定されることから、性的可塑性を持つ生殖細胞と体細胞は狭い場所に少量分布しているものと考えられる。卵巣における精巣組織の起源を追跡することで、将来は生殖幹細胞への研究と繋がるものと期待される。ベラの成熟精巣はエストロゲンで容易に成熟卵巣へと転換出来ることが明らかとなった。しかし、雌雄異体魚の成熟精巣ではエストロゲンにより性転換を誘導することは出来ない。その理由は明確ではないが、雌雄異体魚では性決定遺伝子が精巣維持に強く働いているために外因性エストロゲンでは卵巣分化を誘導出来ないのかもしれない。

### 吉崎グループ：

生殖腺の性に関しては従来多くの研究がなされてきたが、「生殖細胞の性」に関する研究は多くはない。そこで本研究では、特に卵原細胞の性について移植実験によりその可塑性の解析を行った。その結果、卵原細胞は、生殖腺体細胞の性に依存して雄の生殖細胞に変換しうることを明らかにした。さらに、卵原細胞と精原細胞の分子レベルでの差異を明らかにするため、マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析を行った。その結果、精原細胞と卵原細胞は、両者と始原生殖細胞の距離よりも近い関係にあり、極めて類似した細胞であることが明らかとなった。しかし、精原細胞と卵原細胞の間では明瞭に発現パターンの異なる遺伝子も存在していた。とくにプロタキニン<sup>1</sup>は始原生殖細胞では全く発現していないが、精原細胞へと分化することで発現が開始することが明らかとなった。なお、本遺伝子は卵原細胞を含む雌性生殖細胞、さらには精母細胞以降の分化した細胞では全く発現していなかった。また、生殖細胞の有無（あるいはその数）が生殖腺の性に及ぼす影響を明らかにするため、ニジマスの生殖腺から遺伝子ノックダウン法を駆使して生殖細胞を完全に除去し、得られた生殖細胞欠損生殖腺の性を解析した結果、既知のメダカやゼブラフィッシュの例とは異なり、ニジマス生殖腺の性は生殖細胞の有無による影響を受けないことが明らかとなった。さらに、生殖細胞の増殖・分化を制御すると考えられる支持細胞の性的可塑性を明らかにする目的で、ニジマス支持細胞を単離し、これを異性の生殖腺細胞と混合して 3 次元再構築を行う実験系を構築した。その結果、セルトリ細胞が雌性生殖細胞を、さらに顆粒膜細胞が雄性生殖細胞と取り囲む様子が観察された。また、*in vivo* へのこれら支持細胞の移植実験系も開発した。稚魚の腹腔内へと大量の支持細胞を移植した場合に、一部の宿主個体の生殖腺に外来の支持細胞が取り込まれることを明らかにした。特にセルトリ細胞を雌宿主へと移植した場合、卵母細胞を外来のセルトリ細胞が取り囲む様子が観察された。

以上の結果から、ニジマスの精原細胞、卵原細胞は互いに類似した細胞であり、それを取り囲む生殖腺体細胞の性に従い、異性の生殖細胞へと分化転換しうる細胞であるが、遺伝子発現パターンから、両者は明瞭に識別しうる細胞であることが明らかとなった。この生殖細胞の性転換を制御する支持細胞に関しては、*in vitro*、*in vivo* における移植系を構築したのみに留まっており、今後これらの実験系と分子レベルでの解析、さらに機能解析を組み合わせることで、支持細胞の性的可塑性についても明らかになると期待される。

### 大久保グループ：

メダカ成魚の脳内で発現に性差を示す 14 種類の遺伝子を同定した。それらの遺伝子の中で、エストロゲン受容体 *ERβ2* は他の遺伝子の性特異的な発現に先立って、雌特異的に発現

し始めることを明らかにした。また、その発現部位は他の雌特異的な遺伝子 *npb* と *vip* の発現部位と一致することを見出した。さらに、*ERβ2* を含めたこれら 3 種類の雌特異的な遺伝子の発現は、遺伝的な性によって直接規定されておらず、卵巣由来のエストロゲンによって制御されていることを明らかにした。また、雌特異的な *npb* ペプチドの作用部位は延髄と脊髄であることを明らかにすることで、*npb* が雌特異的な性行動を制御している可能性を示唆した。これらの知見から、卵巣由来のエストロゲンが脳に到達すると脳内の *ERβ2* 発現が上昇し、その *ERβ2* の作用により、*npb* と *vip* が雌特異的に発現することで脳が雌化する、という脳の雌化機構が考えられる。このような卵巣からのエストロゲンに依存した脳の性分化機構ゆえに、魚類の脳は性的可塑性を有するものと推察される。

### 3. 研究構想

脊椎動物における生殖腺と脳の性的可塑性に関する分子、細胞レベルの研究は、適当な実験系が欠如していたためにこれまでほとんどなされてこなかった。本研究は、クレスト研究「魚類生殖内分泌系に及ぼす内分泌かく乱物質の影響の分子メカニズム」における「生殖腺の性分化に及ぼす内分泌かく乱物質の主要なターゲットは生殖腺体細胞である — 生殖腺体細胞は性的可塑性を有する」という主要な研究成果を基盤として計画された。本研究の大きな特徴は、脊椎動物で性的可塑性が飛びぬけて高いと考えられている魚類、特に、メダカと数種の性転換魚を研究対象とすることである。本研究では、これらの特徴を最大限に生かして、研究が遅れている脊椎動物における性的可塑性に関する研究モデルを確立するとともに、その系を駆使して生殖腺と脳（性行動）に保持されると考えられる性的可塑性の分子メカニズムに関する先駆的研究を行うことを目的とした。

本研究は当初、大きく 5 つの研究、1) 性決定/分化の分子メカニズム—メダカとマウスとの性分化/性的可塑性の違い（長濱グループ）、2) 稚魚期の性的可塑性（長濱グループ）、3) 成魚期の性的可塑性（長濱グループと中村グループとの緊密な共同研究）、4) 脳（性行動）の性的可塑性（長濱グループ）、5) 性転換魚の性的可塑性（長濱グループと中村グループとの緊密な共同研究）、からスタートした。その後、平成 20 年度からは吉崎グループが新たに加わり、6) 生殖細胞の性的可塑性、について担当することとなった。なお同時期に、大久保准教授（東京大学農学部）グループも本研究に加わるようになったが、彼は本研究の最初の 2 年間は、長濱グループの一員として前記の課題 4) のチームリーダーであった。したがって、本研究班に復帰後も同様な課題を担当した。

本研究班では、性転換魚と雌雄異体魚の双方から得られる知見を共有しつつ研究を推進することにより、各発生時期にある生殖腺の生殖細胞、各種体細胞、そして脳の性的可塑性に関して重要な研究成果を得ることができた。なかでも、卵巣内のエストロゲン（エストラジオール-17β）量を低下させることで成熟卵巣から成熟精巣へと性転換させ、得られた精子で次世代を誕生させることができたことは全脊椎動物を通して初めてであり画期的な研究成果である。当然ながら、この研究成果はまた多くの新しい研究課題を生むことになる。エストロゲン量の低下による生殖腺体細胞や生殖幹細胞の雄性方向への分化の分子シグナル、とくに両者間の相互作用の分子メカニズムについての新しい理解が深まることが期待される。さらに、雌雄異体の成魚で逆方向の性転換、すなわち成熟精巣から成熟卵巣への性転換を起こすことができるのであろうか。この問題についても本研究では新たな知見が得られた。性転換魚のミツボシキウセンの成熟雄魚にエストロゲンを投与することにより成熟雌魚に性転換させることに成功したのである。

## 4. 研究実施内容

### 4. 1 “性的可塑性の分子メカニズムに関する研究（長濱グループ）”

#### (1) 実施の内容

本研究では、脊椎動物のうちで性的可塑性がもっとも高いと考えられている魚類、特に雌雄異体魚であるメダカ（*Oryzias latipes*）とティラピア（*Oreochromis niloticus*）に加え、双方向性転換魚であるオキナワベニハゼ（*Trimma okinawae*）を実験魚として用いた（図1）。性的可塑性のメカニズムを解析するうえで重要なことは対象とする生物種の本来の性（遺伝的性）を知ることであるが、このことが原因で研究の対象が著しく限定される。我々は先に、メダカではY染色体上に存在する遺伝子 *Dmy* を脊椎動物で2番目の性決定遺伝子として同定した。また、ティラピアでは、YY魚や性ステロイドホルモン処理などを利用することにより全雌系統、全雄系統を作出することに成功している。さらに、本研究の後半には遺伝子機能の解析に必要な RNAi による遺伝子ノックダウン法を新たに開発することができた。この方法を用いることで、これまで生涯にわたる遺伝子欠失の影響を調べることができなかったことが克服されたことにより、性決定遺伝子の欠失による成魚での表現型を解析できるようになったことは本研究課題を進展させる上で大いに効果的であった。また、TILLING 法による突然変異体の解析法も導入した。あわせて、メダカを対象とした遺伝子ノックアウト法の開発にも挑戦したが、最近になりようやく相同組み換えにはじめて成功した。本研究では、これらの研究材料、手法を駆使しながら、これまでほとんど研究されてこなかった脊椎動物における性的可塑性の分子メカニズムについて解析を行った。

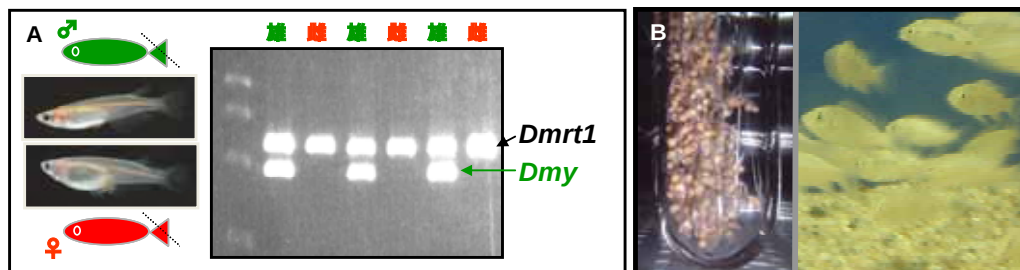


図1. 本研究(長濱)に用いた魚類. メダカ(左), ティラピア(右). A, *Dmy*の有無による遺伝的性の確認. B, 人工授精によるティラピアの全雄、全雌の生産.

#### 1) 遺伝子機能の解析法

ある遺伝子の生体内での機能を明らかにするためには、その遺伝子の機能を欠損させた個体を作成し正常個体のものと表現型を比較することが非常に重要である。マウスでは相同組み換えを利用して標的遺伝子の遺伝子座を改変し機能を欠損させるノックアウト法が確立されており、多くの遺伝子の機能解析が行われてきた。しかし、このノックアウト法はマウスとラット以外の脊椎動物ではいまだ成功していない。

##### A. RNAi による遺伝子ノックダウン法の確立（メダカ）

本研究では、*Dmy*、*ERβ2*、*Gsdf*などの発現抑制実験は vector-based RNAi 法で行った。標的遺伝子のアンチセンス RNA (2~300 bp) をすべての細胞で恒常的に発現するプロモーターである CMV プロモーターの制御下で発現させることでノックダウンを誘導した。ノックダウンコンストラクトは Krishnan らのウシエビ（*Penaeus monodon*）における vector-based RNAi 法(Vaccine 27:3849–55, 2009)を参考に設計した。アンチセンス RNA の鋳型となる領域を 標的遺伝子 cDNA の plasmid から PCR により増幅し、pcDNA3.1 vector (invitrogen)にアンチセンス方向となるようにクローニングした。ノックダウンの特異性の検証は GFP トラン



スジェニック系統と細胞培養系を用いて行った（図2）。

メダカ胚へのノックダウンコンストラクトの導入はエレクトロポレーションにより行った。メダカ Qurt 系統または d-rR 系統の卵を受精直後（1 時間以内）に採取し、付着系を取り除いた。メダカ卵 100～200 個を 4 mm Gap のエレクトロポレーションキュベットに入れ、3  $\mu$ g/ml の DNA コンストラクトを含む HEPES buffer 300  $\mu$ l で満たした。室温で 5 分間インキュベートした後、エレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションには CUY21 EDIT エレクトロポレーター（BEX）を用いた。エレクトロポレーションの条件は 24V、9 ミリ秒を 0.9 ミリ秒の間隔で 3 回行うとした。その後、メダカ卵はメチレンブルーを添加した通常の飼育水に移し、通常通りに飼育した。ノックダウンコンストラクトがメダカに導入されたかどうかは PCR により確認した。

*Dmy* ノックダウンメダカではノックダウンコンストラクトはゲノムにインテグレーションされ、次世代に遺伝した。F1 および F2 世代において、ノックダウンコンストラクトを持つ XY 個体の中にメスへの性転換が起こった個体が観察され、ノックダウンの効果も次世代に遺伝することが明らかになった。また、*Dmy* ノックダウンメダカの F1 世代から RNA を抽出し、ノーザンブロットを行った結果、ノックダウンコンストラクト由来の 60-70b の“long small RNA”の発現が確認された。ノックダウンのメカニズムについては不明な点が多いが、この 60-70b の RNA から miRNA や siRNA が作られ、ノックダウンが誘導されるのではないかと考えられる。

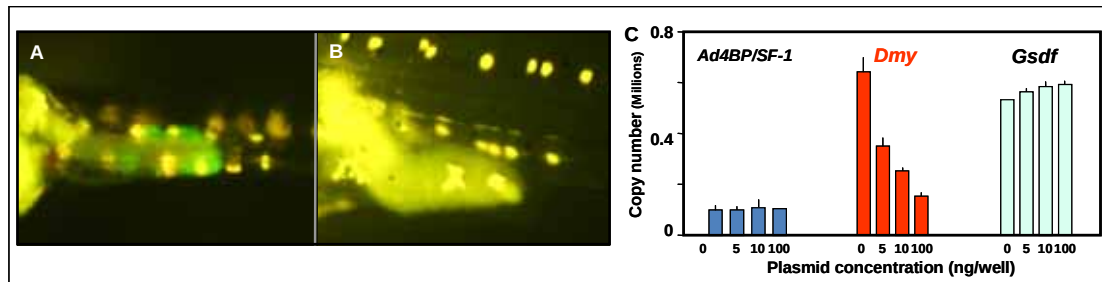


図2. GFPトランスジェニック系統 (A, B) と細胞培養 (C) による遺伝子ノックダウンの特異性の検証.  
A, コントロール, B, GFPノックダウン.

## B. 遺伝子ノックアウト法の開発に向けての試み（メダカ）

本研究では、メダカを用いて生殖細胞の維持に関わると考えられている遺伝子 *Nos3* のノックアウト個体の作製を試みた。ノックアウトメダカの作製には 2 つの技術的な段階がある。1) 未分化胚性幹細胞 (ES 細胞) に、標的遺伝子のターゲティングベクターを導入し、万能性を保つ標的遺伝子の相同組み換え細胞株を単離することと、2) 標的遺伝子がノックアウトされた細胞株を細胞移植法、または核移植法を用いて、生体へ導入し、生殖系列キメラを作成することである。

我々はまず *Nos3* の 5'側 3.2 kb と 3'側 5.6 kb を含む *Nos3* 周辺のゲノム 9.8 kb をクローニングし、*Nos3* 遺伝子の翻訳領域を緑色蛍光タンパク質 GFP とポジティブセクションマーカーであるネオマイシン耐性遺伝子 (*Neo*) に置き換え、3'側にネガティブセクションマーカーであるサイミジンカイネース (*Stk*) を付加したターゲティングベクターを作成した。次にこの *Nos3* ターゲティングベクターを GENE JUICE 法により、メダカ ES 細胞株に導入した。相同組み換えにより、*Nos3* 遺伝子座がターゲティングベクターに置き換わった ES 細胞株を G418 および Gancyclovir 試薬によるセクションで単離し、標的 *Nos3* 遺伝子座が欠損したことを PCR およびサザンブロット法で確認した。

次に *Nos3* 遺伝子欠損型 ES 細胞株を胚期胚に細胞移植した。*Nos3* 遺伝子を置き換えた GFP の蛍光を観察し、*Nos3* 遺伝子欠損型 ES 細胞株由来の細胞を調べた。その結果、様々な細胞あるいは器官に *Nos3* 遺伝子欠損型 ES 細胞株由来の細胞は分布しており、胚性幹細胞の万能性が保持されていることが示された。



今後は細胞移植法あるいは核移植法により、*Nos3* 遺伝子欠損型 ES 細胞の生殖系列キメラメダカの作製を行う。生殖系列キメラメダカの F1 同士を掛け合わせることで、欠損型 *Nos3* 遺伝子座をホモで持つ *Nos3* ノックアウトメダカが作出される。

## 2) 性決定遺伝子

我々は 2002 年にメダカの性決定遺伝子を単離し、*Dmy* と決定した。*Dmy* は脊椎動物で同定された 2 番目の性決定遺伝子である。本研究では性的可塑性との関連で、*Dmy* 遺伝子の機能獲得実験 (gain-of-function) と機能欠失 (loss-of-function) を行った。このうち機能欠失実験に関しては、本研究で新たに開発した、遺伝子機能欠失の影響が成体まで維持される RNAi による遺伝子ノックダウン法を用いた。

### A. *Dmy* 機能獲得実験

NHI 系統由来の *Dmy* を含む 117 kb のゲノム断片を持つベクターを構築し、これを d-rR 系統の受精卵にマイクロインジェクションにより遺伝子導入した。これらのトランスジェニック個体を成体まで飼育し、体色から本来の遺伝子型を判定し (白は XX、黄色は XY)、表現型の性と比較した。41 個体の白メダカのうち、30 個体は雌、11 個体は雄であった。これらの白雄は、d-rR 由来の *Dmy* を持たないことから、導入したゲノム断片の影響で雄に分化したと考えられた。これにより、*Dmy* を含んだ 117 kb のゲノム領域は、XX 個体を雄に分化させるのに「十分な」機能を持つと結論された (図 3)。

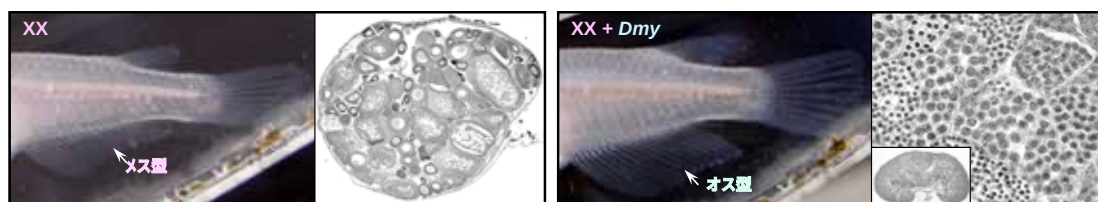


図3. XX受精卵への*Dmy*遺伝子の導入による機能的雄への性転換誘起 (*Dmy*遺伝子の機能獲得実験). 左から対照XX雌の表現型と卵巣, *Dmy*導入XX性転換雄の表現型と精巣.

性決定遺伝子に変異をもつ XY 個体は哺乳類でもメダカでも雌となる。一方、*SRY/Sry* と *Dmy* を含む DNA 断片を過剰発現させたマウスもメダカも表現型は雄となる。しかし、遺伝子導入により性転換したマウスとメダカとでは、精巣の発達と成熟状態に大きな違いがある。マウスでは、XXY 雄や XX 男性のそれと同様、精細胞を欠く小さな精巣であり、成熟した精子はつくられない。一方、メダカでは精子形成が正常に進行し受精能をもつ正常な精子がつくられることが本研究ではじめて明らかになった (図 4)。この違いが生ずる理由として、哺乳類とメダカの性染色体の違いが関係すると考えられる。哺乳類の Y 染色体は X 染色体に比べて著しく小さく、ごく限られた数の遺伝子しか存在しないが、その中には精子形成に関わる遺伝子群が含まれていることが重要である。*Sry* を遺伝子導入された XX 個体で正常な精子がつくられない原因のひとつはこの点にあると考えられる。一方、メダカでは X と Y 染色体は形態的にも区別は難しく、両染色体に存在する遺伝子も非常に類似している。このような X と Y の性染色体の類似性がメダカ (魚類の) の性的可塑性の大きな原因となっていると考えられる。

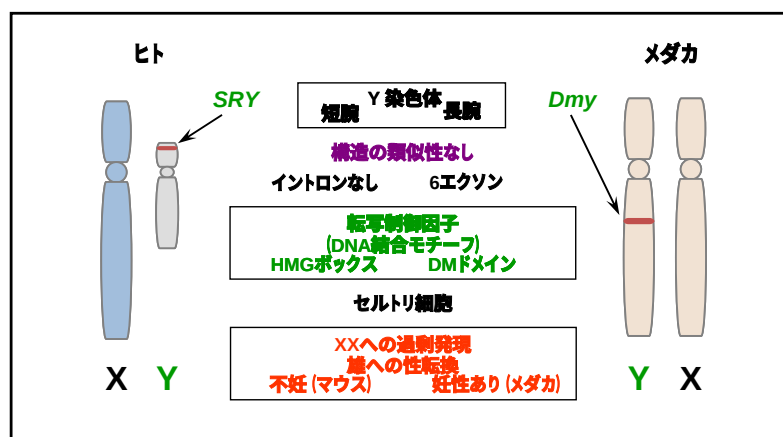


図4. ヒト (SRY) とメダカ (Dmy) の性決定遺伝子の比較.

## B. Dmy 機能欠失実験

これまでの本研究から、野生の *Dmy* 突然変異体がメスであること、またモルフォリノやグリップ NA を用いた *Dmy* ノックダウンを孵化直後まで飼育すると生殖細胞の増殖が活発となり、減数分裂への移行が観察された。しかし、これらの方法ではノックダウン効果が孵化直後に消失するのでその後の生殖腺の形態、表現型や性行動などを解析することができなかった。この障害を克服するために本研究で開発された RNAi 法ではメダカの生涯における *Dmy* の機能を解析することが可能となった。この方法によりまず、ノックダウン XY 個体と対照群との性分化期（受精後 5 日、孵化後 10 日）について、*Dmy* に加えてこの時期の精巣と卵巣で特異的に発現する遺伝子群の発現について RT-PCR により解析した(図 5)。その結果、*Dmy* を含む全ての精巣特異的遺伝子は対照群に比べて孵化後に減少し始め、孵化後には著しく減少した。一方、卵巣特異的遺伝子群に関しては全く逆でノックダウン個体のほぼ全てで著しく発現が上昇した。このようにノックダウン直後の生殖腺ではすでに卵巣分化が誘導されていると考えられた。このことは孵化後 50 日の生殖腺が完全な卵巣であり、多くの周辺仁期の卵母細胞が存在し、卵巣腔も認められたことから確認された。

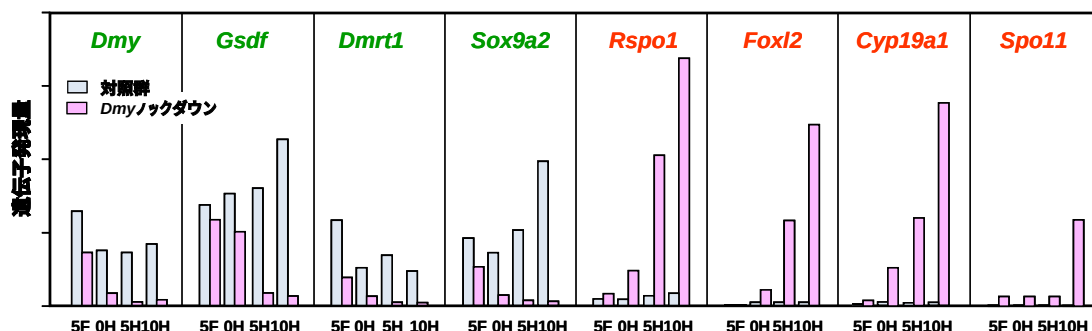


図5. *Dmy* 遺伝子のノックダウン直後（受精後5日から孵化後10日まで）の各種遺伝子の発現変動. 性分化期における精巣特異的遺伝子群 (*Dmy*, *Dmrt1*, *Gsdf*, *Sox9a2*) の発現が抑制され、かわって卵巣特異的遺伝子群 (*Rspo1*, *Foxl2*, *Cyp19a1*, *Spo11*) の発現が著しく促進される。

ノックダウン個体を継続して飼育すると産卵する個体が出現した。これらの個体の生殖腺（完全な卵巣）における遺伝子発現を RT-PCR 及び in situ hybridization で解析すると、正常な XX 雌と同様の発現パターンを示した（図 6）。XY 雌と正常な雌を交配させると受精卵が得られ、胚も正常に育った。これらの結果から、*Dmy* はメダカの性決定遺伝子として「必要」な機能をもつことが明らかになった（図 7）。前述した機能獲得実験での結果を総合して、*Dmy* はメダカの性決定遺伝子（精巣決定遺伝子）であることが完全に証明された。

さらに、この機能欠失実験の結果から、メダカの性決定遺伝子 *Dmy* は、1) 雄特異的遺伝子の発現を誘起すること、2) 雌特異的遺伝子の発現を抑制させること、が明らかになった。

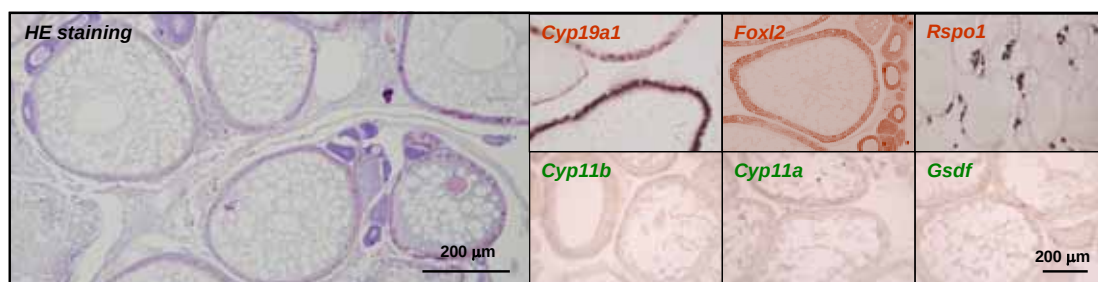


図6. *Dmy* 遺伝子ノックダウン後のXY成魚の生殖腺の組織像(卵巣, HE染色)と各種遺伝子の発現. 雌特異的遺伝子群(*Cyp19a1*, *Foxl2*, *Rspo1*)の発現が強く、雄特異的遺伝子群(*Cyp11b*, *Cyp11a*, *Gsdf*)の発現は認められない。

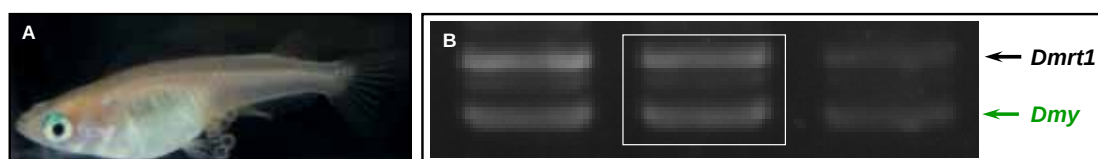


図7. *Dmy*ノックダウンのF3雌個体の表現型(A)と*Dmy*の存在(B)。

### 3) 稚魚期の性的可塑性の分子メカニズム

#### A. ティラピア

これまでのティラピアを用いた本研究から、ティラピアの生殖腺の性分化に関わる主要な遺伝子群が明らかになっている。我々の用いている飼育条件下でティラピアは、孵化後3日目に始原生殖細胞が生殖腺に移行することにより形成される。その2-3日後にはXY生殖腺の生殖細胞を取り囲む体細胞で *Dmrt1* の発現が開始し、その後生殖細胞は増殖をほぼ停止する。ごく最近我々は、*Gsdf*が(*Gsdf*の詳細は後述) *Dmrt1* にほぼ1日先立ち生殖細胞を取り囲む体細胞で発現することを見出した。一方、XX生殖腺では、孵化後5-6日で血管周辺にステロイド産生細胞が出現し、その細胞で *Cyp19a1* が発現するとともに、生殖細胞を取り囲む体細胞(前顆粒膜細胞)では *Foxl2* が発現を開始する。XX生殖腺ではその細胞はその後増殖し、数を増す。なお、魚類の芳香化酵素は、卵巣型芳香化酵素(*Cyp19a1*)と脳型芳香化酵素(*Cyp19a2*)の2つがある。

#### a. 性ホルモン処理による性転換

**アンドロゲン処理：** 孵化直後のティラピア XX 稚魚をメチルテストステロン等の外因性アンドロゲンで数日間にわたり処理すると、生殖細胞は本来の XX 個体で起こるはずの増殖を続けることなく増殖を停止し、生殖腺は精巣へと分化した。この時、*Cyp19a1* の発現は抑制され、かわって *Dmrt1* の発現が急速に誘導された(図8)。アンドロゲンはこの時期の XX 生殖腺ですでに発現しているアンドロゲン受容体との結合を介して *Cyp19a1* 遺伝子の5'上流域にあるアンドロゲン応答配列(ARE)に結合してその作用を発揮することが示された(図9、10)。また、XX生殖腺の濾胞状構造を示す体細胞(前顆粒膜細胞)が一旦 *Cyp19a1* を発現しても、アンドロゲンを処理することにより、*Cyp19a1* 発現が抑制され、かわって同じ細胞に *Dmrt1* が発現することがわかった。従って、この時期の XX 生殖腺の体細胞は分化転換能を有している可能性が強く示唆された。

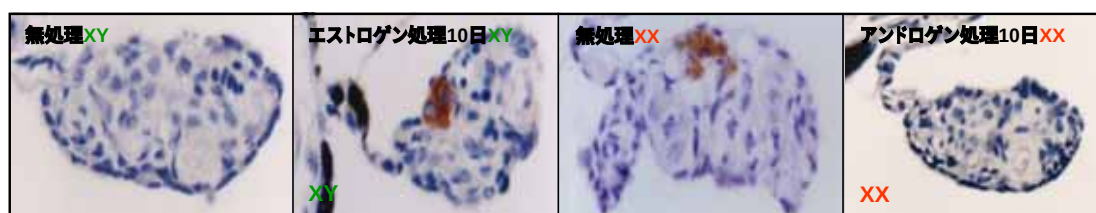


図 8. 性ステロイド処理による卵巢型芳香化酵素遺伝子発現の影響。

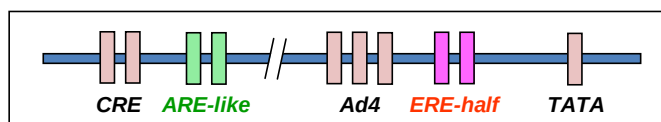


図 9. ティラピア卵巢型芳香化酵素 5' 上流域。

**エストロゲン処理：** 一方、孵化直後のティラピア XY 稚魚をエチニルエストラジオール等の外因性エストロゲンで数日間にわたり処理すると、生殖細胞は本来の XY 生殖腺で起こるはずの増殖停止をすることなく引続き増殖し、生殖腺は卵巢へと分化した。この時、*Dmrt1* の発現は起こらず、かわって芳香化酵素をはじめとしてエストロゲン合成に必要なすべてのステロイド代謝酵素遺伝子群の発現が体細胞で急速に誘導された（図 8）。2 種類のエストロゲン受容体 (*ERα* と *β*) はともに遺伝的雄の生殖腺でも孵化 5 日後までにはすでに発現しているので、エストロゲンはこれらのエストロゲン受容体との結合を介して芳香化酵素遺伝子の 5' 上流域にあるエストロゲン応答配列 (ERE-half) に結合してその作用を発揮すると考えられる（図 10）。

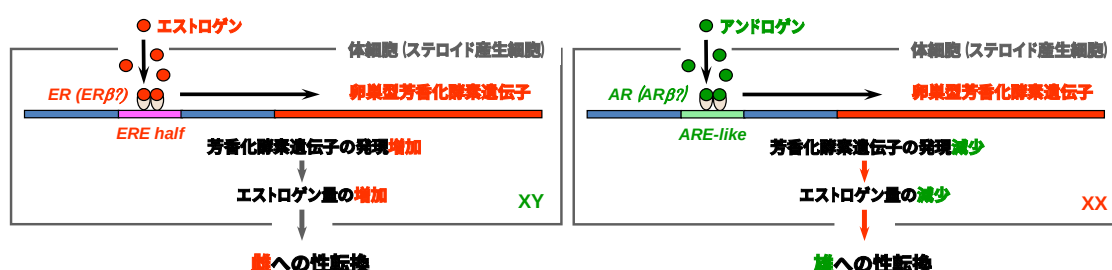


図 10. 性ステロイド (エストロゲン、アンドロゲン) 処理による XX, XY ティラピアの雄化、雌化の機構。

## b. 遺伝子機能獲得・欠失による性転換

上述したように、性ステロイド処理による性転換は生殖腺体細胞での遺伝子発現の転換を介していることが明らかになった。次に、この生殖腺体細胞での雌雄特異的遺伝子発現を人為的に転換させることにより性転換を誘起させることができるか否かを過剰発現実験により調べた。その結果、XX 胚への *Dmrt1* と *Foxl2* のドミナント・ネガティブ変異体の過剰発現は生殖腺の雄化を誘起すること、さらにこれらの成熟魚は妊性を有する精子を生産することがわかった。一方、XY 受精卵への *Foxl2* の過剰発現は完全な性転換はみられないものの、多くの個体で生殖腺の一部に卵母細胞や *Cyp19a1* 陽性細胞が出現した。

後述するように、メダカで *Dmy* の下流直下に作動する候補遺伝子として *Gsdf* を同定したが、このホモログをティラピアからも単離し、性分化期の発現パターンを解析するとともに、XX 受精卵への過剰発現の影響を解析した。その結果、*Gsdf* は孵化後 4 日の XY 生殖腺で特異的に発現することを見出した（図 11）。したがって、*Gsdf* はこれまで生殖腺（ティラピア）での発現が調べられたどの遺伝子よりも早い時期に発現する遺伝子であることがわかった。また、*Gsdf* を受精卵の時期に過剰発現された XX 個体の成体の一部（約 30%）



の個体で完全な雄への性転換が観察された（図 11）。

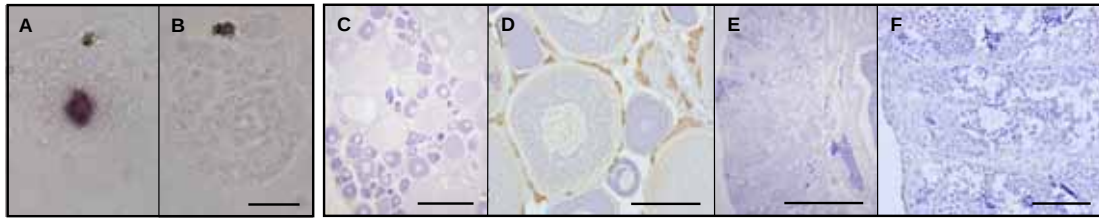


図 11. ティラピアにおける*Gsdf* の発現とXX個体への過剰発現の影響. 孵化5日後のXY個体 (A) とXX個体 (B); C & D, 正常XX成魚; E & F, *Gsdf* を過剰発現されたXX成魚.

## B. メダカ

ティラピアとは異なりメダカでは、性分化開始時に発現する遺伝子は雄化にかかわる *Dmy* と *Dmrt1*（精巢のセルトリ細胞に発現する）が同定されているのみであった。したがって、この時期の雌雄生殖腺の性的可塑性の分子メカニズムを解析するためには、雌雄の遺伝子マーカー、特に卵巣分化の直前、或いは初期に発現する雌マーカーの欠如が解析を困難にしてきた。そこで本研究では、*Dmy* の有無によりメダカ生殖腺で発現する遺伝子の同定、およびそれら遺伝子の機能解析を行った。

### a. 雄特異的遺伝子群

**Gonadal soma-derived factor (*Gsdf*) :** これまでの我々の研究から、メダカでは *Dmy* に加えて *Dmrt1* も精巢に強く発現することが明らかになってきたが、両者における発現のタイミングはほぼ 20 日間ほども異なっていた。そこで本研究では、*Dmy* の発現後に精巢で新たに発現する遺伝子の単離を計画した。その目的のために、性分化後期の雌雄生殖腺からの RNA サブトラクションライブラリーを搭載したマイクロアレイ及び in situ ハイブリダイゼーションによる発現解析を合わせて、1) 初期性分化時期から雄で発現の高い遺伝子、または 2) 卵巣を形成した後、雄への性転換を開始する変異体 (*scl*) で発現が高い遺伝子の検索を行うことで、雄特異的に発現する遺伝子のスクリーニングを試みた。初期生殖腺については、これまで分離することができなかった初期生殖腺（雌雄各ステージ）をレーザーキャプチャーマイクロダイゼクション (LCM) 法を用いて切り出してサンプリングし、マイクロアレイ解析を行った。その結果、雄の支持細胞で強く発現する遺伝子が単離され、この遺伝子の配列を解析した結果、最近報告されたニジマス *Gsdf* のメダカホモログ遺伝子であり、硬骨魚類に特異的な遺伝子であることが明らかになった。*Gsdf* 遺伝子は形態的に性差が明らかとなる孵化日から雄の生殖細胞周囲の体細胞で強い発現を示し、発達した精巢では支持細胞であるセルトリ細胞及び精巢輸出管の上皮細胞で強い発現が検出される（図 12）。一方、卵巣では *Gsdf* 遺伝子の弱い発現が検出される。これまでメダカ初期生殖腺において精巢決定遺伝子である *Dmy* 以外に明らかな雄特異的な発現を示す因子は報告されていないので、メダカ *Gsdf* 遺伝子は初めて単離された雄の体細胞の分化マーカー（候補）である。

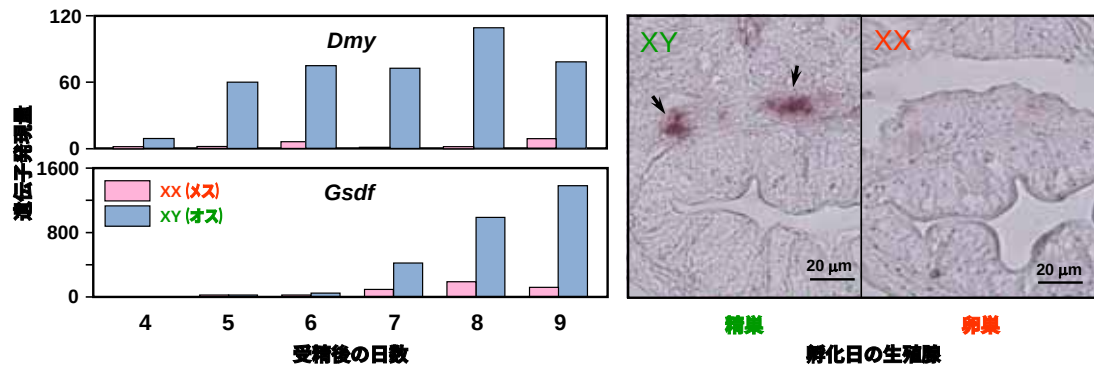


図12. 受精後のメダカ胚における*Dmy*と*Gsdf*の発現変動. 孵化日のXY生殖腺 (精巣) で強い発現が認められる.

*Gsdf* 遺伝子は受精後6日のメダカ胚のXY生殖腺の体細胞に発現を開始するが、これはメダカの性決定遺伝子 *Dmy* の発現パターンとほぼ一致する。そこで、蛍光 in situ hybridization による2重染色法を用いて *Gsdf* と *Dmy* の発現細胞を詳しく解析した。その結果、2つの遺伝子はいずれも同一の細胞 (精原細胞を取り囲むセルトリ細胞) で発現していることが明らかになった (図13)。

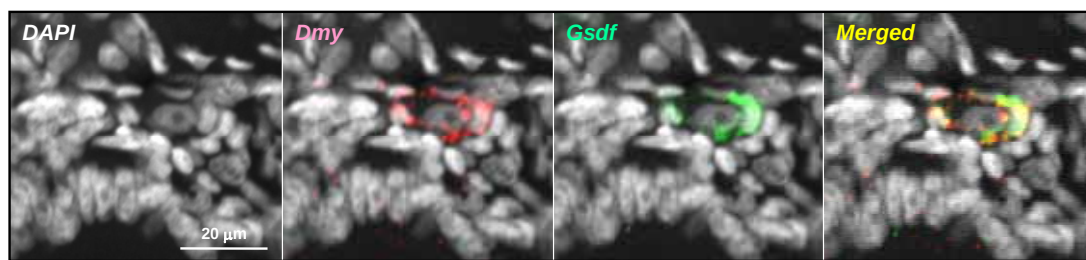


図13. 孵化日のXYメダカの生殖腺における*Dmy*遺伝子と*Gsdf*遺伝子の同一細胞内での共局在.

*Gsdf* をノックダウンしたメダカについて組織切片を作成し、生殖腺の形態を観察した。その結果、遺伝的性がXYであるにもかかわらず、卵母細胞が存在する生殖腺を持つ個体が見られた。また、メダカを含めた硬骨魚類で最初の形態的な雌雄差として、生殖細胞の数の差 (生殖細胞の数が雄よりも雌が多い) が知られている。*Gsdf* ノックダウンメダカの孵化日での生殖細胞数を計測したところ、一部のXY個体では生殖細胞数が増加し、一部のXX個体では減少する傾向がみられた。さらに減数分裂関連遺伝子など雌分化マーカーの発現を解析した結果、*Gsdf* をノックダウンしたXY個体では少なくとも孵化後5日には発現がみられた。これらの結果から、*Gsdf* が精巣分化の初期段階において重要な役割を果たしていることが結論されるが、今後は *Gsdf* の下流でどのような遺伝子が働いて精巣が分化するのかを明らかにしたいと考えている。

**Dmrt1:** 多くの脊椎動物で精巣分化に関連した発現パターンを示す *Dmrt1* 遺伝子は、メダカの性決定遺伝子のオースログであると考えられている。メダカにおいてもその発現パターンは精巣の分化に関連しており、精巣分化における重要な機能が予測されるがその機能解析はなされていなかった。そこで本研究ではメダカ突然変異ライブラリー (TILLING、藤堂 剛教授) より *Dmrt1* 突然変異体を探索したところ、4系統の *Dmrt1* 突然変異メダカについて、突然変異ホモ個体を交配により作出し、その表現型を調査した結果、1つの系統で特徴的な表現型を見つけることができたので、その系統について近交系への戻し交配を5回行った後、*Dmrt1* 突然変異ホモ個体を作出すべく交配を行い、突然変異体の表現型を観察した。この系統の組織切片を作成して孵化後30日の生殖腺の様子を観察したところ、す



すべての XY 個体が卵巣を発達していた (図 14)。これまで不安定だった表現型が、近交系に戻し交配したことで、安定したと考えられる。次に、この系統において、いつから性転換するのかを調べるために組織切片を作成して孵化後 5 日と 20 日の生殖腺の様子を観察した。メダカの初期発生において、生殖細胞数は雌雄で異なり、孵化後 5 日では、XX (雌) の生殖細胞数は、XY (雄) の生殖細胞数 2-4 倍となっている。孵化後 5 日の個体の生殖細胞数は、XX、XY 個体共に野生型のそれとほぼ同じであった。一方、孵化後 20 日の XY 生殖腺には、発達中の卵母細胞が観察できた (図 14)。このことから、この系統では孵化後 20 日の XY 生殖腺は卵巣方向へと分化を始めていると考えられた。つまり、この変異体の生殖腺は、性決定遺伝子 *Dmy* の存在により、一端精巣方向へと分化するものの、精巣形成に重要な遺伝子不全により精巣に分化できなくなる結果、速やかに卵巣方向へと分化転換していると考えられた。現在、孵化後 5 日から 20 日の期間における *Gsdf* をはじめとした種々遺伝子の発現解析を行っている。今後さらに、この性転換する表現型の原因が *Dmrt1* であることを示すために、野生型の *Dmrt1* ゲノムを含む組換え DNA を導入することにより表現型が回復するかどうかを確かめる必要がある。

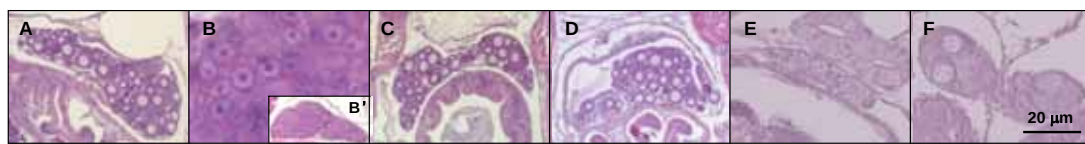


図 1.4. *Dmrt1* 突然変異体 (Tilling による) 生殖腺組織像の解析. (A) XX, *Dmrt1*<sup>+/b</sup>, (B) XY, *Dmrt1*<sup>+/b</sup>, (C) XX, *Dmrt1*<sup>bb</sup>, (D) XY, *Dmrt1*<sup>bb</sup>, (E) XY, *Dmrt1*<sup>+/b</sup>, (F) XY, *Dmrt1*<sup>bb</sup>. A-D, 孵化後 30 日, E, F, 孵化後 20 日.

## b. 雌特異的遺伝子群

我々のティラピアを用いた研究が契機となり、魚類のみならず鳥類などの他の非哺乳類脊椎動物でも、卵巣分化にエストロゲンが重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。しかし、メダカでは XX 胚の生殖腺で卵巣分化に先立ってエストロゲン合成酵素の遺伝子群が発現しているという明確な証拠は報告されていないので、メダカで卵巣分化に果すエストロゲンの役割は不明のままである。

**エストロゲン受容体：** そこで本研究では、エストロゲン作用に不可欠なエストロゲン受容体 (ER) について発現パターンの解析、およびそれら受容体の性分化に果す役割を機能欠失実験により解析することにした。メダカの卵巣から 3 種の ER (*ERα*, *ERβ1*, *ERβ2*) 遺伝子をクローニングし、各々の性分化期生殖腺における発現を調べたところ、*ERβ2* が卵巣分化が開始する時期の XX 生殖腺で特異的に発現していることを見出した。XY 受精卵に E2 処理を行うと *ERβ2* のみが XY 生殖腺で発現が促進された (図 15)。

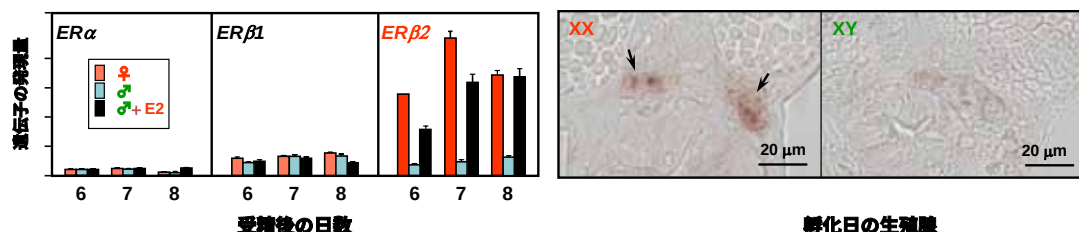


図 1.5. 性分化期における 3 種のエストロゲン受容体遺伝子の発現に及ぼすエストロゲン処理の影響. エストロゲン処理により *ERβ2* 遺伝子の発現が強く促進される。ERβ2 遺伝子は孵化日の XX 生殖腺 (卵巣) で強い発現 (矢印) が認められる。

さらに、これら 3 種の ER のそれぞれについて XX 個体におけるノックダウンの影響を解析したところ、*ERβ2* をノックダウンした XX 個体の約 40% で雄への完全な機能的性転換が起こった。一方、他の *ERα* と *ERβ1* のノックダウン個体では性転換はまったく起こらなかった。これらの結果より、性分化期の XX 生殖腺で発現する *ERβ2* がメダカの卵巣分化に重要な役割を果たすことが初めて明らかになった (図 16)。

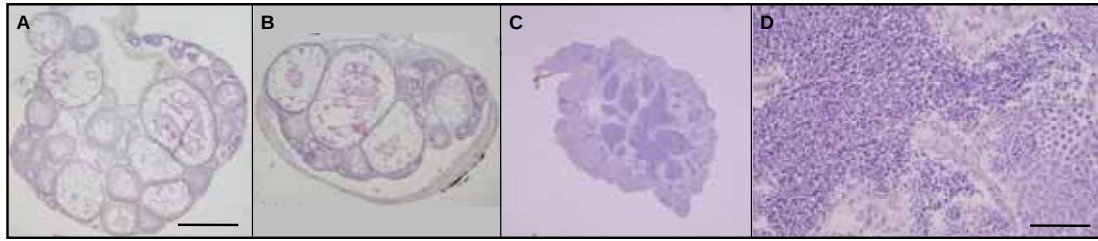


図16. エストロゲン受容体遺伝子ノックダウンの影響(受精卵でノックダウン後、成魚の生殖腺を観察)．A, ER $\alpha$  (卵巣)；B, ER $\beta$ 1 (卵巣)；C & D, ER $\beta$ 2 (精巣, 精子が存在)．A-C (bar 100  $\mu$ m), D (bar 100  $\mu$ m)．

**R-spondin 1:** *R-spondin1* (*Rspo1*) はマウスで最初に見出された遺伝子で、哺乳類でもこれまで余り研究が進んでいなかった卵巣分化への重要な役割が注目されている。メダカを用いた本研究で、性分化期の XX 生殖腺で *Rspo1* の発現が認められることを示すとともに、同時期の XY 生殖腺でもエストロゲン処理により *Rspo1* の発現が促進されることを見出した(図17)。*Rspo1* 遺伝子の機能をノックダウンと過剰発現により解析した。その結果、XX 受精卵での *Rspo1* のノックダウンにより精巣が形成され、XY 受精卵への過剰発現では卵巣が形成された(図17)。これらの結果から、*Rspo1* は卵巣分化に不可欠であることが明らかになった。今後、メダカの卵巣形成に果すエストロゲン/エストロゲン受容体との関連を解析する必要がある。

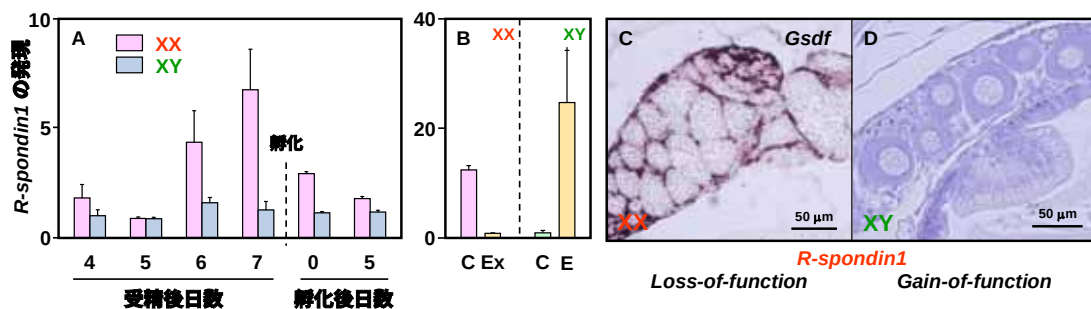


図17. *Rspo1* 遺伝子の発現 (A, B)．A, 性分化期における発現の雌雄差；B, 成魚における芳香化酵素阻害剤 (Ex) とエストロジオール-17 $\beta$  (E) 処理の影響；C, *Rspo1* のノックダウン (XX, *Gsdf* の発現)；D, *Rspo1* の過剰発現 (XY)．

#### 4) 成魚期の性的可塑性の分子メカニズム

##### A. ティラピア (長濱グループと中村グループの共同研究)：

我々は先のクレスト研究で、成熟途上の若い卵巣 (卵黄形成前期) をもつティラピア雌 (XX) が性的可塑性を有することを見出した。そこで本ソルスト研究では、さらに成熟が進んだ成熟雌 (2、3 週間毎に排卵、産卵を繰り返す) を用いて、ファドロゾール (芳香化酵素阻害剤、AI) によるエストロゲン生成の抑制の影響を調べた。その結果、完全に成熟したティラピア雌を用いても、雄への機能的性転換が誘起されることがわかった(図18)。さらに、性転換 XX 雄は正常の XY 雄と同様に活発な雄の性行動 (追尾行動) を示し、正常 XX との交配で正常な受精卵、稚魚が高率で得られた。しかし、成熟に達していない若い卵巣を用いた以前の実験に比べて AI 処理を開始してから性転換までに要する期間が長かったため、両者における生殖腺形態の違いを詳しく解析した。その結果、孵化後 50-70 日の未熟卵巣を使用した場合には、短期間処理 (1-2 ヶ月) でも、精巣組織は卵巣の中央部から後端に至るまでの幅広い範囲で出現するが、孵化後 150 日目の成熟卵巣の場合では、処理開始後 3 月目以降にならなければ精巣組織が出現しないことがわかった。しかもこの場合、精巣の出現部位は、卵巣後方部の卵巣腔近傍に限定されることが明らかになった。このこと

から、可塑性を持つ生殖細胞と体細胞の数は、配偶子形成、成熟（加齢）にともなって減少するとともに、卵巢のごく限られた場所にのみ分布することが明らかになった。一方、*Dmrt1* の特異的抗体を作製して免疫細胞化学法により卵巢から精巣への転換過程を解析したところ、精巣組織は卵巢周辺の間質組織より形成されることが明らかになった。この場合には、同一の細胞の分化転換によるのではなく、間質組織に存在する未分化の生殖細胞と体細胞より生ずる可能性が示唆された。

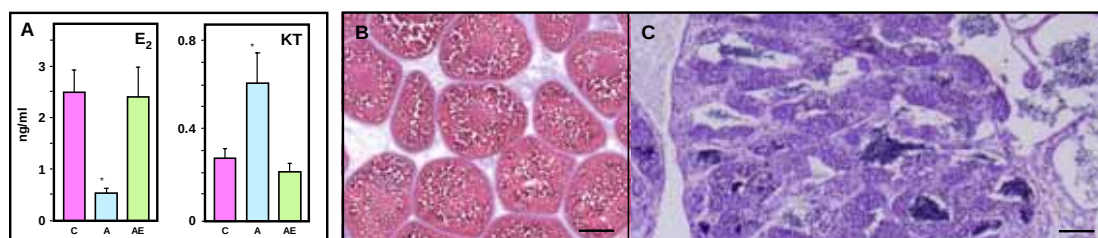


図18. ティラピアXX成熟魚における芳香化酵素阻害剤 (AI) の影響. A, AI処理後の血中性ホルモン量の変動 (E2, エストラジオール-17 $\beta$ ; KT, 11-ケトテストステロン). C, 対照群; AI, AI処理群; AE, AI+E2. B, 対照群 (卵巢); C, AI処理後180日のXX生殖腺 (精巣)。

## B. メダカ：

前述したように、本研究で雌雄異体魚であるティラピア成熟雌魚のエストロゲン産生を抑制することにより成熟雌から成熟雄へと性転換させることに初めて成功した。次に我々は、成熟成魚における性的可塑性の保持をメダカ（雌雄異体魚）で確認するとともに、エストロゲン産生を抑制した後に新たに出現する精巣組織の起源について詳しく解析することにした。メダカ雌成熟成魚（孵化後5か月、毎日産卵中）を、ステロイド性芳香化酵素阻害剤 (Exemestane, Ex) で処理し、卵巢から精巣への性転換過程における遺伝子発現の変動を蛍光 in situ hybridization の2重染色により解析した。メダカ成熟卵巢には、1-2個の未分化生殖細胞 (*Vasa* を発現) を未分化体細胞 (*Sox9a2* を発現) が取り囲む構造 (シスト) が存在する。Ex 未処理個体のシスト中には、*Sox9a2* を発現する体細胞のみが存在し、セルトリ細胞の分化マーカーである *Gsdf* を発現する細胞は見られない (図19)。

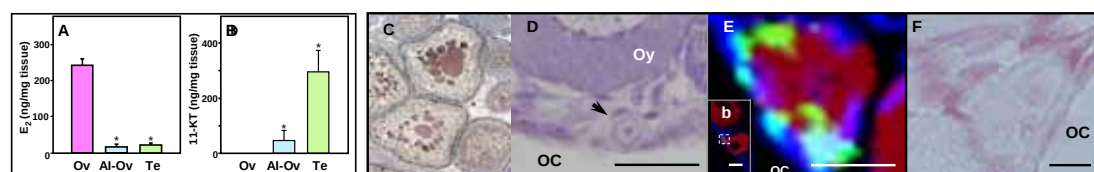


図19. 芳香化酵素阻害剤 (AI) 処理による成熟雌メダカの性転換. AI処理後に生殖腺中のエストロゲン量は減少し、かわってアンドロゲンの産生が高まる (A, B)。AI処理後の卵巢には大型の卵胞に加えて、排卵後濾胞が認められる (C)。卵巢腔に接する卵巢部位に少数のシスト (D, 矢印) がみられる。このシスト中には *Vasa*-positive の未分化生殖細胞と *Sox9a2*-positive の体細胞が存在するが (E)、*Gsdf*-positive の体細胞は認められない (F)。OC, 卵巢腔。

ところが、AI 処理開始後30日を経過した生殖腺では、シスト中の生殖細胞数の増大がみられるとともに、それらを取り囲む体細胞中に *Gsdf* の発現が認められるようになる。したがって、AI 処理後に未分化体細胞がセルトリ細胞に分化したことが示唆された。この時点では、*Sox9a2* も同一細胞で発現している。さらに AI 処理を続けると、シスト中で精子形成が進行してシスト内が精母細胞で占められるようになると体細胞（セルトリ細胞）での *Gsdf* の発現は消失し、その後に (AI 処理を開始して60日後) 精巣組織内に精子が出現した。精巣から取り出した精子で正常の成熟雌からの卵を受精させると受精卵が得られ、胚は正常に雌個体として成熟し、受精能を有する卵を生産した。また、発達した精巣組織中にはライディッヒ細胞も認められるようになる (図20、21)。



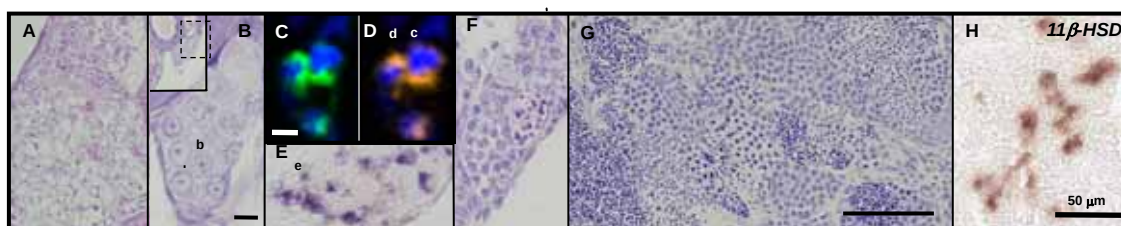


図 20. AI 処理開始後のメダカ成熟雌魚の生殖腺。AI 処理開始後に大型卵胞の退行が起こり (A)、次いで卵巣腔に近い部分のシストに多数の精原細胞が認められるようになる (B)。これらのシスト中には精原細胞を取り囲んで *Sox9a2* と *Gsdf* に陽性な体細胞 (セルトリ細胞) が存在する (C-E)。さらに AI 処理を続けると精巣組織はさらに発達して (F)、精子およびライディッヒ細胞がみとめられるようになる (F-H)。

AI を処理された雌魚は 2–3 日以内に産卵を停止する。その後、卵巣では徐々に大型卵胞の退行が始まる。この退行卵胞の濾胞組織は退行初期には *Foxl2* 発現のみが認められたが、他の雌雄特異的のマーカ遺伝子は in situ hybridization では検出されないばかりでなく、さらに退行が進行して卵胞が消失するまで、用いた雌雄遺伝子マーカーは検出されなかった。したがって、AI 処理後にみられる退行卵胞が精巣組織の構成要素の一部に分化転換する可能性は低いと判断された。

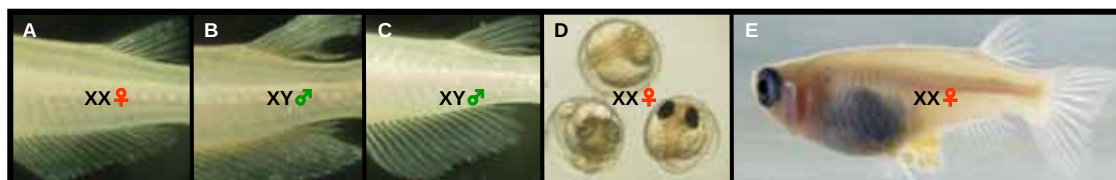


図 21. メダカ XX 成熟魚における芳香化酵素阻害剤 (AI) の影響。A, 対照雌; B, 対照雄; C, AI 処理 1 日; D, AI 処理後の性転換雄と正常雌と交配して得られた受精卵; E, D の受精卵が成熟した XX 雌。

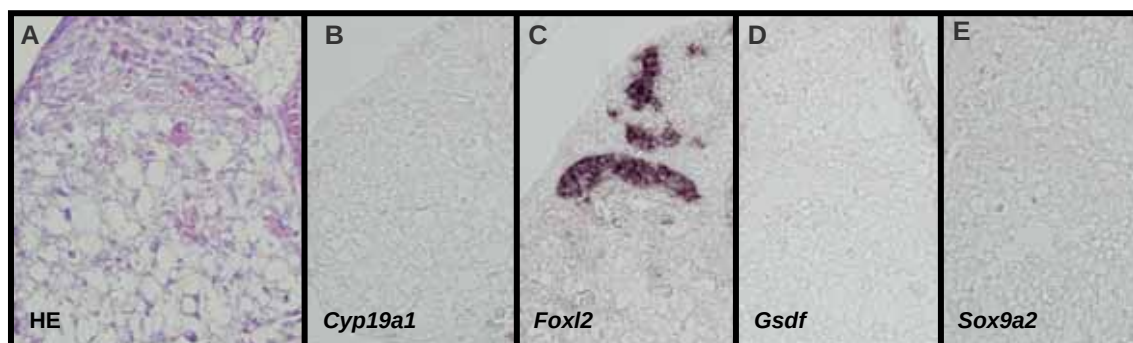


図 22. AI 処理開始後の XX 生殖腺における各種遺伝子の発現。

これらの結果から、2 種の雌雄異体魚の卵巣はエストロゲン産生が抑制されると精巣へと性転換することが脊椎動物ではじめて示された。したがって、これまで哺乳類などと同様に、雌雄異体魚 (メダカやティラピアなど) の成体では性転換が起こらないと考えられてきたが、本研究の結果はこの仮説を覆すこととなった。さらに、成熟雌魚の卵巣における卵胞の維持には卵胞中でエストロゲンが適量常につくられていることが必要であることも明らかになった。また、本研究で得られた結果を総合すると、成熟雌魚には卵と精子のどちらにも分化、成熟し得る未分化生殖幹細胞が存在すること、その幹細胞を取り囲む体細胞で発現する *Sox9a2* は生殖細胞を幹細胞にとどめさせる何らかの役割を果たすものと推察される。また、AI 処理により内因性エストロゲンが抑制されると *Gsdf* 遺伝子の発現の引き金が引かれ、精巣組織の構築、さらには精子形成へと進行するものと推察される。今後、成熟卵巣におけるエストロゲンによる未分化シスト構造の保持の分子メカニズム、さらに

はその生成量の低下によって起こる *Gsdf* の発現の分子メカニズムおよびその機能について明らかにする必要がある。なお、最近、別の研究者ら (Nakamura et al., Science, 2010) は、メダカ卵巣中に生殖幹細胞 (Germline stem cells; GSC) および *Sox9a2* 陽性体細胞の存在を報告した。

## 5) 脳の性的可塑性の分子メカニズムに関する研究：

### A. メダカ

#### a. 成熟魚の性行動の性的可塑性：

まず、メダカの成魚の性行動に性的可塑性があるのかを調べた。メダカ胚を性ホルモンで処理することで、遺伝的な性に関わらず、人為的に性の表現型をコントロールできることが知られている。そこで、メダカ成魚を、異性に特有な性ホルモンで処理し、異性の性行動が誘起されるかを調べたところ、エストロゲン (E2) を含む水で飼育した雄のメダカ成魚は、E2 処理 2 日目から雌型の性行動を示すようになり、通常の雄と交差 (哺乳類の交尾に相当する行動) まで行った。また逆に、アンドロゲン (メチルテストステロン) を含む水で飼育した雌のメダカ成魚は、処理後 4 日目から雄型の性行動を示すようになり、通常の雌と交差を行うようになった。これらのことから、自然条件下では性転換を行わないメダカでも、性転換魚と同様に生涯にわたり脳の性的可塑性を保持していることが明らかとなった。また、メダカ脳の性転換は、実験に使用した濃度の 10 ng/ml 性ホルモン処理では、2-4 日を要することが示された。

#### b. メダカの脳に発現する遺伝子群：

成熟メダカで性行動の可塑性が保持されていることが明らかになったので、次に、メダカの雌雄成魚の脳内で性特異的に発現する遺伝子の探索を試みた。cDNA サブトラクション法および定量的 PCR 法を用いたスクリーニングの結果、雌の脳で高い発現量を示す 5 種類の遺伝子と、雄の脳で高い発現量を示す 6 種類の遺伝子が同定された。さらに、それらの遺伝子の全てについて、cDNA クローニングを行い、全長塩基配列を決定した。スクリーニングによって得られた遺伝子の一つに、雄の脳の方が雌の脳よりも約 3-4 倍高い発現量を示す興味深い遺伝子があった。その遺伝子は、配列の一部に *snap* (small nuclear RNA activating protein) に似た領域をもつことから、*snapl* (*snap*-like) と呼ぶことにした。*snapl* の発現は、表現型の性には一致せず、遺伝的な性に一致するパターンを示すことから、*snapl* の発現パターンは、性ホルモンなどの二次的な要因によって規定されているのではなく、遺伝的に直接規定されていることが推察された。次いで、*snapl* はメダカゲノム中に複数コピー存在し、雄と雌がもっている *snapl* 遺伝子のコピー数の比は、およそ 2:1 であることが分かった。このことは、複数コピー存在する *snapl* 遺伝子のうち、少なくとも 1 コピーは Y 染色体上に位置していることを示している。そこで、Y 染色体上の *snapl* 遺伝子を *snably* (*snapl* on Y chromosome) と命名した。約 1.8 kb の *snapl* 転写産物は、雌雄の脳にほぼ同量発現しているが、5.2 kb の転写産物は完全に雄特異的であった。つまり、雌雄の脳で共通に発現している 1.8 kb の転写産物は、常染色体上あるいは性染色体の相同領域に位置する *snapl* 遺伝子に由来するものであり、一方、雄特異的に発現している 5.2 kb の転写産物は、Y 染色体上の Y 特異的領域に位置する *snably* 由来であることが明らかとなった。以上のことから、Y 染色体上の *snably* が、かなり早い発生段階から成魚にいたるまで、雄の脳特異的に発現していることがはじめて示された。現時点では *snably* の機能については不明であるが、その発現の性差が、生殖腺のいかなる性差よりも早く現れることから、メダカの脳は自立的に性分化している可能性が示唆される。

メダカ成魚の脳で性特異的な発現を示す遺伝子として脳型芳香化酵素遺伝子 (*Cyp19a2*) を単離した。*Cyp19a2* は RT-PCR 解析でも、他の性ステロイド或いは受容体の遺伝子の発現



に比べて著しく高いことがわかった。一方、*Cyp19a1*（卵巣型芳香化酵素）の発現はまったく認められなかった。*Cyp19a2* は成魚の脳で比較的広い分布を示すが、発現量は常に雌の脳で高い。なかでも、視蓋最内層（VGZ）とよばれる領域でもっとも大きな性差（雌>雄）を示すことが明らかになった（図 23）。性ステロイド処理 10 日後の VGZ 領域における *Cyp19a2* の発現を In situ hybridization で詳細に解析した結果、雌の脳でアンドロゲン処理により抑制され、雄の脳でエストロゲン処理により促進されることがわかった（図 24）。次に、AI で 10 日間処理した成熟雌を何も処理しない正常な雌とペアにすると、AI 処理雌は正常雌を追尾して正常な雄の性行動を示した。また、この AI 処理後の雌脳では、正常な雌の脳とは異なり、視蓋最内層における *Cyp19a2* の発現が著しく減少していた。この時、生殖腺中の *Cyp19a1* の発現には顕著な変動はみられなかった。また、メダカの脳の性ステロイドホルモン含量を液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計（LC-MS/MS）法により測定したところ、雌でエストラジオール - 17 $\beta$  が高値を示すことが明らかになった（図 25）。これらの結果から、脳型芳香化酵素（従って、エストロゲン）が雌魚の雄行動の誘起に、すなわち性的可塑性に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

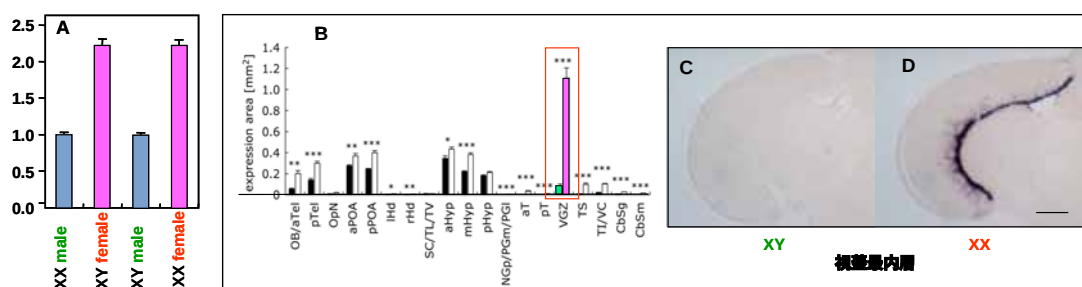


図 23. メダカの脳における脳型芳香化酵素遺伝子 (*Cyp19a2*) の発現。遺伝的雌または遺伝的雄にエストロゲン処理を施したグループで *Cyp19a2* の発現は高い (A)。 *Cyp19a2* は脳の広い領域に分布するが、視蓋最内層 (VGZ) での発現が雌で顕著に高い (B-D)。雄 (C) と雌 (D) の最内層。C, D (bar 200  $\mu$ m)。



図 24. メダカの視蓋最内層における脳型芳香化酵素遺伝子 (*Cyp19a2*) の発現に及ぼすエストロゲン (E2)、芳香化酵素阻害剤 (AI)、卵巣摘出 (Ovx)、卵巣摘出+エストロゲン処理の影響。

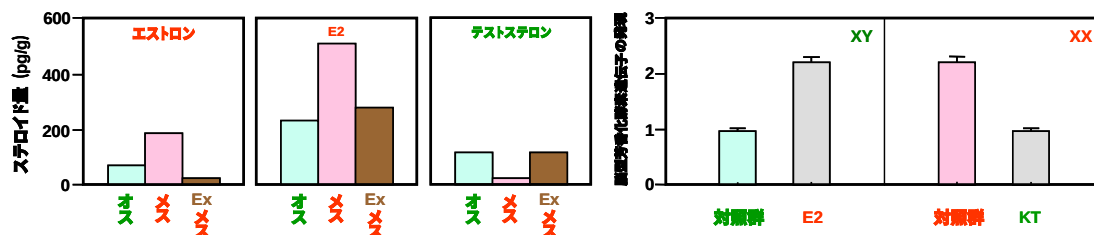


図 25. メダカ脳における性ステロイドホルモン含量および、エストロゲン或いはアンドロゲン処理したメダカの脳型芳香化酵素 (*Cyp19a2*) 遺伝子の発現量の変化

## (2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

本研究で得られた主な成果は以下のとおりである。1) メダカの性分化の新しい制御因子として *Gsdf* (精巣分化) と *ER2 $\beta$*  および *Rspo1* (卵巣分化) を同定した、2) 胚・稚魚期の性ホルモンによる性転換は体細胞の遺伝子発現の転換によりもたらされることを示した、3) 成熟卵巣におけるエストロゲン産生の低下が成魚の成熟卵巣から成熟精巣への性転換を起こすことを発見した、4) 成熟卵巣に常に存在する未分化生殖幹細胞と体細胞の集塊 (シスト) が新たに形成される精巣組織の起源となることを見出した、5) 性ホルモン依存性の性行動の転換に脳内の視蓋最内層に局在する脳型芳香化酵素が深く関わることを示唆した。

このうち、*Gsdf* に関しては *Dmy* の直下に作動する遺伝子の候補として精巣分化に重要な役割を果たすことが示唆された。今後、精巣の分化過程に関わる *Dmy* と *Gsdf* との関連を明らかにすることでこれまで哺乳類の性決定遺伝子 *SRY/Sry* のみで解析されてきた性決定遺伝子の作用機構について新たな知見が得られるものと期待される。さらに、エストロゲン低下による成熟卵巣から成熟精巣への性転換過程で *Gsdf* は未分化生殖腺体細胞をセルトリ細胞へと分化させる作用をも示すことが明らかになった。*Gsdf* の発現機構が明らかにされれば、成熟卵巣における性転換の初期過程が明らかになるばかりでなく、これまで研究されることがない性ホルモンによるセルトリ細胞の分化メカニズムがはじめて解析される可能性がある。メダカの卵巣分化に関して、エストロゲン受容体  $\beta 2$  と *Rspo1* が重要な因子として同定され、そのノックダウンはいずれも機能的雄への性転換をもたらすことがはじめて示された。両者の関係が明らかになれば、鳥類を含めた他の脊椎動物での卵巣の分化メカニズムの理解に大いに貢献することになる。また最近、3 種のエストロゲン受容体の抗体が作製され、現在それら各々のメダカにおける特異性が検討されている。今後、これらの抗体はメダカの卵巣分化や性的可塑性の制御におけるエストロゲンの作用メカニズムの解析に大いに活用されるであろう。

本研究ではまた、特定の遺伝子の機能を生涯にわたって破壊するノックダウン法 (RNAi) が開発されたばかりでなく、メダカを用いた遺伝子ノックアウト法の開発に関しても予期した以上の成果があがった。メダカの ES 細胞で相同組換えによるジーンターゲッティングに成功したのである。メダカ遺伝子のノックアウト法の開発の可能性が一気に高まったのではないかと、そのさらなる進展を期待している。もしこれが成功すれば、生物実験モデルとしてのメダカの重要性・優位性は益々高まり、マウスとともに遺伝子機能を解析するための担い手として、脊椎動物の生物・医学研究に及ぼす影響と効果は非常に大きいと判断される。

## 4. 2 “一方向と両方向の性転換魚における生殖腺の性的可塑性に関する研究 (中村グループ)”

### (1) 実施の内容

性転換魚の性的可塑性については、数種の性転換魚（ベラ、ハゼ、クマノミ、ハタ等）を駆使して生殖腺に焦点をあて研究を推進した。それぞれの魚の性転換様式を詳細に調べるとともに、その制御メカニズムについて、特にホルモン因子とのかかわりについて解析を行った。これらの性転換魚の雌（卵巣）から雄（精巣）への性転換で、いずれの種でも、最初の引金は常にエストロゲン量の急激な減少であることがわかった。また、ファドロゾール（芳香化酵素阻害剤, AI）処理によりエストロゲン生成を抑制することで雌から雄への性転換を誘起することができることを示すとともに、この処理が比較的短期間（5日間）で十分な効果を発揮することを見出した。機能的性転換が完了するまでには処理開始日から約3週間がかかるが、このうち最初の5日間のみファドロゾール処理で十分であり、残りの期間はファドロゾールを含まない餌で飼っても性転換は完了することがわかった。

#### 1) ミツボシキュウセン（雌から雄への性転換）

##### A. 性転換過程

###### a. アポトーシス

AIによる性転換誘導の系を使い、卵巣が精巣に完全に置き換わる過程の生殖細胞と体細胞の起源を解明するためにアポトーシス（細胞自殺）と細胞増殖について解析した。アポトーシスの鍵酵素であるCaspase-3に対する特異抗体を用い、性転換に伴うアポトーシス細胞の出現を免疫組織化学的に解析した。成熟卵巣においては、Caspase-3陽性細胞は観察されなかった。性転換初期生殖腺では、多数の卵母細胞の核においてCaspase-3に対する陽性反応が観察された（図26）。一方、生殖幹細胞や体細胞ではCaspase-3陽性を示す細胞はほとんど確認されなかった。このことから、分化・発達した卵母細胞の退行・消失はアポトーシスが原因であると考えられた。しかし、生殖幹細胞と体細胞にはアポトーシスはほとんど観察されなかったことから、卵巣組織を構築していた生殖幹細胞と体細胞は性転換後も精巣に残ることが明らかになった。

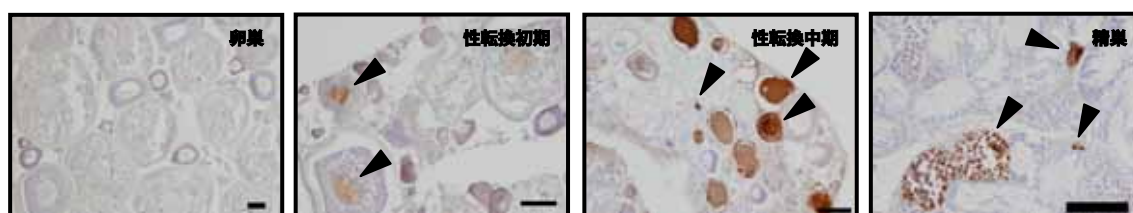


図26. 性転換に伴うCaspase-3の免疫組織. 性転換の開始とともに発達した卵細胞にアポトーシスの指標となるCaspase-3の発現が見られるようになる. 性転換に伴い卵母細胞はアポトーシスにより死に消失する.

###### b. 細胞増殖

性転換に伴う細胞の増殖は、臭化デオキシウリジン（BrdU）を取り込ませることで追跡した。性転換初期では退行卵を取り囲む多数の顆粒膜細胞にBrdUの取り込みが観察された。卵母細胞の消失にともないBrdU陽性細胞は卵巣薄板中央部の体細胞群中に多く見られた。性転換後期の精子形成を開始した生殖腺においても卵巣薄板の中央部にBrdU陽性反応を示す体細胞群が観察された。このことから、卵を取り囲む顆粒膜細胞は増殖し、精巣へ転換後間質部に残存すること明らかになった（図27）。一方、生殖細胞では、性転換開始直後に少数の生殖幹細胞にBrdUの取り込みが観察された。性転換後期の生殖腺でも精原細胞や、精細胞、精子にBrdUの取り込みが観察された。しかし、BrdUを取り込んだセルトリ細胞とライデッヒ細胞は殆ど見られなかった。生殖幹細胞は、性転換開始の極く初期に増殖し、

分化を開始することが明らかになった。

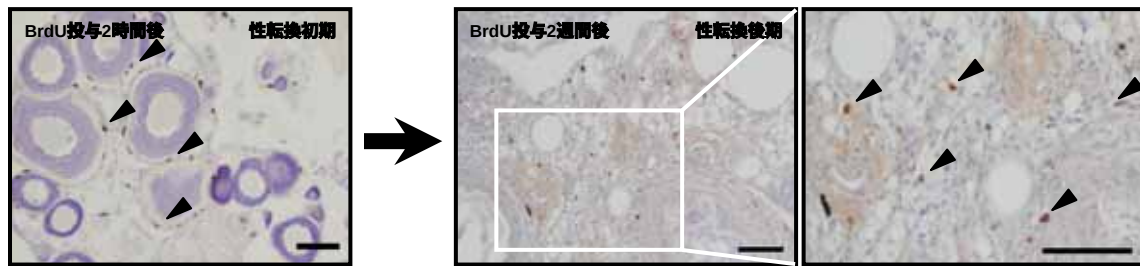


図 27. 性転換に伴うBrdU陽性細胞の追跡. 細胞分裂の指標となるBrdU取り込みは性転換開始時の退行卵を取り囲む顆粒膜細胞に多く見られた. 性転換後でも精巣間質部にBrdUを取り込んだ細胞が残ることが明らかとなった.

### c. Foxl2

芳香化酵素の転写調節因子で、卵巢分化に関係する *Forkhead transcriptional factor L2* (*Foxl2*) を体細胞のマーカーとして、性転換に伴う発現変化について明らかにした。定量的PCRの結果から卵巢と精巣では *Foxl2* の発現量に性差は見られなかった。次に、*Foxl2* に対する特異抗体を作製し、性転換過程における生殖腺内の発現変化について解析した(図 28)。その結果、雌の卵巢内において *Foxl2* は卵母細胞を取り囲む顆粒膜細胞に特異的に発現することを明らかにした。また性転換初期の退行卵を取り囲む顆粒膜細胞の陽性反応は低下した。しかし、残された卵母細胞の顆粒膜細胞には *Foxl2* が発現していた。また、これまで *Foxl2* の発現が観察されなかった卵巢白膜の内側に存在する体細胞において *Foxl2* が強く発現し始める事も明らかにした。続いて性転換が進行し卵母細胞がほぼ消失した性転換後期の生殖腺において *Foxl2* は顆粒膜由来と考えられる細胞に発現が見られ。精巣において *Foxl2* は間質に存在する体細胞と精原細胞の周りの体細胞で発現していた。これらの結果から、卵巢から精巣へと転換する際に、少なくとも卵巢内にある顆粒膜細胞由来の細胞は精巣を構築する細胞として再利用されていることが強く示された。

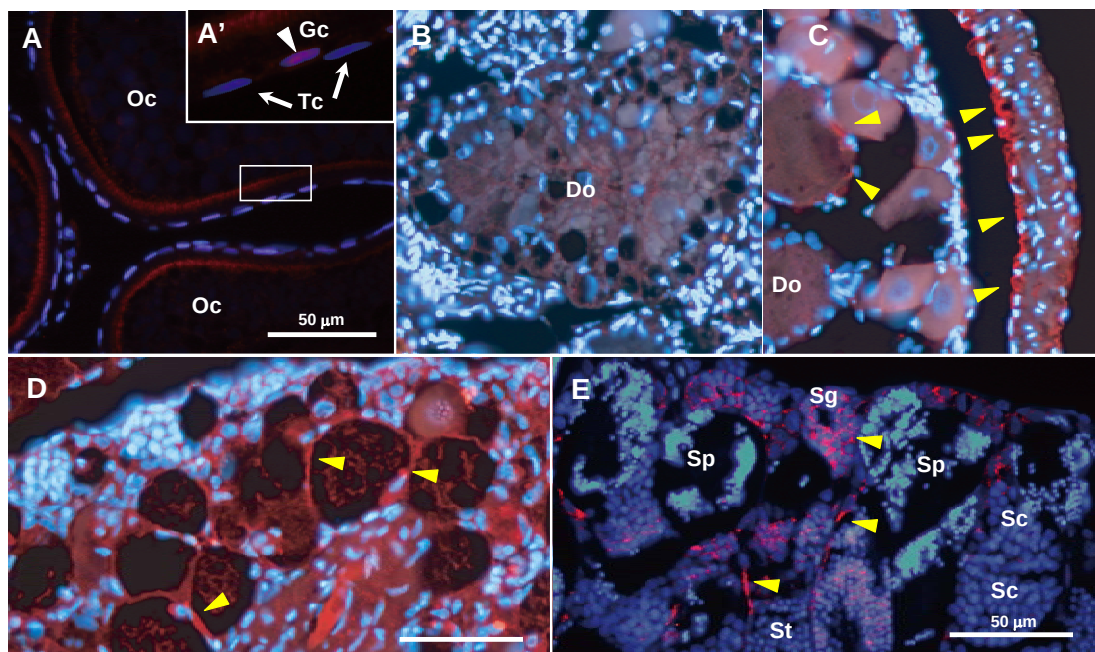


図 28. 性転換に伴うFoxl2の発現変化. 卵巢 (A) では顆粒膜細胞 (gc) に発現する. 性転換初期 (B, C), 性転換後期 (D) を経て精巣への性転換後 (E) でも間質部分に陽性細胞 (矢尻) は残存する. Oc; 卵母細胞, Tc; 夾膜細胞, Do; 崩壊卵, Sp; 精子, St; 精子細胞, Sc; 精細胞, Sg: 精原細胞.

### d. Dmrt1

次に、精巣分化に重要な役割を果たすと考えられている *Dmrt1* の発現を定量的 PCR を用



いて調べた。その結果、卵巢においても発現が見られた。性転換初期の生殖腺では低い、性転換後の精原細胞の増殖や精母細胞の出現する時期になると発現量が上昇し、精巣に転換後には有意に高い発現を示した。Dmrt1 に対する特異的抗体を作製して、性転換に伴う発現細胞を追跡した（図 29）。その結果、卵巢では顆粒膜細胞にシグナルがみられた。性転換中期では卵巢薄板縁辺部の体細胞に陽性反応が見られ始めた。性転換後期の精原細胞、精母細胞を取り囲むセルトリ細胞に強い反応が見られた。

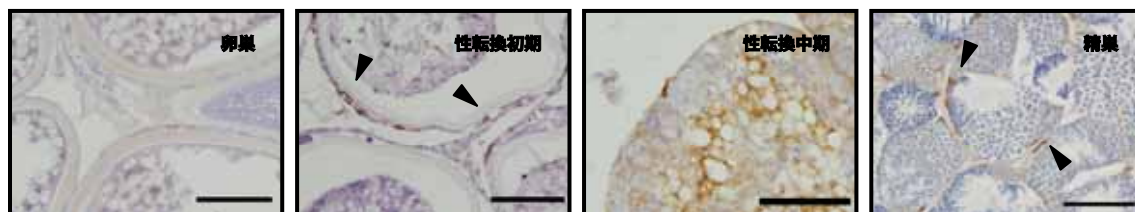


図 29. 性転換に伴う Dmrt1 の変化。性転換開始直後の生殖細胞を取り囲む体細胞に発現がはじめて出現する。精原細胞の増殖に伴いセルトリ細胞に強く発現する。

#### e. *Gsdf*

精巣に特異的に発現し、精巣分化に非常に重要な役割を持つと考えられている *Gonadal soma derived factor (Gsdf)* 遺伝子をマーカーとして性転換に伴う精巣を構築する体細胞の起源について in situ ハイブリダイゼーション法により解析した（図 30）。*Gsdf* 遺伝子の発現は、卵巢の生殖細胞と体細胞では見られなかった。しかし、性転換の極く初期の生殖幹細胞を取り囲む体細胞に明確なシグナルが観察された。その後も *Gsdf* 遺伝子の発現は、増殖した生殖幹細胞に隣接する体細胞においてのみ観察された。性転換完了後の精巣においてもセルトリ細胞に強い発現が確認された。以上の結果、性転換初期の段階において生殖幹細胞を取り囲む支持細胞はセルトリ細胞へと分化することが示唆された。このセルトリ細胞の機能獲得により生殖細胞は精子形成へと向かうことが示唆された。更に、セルトリ細胞は少なくとも卵巢中にある生殖幹細胞を取り囲む体細胞より由来するものと考えられる。

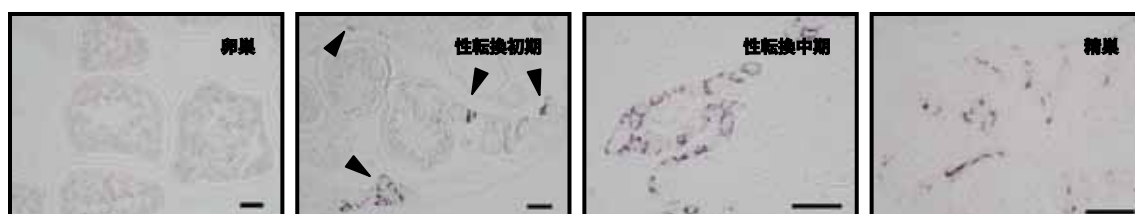


図 30. 性転換に伴う *Gsdf* 遺伝子の発現変化。性転換開始直後の生殖細胞を取り囲む体細胞に発現がはじめて出現する（矢印）。精原細胞の増殖に伴いセルトリ細胞に強く発現する。

#### f. *Cyp19a1*

血中のエストロゲン量の急激な減少が性転換の引き金であることが明らかになった。エストロゲン合成に関与する芳香化酵素遺伝子 (*Cyp19a1*) を in situ hybridization 法により解析した（図 31）。その結果、卵巢での *Cyp19a1* の発現は、卵黄形成期の卵母細胞を取り囲む顆粒膜細胞において発現が確認された。性転換開始直後から *Cyp19a1* 発現細胞は減少した。性転換中期に至ると、発現細胞はほとんど観察されず、精巣においても芳香化酵素遺伝子のシグナルは観察されなかった。この結果は、性転換開始後に見られる血中 E2 量の変化と一致していた。

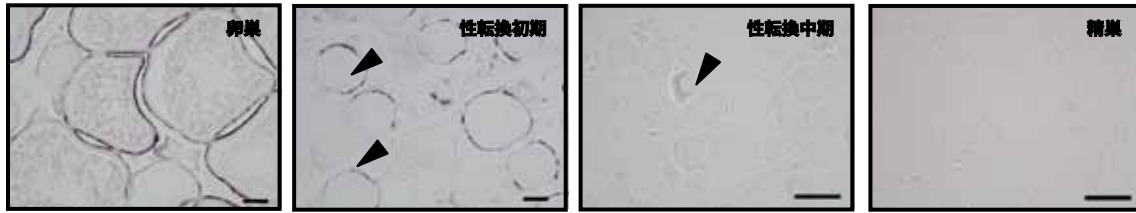


図3 1. 性転換に伴うCyp19a1 遺伝子の発現変化. 卵巣では発達した卵母細胞を取り囲む顆粒細胞に強い反応が見られる. 性転換に伴い発現が弱まり, 性転換中期以降では発現は全く見られなくなる.

## B. エストロゲン処理による雄から雌への性転換

ミツボシキウセン成熟雄の精巣に対するエストロゲンの影響を調べた。活発に精子形成する生まれつきの雄 (IP) にエストロゲンの経口的 (20–200  $\mu\text{g/g}$  餌料) 処理を行なった (図 32)。その結果、精子形成を行う生殖細胞は退化し、若い卵母細胞が精巣全体に出現した。最終的に精巣組織が完全に消失して、濾胞細胞を持つ成熟した卵へと発達した。エストロゲンにより成熟した精巣を卵巣へと転換することに成功した。

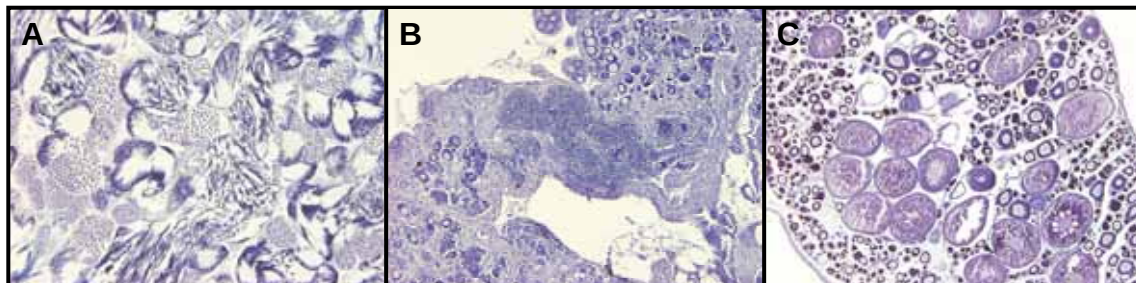


図3 2. ミツボシキウセン成熟雄の精巣に対するエストロゲンの影響. (A) 雄の成熟精巣, 活発に精子形成を行っている. (B) エストロゲン処理した個体の精巣、精子が著しく少なくなり、若い卵母細胞が出現してくる. (C) エストロゲン処理により精巣から卵巣への転換、精巣組織が完全に消失して濾胞細胞が発達した成熟した卵母細胞が発達する.

## 2) クマノミ (雄から雌への性転換)

雌性腺魚のクマノミ *Amphiprion clarkii* はイソギンチャクに一夫一妻と数尾の未熟個体と共生して社会を形成している。この社会から雌がいなくなると雄が雌に性転換する。未成熟魚の中で一番大きな個体が雄として成熟して再び一夫一妻の社会を形成する。そこで、このクマノミの成魚と性転換過程における生殖腺の構造を調べた。成魚雄の生殖腺は成熟した精巣と未熟な卵巣からなる両性生殖腺であった。一方、成魚雌の生殖腺は、成熟した卵からなる卵巣組織より形成されていた (図 33)。雌への性転換は、雄の両性生殖腺の精巣組織が消失して、未熟な卵巣組織が発達することで完了することが明らかとなった。



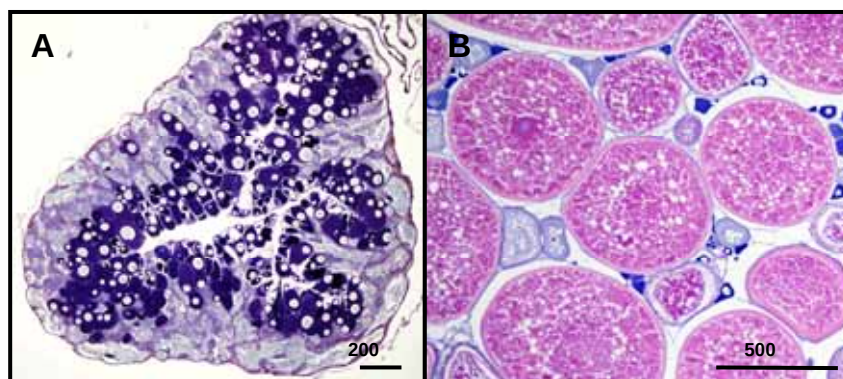


図 3 3. クマノミ成魚の生殖腺の構造. (A) 成魚雄の生殖腺; 未熟な卵巣と成熟した精巣を同時に持つ両性生殖腺構造である. (B) 成魚雌の生殖腺雌の生殖腺; 成熟した卵母細胞を持つ. 精巣組織は見あたらない.

次に、性分化過程を調べた。孵化後の個体の生殖腺は未分化な状態であった。その後、全ての個体の生殖腺は卵巣に分化、発達した。その後、卵巣の中に突然精巣組織が分化、発達して両性生殖腺となった。更に、精巣組織が成熟して雄として機能することが明らかとなった（図 34）。生まれつきの精巣を持つ雄はいなかった。全ての雄は卵巣を持つ雌から由来することが明らかとなった。

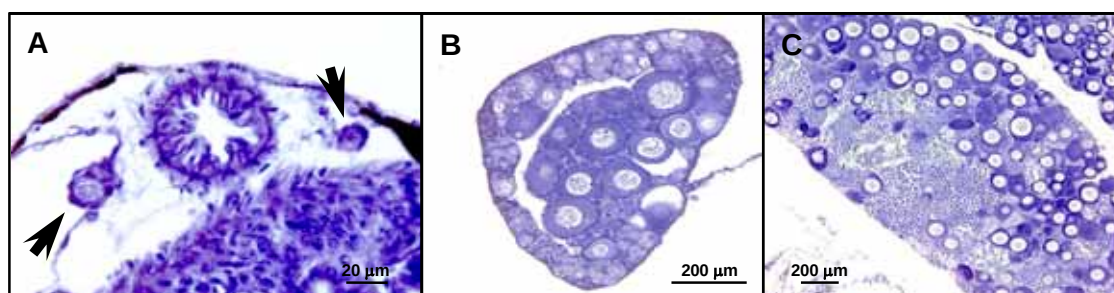


図 3 4. クマノミの性分化過程における生殖腺構造の変化. (A) 孵化直後の未分化生殖腺（矢印），生殖細胞を取り囲む体細胞よりなる. (B) 未熟卵巣, 全ての個体は卵巣を持つ雌となる. 精巣を持つ生まれつきの雄はいない. (C) 両性生殖腺の分化, 卵巣中に精巣組織が出現する.

雄から性転換した雌の卵巣には精巣組織が認められないが、成熟雌に芳香化酵素阻害剤を投与すると卵巣中に再び精巣が出現した。エストロゲンの低下は精巣分化を引き起こした（図 35）。

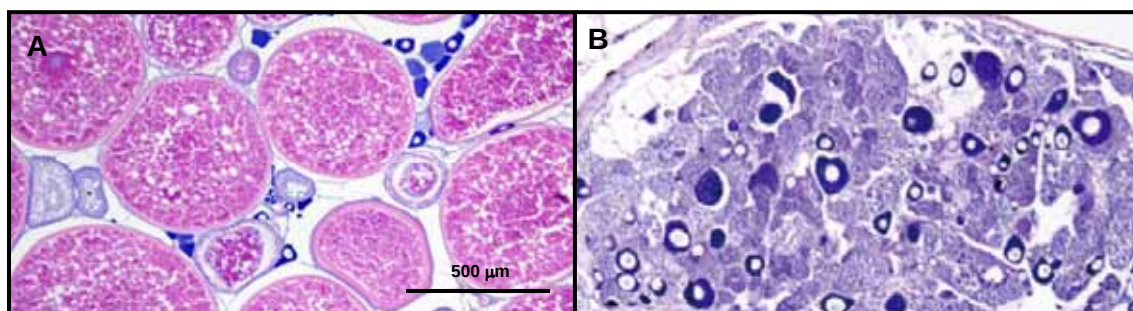


図 3 5. クマノミの芳香化酵素阻害剤処理による生殖腺の構造の変化. (B) 芳香化酵素阻害剤投与により成熟した卵巣中に精巣組織が出現する。

### 3) オキナワベニハゼ (双方向の性転換)

#### A. オキナワベニハゼ (以下オキベニと略) の性転換 (長濱グループとの共同研究)

##### a. 社会環境要因の性転換機構の解析

オキベニ (*Trimma okinawae*) は繰り返し何度も両方向に性転換する非常に興味ある性転換様式を示す。本種は脊椎動物の性の可塑性を調べるには非常に優れた実験モデルとなる。性転換を引き起こす機構について調べた。

これまでの CREST プロジェクトでは、オキベニの雄あるいは雌をペアにして性転換を誘導する飼育実験を再度行い、性行動の変化について解析した (図 36)。雄あるいは雌ペア飼育に関わらず、実験開始直後にペア同士の激しい争い行動 (闘争行動) が観察された。闘争行動は雄ペアでは  $41 \pm 15$  分、雌ペアでは  $21 \pm 9$  分間行われた。雄・雌ペアに関わらず例外なく体サイズによって順位を決定し、体の大きな個体が巣を占拠した。次に、体の大きな個体は小さな個体に対し求愛行動を行った。その後、雌ペアでは実験開始後 5 日目に、雄ペア実験開始後 10 日目に産卵が起きることを確認した。以上の結果より、オキベニでは生殖腺の性転換以前に行動変化 (闘争行動) が始めに起こり順位決定が決定される。次に大きな個体が巣の占拠/求愛行動が起こり、生殖腺が性転換し、その後、産卵に至る過程を明らかにした。

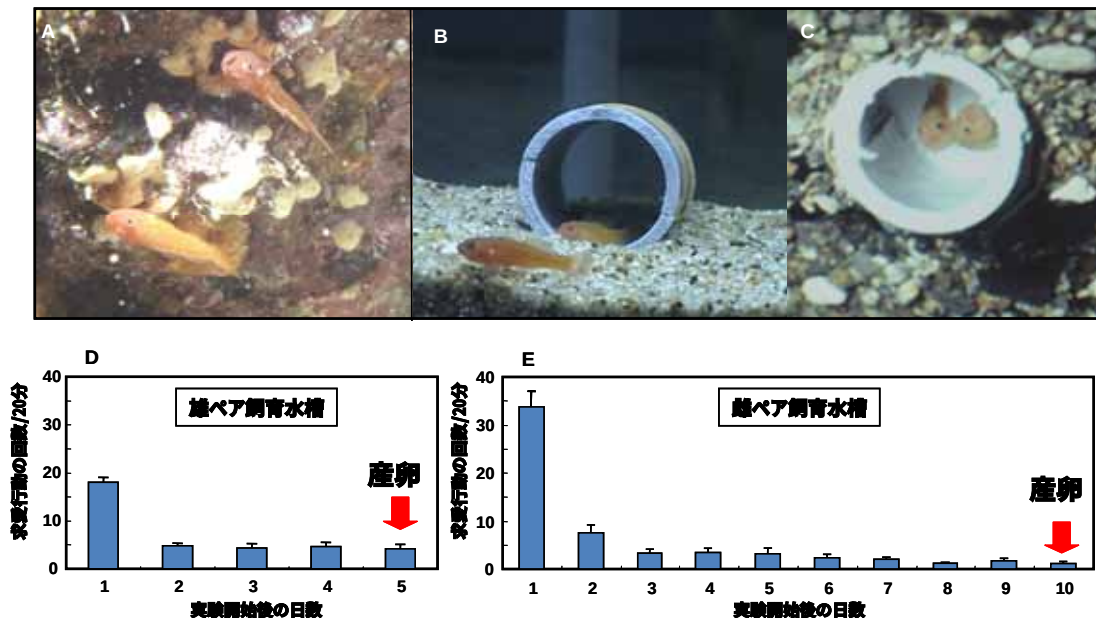


図 36. オキナワベニハゼ (A) のペア飼育。闘争行動終了後、ペア内の順位が決定され体サイズの大きな個体が巣を占拠する (B)。その後、雌のペア水槽では実験開始後 5 日目 (D)、雄ペア水槽では実験開始後 10 日目 (E) に排卵と産卵が確認される (C)。

次に、接触出来ないが、お互いが見える透明なガラス仕切のある水槽を用意し、大小 2 尾の雌・雌または雄・雄を入れて性転換について調べた (図 37)。実験開始直後ガラス越しに闘争行動を示すペアでは、常に体長の大きな個体が雄で小さな個体が雌であった。更に、お互いが見えないが水が行き来出来る水槽を用意し雄ペアと雌ペアで性転換を調べた。雄ペアでは性転換しなかったが、雌ペアは両個体とも雄となった。フェロモンの影響によると考えられる性転換は起こらなかった。以上のことから、オキベニの双方向の性転換には、お互いの接触やフェロモンは必要なく視覚情報だけで十分であることが明らかになった。



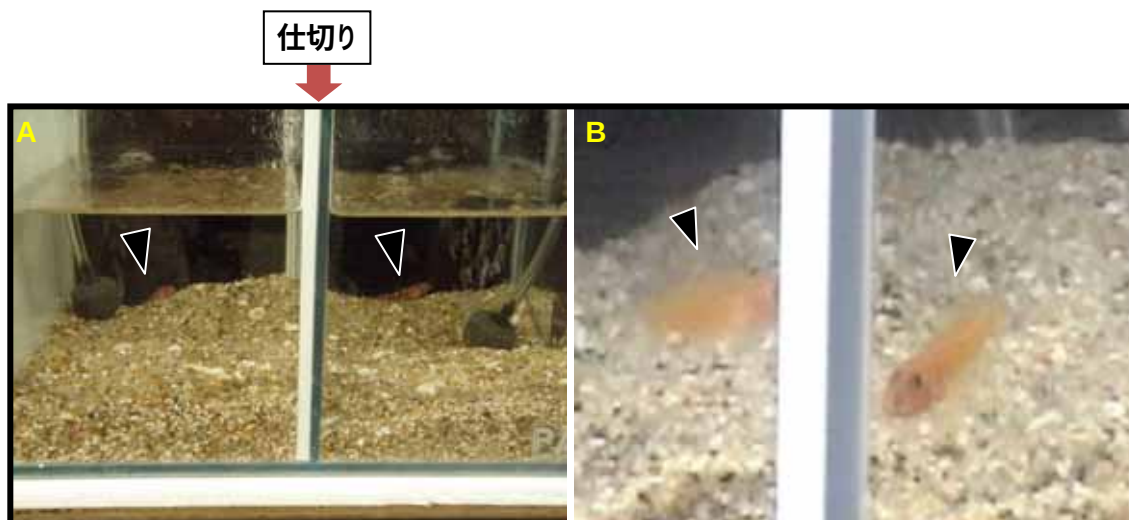


図37. ガラス仕切り水槽に入れたオキナワベニハゼ. A; ガラス仕切り水槽に入れたオキナワベニハゼ (矢印) B; 実験開始直後仕切りを外すとオキナワベニハゼはガラス越しに相手に闘争行動を示す。

次に、人為的な視覚刺激（オキベニと同じ色をした石、オキベニが写ったディスプレイ・写真、別種、鏡）の影響を調べた。設置した多くの刺激に対してオキベニは反応しなかったが、鏡に対してのみ反応が見られた。鏡に映った自分の姿に闘争行動を示した。さらに鏡を見せ続けると闘争行動終了後の逃避行動も観察され最終的に雄から雌への性転換を誘導することに成功した。しかしながら個体差が大きく 25 例の内、鏡に反応して性転換が誘導されたのは僅か 2 例のみであった。次に、凹凸鏡による実験も行ったが、鏡に反応せず、闘争行動、性転換も誘導出来なかった。さらに我々はオキベニと外見は非常に似ているが別種のベニハゼ(*Trimma caesiura*)を同一水槽内での飼育影響について調べた (図 38)。体の大きなベニハゼ雌と小さいオキベニ雌を飼育した場合、オキベニの雌は体が小さいにも関わらず雄へ性転換した (n=8)。これらの事からオキベニは同種と他種を厳密に認識し、社会環境圧は同種によってもたらされることが明らかとなった。

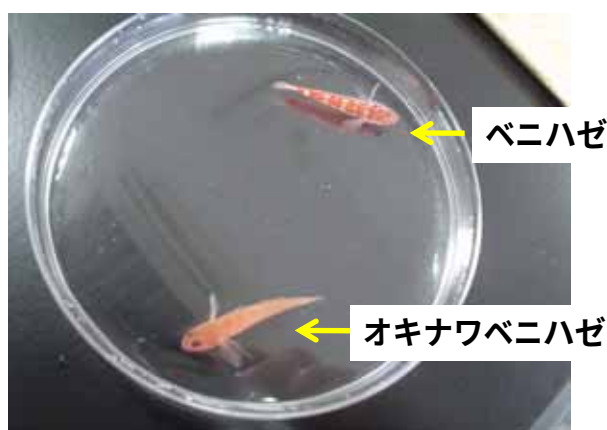


図38. オキナワベニハゼとベニハゼ. 両種は近縁種であり体サイズ、生息場所等同じである。(体の模様に関連点が見られる)。両種を同一水槽に飼育すると、巣を巡って争う。

今までの実験より、視覚により周りの同種個体との社会環境によって自らの性を決定する。そこで社会環境の影響のない雄あるいは雌単独飼育による性選択性を調べた。その結果、実験開始前に雄であった全ての個体は、雄のままであった (n=8)。しかし雌の単独飼育では 8 例中 7 例において、雄へ性転換した。このことから、オキベニは雄も雌も常に雄になることを望んでいると推測された。この事実は雄となることで、多くの雌との交配により次世代で自分の DNA を多く残せるようにするためであると考えられる。

## b. 生殖腺刺激ホルモンと生殖腺刺激ホルモン受容体の役割

先の CREST プロジェクトでは、オキベニの性転換時に生殖腺刺激ホルモン(GTH)の受容体 (*Gthr*) 遺伝子の発現が急激に変動することを見出した。本研究では、GTH 受容体遺伝子の発現変動を定量的 PCR でさらに詳しく解析し、2 種類の GTH-R (濾胞刺激ホルモン受容体, FSH-R; 黄体形成ホルモン受容体, LH-R) はいずれも、性転換の方向にしたがって急激に増加することを示した (例えば、雌から雄への性転換では卵巣部分の発現が急減し、精巣部分の発現が増加する) (図 39)。また、この性転換時の卵巣組織と精巣組織を別々に分離し、生殖腺刺激ホルモン (サケ GtH とヒト胎盤性性腺刺激ホルモン) と共に培養すると、受容体遺伝子の増減に対応して生殖腺刺激ホルモンに対する感受性が変動した。雄性先熟魚のクマノミの性転換においてもオキベニ同様に両 GTH-R が関与していることが明らかになった。視覚から脳を介して生殖腺に至る遺伝子関与を図 40 にまとめた。

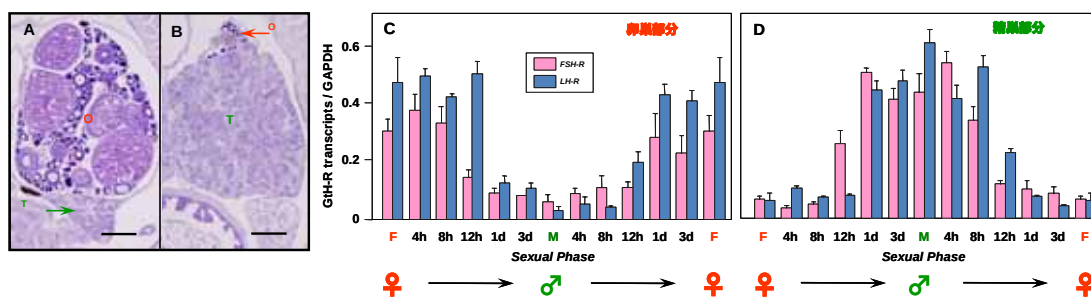


図 39. オキナワベニハゼの性転換. 雌から雄, そして再び雌への性転換時に生殖腺刺激ホルモン受容体遺伝子 (*Fshr*, *Lhr*) の発現が著しく変動する (D, E). 図BとCのOは卵巣, Tは精巣. B, C (bar 200  $\mu$ m).

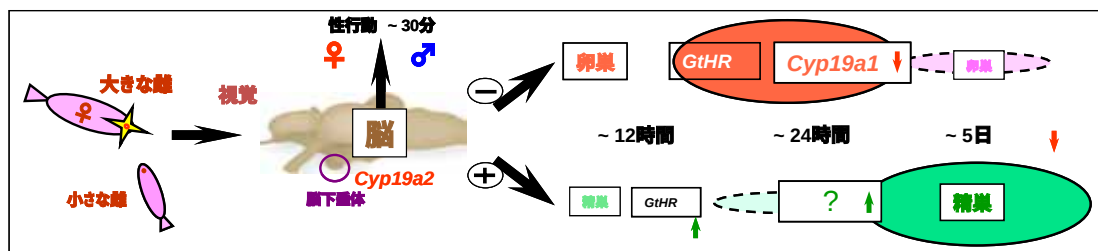


図 40. オキナワベニハゼの性転換. 雌から雄, そして再び雌への性転換時に生殖腺刺激ホルモン受容体遺伝子 (*Fshr*, *Lhr*) の発現が著しく変動する (D, E). 図BとCのOは卵巣, Tは精巣.

そこでオキベニの両 *Gthr* 遺伝子の 5' 上流域を単離し、*Gthr* 遺伝子の転写調節機構を解析した。両遺伝子はいずれも真核生物の細胞で RNA 合成酵素の転写部位である TATA box、あるいは遺伝子転写に関わる CCAAT 配列が欠損していることが明らかになった。これらの結果は両遺伝子が細胞内でユビキタスに発現する遺伝子であることを示している。また両遺伝子上流域には、様々な転写調節部位 (*Fshr*; E-box, ERE-half, Sry, *Lhr*; ERE-half, AP1, CRE) が存在することが明らかとなった。

なお、雌から雄へ性転換するハタでは生殖腺刺激ホルモンのうち濾胞刺激ホルモン (FSH) が雌の脳下垂体で発現が著しく低いのにに対して雄では有意に高い発現を示した。雌へ哺乳類の FSH を投与すると卵巣から精巣への性転換を誘導することが出来た。更に、卵巣から精巣への転換に伴い *Fshr* 遺伝子の発現量が増加することが明らかとなった。このことから性転換開始に脳下垂体の FSH が決定的役割を果たすことを見出した。

次に、GTH により調節されていると考えられる性ホルモン関連因子について調べた。オキベニで開発した DNA マイクロアレイを用いて生殖腺刺激ホルモン受容体の発現変化後の生殖腺における遺伝子発現変化を網羅的に解析した。雌の卵巣と雌から雄への性転換開始後 1 日目の個体 (FM1D) の卵巣は、両組織で形態的差はなく成熟した卵巣であるにも関わらず、非常に多くの遺伝子に変化が見られた。それらの遺伝子の中でも性ステロイドホルモン合成酵素遺伝子群 (*Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Cyp19a1*, *Cyp19a2*) の発現が性転換に伴って全

て有意に減少していた。次に性転換に伴う生殖腺の性ホルモン産生能を調べた。その結果、雌の卵巢ではエストロゲン産生は高かったが、性転換に伴い減少した。一方、テストステロン産生は雄の精巣では高く性転換に伴い低下した。このように、脳からのシグナルである GTH が生殖腺の GTH-R に伝わり、次にステロイドホルモンの合成変化を引き起こし、生殖腺に発達を調節していることが明らかとなった。クマノミの性転換においてもエストロゲンが重要な役割を果たしていることを明らかにした。

## (2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

魚の性転換機構の解明に基づき、雌雄異体魚の成熟雌のエストロゲンを低下する方法により、今まで不可能とされてきた機能的な雄への性転換誘導技術確立した。この方法は、ティラピア以外でもコイ、ゴマアイゴ、ゼブラフィッシュなどの雌雄異体魚でも有効であることから、多くの魚類の親でも性転換が可能であることを示している。一般に性決定が XX 型の場合、遺伝的雌が雄に性転換すると偽雄 (XX 雄) となる。偽雄は正常の雌 (XX) と交配すると子供は全て雌が産まれてくることから雌雄の産み分け技術として水産に応用することが出来る。親で性転換を誘導することが出来れば、優れた形質を持つ (たとえば成長が著しく早い、耐病性を持つなど) 雌を雄にすることで多数の形質の優れた子孫を作ることが出来る。卵で凍結保存は不可能であるが、優れた DNA を精子として凍結保存することが可能となる。ティラピアで明らかになったように、生殖細胞は高温に弱く、長期間の暴露では完全に生殖細胞を欠く不妊化個体を作ることになった。この不妊化魚は、成熟にエネルギーが使われずに成長に回るために著しく成長が早まることが明らかになった。高温飼育による不妊化は、汎用の機器を使い高温を維持するだけの技術で、特別な技量を必要としない。養殖の際に養殖池から逃げだし、飼育地の他の生物を食べることで地域の生態系を破壊することが懸念されるが、不妊化している魚は子孫を残せないことから生態系に与える影響は極めて少ない。また、不妊化魚を大量に生産することが可能であることから、養殖種苗として大いに期待される。近年、本研究の分担者の吉崎グループにより種を超えて生殖細胞を移植する技術が確立された。優れた形質を持つ個体から得た生殖細胞を生殖口よりカニューレーションにより直接不妊化生殖腺に移植することで優れた形質を持つ精子と卵子を容易に作ることが可能となった。成熟サイズまで飼育した不妊化個体の生殖腺に、生殖細胞を移植すると直ちに成熟を開始するので子供を作るまでの時間を著しく短縮すること可能となる。選抜育種は時間がかかるために困難を伴っていたが、生殖腺の不妊化と生殖細胞の移植により時間の問題は改善された。

#### 4. 3 “ 魚類の生殖細胞とその支持細胞の性的可塑性に関する細胞生物学的研究 (吉崎グループ) ”

##### (1) 実施の内容

##### 1) ニジマス卵原細胞は精子へと分化する

魚類の生殖腺の性は、本グループの他メンバーの研究により、その多くが明らかになりつつあるが、魚類の生殖細胞そのものの性に関する知見は未だ少ないのが現状である。そこで、本研究では魚類の生殖細胞の性的可塑性を明らかにする目的で、卵原細胞の移植実験を行った。性分化が完全に完了した9カ月令の *vasa-Gfp* 遺伝子導入ニジマス雌個体（ニジマスの性分化は70日令で完了）から卵巣を採取し、酵素処理により細胞分散を行った後、フローサイトメーターで GFP 陽性の生殖細胞のみを精製することで移植実験に供した。研究分担者はすでに精原細胞を孵化直後の稚魚の腹腔内へと移植すると、移植細胞は拒絶されることなく宿主生殖腺へと自発的に移動し、最終的にはそこに取り込まれ、配偶子形成を開始することを報告している (Okutsu *et al.*, PNAS, 2006)。そこで、本研究でも調整した卵原細胞を孵化稚魚の腹腔内へと移植した (図 41)。その結果、移植された卵原細胞も拒絶されることなく孵化稚魚の生殖腺へと移動し、そこで増殖を開始することが明らかとなった。さらに、宿主が雌の場合、これらのドナー由来の生殖細胞は機能的な卵へと分化した。特筆すべき点として、宿主が雄であった場合には、これらのドナー由来の卵原細胞は宿主精巣内で精子形成を開始し (図 42)、最終的にこれらのドナー細胞は精子にまで分化した。得られた精子を用いて次世代を生産した結果、間違いなくドナーのマーカである *vasa-Gfp* 遺伝子を保持した正常な個体を得ることができた (図 43)。なお、これらの卵原細胞から生産された精子由来の個体は、すべて雌であることも明らかとなった。このことは、得られた次世代個体が間違いなく XX の卵原細胞から作られた精子に由来していることを示唆している。また、卵原細胞の移植を施した宿主個体の生殖腺を組織学的に観察した結果、観察した全個体において卵巣精子、あるいは精巣卵といった構造は全く認められなかった。さらに、卵原細胞移植により宿主個体の性が転換するという現象も認められなかった。これら一連の結果と同様に、精原細胞移植においても移植した精原細胞は雌宿主卵巣内において機能的な卵へと分化することが既に明らかになっている。これらの結果をまとめると、生殖細胞の性は高い性的可塑性を保持しており、これらの性は体細胞の性に依存することが明らかとなった。

本実験は、通常の生殖細胞を保持する宿主個体に、外来の生殖細胞を過剰に加えるという実験である。言い換えると個体が保持する生殖細胞数が通常個体より増えることを意味している。メダカとゼブラフィッシュを用いた先行研究から、魚類の性決定には生殖細胞の数が重要な役割を果たしていることが示唆されており、生殖腺内に生殖細胞が存在しない突然変異体では雄に、生殖細胞が過剰に増殖した個体では雌になることが知られていた。そこで、続いて生殖細胞の数がニジマスの性に及ぼす影響を調査した。



図 4 1. ニジマス孵化稚魚の腹腔内への卵原細胞の顕微注射。



図 4 2. 宿主精巣に取り込まれ、増殖を開始したドナー由来卵原細胞 (緑色蛍光を発している)。

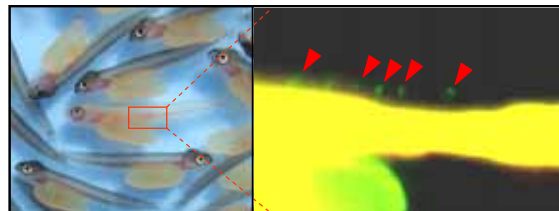


図 4 3. ドナー卵原細胞由来の精子から生じた次世代個体 (左アルビノ個体) とその腹部の蛍光観察像 (右)。ドナーに優性アルビノを、宿主に野生型を用いた。蛍光視野の矢じりが GFP 標識された生殖細胞。



## 2) 生殖細胞と性

本実験ではメダカやゼブラフィッシュとは、遺伝的には目レベルで分岐しているニジマスを用いて生殖細胞の存在の有無が個体の性に及ぼす影響を調査した。始原生殖細胞の生存に必須であることが知られている *Deadend* 遺伝子のニジマスホモログを単離し、その配列に対するモルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を合成した。この MO をニジマス受精卵へと顕微注入し、得られた胚を飼育した結果、そのほとんどの個体で生殖細胞数の減少が観察されたが、10 個体において生殖細胞を完全に消失した個体を得ることができた(図 44)。ニジマスの場合、卵を体外へと排出する輸卵溝は雌に特異的な構造であるため、その有無により雌雄判別を行った。その結果、これら 10 尾のうち雌が 5 尾、雄が 5 尾であり、生殖細胞の消失により性が転換する現象は認められなかった。また、雌個体が保持する生殖腺には卵巢特異的な構造であるラメラ構造が認められた。さらに、これら生殖細胞を欠損した生殖腺における雌雄特異的なマーカー遺伝子の発現を解析した結果、雌個体では *Cyp19a1a* の発現が、雄個体では *Dmrt1* の発現が認められた (図 45)。さらに、各個体から血液を採取し、血中ステロイド量を測定した結果、11-ケトテストステロンレベルが雄では雌より有意に高いという結果が得られた (図 46)。以上のように、生殖細胞欠損個体において、生殖腺形態、性ステロイドすべてにおいて矛盾なく雄と雌が 1 対 1 で生じるという結果が得られた。実際に、上記の生殖細胞移植実験でも宿主の性が移植された生殖細胞によって転換することはないという結果も併せて考えると、ニジマスにおいて生殖細胞の数そのものが生殖腺の性には影響を及ぼさないものと結論付けられた。これらの結果は、魚類においては、性という動物にとって極めて重要な表現型を決めるメカニズムも多岐にわたっており、特に生殖にとって必須の細胞である生殖細胞が性に及ぼす役割も種によって異なることを示唆している。輸卵管を持たないニジマスでは、性的に未分化な時期に雄性ステロイド処理を施すと、精子形成は起きるものの、輸精管の形成は起こらない。この事実はニジマスの生殖腺の形態的性は、メダカ等の魚類より性的可塑性が低いことを意味しているとも考えられ、今回の実験で生殖細胞の欠損が生殖腺の性に影響を与えなかった事実と何らかの関連があるかもしれない。いずれにせよ、魚類全般の性を理解して行く上で、モデル動物の研究が重要であることは言うまでもないが、その多様性を理解する上では、モデル動物以外での研究結果も重要であることが再確認された。

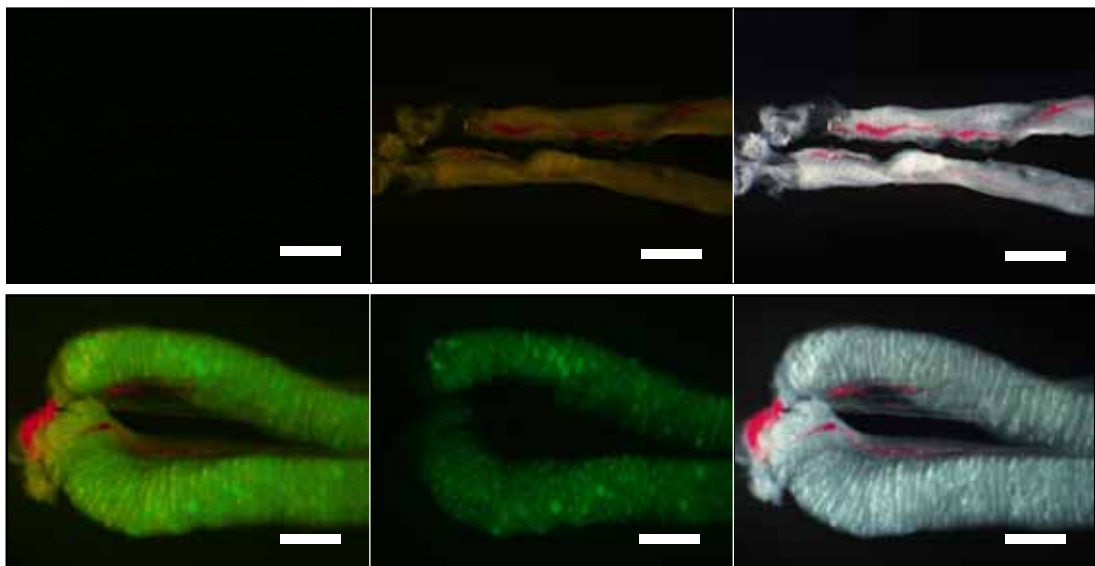


図 4 4. Dnd MOによる生殖腺オブ欠損個体 (雌) の作出。上段は処理区, 下段は対照区. 左から蛍光視野, 中間視野, 明視野.

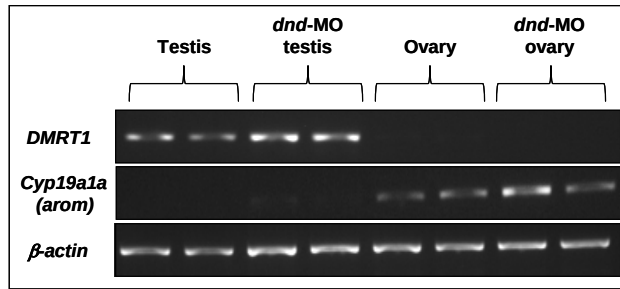


図 4 5. 生殖細胞を欠損した雌雄個体生殖腺における雄マーカー (*dmrt1*) と雌マーカー (*cyp19a1a*) の発現.

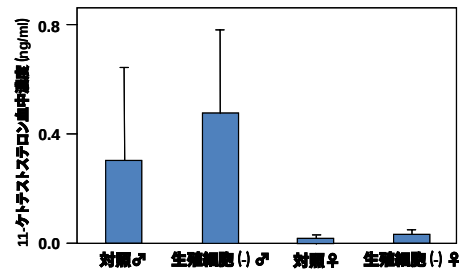


図 4 6. 生殖細胞を欠損した雌雄個体における血中 11-ケトテストステロン濃度.

### 3) 生殖細胞の性

上記の研究において、精原細胞と卵原細胞は互いに分化転換しうる関係であり、高い性的可塑性を有していることが明らかとなった。そこで、そもそもこれらの性の異なる 2 種類の細胞はどのくらい類似しており、どのくらい異なっているのかを分子レベルで比較した。さらに、始原生殖細胞から性分化した精原細胞、卵原細胞が分子レベルでどのような距離関係にあるかも全く明らかになっていない。特に哺乳動物においては始原生殖細胞は性分化直後に減数分裂に入るため、生殖腺の性分化後の体細胞分裂を行っている雌性生殖細胞、すなわち卵原細胞に関する情報を極めて限られている。そこで、本研究では始原生殖細胞、精原細胞、さらに卵原細胞の差異をトランスクリプトーム解析により調査した。アジェレント社の大西洋サケに対する 21K のアレイを用い、解析を行った。なお、RNA は *vasa-Gfp* 遺伝子導入ニジマスの受精後 40 日令の未分化生殖腺、9 か月令の精巣と卵巣から GFP 蛍光を指標にしたフローサイトメトリーにより精製した生殖細胞から抽出した。

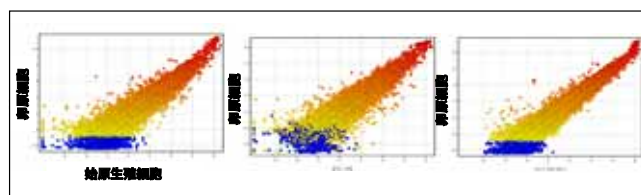


図 4 7. 精原細胞卵原細胞始原生殖細胞間の遺伝子発現比較 (スキャッチャードプロット解析).

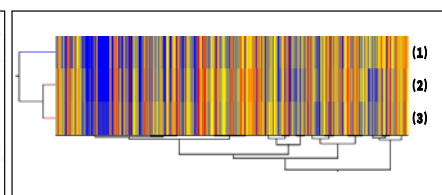


図 4 8. 精原細胞、卵原細胞、始原生殖細胞間での遺伝子発現に基づいたクラスター解析.

各種細胞間での発現遺伝子比較を行ったスキャッチャードプロットを図 47 に示したが、これら 3 種の細胞の中で始原生殖細胞が最も発現パターンが異なることが明らかとなった。これらの情報をもとにクラスター解析を行った結果、精原細胞と卵原細胞は極めて類似した細胞であり、両者間の距離は始原生殖細胞との距離よりかなり小さいことが明らかとなった (図 48)。しかし、両者間においても遺伝子発現の差異は明瞭に存在し、アレイ解析から明らかになった精原細胞、卵原細胞で異なる発現を示すクローンについて RT-PCR 解析を行った結果、図 49 に示したクローンにおいては明瞭に発現量が異なることが明らかとなった。これらのうちプロタキニンの発現パターンを *in situ hybridization* で解析した結果、卵原細胞や始原生殖細胞では全くその発現が認められず、精原細胞のみで明瞭な発現が認められることが明らかとなった (図 50)。特に、繁殖期の精巣におけるロビュールの壁面に存在する少数の精原細胞において強い発現が観察された。これらの細胞は次年度の産卵期における精子形成を一手に担う精原細胞であり、高い幹細胞能を保持している集団であると考えられる。本遺伝子の発現パターンの詳細と機能は、この 2 年間で明らかにすることはできなかったが、プロタキニンの精原細胞における発現はいかなる動物種においても報告されておらず、今後の研究による解析が重要であると考えられる。

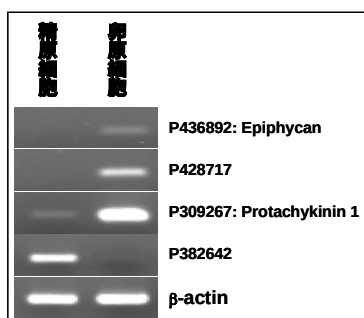


図4 9. 精原細胞, 卵原細胞間での発現量に差がある遺伝子群.

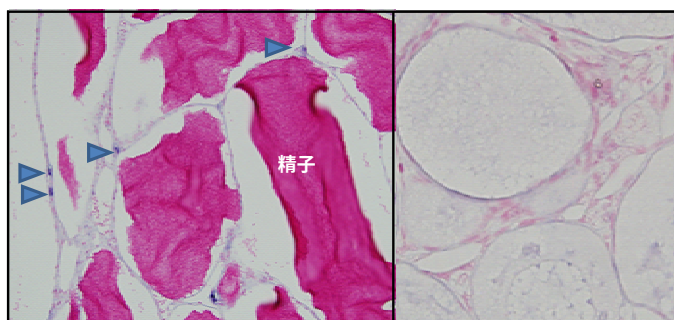


図5 0. プロタキニン遺伝子の精巣における特異的発現 (左). 右は卵巣における対照実験. 精巣写真の矢じりはプロタキニンを発現している精原細胞.

#### 4) 支持細胞の性

上記の実験において、生殖細胞の性を決定するのは生殖腺体細胞であることが強く示唆された。そこで、次に生殖腺体細胞のうち生殖細胞と直接接触する唯一の細胞である支持細胞、すなわち卵巣の顆粒膜細胞と精巣のセルトリ細胞は、性的な可塑性があるのかを明らかにするために、これらの細胞の移植実験系の構築と異性間で細胞凝集塊を形成させた3次元再構築を試みた。3次元構築に関しては、セルトリ細胞と顆粒膜細胞を特異的に可視化した inhibin-DsRed 遺伝子導入ニジマスから DsRed 蛍光を指標に両細胞を精製した。inhibin-DsRed 陽性の顆粒膜細胞は vasa-GFP 精巣の全細胞と、inhibin-DsRed 陽性のセルトリ細胞は vasa-GFP 卵巣の全細胞と共培養した。ペレット法、メチルセルロース法等を比較検討した結果、スフェロイド作成用培養皿内で混合細胞を旋回培養することで、効率よく再構築細胞塊を作成することが可能であった。また、得られた再構築細胞塊を共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、図 51 に示したように精原細胞を顆粒膜細胞由来の DsRed 陽性細胞が取り囲んでいる様子、および卵巣由来の生殖細胞をセルトリ細胞由来の DsRed 陽性細胞が取り囲んでいる様子を確認することができた。これらの支持細胞を再度セルソーティングした後、各細胞における遺伝子発現解析を予定していたが、残念ながら2年間の研究期間でそこまでたどり着くことが出来なかった。一方、in vivo で支持細胞を生殖腺に移植し、生殖細胞を取り囲ませるという実験も試みた。成魚生殖腺に移植した場合、生殖腺内に移植細胞が残存することはなかったが、低頻度ながら雌の孵化稚魚の腹腔内にセルトリ細胞を移植した際に、宿主の生殖細胞をドナー由来のセルトリ細胞が囲んでいる様子を観察することができた(図 52)。しかし、本実験系は現段階では成功率が低く、これらの細胞における遺伝子発現、さらには機能を解析するには至らなかった。今後は、これら支持細胞の性的可塑性をマーカー遺伝子の発現解析および機能解析により検証していく予定である。

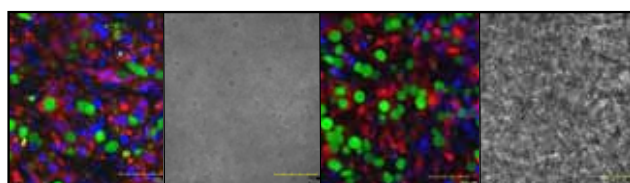


図5 1. DsRed標識した支持細胞と異性の生殖腺細胞による3次元再構築 (左: 共焦点 (赤: 支持細胞, 緑: 生殖細胞, 青: ヘキスト染色), .



図5 2. DsRed標識したセルトリ細胞を移植した♀宿主卵巣. セルトリ細胞が卵母細胞と取り囲んでいる.

#### (2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

平成 21-22 年度の2年間にわたるニジマスを用いた研究において、精原細胞、卵原細胞

の性は生殖腺体細胞の性に依存して転換することが可能であることを明らかにした。また、メダカとゼブラフィッシュの例とは異なり、ニジマスの性は生殖細胞の数による影響は受けないことが明らかとなった。さらに、マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析の結果、精原細胞と卵原細胞は、両者と始原生殖細胞の距離よりも近い関係にあり、極めて類似した細胞であることが明らかとなった。しかし、精原細胞と卵原細胞の間では明瞭に発現パターンの異なる遺伝子も存在していた。とくにプロタキキニンは始原生殖細胞では全く発現していないが、精原細胞へと分化することで発現が開始することが明らかとなった。なお、本遺伝子は卵原細胞を含む雌性生殖細胞、さらには精母細胞以降の分化した細胞では全く発現していなかった。

精原細胞移植系を用いて精子形成を再開させる実験系はマウスでは1994年に初めて報告されて以来 (Brinster and Zimmermann, PNAS, 1994)、数種の家畜でも報告されているが (Hill and Dobrinski, Reprod Fertil Dev. 2006)、卵原細胞の移植系は本研究 (Yoshizaki *et al.*, Development, 2010) が全動物種を通じて唯一のものである。また研究分担者が開発した生殖細胞移植による卵と精子の両者を生産する実験系は、“サバにマグロを生ませる”実験に代表されるように、親の飼育が困難な魚種の配偶子を、飼育が容易な代理親魚に生産させるためのツールとして極めて重要である。また、移植前の細胞を凍結保存することも可能になっていることから (Okutsu *et al.*, Science, 2007; Yoshizaki *et al.*, Comp Biochem Physiol. D, 2010)、卵の凍結保存が不可能な魚類においては、これら生殖細胞の凍結保存技術と移植実験の組み合わせは、絶滅危惧種の保全、あるいは種内の遺伝的多様性を維持するための効率的、かつ現実的な方法として、直ちに応用可能な段階にまで技術開発が進んでいる。なお、これら一連の応用において、本研究で明らかになった魚類生殖細胞の性的可塑性は、単性の生殖細胞から両性の配偶子を生産する上で極めて重要な特性である。

一方、支持細胞を用いた実験では、セルトリ細胞と卵巣細胞、あるいは顆粒膜細胞と精巣細胞を混合後に3次元再構築を促すことで、異性の支持細胞に生殖細胞が包まれている状況を創出することが可能であった。近年、ゼブラフィッシュを用いた研究で、精巣の細胞凝集塊を腹腔内へと移植することで、腹腔内で精巣様構造が構築され、機能的な精子が生産されるという報告がなされた (Kawasaki *et al.*, Biol Reprod., 2010)。今後は顆粒膜細胞とセルトリ細胞を置き換えて混合した細胞集団から細胞凝集塊を構築し、これをニジマス腹腔内へと移植する実験系を構築することで、異性の支持細胞が生殖細胞の増殖・分化を正常にサポートすることが可能であるかを検証していきたい。さらに、研究分担者らは別プロジェクト研究においてニジマス個体内においても Cre-loxP が作動し、毒素遺伝子を用いた Cell Ablation 系の構築が可能であることを示唆するデータを得ている (久米・吉崎、日本繁殖生物学会、2010)。今後は本研究で開発した支持細胞の *in vivo* 移植系と、内在性の支持細胞を ablation する実験系を組み合わせることで、*in vivo* において支持細胞のみを異性由来のものと置換することが可能になると期待される。本系が構築できれば異性の支持細胞の性的可塑性や機能を *in vivo* で解析することも可能になると期待される。



#### 4. 4 “メダカの脳の性的可塑性に関する研究（大久保グループ）”

##### （1）実施の内容

メダカ成魚の脳内で発現に性差を示す 14 種類の遺伝子を同定した。そのうちの 1 つ、エストロゲン受容体遺伝子 *ERβ2* の性成熟に伴う脳内発現を解析したところ、*ERβ2* は他の遺伝子の性特異的な発現に先立って、雌特異的に発現し始めることが明らかとなった。他の遺伝子の多くが産卵開始期にかけてはじめて性差を示すようになるのに対し、*ERβ2* は第二性徴が現れ始める 1 ヶ月齢の段階で既に、性成熟期とそれほど変わらない発現量を示し、かつ明瞭な性差（雌での高い発現）を示すことが分かった。一方、性成熟後は、性周期や日周期に伴う大きな発現変動は示さず、調べたほぼ全ての時間帯で雌の方が安定して高い発現を示すことが分かった。また、性転換メダカを用いた解析から、脳内における *ERβ2* の発現は、遺伝的性（性染色体あるいは性決定遺伝子）によって直接規定されているわけではないことが明らかとなった。さらに、卵巣除去手術により発現が低下し、エストロゲン投与により発現が回復することから、脳内の *ERβ2* 発現は、遺伝的に直接規定されているのではなく、卵巣由来のエストロゲンによって支配されていることが明らかとなった。*ERβ2* 遺伝子上流領域には、典型的なエストロゲン応答配列が存在することから、脳内での *ERβ2* の発現はエストロゲンによって直接支配されていることが推察される。

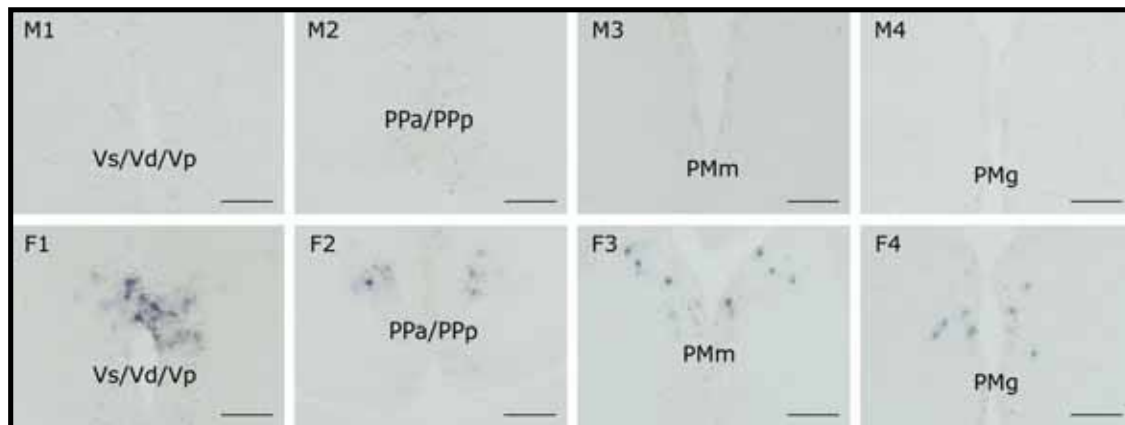


図 53. メダカ成魚の脳における *ERβ2* の雌特異的な発現部位. *ERβ2* は Vs/Vd/Vp, PPa/PPp, PMm, PMg において雌特異的に発現する. M1 から M4 までのパネルは雄の脳を、F1 から F4 までのパネルは雌の脳を示す。

*ERβ2* の脳内での発現部位を解析したところ、4 つの神経核、終脳 Vs/Vd/Vp、視索前野 PPa/PPp、視索前野 PMm、視索前野 PMg において雌のみで発現することが明らかとなった（図 53）。興味深いことに、これらの 3 つの神経核は、雌で高い発現を示す他の遺伝子の発現部位と一致した。具体的には、Vs/Vd/Vp と PMm, PMg では神経ペプチド遺伝子の一種 *npb* が *ERβ2* と同様に雌特異的に発現し、PPa/PPp では別の神経ペプチド遺伝子 *vip* が、やはり雌特異的に発現していた（図 54）。そこで、これら *npb* と *vip* についても性転換メダカを用いた発現解析や、卵巣除去手術とその後の性ホルモン投与実験を行ったところ、両遺伝子ともにその発現は *ERβ2* と同様、遺伝的に直接規定されているのではなく、卵巣由来のエストロゲンによって支配されていることが明らかとなった。さらに、BAC クローンを用いて *npb* と *vip* のプロモーター領域をクローニングしたところ、両者ともに典型的なエストロゲン応答配列を有することも明らかとなった。したがって、卵巣から放出されたエストロゲンが *ERβ2* を介して *npb* と *vip* の雌特異的な発現を直接誘導していることが考えられる。

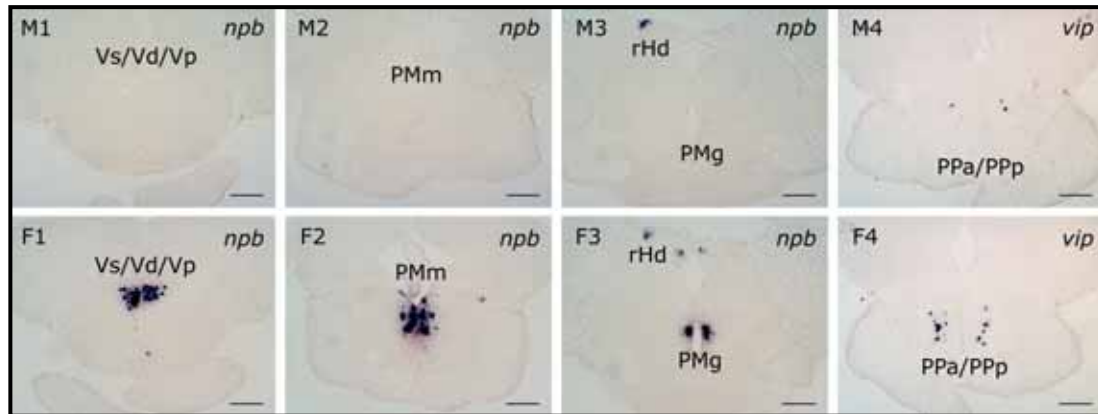


図5 4. メダカ成魚の脳における $npb$ と $vip$ の雌特異的発現部位.  $npb$ はVs/Vd/VpとPMm, PMgにおいて雌特異的に発現する (M1-3パネルとF1-3パネル).  $vip$ はPPa/PPpにおいて雌特異的に発現する (M4パネルとF4パネル). M1からM4までのパネルは雄の脳を, F1からF4までのパネルは雌の脳を示す.

$npb$  は比較的最近発見された神経ペプチド遺伝子であり、その詳細な機能についてはまだ明らかとなっていない。そこで、 $npb$  ペプチドに対する特異抗体を作製し、脳内での  $npb$  ペプチドの作用部位を特定した。その結果、Vs/Vd/Vp と PMm, PMg で雌特異的に産生された  $npb$  ペプチドは主として被蓋を経て延髄と脊髄に運ばれ、それらの領域で作用することが明らかとなった。このことは、 $npb$  ペプチドが何かしらの運動系を制御している可能性を示唆している。 $npb$  が雌特異的に発現する Vs/Vd/Vp と PMm, PMg は全て性行動への関与が示されている神経核であることを考え合わせると、 $npb$  は雌の性行動を制御する脳内因子である可能性が高い。一方、 $vip$  は鳥類において攻撃行動を抑制する作用をもつことが報告されている。したがって、メダカ脳内の PPa/PPp における雌特異的な  $vip$  の発現は雌において他個体への攻撃行動を抑制するはたらきがあるのかもしれない。脊椎動物では一般的に雄の方が雌よりも攻撃性が高いが、これは、 $vip$  の雌特異的な脳内発現に起因している可能性がある。

以上の結果を総合すると、「卵巣由来のエストロゲンが脳に到達すると脳内で雌特異的な  $ER\beta 2$  の発現上昇が引き起こされ、それが引き金となり、 $npb$  や  $vip$  が雌特異的に発現するようになる。そして、それらの雌特異的遺伝子の作用により、雌特異的な性行動の発現や攻撃性の減少といった脳の雌化が引き起こされる」という機構が考えられる。この脳の雌化に関する仮説は、魚類の脳が性的可塑性を有する要因（脳の雌化が遺伝的ではなく、卵巣からのエストロゲンに依存するため）や、性行動や攻撃行動の性差も遺伝子レベルで上手く説明することができる点で非常に合理的であり、信頼性はかなり高いと考えられる。

## (2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

本研究によって、卵巣からのエストロゲンと脳内でのエストロゲン受容体  $ER\beta 2$  の雌特異的な発現がメダカの脳の雌化の起点となっていることが明らかとなった。性的可塑性を有したまま性分化する魚類の脳については古くから多くの関心が寄せられてきたが、魚類の脳が性分化する分子機構については全くの未知であった。本研究はその機構をはじめて遺伝子レベルで説明する糸口を提示した。その意義は極めて大きく、本研究での成果を手がかりとして、今後数年のうちに研究が飛躍的に進むと考えられる。特に、脳の雌化に関わる遺伝子群のノックアウト実験や、雌化過程での詳細な発現プロファイリング解析等を行うことで、近い将来、魚類の脳の雌化機構の全体像が明らかになることが見込まれる。また、哺乳類でもあまり明らかとなっていない性行動や攻撃行動の脳内制御機構についても、本研究での成果を基盤としてさらに研究を発展させることにより、その詳細な機構が見えてくることが期待される。また、脳の雌化機構と並行して脳の雄化機構に関しても研究を進めていく予定であり、それらの知見を総合することで、魚類の脳における性分化および性的可塑性の分子メカニズムの全容が明らかになると考えられる。加えて、本研究で得られた成果をもとに哺乳類等でも解析を進めることで、魚類ばかりでなく脊椎動物の脳にお

ける性分化機構、特に性の確かさ・ゆらぎやすさの一般原則や、その進化的側面もはじめて見えてくることが期待される。

## 5. 類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

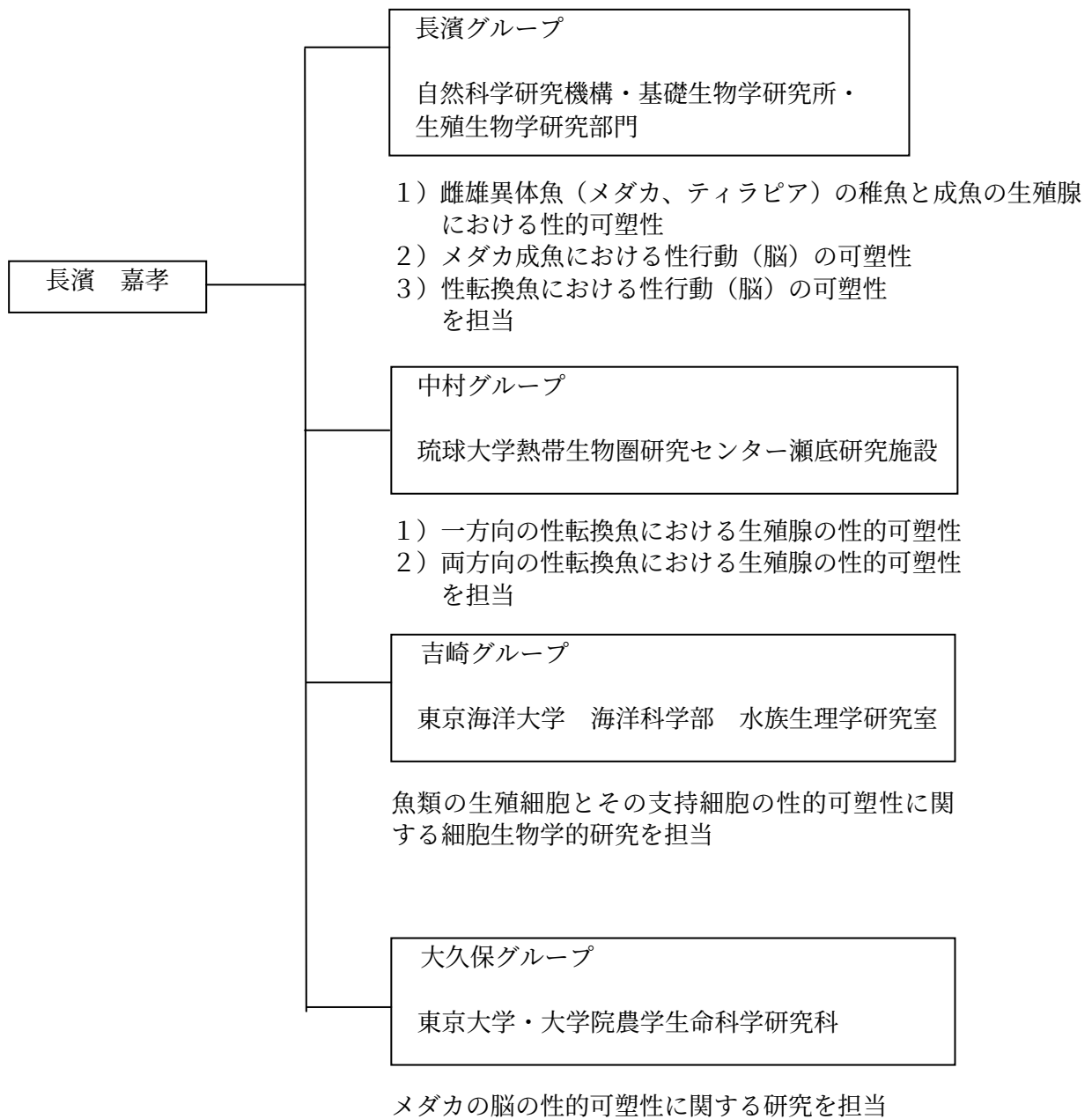
本研究の目的は、性転換魚と雌雄異体魚を用いて生殖腺と脳の性的可塑性の分子機構を明らかにすることである。本研究で得られた最大の成果は、雌雄異体魚であるティラピアとメダカの成魚で成熟卵巣から成熟精巣への性転換を起こすことに世界に先駆け成功したことである。この成果は、これまで性転換を起こす方法として通常に用いられてきた性ホルモン処理とは逆に、芳香化酵素阻害剤（AI）を活用して成熟卵巣での性ホルモン（エストロゲン）産生を抑制するというアプローチを駆使することによりもたらされた。本研究でも触れたように、成熟卵巣でエストロゲン産生を抑制することによる成熟精巣への性転換はゼブラフィッシュやコイでも確認されているので、広く魚類に共通な現象であると考えられる。次の我々の興味は、この成体の生殖腺に保持されている性的可塑性は魚類以外の他の脊椎動物にも共通なのかという問題である。哺乳類以外の脊椎動物でも発生初期のAI処理は遺伝的な雌を機能的な雄に性転換させることは報告されている。したがって今後、他の脊椎動物の成熟雌で長期間にわたるAI処理を行うことにより本研究で得られたように成体における成熟卵巣から成熟精巣への機能的性転換を誘起することができる可能性がある。

2種の雌雄異体魚（メダカとティラピア）を用いた本研究で、成熟卵巣の限られた部位に生殖幹細胞とそれを取り囲む体細胞からなる構造（シスト）が認められることが明らかになった。同一の構造は本年メダカで別の研究グループによって報告された（Nakamura et al., Science 2009）。また、マウスでも同様な構造が報告されている。本研究では新たに、シスト内の未分化体細胞がエストロゲン産生の低下の刺激を受けて活性化し、セルトリ細胞に分化することが明らかになった。この体細胞の分化過程で重要な役割を果たすのが我々がメダカの性決定遺伝子 *Dmy* の下流遺伝子を探索する過程で単離した *Gsdf* 遺伝子である。次いで、このセルトリ細胞の作用をうけて未分化生殖細胞が精原細胞へと分化を遂げるものと考えられる。したがって、成熟卵巣から成熟精巣への性転換の初期過程に関わる生殖細胞と体細胞はすでに成熟卵巣に備わっているのである。一方で、性転換を考えると、既存の生殖腺体細胞の分化転換を考える必要がある。エストロゲン受容体遺伝子を破壊されたマウスの卵巣で顆粒膜細胞からセルトリ細胞への分化転換が知られていた。また最近、成熟雌の卵巣で *Foxl2* の遺伝子破壊により顆粒膜細胞からセルトリ細胞への分化転換が報告された（Uhlenhaut et al., Cell 2009）。事実我々も、本研究を計画するにあたってのアプローチとして生殖腺体細胞の分化転換が成魚における生殖腺性転換の基本的メカニズムであろうと予想して、トランスジェニック系統などを利用しての実験を組んでいた。しかし、エストロゲン産生の低下により誘起される成熟卵巣から成熟精巣への性転換の過程では顆粒膜細胞からセルトリ細胞への分化転換を示唆するような結果は現在のところ得られていない。この点は、胚・稚魚期の性転換時における生殖腺体細胞の挙動を含めてさらに詳しく検討する必要がある。



## 6. 研究実施体制

### (1) 体制



## (2)メンバー表

### ① 長濱グループ

| 氏 名                     | 所 属                                                     | 役 職          | 研究項目    | 参加時期                          |
|-------------------------|---------------------------------------------------------|--------------|---------|-------------------------------|
| 長濱 嘉孝                   | 大学共同利用<br>機関法人自然<br>科学研究機構<br>基礎生物学研<br>究所生殖生物<br>学研究部門 | 特任教授         |         | 平成 17 年 11 月～<br>平成 23 年 3 月  |
| 吉国 通庸                   | 基生研生殖                                                   | 准教授          | 卵成熟     | 平成 17 年 11 月～<br>平成 19 年 3 月  |
| 大久保 範聡                  | 基生研生殖                                                   | 助教           | 脳の性分化   | 平成 17 年 11 月～<br>平成 20 年 3 月  |
| 井尻 成保                   | 基生研生殖                                                   | 研究員          | 性決定・性分化 | 平成 17 年 11 月～<br>平成 19 年 3 月  |
| 宇佐美 剛志                  | 基生研生殖                                                   | 研究員          | 性転換魚の解析 | 平成 18 年 4 月～<br>平成 23 年 3 月   |
| 酒井 章衣                   | 基生研生殖                                                   | 研究員          | 性分化     | 平成 17 年 11 月～<br>平成 23 年 3 月  |
| 司馬 桂君                   | 基生研生殖                                                   | 研究員          | 性分化     | 平成 17 年 11 月～<br>平成 23 年 3 月  |
| 柴田 安司                   | 基生研生殖                                                   | 研究員          | 卵成熟・性分化 | 平成 17 年 11 月～<br>平成 23 年 3 月  |
| 松田 勝                    | 基生研生殖                                                   | 研究員          | 性決定・性分化 | 平成 18 年 4 月～<br>平成 19 年 3 月   |
| Basu<br>Dipanjana       | 基生研生殖                                                   | 研究員          | 性分化     | 平成 17 年 11 月～<br>平成 19 年 3 月  |
| Basu<br>Shakuntala      | 基生研生殖                                                   | 研究員          | 性分化     | 平成 17 年 11 月～<br>平成 19 年 3 月  |
| Paul Bindhu             | 基生研生殖                                                   | 研究員          | 性決定・性分化 | 平成 17 年 11 月～<br>平成 23 年 3 月  |
| 劉 恩良                    | 基生研生殖                                                   | 研究員          | 性決定・性分化 | 平成 17 年 11 月～<br>平成 19 年 3 月  |
| Bhandari<br>Ramji Kumar | 基生研生殖                                                   | 研究員          | 性分化・性転換 | 平成 17 年 11 月～<br>平成 19 年 3 月  |
| Wang De Shou            | 中国師範大学                                                  | 教授           | 性分化・性転換 | 平成 17 年 11 月～<br>平成 19 年 3 月  |
| 中本 正俊                   | 基生研生殖                                                   | 研究員          | 性決定・性分化 | 平成 17 年 11 月～<br>平成 23 年 3 月  |
| 堀口 涼                    | 基生研生殖                                                   | 研究員          | 性転換     | 平成 17 年 11 月～<br>平成 23 年 3 月  |
| Tapas<br>Chakraborty    | 基生研生殖                                                   | 研究員          | 性決定・性分化 | 平成 22 年 10 月～<br>平成 22 年 11 月 |
| Chaube Radha            | 基生研生殖                                                   | 外国人特<br>別研究員 | 性分化・性転換 | 平成 17 年 11 月～<br>平成 19 年 3 月  |

|              |       |           |                  |                              |
|--------------|-------|-----------|------------------|------------------------------|
| Zhao Haobin  | 基生研生殖 | 外国人特別研究員  | 性分化              | 平成 18 年 4 月<br>平成 20 年 3 月   |
| Cui JianZhou | 基生研生殖 | 外国人特別研究員  | 性分化・性転換          | 平成 19 年 4 月～<br>平成 21 年 3 月  |
| Li JianZhong | 基生研生殖 | 外国人特別研究員  | 性決定・性分化          | 平成 19 年 4 月～<br>平成 21 年 3 月  |
| 太田耕平         | 基生研生殖 | 特別研究員     | 性転換              | 平成 17 年 11 月～<br>平成 20 年 3 月 |
| 栗田加代子        | 基生研生殖 | 院生        | 性分化              | 平成 17 年 11 月～<br>平成 20 年 3 月 |
| 周 林燕         | 基生研生殖 | 外国人特別研究員  | 性決定・性分化          | 平成 17 年 11 月～<br>平成 22 年 3 月 |
| 関藤 利枝        | 基生研生殖 | 研究補助員     | 性決定・性分化解析の補助     | 平成 17 年 11 月～<br>平成 19 年 3 月 |
| 原 郁代         | 基生研生殖 | 技術支援員     | 卵成熟の補助           | 平成 17 年 11 月～<br>平成 19 年 3 月 |
| 平川 恵里        | 基生研生殖 | 研究補助員     | 性決定・性分化解析の補助     | 平成 17 年 11 月～<br>平成 19 年 3 月 |
| 高木 千賀子       | 基生研生殖 | 技術支援員     | メダカの飼育管理及び採卵     | 平成 18 年 4 月～<br>平成 23 年 3 月  |
| 柴田 恵美子       | 基生研生殖 | 技術支援員     | ティラピアの飼育管理       | 平成 17 年 11 月～<br>平成 23 年 3 月 |
| 浅尾 久世        | 基生研生殖 | 技術支援員     | 遺伝子解析の補助         | 平成 21 年 9 月～<br>平成 23 年 3 月  |
| 石川 裕恵        | 基生研生殖 | 技術員       | 組織切片作成の補助        | 平成 21 年 4 月～<br>平成 23 年 3 月  |
| 齋藤 洋美        | 基生研生殖 | 技術員       | 遺伝子解析の補助         | 平成 21 年 4 月～<br>平成 23 年 3 月  |
| 嶋田 ゆう        | 基生研生殖 | JST 研究補助員 | 遺伝子解析の補助及びメダカの飼育 | 平成 17 年 11 月～<br>平成 23 年 3 月 |
|              |       |           |                  |                              |

## ② 中村グループ

| 氏 名   | 所 属                     | 役 職 | 研究項目        | 参加時期                          |
|-------|-------------------------|-----|-------------|-------------------------------|
| 中村 將  | 琉球大学 熱帯生物圏研究センター 瀬底研究施設 | 教授  | 性転換魚の性的可塑性  | 平成 17 年 11 月～<br>平成 23 年 03 月 |
| 小林 靖尚 | 琉大熱生研                   | 研究員 | 分子生物学的解析    | 平成 17 年 11 月～<br>平成 23 年 03 月 |
| 山家 秀信 | 琉大熱生研                   | 研究員 | 魚の性行動の観察、解析 | 平成 17 年 11 月～<br>平成 21 年 03 月 |

|                          |       |       |                           |                               |
|--------------------------|-------|-------|---------------------------|-------------------------------|
| 堀口 涼                     | 琉大熱生研 | 研究員   | 分子生物学的解析                  | 平成 19 年 04 月～<br>平成 20 年 03 月 |
| 三浦さおり                    | 琉大熱生研 | 院生    | 魚の飼育、組織学、ホルモンの測定          | 平成 17 年 11 月～<br>平成 21 年 03 月 |
| 小松 徹                     | 琉大熱生研 | 協力研究員 | 組織学、ホルモンの測定、データの取りまとめ     | 平成 17 年 11 月～<br>平成 21 年 03 月 |
| 小島 豊                     | 琉大熱生研 | 技術員   | 組織学、ホルモンの測定、データの取りまとめ     | 平成 19 年 04 月～<br>平成 20 年 03 月 |
| Mohammad. Ashraful. Alam | 琉大熱生研 | 研究員   | 魚の飼育、組織学、ホルモンの測定、分子生物学的解析 | 平成 17 年 11 月～<br>平成 22 年 10 月 |
| 榊 克子                     | 琉大熱生研 | 院生    | 魚の飼育、組織学、ホルモンの測定          | 平成 17 年 11 月～<br>平成 18 年 3 月  |
| 屋富祖 絵里                   | 琉大熱生研 | 研究員   | 組織学、魚の飼育、免疫組織化学           | 平成 18 年 04 月～<br>平成 19 年 03 月 |
| 野津 了                     | 琉大熱生研 | 院生    | 魚の飼育、組織学、ホルモンの測定          | 平成 19 年 04 月～<br>平成 23 年 03 月 |
| 屋富祖 妙子                   | 琉大熱生研 | 研究補助員 | 実験魚の飼育管理等                 | 平成 17 年 11 月～<br>平成 23 年 03 月 |
| 村田 良介                    | 琉大熱生研 | 院生    | 性分化の組織学、免疫組織科学            | 平成 19 年 4 月～<br>平成 23 年 03 月  |
| Narayan. Pandit          | 琉大熱生研 | 院生    | 生殖腺の分化の組織学、ホルモンの測定        | 平成 20 年 9 月～<br>平成 22 年 10 月  |
| Sabina. Ruksana          | 琉大熱生研 | 院生    | 生殖腺の可塑性、組織学、免疫組織化学        | 平成 20 年 9 月～<br>平成 23 年 03 月  |
|                          |       |       |                           |                               |

### ③ 吉崎グループ

| 氏 名    | 所 属          | 役 職   | 研究項目       | 参加時期                        |
|--------|--------------|-------|------------|-----------------------------|
| 吉崎 悟朗  | 東京海洋大学・海洋科学部 | 准教授   | 研究指導・とりまとめ | 平成 21 年 4 月～<br>平成 23 年 3 月 |
| 三輪 美砂子 | 東京海洋大学       | 技術補佐員 | アレイ実験、培養   | 平成 21 年 4 月～<br>平成 23 年 3 月 |
| 識名 信也  | 東京海洋大学       | D4    | 器官培養       | 平成 21 年 4 月～<br>平成 22 年 3 月 |
| 佐藤 茉菜  | 東京海洋大学       | D2    | ISH 実験     | 平成 21 年 4 月～<br>平成 23 年 3 月 |
| 八木澤 優  | 東京海洋大学       | M2    | ノックダウン実験   | 平成 21 年 4 月～<br>平成 23 年 3 月 |
| 中島 絵里子 | 東京海洋大学       | M2    | 生殖細胞移植実験   | 平成 21 年 4 月～<br>平成 23 年 3 月 |



|  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|
|  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|

④ 大久保グループ

| 氏 名    | 所 属                                       | 役 職 | 研究項目              | 参加時期                        |
|--------|-------------------------------------------|-----|-------------------|-----------------------------|
| 大久保 範聡 | 東京大学 大学院農学生命科学研究科<br>水圏生物科学専攻<br>水族生理学研究室 | 准教授 | メダカの脳の性的可塑性に関する研究 | 平成 21 年 4 月～<br>平成 23 年 3 月 |
| 竹内 研生  | 東大水族生理                                    | 院生  | 性分化               | 平成 21 年 4 月～<br>平成 23 年 3 月 |
| 平木 十和子 | 東大水族生理                                    | 院生  | 性分化               | 平成 21 年 4 月～<br>平成 23 年 3 月 |
| 妻木 孝泰  | 東大水族生理                                    | 院生  | 性分化               | 平成 21 年 4 月～<br>平成 23 年 3 月 |
|        |                                           |     |                   |                             |

## 7. 研究期間中の主な活動

### (1) ワークショップ・シンポジウム等

| 年月日                 | 名称                                                                               | 場所                               | 参加人数 | 概要                             |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|------|--------------------------------|
| 平成 20 年<br>7 月 16 日 | ソルスト長濱・中村チーム研究連絡会議                                                               | 琉球大学熱帯生物圏研究センター<br>瀬底実験所         | 15 名 | 研究の総括と今後の研究計画、共同研究について         |
| 平成 22 年 6<br>月 30 日 | Satellite International Symposium<br>「Reproductive Biology of Aquatic Organisms」 | 沖縄県本部町<br>海洋博覧会記念公園管理財団、総合研究センター | 60   | 海洋博覧会記念公園管理財団との共同でシンポジウムを主催した。 |
|                     |                                                                                  |                                  |      |                                |
|                     |                                                                                  |                                  |      |                                |

これまでの研究期間中に、特に、本研究プロジェクトのためのワークショップやシンポジウムを開催したことはなかった。しかし、長濱グループと中村グループの研究者は双方の研究室を頻繁に訪問し、共同研究や研究成果についての考察、討論を行ってきた。特に、研究代表者の長濱は琉球大学の瀬底実験所を年に数回訪れて本研究プロジェクトの綿密な研究打合せを行ってきた。従って、2つの研究グループ間の研究交流はきわめて密であり、そのことは本研究の推進にとって非常に重要なことであると考えられる。

### (2) 招聘した研究者等

| 氏 名（所属、役職）                                                                         | 招聘の目的                              | 滞在先                  | 滞在期間              |
|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------|-------------------|
| David Zakower (ミネソタ大学・教授)                                                          | セミナー及び研究指導のため                      | 基生研                  | 平成21年9月13日～20日    |
| Ramji BHANDARI (ワシントン州立大学・講師)                                                      | 実験指導のため                            | 基生研                  | 平成22年10月23日～31日   |
| Graham Young (University of Washington, Professor)                                 | 招待講演及び熱帯性魚類の性分化、成熟機構解明のための共同研究の打合せ | 琉球大学<br>基礎生物学<br>研究所 | 平成20年10月27日～11月7日 |
| Ching-Fong Chang、(Department of Aquaculture, National Taiwan Ocean University, 教授) | シンポジウムでの発表及び意見交換                   | 琉球大学・瀬底研究施設          | 平成22年6月29日～7月1日   |
|                                                                                    |                                    |                      |                   |

|  |  |  |  |
|--|--|--|--|
|  |  |  |  |
|--|--|--|--|

平成 17 年 10 月に本研究プロジェクトが開始されて以来、特に本研究費で研究者を招聘したことはない。しかし、この間、10 名を超える外国人研究者が我々の研究室を訪れたが、その都度セミナーを依頼するとともに十分な意見交換、討論を行った。一方で、研究室の博士研究員等に外国での発表（口頭、ポスター発表）の経験を積ませるために、本研究課題に深く関連する 2 つの国際シンポジウム（平成 18 年 4 月にハワイで開催された第 4 回脊椎動物の性決定に関する国際シンポジウム、本年 6 月にフランスで開催された第 8 回魚類の生殖生理に関する国際シンポジウム）に研究室からそれぞれ 10 名近くの教官、研究員、大学院生を参加させ、それぞれが研究発表を行うとともに、出席した外国からの研究者らと研究成果について討論するとともに情報交換を行った。

## 8. 発展研究による主な研究成果

### (1) 論文発表

#### ① 原著論文 (国内 (和文) 誌 0 件 国際 (欧文) 誌 84 件)

1. Tokumoto, M., Nagahama, Y., Thomas, P. and Tokumoto, T. (2006). Cloning and identification of a membrane progesterin receptor in goldfish ovaries and evidence it is an intermediary in oocyte meiotic maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 145, 101-108. DOI:10.1016/j.ygcen.2005.07.002
2. Oshima, Y., Kato, T., Wang, D., Murakami, T., Matsuda, Y., Nagahama, Y. and Nakamura, M. (2006). Promoter activity and chromosomal location of the *Rana rugosa* P450 aromatase (CYP19) gene. *Zool. Sci.* 23, 79-85. DOI: 10.2108/zsj.23.79
3. Komatsu, T., Nakamura, S. and Nakamura, M. (2006). A sex cord-like structure and some remarkable features in early gonadal sex differentiation in a marine teleost *Siganus guttatus* (Bloch). *J. Fish. Biol.* 68, 236-250. DOI:10.1111/j.1095-8649.2005.00897.x
4. Bhandari, R.K., Nakamura, M., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2006). Suppression of steroidogenic enzyme expression during androgen-induced sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 145: 20-24. DOI:10.1016/j.ygcen.2005.06.014
5. Bhandari, R.K., Alam, M.A., Soyano, K. and Nakamura, M. (2006). Induction of female-to-male sex change in the Honeycomb grouper (*Epinephelus merra*) by 11-ketotestosterone treatments. *Zool. Sci.* 23, 65-69. DOI: 10.2108/zsj.23.65
6. Alam, M.A., Bhandari, R.K., Kobayashi, Y., Nakamura, S., Soyano, K. and Nakamura, M. (2006). Changes in androgen-producing cell size and circulating 11-ketotestosterone level during female-male sex change of honeycomb grouper *Epinephelus merra*. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 206-214. DOI: 10.1002/mrd.20393
7. Okubo, K., Sakai, F., Lau, E.L., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Naruse, K., Aida, K. and Nagahama, Y. (2006). Forebrain gonadotropin-releasing hormone neuronal development: insights from transgenic medaka and the relevance to X-linked Kallmann syndrome. *Endocrinology* 147, 1076-1084. DOI: 10.1210/en.2005-0468
8. Alam, M.A., Bhandari, R.K., Kobayashi, Y., Nakamura, S., Soyano, K. and Nakamura, M. (2006). Induction of sex change within two full moons during breeding season and spawning in grouper. *Aquaculture* 255, 532-535. DOI:10.1016/j.aquaculture.2006.01.008
9. Nakamoto, M., Matsuda, M., Wang, D.S., Nagahama, Y. and Shibata, N. (2006). Molecular cloning and analysis of gonadal expression of Foxl2 in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 344, 353-361. DOI:10.1016/j.bbrc.2006.03.137
10. Komatsu, T., Bhandari, R.K., Kobayashi, T., Nakamura, S. and Nakamura, M. (2006). GnRHa-accelerated spermatogenesis in the testes of underyearling golden rabbitfish, *Siganus guttatus* (Bloch). *Aquaculture* 257, 558-565. DOI:10.1016/j.aquaculture.2006.03.012
11. Yamaguchi, A., Katsu, Y., Matsuyama, M., Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. (2006). Phosphorylation of the p34(cdc2) target site on goldfish germinal vesicle lamin B3 before oocyte maturation. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 501-517. DOI:10.1016/j.ejcb.2006.02.002



12. Paul-Prasanth, B., Matsuda, M., Lau, E.L., Suzuki, A., Sakai, F., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2006). Knock-down of DMY initiates female pathway in the genetic male medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 351, 815-819. DOI:10.1016/j.bbrc.2006.10.095
13. Wang, D.S., Kobayashi, T., Zhou, L.Y., Paul-Prasanth, B., Ijiri, S., Sakai, F., Okubo, K., Morohashi, K. and Nagahama, Y. (2007). Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with Ad4BP/SF-1. *Mol. Endocrinol.* 21, 712-725. DOI:10.1210/me.2006-0248
14. Matsuda, M., Shinomiya, S., Kinoshita, M., Suzuki, A., Kobayashi, T., Paul-Prasanth, B., Lau, E.L., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M. and Nagahama, Y. (2007). DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 3865-3870. DOI:10.1073/pnas.0611707104.
15. Kaeding, A.J., Ast, J.C., Pearce, M.M., Urbanczyk, H., Kimura, S., Endo, H., Nakamura, M. and Dunlap, P. V. (2007). Phylogenetic diversity and co-symbiosis in the bioluminescent symbioses of *Photobacterium mandapamensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 3173-3182. DOI: 10.1128/AEM.02212-06.
16. Liu, Z.H., Wu, F.R., Jiao B.W., Zhang, X.Y., Hu, C.J., Huang, B.F., Zhou, L.Y., Huang X.G., Wang, Z.J., Zhang, Y.G., Nagahama, Y., Cheng, C.H.K and Wang, D.S. (2007). Molecular cloning of Dmrt1, Foxl2 and Cyp19 in Southern catfish and their possible roles in sex differentiation. *J. Endocrinol.* 194, 223-241. DOI:10.1677/JOE-07-0135
17. Ohmuro-Matsuyama, Y., Okubo, K., Matsuda, M., Ijiri, S., Wang, D.S., Guan, G., Suzuki, T., Matsuyama, M., Morohashi, K. and Nagahama, Y. (2007). Liver receptor homologue-1 (LRH-1) activates the promoter of brain aromatase (*cyp19a2*) in a teleost fish, the medaka, *Oryzias latipes*. *Mol. Reprod. Develop.* 74, 1065-1071. DOI: 10.1002/mrd.20497
18. Zhou, L.Y., Wang, D.S., Kobayashi, T., Yano, A., Paul-Prasanth, B., Suzuki, A., Sakai, F. and Nagahama, Y. (2007). A novel type of P450c17 lacking the lyase activity is responsible for C21-steroid biosynthesis in the fish ovary and head kidney. *Endocrinology* 148, 4288-4291. DOI:10.1210/en.2007-0487
19. Mittelholzer, D., Andersson, E., Consten, D., Hirai, T., Nagahama, Y. and Norberg, B. (2007). 20 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and CYP19A1 are differentially expressed during maturation in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J. Mol. Endocrinol.* 39, 319-328. DOI: 10.1677/JME-07-0070
20. Nakamoto, M., Wang, D.S., Suzuki, A., Matsuda, M., Nagahama, Y. and Shibata, N. (2007). Dax1 suppresses P450arom expression in medaka ovarian follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 1239-1246. DOI: 10.1002/mrd.20689
21. Alam, M.A. and Nakamura, M. (2007). Efferent duct differentiation during female-to-male sex change in honeycomb grouper *Epinephelus merra*. *J. Fish. Biol.* 71, 1-11. DOI:10.1111/j.1095-8649.2007.01592.x
22. Zhou, L.Y., Wang, D.S., Shibata, Y., Paul-Prasanth, B., Suzuki, A. and Nagahama, Y. (2007). Characterization, expression and transcriptional regulation of *P450c17-I* and *-II* in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 362, 619-624. DOI:10.1016/j.bbrc.2007.08.044

23. Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Guan, G. and Nagahama, Y. (2008). Sexual dimorphic expression of DMRT1 and Sox9 during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Dev. Dyn. 237, 297-306. DOI: 10.1002/dvdy.21409
24. Miura, S., Nakamura, S., Kobayashi, Y., Francesc, P. and Nakamura, M. (2008). Differentiation of ambisexual gonads and immunohistochemical localization of P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme during gonadal sex differentiation in the protandrous anemonefish, *Amphiprion clarkii*. Comp. Biochem. Physiol. Part B 149, 29-37. DOI:10.1016/j.cbpb.2007.08.002
25. Alam, M.A. and Nakamura, M. (2008). Determination of sex and gonadal maturity in the honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, through biopsy. Aquacult. Int. 16, 27-32. DOI 10.1007/s10499-007-9120-3
26. Miura, S., Horiguchi, R. and Nakamura, M. (2008). Immunohistochemical evidence for 11 $\beta$ -hydroxylase (P45011 $\beta$ ) and androgen production in the gonad during sex differentiation and in adults in the protandrous anemonefish *Amphiprion clarkii*. Zool. Sci. 25, 212-219. DOI: 10.2108/zsj.25.212
27. Ijiri, S., Kaneko, H., Kobayashi, T., Wang, D.S., Sakai, F., Paul-Prasanth, B., Nakamura, M. and Nagahama, Y. (2008). Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Biol Reprod. 78, 333-341. DOI: 10.1095/biolreprod.107.064246
28. Sakai, F., Kobayashi, T., Matsuda, M. and Nagahama, Y. (2008). Stability in aromatase immunoreactivity of steroid-producing cells during early development of XX gonads of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: An organ culture study. Zool. Sci. 25, 344-348. DOI: 10.2108/zsj.25.344
29. Shimizu, A., Hamaguchi, M., Ito, H., Ohkubo, M., Udagawa, M., Fujii, K., Kobayashi, T. and Nakamura, M. (2008). Appearances and chronological changes of mummichog *Fundulus heteroclitus* FSH cells and LH cells during ontogeny, sexual differentiation, and gonadal development. Gen. Comp. Endocrinol. 156, 312-322. DOI:10.1016/j.ygcen.2008.01.022
30. Alam, M.A., Kobayashi, Y., Horiguchi, R., Hirai, T. and Nakamura, M. (2008). Molecular cloning and quantitative expression of sexually dimorphic markers Dmrt1 and Foxl2 during female-to-male sex change in *Epinephelus merra*. Gen. Comp. Endocrinol. 157, 75-85. DOI:10.1016/j.ygcen.2008.03.018
31. Kojima, Y., Bhandari, R. K., Kobayashi, T. and Nakamura, M. (2008). Sex change of adult initial-phase male wrasse, *Halichoeres trimaculatus* by estradiol-17 $\beta$  treatment. Gen. Comp. Endocrinol. 156, 628-632. DOI:10.1016/j.ygcen.2008.02.003
32. Matsuoka, Y., Kobayashi, T., Kihara, K. and Nagahama, Y. (2008). Molecular cloning of Plk1 and Nek2 and their expression in mature gonads of the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Mol. Reprod. Develop. 75, 989-1001. DOI: 10.1002/mrd.20843
33. Swapna, I., Sudhakumari, C.C., Sakai, F., Sreenivasulu, G., Kobayashi, T., Kagawa, H., Nagahama, Y. and Senthilkumaran, B. (2008). Seabream GnRH immunoreactivity in brain and pituitary of XX and XY Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* during early development. J. Exp. Zool. 309A, 419-426. DOI: 10.1002/jez.467
34. Shen, X.Y., Cui, J.Z., Gong, Q.L., Liu, Y.J. and Nagahama, Y. (2008). Transcript expression profiles of *Takifugu rubripes* spermatozoa and eggs by expressed sequence tag analysis. Fish Physiol. Biochem. 34, 235-243. DOI: 10.1007/s10695-007-9182-1

35. Guan, C.W., Sherly, T., Nakamura, M. and Ching, F.C. (2008). Dual roles of *cyp19a1a* in gonadal sex differentiation and development in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. Biol. Reprod. 79, 1111-1120. DOI: 10.1095/biolreprod.108.069146
36. Horiguchi, R., Kobayashi, Y. and Nakamura, M. (2008). Molecular cloning and expression of three estrogen receptors in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. Cybium 32, 88-89.
37. Todo, T., Sato, M., Ashida, M., Yamaguchi, N., Kobayashi, Y., Adachi, S., Yamauchi, K. and Nakamura, M. (2008). *In vitro* induction of gonadal sex change in a protogynous fish, three-spotted wrasse (*Halichoeres trimaculatus*). Cybium 32, 106.
38. Ogawa, S., Akiyoshi, M., Higuchi, M., Nakamura, M. and Hirai, T. (2008). 'Post-sex differentiation' sex reversal in the female common carp (*Cyprinus carpio*). Cybium 32, 102-103.
39. Miura, S. and Nakamura, M. (2008). The role of estrogen in gonadal sex differentiation in protandrous anemonefish *Amphiprion clarkii*. Immunohistochemical localization of P450<sub>scc</sub> in gonads of male and female phases. Cybium 32, 87
40. Farlora, R., Kobayashi, S., Franca, L.R., Batlouni, S.R., Lacerda, S.M.S.N. and Yoshizaki, G. (2009). Expression of GFP in transgenic tilapia under the control of the medaka b-actin promoter: establishment of a model system for germ cell transplantation. Anim. Reprod. 6, 450-459.
41. Mittelholzer, C., Andersson, E., Taranger, G.L., Consten, D., Hirai, T., Senthilkumaran, B., Nagahama, Y. and Norberg, B. (2009). Molecular characterization and quantification of the gonadotropin receptors FSH-R and LH-R from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Gen. Comp. Endocrinol. 160, 47-58. DOI:10.1016/j.ygcen.2008.10.015
42. Murata, R., Karimata, H., Alam, M.A. and Nakamura, M. (2009). Precocious sex change and spermatogenesis in the under yearling Malabar grouper *Epinephelus malabaricus* by androgen treatment. Aquaculture Research 41, 303-308. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2009.02332.x
43. Ngamniyom, A., Magtoon, W., Nagahama, Y. and Sasayama, Y. (2009). Expression levels of hormone receptors and bone morphogenic protein in fins of medaka. Zool. Sci. 26, 74-79. DOI: 10.2108/zsj.26.74
44. Senthilkumaran, B., Sudhakumari, C.C., Wang, D.S., Sreenivasulu, G., Kobayashi, T., Kobayashi, H.K, Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. (2009). Novel 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases from gonads of the Nile tilapia: Phylogenic significance and expression during reproductive cycle. Mol. Cell. Endocrinol. 299, 146-152. DOI:10.1016/j.mce.2008.11.008
45. Cui, J.Z., Shen, X.Y., Yan, Z.W., Zhao, H.B. and Nagahama, Y. (2009). Homology-modeled ligand-binding domains of medaka estrogen receptors and androgen receptors: a model system for the study of reproduction. Biochem. Biophys. Res. Comm. 380, 115-121. DOI:10.1016/j.bbrc.2009.01.047
46. Kobayashi, Y., Nakamura, M., Sunobe, T., Usami, T., Kobayashi, T., Manabe, H., Paul-Prasanth, B., Suzuki, N. and Nagahama, Y. (2009). Sex change in the gobiid fish is mediated through rapid switching of gonadotropin receptors from ovarian to testicular portion or vice-versa. Endocrinology 150, 1503-1511. DOI:10.1210/en.2008-0569
47. Nakamoto, M., Muramatsu, S., Yoshida, S., Matsuda, M., Nagahama, Y. and Shibata, N. (2009). Gonadal sex differentiation and expression of *Sox9a2*, *Dmrt1*, and *Foxl2* in *Oryzias luzonensis*. Genesis 47, 289-299. DOI: 10.1002/dvg.20498

48. Nozu, R., Kojima, Y. and Nakamura, M. (2009). Short-term treatment with aromatase inhibitor induces sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. Gen. Comp. Endocrinol. 161, 360-364. DOI: 10.1016/j.ygcen.2009.01.024
49. Boonanuntanasarn, S., Panyim, S. and Yoshizaki, G. (2009). Usage of putative zebrafish U6 promoters to express shRNA in Nile tilapia and shrimp cell extracts. Transgenic Res. 18, 323-325. DOI: 10.1007/s11248-009-9249-0
50. Sakao, S., Fujimoto, T., Kobayashi, T., Yoshizaki, G., Yamaha, E. and Arai, K. (2009). Artificially induced tetraploidy masu salmon have the ability to form primordial germ cells. Fish. Sci. 75, 993-1000. DOI: 10.1007/s12562-009-0124-y
51. Chen, W., Cao, M., Yang, Y., Nagahama, Y. and Zhao, H. (2009). Expression pattern of *prmt5* in adult fish and embryos of medaka, *Oryzias latipes*. Fish Physiol. Biochem. 35, 325-332. DOI: 10.1007/s10695-008-9233-2
52. Murata, R., Karimata, H., Alam, M.A. and Nakamura, M. (2009). Gonadal sex differentiation in the Malabar grouper, *Epinephelus malabaricus*. Aquaculture 293, 286-289. DOI:10.1016/j.aquaculture.2009.04.031
53. Paul, V.D., Kojima, Y., Nakamura, S. and Nakamura, M. (2009). Inception of formation and early morphogenesis of the bacterial light organ of the sea urchin cardinalfish, *Siphamia versicolor*. Marine. Biol. 156, 2011-2020. DOI: 10.1007/s00227-009-1232-z
54. Wu, F.R., Zhou, L.Y., Nagahama, Y. and Wang, D.S. (2009). Duplication and distinct expression patterns of two thrombospondin-1 isoforms in teleost fishes. Gene Expr. Patterns 9, 436-443. DOI:10.1016/j.gep.2009.05.001
55. Cavileer, T., Hunter, S., Okutsu, T., Yoshizaki, G. and Nagler, J.J. (2009). Identification of novel genes associated with molecular sex differentiation in the embryonic gonads of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Sex Dev. 3, 214-224. DOI: 10.1159/000228722
56. Takeuchi, Y., Higuchi, K., Yatabe, T., Miwa, M. and Yoshizaki, G. (2009). Development of spermatogonial cell transplantation in nibe croaker, *Nibea mitsukurii* (Perciformes, Sciaenidae). Biol. Reprod. 81, 1055-1063. DOI: 10.1095/biolreprod.109.077701
57. Yoshizaki, G., Okutsu, T., Ichikawa, M., Hayashi, M. and Takeuchi, Y. (2010). Sexual plasticity of rainbow trout germ cells. Anim. Reprod. 7, 187-196.
58. Zhang, W., Zhou, L., Senthilkumaran, B., Huang, B.F., Sudhakumari, C.C., Kobayashi, T., Nagahama, Y. and Wang, D.S. (2010). Molecular cloning of two isoforms of 11 $\beta$ -hydroxylase and their expressions in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Gen. Comp. Endocrinol. 165, 34-41. DOI:10.1016/j.ygcen.2009.05.018
59. Kanda, S., Nishikawa, K., Karigo, T., Okubo, K., Isomae, S., Abe, H., Kobayashi, D. and Oka, Y. (2010). Regular pacemaker activity characterizes gonadotropin-releasing hormone 2 neurons recorded from green fluorescent protein-transgenic medaka. Endocrinology 151, 695-701. DOI:10.1210/en.2009-0842
60. Kobayashi, Y., Horiguchi, R., Miura, S. and Nakamura, M. (2010). Sex- and tissue-specific expression of P450 aromatase (*cyp19a1a*) in the yellowtail clownfish, *Amphiprion clarkii*. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 155, 237-244. DOI:10.1016/j.cbpa.2009.11.004

61. ○Wang, D.S., Zhou, L.Y., Kobayashi, T., Matsuda, M., Shibata, Y., Sakai, F. and Nagahama, Y. (2010). *Doublesex*- and *Mab-3*-Related Transcription Factor-1 repression of aromatase transcription, a possible mechanism favoring the male pathway in tilapia. *Endocrinology* 151, 1331-1340. DOI:10.1210/en.2009-0999
62. ○Yoshizaki, G., Ichikawa, M., Hayashi, M., Iwasaki, Y., Miwa, M., Shikina, S. and Okutsu, T. (2010). Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. *Development* 137, 1227-1230. DOI: 10.1242/dev.044982
63. Sudhakumari, C.C., Senthilkumaran, B., Raghuveer, K., Wang, D.S., Kobayashi, T., Kagawa, H., Krishnaiah, C., Dutta-Gupta, A. and Nagahama, Y. (2010). Dimorphic expression of tryptophan hydroxylase in the brain of XX and XY Nile tilapia during early development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 166, 320-329. DOI:10.1016/j.ygcen.2009.11.009
64. Nakamoto, M., Fukasawa, M., Orii, S., Shimamori, K., Maeda, T., Suzuki, A., Matsuda, M., Kobayashi, T., Nagahama, Y. and Shibata, N. (2010). Cloning and expression of medaka cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 during gonadal development. *Develop. Growth Differ.* 52, 385-395. DOI: 10.1111/j.1440-169X.2010.01178.x
65. Yazawa, R., Takeuchi, Y., Higuchi, K., Yatabe, T., Kabeya, N. and Yoshizaki, G. (2010). Chub mackerel gonads support colonization, survival, and proliferation of intraperitoneally transplanted xenogenic germ cells. *Biol. Reprod.* 82, 896-904. DOI: 10.1095/biolreprod.109.081281
66. Ruksana, S., Pandit, N.P. and Nakamura, M. (2010). Efficacy of exemestane, a new generation of aromatase inhibitor, on sex differentiation in a gonochoristic fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 152, 69-74. DOI:10.1016/j.cbpc.2010.02.014
67. Shinoda, T., Miranda, L.A., Okuma, K., Hattori, R.S., Fernandino, J.I., Yoshizaki, G., Somoza, G.M. and Strüssmann, C.A. (2010). Molecular cloning and expression analysis of Fshr and Lhr in relation to Fshb and Lhb subunits during the period of temperature-dependent sex determination in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Mol. Reprod. Dev.* 77, 521-532. DOI: 10.1002/mrd.21179
68. Alam, M.A., Kobayashi, Y., Hirai, T. and Nakamura, M. (2010). Isolation, characterization and expression analyses of FSH receptor in protogynous grouper. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 156, 364-371. DOI:10.1016/j.cbpa.2010.03.001
69. Shikina, S. and Yoshizaki, G. (2010). Improved in vitro-culture conditions to enhance the survival, mitotic activity and transplantability of rainbow trout type A spermatogonia. *Biol. Reprod.* 83, 268- 276. DOI: 10.1095/biolreprod.109.082123
70. Shibata, Y., Paul-Prasanth, B., Suzuki, A., Usami, T., Nakamoto, M., Matsuda, M. and Nagahama, Y. (2010). Expression of gonadal soma derived factor (GSDF) is spatially and temporally correlated with early testicular differentiation in medaka. *Gene Expr. Patterns* 10, 283-289. DOI:10.1016/j.gep.2010.06.005
71. Otake, H., Masuyama, H., Mashima, Y., Shinomiya, A., Myosho, T., Nagahama, Y., Matsuda, M., Hamaguchi, S. and Sakaizumi, M. (2010). Heritable artificial sex chromosomes in the medaka, *Oryzias latipes*. *Heredity* 105, 247-256. DOI:10.1038/hdy.2009.174
72. Nagasawa, K., Shikina, S., Takeuchi, Y. and Yoshizaki, G. (2010). Lymphocyte antigen 75 (Ly75/CD205) is a surface marker on mitotic germ cells in rainbow trout. *Biol. Reprod.* 83, 597-606. DOI: 10.1095/biolreprod.109.082081



73. Chakraborty, T., Shibata, Y., Zhou, L.Y., Katsu, Y., Iguchi, T. and Nagahama, Y. (2010). Differential expression of three estrogen receptor subtype mRNAs in gonads and liver from embryos to adults of the medaka, *Oryzias latipes*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 333, 47-54. DOI: org/10.1016/j.jsbmb.2010.11.015
74. Paul-Prasanth, B., Shibata, Y., Horiguchi, R. and Nagahama, Y. (2010). Exposure to diethylstilbestrol during embryonic and larval stages of medaka leads to sex reversal in genetic males and reduced gonado-somatic-indices in genetic females. *Endocrinology* 152, 707-717. DOI: 10.1210/en.2010-0812.
75. Kobayashi, Y., Alam, M.A., Horiguchi, R., Shimizu A. and Nakamura, M. (2010). Sexually dimorphic expression of gonadotropin subunits in the pituitary of protogynous honeycomb grouper (*Epinepheus merra*): evidence that follicle-stimulating hormone (FSH) induces gonadal sex change. *Biol. Reprod.* 82, 1030-1036. DOI: biolreprod.109.080986 [pii] 10.1095/biolreprod.109.080986.
76. Kobayashi, Y., Horiguchi, R., Nozu, R. and Nakamura, M. (2010). Expression and localization of forkhead transcriptional factor 2 (Foxl2) in the gonads of protogynous wrasse *Halichoeres trimaculatus*. *J. Biol. Sex Differ.* 1, 3. DOI: 2042-6410-1-3 [pii]10.1186/2042-6410-1-3.
77. Okutsu, T., Kang, B.J., Miwa, M., Yoshizaki, G., Maeno, Y. and Wilder, M.N. (2010). Molecular cloning and characterization of Dmcl, a gene involved in gametogenesis, from the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish. Sci.* 76, 961-969. DOI: 10.1007/s12562-010-0295-6.
78. Obata, M., Sano, N., Kimata, S., Nagasawa, K., Yoshizaki, G. and Komaru, A. (2010). The proliferation and migration of immature germ cells in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*: observation of the expression pattern in the *M.galloprovincialis* vasa-like gene (Myvlg) by in situ hybridization. *Dev. Genes. Evol.* 220, 139-149. DOI: 10.1007/s00427-010-0335-3.
79. Okubo, K., Takauchi, A., Chaube, R., Paul-Prasanth, B., Kanda, S. Oka, Y. and Nagahama, Y. (2011). Sex differences in aromatase gene expression in the medaka brain. *J. Neuroendocrinology* 23, 412-423. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2011.02120.x.
80. Charkraborty, T., Katsu, Y., Zhou, L.Y., Miyagawa, S., Nagahama, Y. and Iguchi, T. (2011). Estrogen receptors in medaka (*Oryzias latipes*) and estrogenic environmental contaminants: An in vitro-in vivo correlation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 123, 115-121. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2010.11.015.
81. Raghuv eer, K., Sudhakumari, C.C., Senthilkumaran, B., Kagawa, H., Dutta-Gupta, A. and Nagahama, Y. (2011). Gender differences in tryptophan hydroxylase-2 mRNA, serotonin, and 5-hydroxytryptophan levels in the brain of catfish, *Clarias gariepinus*, during sex differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 171, 94-104. DOI: org/10.1016/j.ygcen.2010.12.003.
82. Fernandino, J.I., Popesku, J.T., Paul-Prasanth, B., Xiong, H., Hattori, R.S., Oura, M., Strüssmann, C.A., Somoza, G.M., Matsuda, M., Nagahama, Y. and Trudeau, V.L. (2011). Analysis of sexually dimorphic expression of genes at early gonadogenesis of Pejerrey *Odontesthes bonariensis* using a heterologous microarray. *Sex Dev.* 5, 89-101. DOI: 10.1159/000324423.
83. Kobayashi, Y., Nozu, R. and Nakamura, M. (2011). Role of estrogen in spermatogenesis in initial phase males of the three-spot wrasse (*Halichoeres trimaculatus*): effect of aromatase inhibitor on the testis. *Dev.Dyna.* 240, 116-121. DOI: 10.1002/dvdy.22507.

84. Murata, R., Karimata, H., Kobayashi, Y. and Nakamura, M. (2010) Two types of steroid producing cells occur in the gonads during sex differentiation in the protogynous Malabar grouper *Epinephelus malabaricus*. Int. J. Dev. Biol. (in press).

## ② その他の著作物 (総説、書籍など)

### ②-1 総説 (国内 2 件, 国際 7 件)

1. Nakamura, M., Alam, M.A., Kobayashi, Y. and Bhandari, R.K. (2007). Role of sex hormones in sex change of grouper. J. Mar. Sci. Tech. Special Issue, 23-27.
2. Okubo, K. and Nagahama, Y. (2008). Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. Acta Physiol. 193, 3-15. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2008.01832.x
3. Nagahama, Y. and Yamashita, M. (2008). Regulation of oocyte maturation in fish. Dev. Growth Differ. 50, S195-S219. DOI: 10.1111/j.1440-169X.2008.01019.x
4. Paul-Prasanth, B., Matsuda, M., Kobayashi, T., Suzuki, A., and Nagahama, Y. (2008). Functional analysis of the medaka sex determining gene, DMY – A minireview. Cybium 32, 72-73.
5. Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2009). Molecular aspects of gonadal differentiation in a teleost fish, the Nile tilapia. Sex. Dev. 3, 108-117. DOI: 10.1159/000223076
6. Paul-Prasanth, B., Nakamura, M. and Nagahama, Y. (2010). Sex Determination in Fishes. In “Hormones and Reproduction of Vertebrates” Vol. 1 (D.O. Norris, and K.H. Lopez eds.), pp. 1-14. Academic Press.
7. Shibata, N., Nakamoto, M., Shibata, Y. and Nagahama, Y. (2011). Endocrine regulation of oogenesis in the medaka, *Oryzias latipes*. In “Medaka: A Model for Organogenesis, Human Disease and Evolution” (H. Takeda et al. eds.), pp. 267-283. Springer.

1. 大久保範聡, 長濱嘉孝, 会田勝美. (2006). ゴナドトロピン放出ホルモン受容体 (GnRH-R) の分子進化. 生体の科学 57, 432-433.
2. 大久保範聡. (2007). ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 作用系の比較生物学. 日本比較内分泌学会ニュース 126, 2-12.

### ②-2 書籍 (国内 2 件, 国際 0 件)

1. 長濱嘉孝・井口泰泉共編. 日本動物学会監修, 培風館, シリーズ 21 世紀の動物科学 10, 内分泌と生命現象, 2007 年. p. 256.
2. 長濱嘉孝. 脊椎動物の生殖腺における性決定・分化・転換. 日本動物学会監修, 培風館, シリーズ 21 世紀の動物科学 10, 安部眞一・星 元紀共編, 性と生殖, 2007 年, pp. 125-168.

## (2) 口頭発表

### ① 招待講演 (国内 24 件, 国際 36 件)

1. Nagahama, Y. Sex determination and differentiation in fish. 52nd NIBB Conference. Okazaki, Japan. January 20-23, 2006.
2. Nagahama, Y. Two major factors, DMY and estrogen, regulating sex determination and differentiation in fish. International Symposium on Sex determination and Differentiation. Matsue, Japan. September 22, 2006.
3. Nagahama, Y. Molecular Mechanisms of Sex Differentiation and differentiation in Fish. International Conference of Ecophysiology in Marine Organisms. Keelung, Taiwan. October 3-6, 2006.
4. Nakamura, M. Sex change of grouper. International Conference of Ecophysiology in Marine Organisms. Keelung, Taiwan. October 3-4, 2006.
5. Nakamura, M. Endocrine mechanism of sex change in grouper. Korea-Japan, Japan-Korea Joint Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals. Jeju, Jeju Special Self-Governing Province, Korea. November 20-21, 2006.
6. Okubo, K. and Nagahama, Y. Medaka as a model organism to study the neural control of reproductive function. The Scandinavian Physiological Society Annual Meeting 2007, Oslo, Norway. August 10-12, 2007.
7. Nagahama, Y. Molecular mechanisms of sex-steroid actions on gonadal differentiation and maturation in fish. The Second Italy-Japan Bilateral Seminar on Responses of Marine Organisms to Physical and Chemical Impacts. Palermo, Italy. November 22- 5, 2006.
8. Nagahama, Y. Molecular mechanisms of sex determination and differentiation in fish. The International Symposium of *Oryzias* species. Bangkok, Thailand. November 12-14, 2007.
9. Nagahama, Y. Hormonal regulation of oocyte maturation and ovulation in fish and starfish – comparative to general. 6th Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology. Siliguri, West Bengal, India. December 10-14, 2007.
10. Nagahama, Y. Sexual plasticity in fish. The 54th NIBB Conference on New Frontiers for the Medaka Model -Genome, Bioresources and Biology-. Okazaki, Japan. February 28-29, 2008.
11. Okubo, K. and Nagahama, Y. Sexual differentiation of the medaka brain: identification of a gene predominantly expressed in the female brain, *cyp19a2*. The 54th NIBB Conference on New Frontiers for the Medaka Model -Genomics, Bioresources and Biology-. Okazaki, Japan. February 28-29, 2008.
12. Nagahama, Y. Sex determination, differentiation and sexual plasticity in fish: Current status and future directions. International Symposium on Sex Determination and Gametogenesis in Fish: Current Status and Future Directions. Honolulu, Hawaii, USA. May 30-June 1, 2008.
13. Okubo, K. Sexual differentiation of the medaka brain as revealed by the analysis of *cyp19a2*. Sex Determination and Gametogenesis in Fish: Current Status and Future Directions. Honolulu, Hawaii, USA. May 31-June 1, 2008.
14. Nagahama, Y. Expression of a lyase-deficient Cyp17 in the fish head kidney. 13th International Conference on the Adrenal Cortex. San Francisco, USA. June 11-14, 2008.

15. Nagahama, Y. Hormonal regulation of oocyte maturation and ovulation in fish. 6th International Symposium on Fish Endocrinology. Calgary, Canada. June 22-27, 2008.
16. Nagahama, Y. Sex determination/differentiation and sexual plasticity in fish. 20th International Congress of Zoology. Paris, France. August 26-29, 2008.
17. Okubo, K. Female-predominant expression of *cyp19a2* in the brain of a teleost, medaka. US/Japan Neurosteroid Symposium 2008, Gifu, Japan. September 8-11, 2008.
18. Nagahama, Y. Sex determination/differentiation and sexual plasticity in fish. International Symposium for Gonad and Brain Sex Differentiation. Fukuoka, Japan. September 14-16, 2008.
19. Nagahama, Y. Mechanisms of sex determination/differentiation and sexual plasticity in fish. 2nd International SOX meeting. Awaji, Japan. September 16-19, 2008.
20. Nakamura, M. Sex change in Coral Reef Fish. Howard Bern Symposium: Recent Advances in Comparative Endocrinology. Berkeley, California, USA. March 2-3, 2009.
21. Nagahama, Y. Sexual plasticity in fish. 5th International Symposium on the Biology of vertebrate sex determination (Opening lecture). Kona, Hawaii, USA. April 20-24, 2009.
22. Nakamura, M. Endocrine mechanisms of sex change in coral reef fish. 16th International Congress of Comparative Endocrinology. Hong Kong, China. June 22-26, 2009.
23. Kobayashi, Y., Usami, T., Sunobe, T., Nagahama, Y., Nakamura, M. Serial sex-changing gobiid fish: an animal model to investigate sex behavior associated with sex change. 16th International Congress of Comparative Endocrinology. Hong Kong, China. June 22-26, 2009.
24. Okubo, K. Medaka: a model for the study of brain sex. The second International Symposium for Fish Growth and Reproduction, Hong Kong, China. June 20-21, 2009.
25. Yoshizaki, G., Fujinuma, K. and Shikina, S. Spermatogonial transplantation in fish. The Second International Symposium for Fish Growth and Reproduction. Satellite Symposium for 16th ICCE Meeting 2009, Hong Kong, China. June 20, 2009.
26. Yoshizaki, G. Germ cell transplantation in fish: can mackerel make tuna? Genomics in Aquaculture, Bodo, Norway. July 6, 2009.
27. Yoshizaki, G. Germ cell transplantation in fish. larvi 2009 5th fish & shellfish larvi culture symposium, Ghent, Belgium. September 7, 2009.
28. Nagahama, Y. Sex determination in fish. Howard Bern Symposium: Recent Advances in Comparative Endocrinology. Berkeley, California, USA. March 2-3, 2010.
29. Okubo, K. Sex difference and its plasticity in the expression of aromatase in the medaka brain. 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, Japan. March 26-30, 2010.
30. Yoshizaki, G. Germ cell transplantation in fish: Can surrogate bonito make tuna gametes? Australasian Aquaculture 2010, Tasmania, Australia. May 26, 2010.
31. Yoshizaki, G. Germ cell transplantation in fish. 2010 BIOMODULATION International Symposium on ' Germ Cell, Stem Cell and Reproductive Biology (GSR)', Jeju Island, Korea.

June 7, 2010.

32. Nagahama, Y. Sex determination and Sexual Plasticity in Fish. Satellite International Symposium on Reproduction Biology of Aquatic Organisms – Researches from the Tropical to Temperate Zone. Motobu, Okinawa, Japan. June 30, 2010.
33. Nonaka, M., Nakamura, M. Development of gonads on some Coralliidae corals (Cnidaria; Anthozoa; Octocorallia) collected from Ryukyu Archipelago. Reproductive Biology of Aquatic Organisms. Okinawa, Japan. June 30, 2010.
34. Yoshizaki, G. Germ cell transplantation in fish: Basic biology and applications. Reproductive Biology of Aquatic Organisms, Okinawa, Japan. June 30, 2010.
35. Yoshizaki, G. Germ cell transplantation in fish: can surrogate bonito make tuna? Third National Symposium on Aquaculture Biotechnology 2010, Bogor, Indonesia. October 7, 2010.
36. Yoshizaki, G. Germ cell transplantation in fish: basic biology and its application. III International Symposium on Animal Biology of Reproduction (ISABR 2010), Sao Pedro, Brazil. October 24, 2010.
1. 長濱嘉孝. 魚類の性決定・分化と性的可塑性の分子メカニズム. 第 99 回日本繁殖生物学会シンポジウム「性の戦略」, 名古屋, 平成 18 年 9 月 8 日.
2. 長濱嘉孝. 性一多様性を生み出す原動力. 自然科学研究機構シンポジウム, 東京, 平成 19 年 9 月 23 日.
3. 長濱嘉孝. 卵成熟と排卵の制御機構. 第 32 回日本比較内分泌学会シンポジウム, 日光, 平成 19 年 10 月 12 日.
4. 長濱嘉孝. 魚の性の不思議. 文科省特定領域研究「性分化機構」市民公開シンポジウム, 札幌, 平成 19 年 11 月 24 日.
5. 長濱嘉孝. 性決定/分化から卵の成熟まで一魚類をモデルとした研究一. 特定領域研究「性分化機構の解明」第 3 回「冬のワークショップ」, 静岡, 平成 20 年 3 月 4 日.
6. 長濱嘉孝. 基礎生物学研究所での魚の生殖研究 30 年. 生殖生物学の歴史と展望, 基礎生物学研究所研究会, 岡崎, 平成 20 年 3 月 24 日.
7. 長濱嘉孝, 中村將. 魚類の性決定・性分化とステロイドホルモン. 日本動物学会第 79 回大会シンポジウムー脊椎動物の性決定・性分化とステロイドホルモン, 福岡, 平成 20 年 9 月 17 日.
8. 中村將. サンゴ礁に生息する魚類の性転換. 国際シンポジウム・海生動物の繁殖, 沖縄, 平成 21 年 2 月 21 日.
9. 吉崎悟朗, 竹内裕, 矢澤良輔. 生殖細胞移植技術を用いた魚類の代理親魚養殖: サバからマグロは生まれるか? 第 12 回マリンバイオテクノロジー学会大会, 東京, 平成 21 年 5 月 30 日.
10. 長濱嘉孝. 卵成熟と排卵の内分泌制御メカニズムー魚類卵を中心として. 第 27 回内分泌代謝学サマーセミナー, 三国, 平成 21 年 7 月 16 日.
11. 久米佐知, 番場晃, 高橋加純, 八木澤優, 吉崎悟朗. セルトリ細胞を可視化した遺伝子



導入ニジマスの開発:生殖幹細胞のニッチ解析を目指して. 第 102 回日本繁殖生物学会大会, 奈良, 平成 21 年 9 月 10 日.

12. 吉崎悟朗. ニジマスの配偶子幹細胞: 移植実験から見てきたこと Gamete stem cells in rainbow trout; what we can see from transplantation assay. 日本動物学会第 80 回大会, 東静岡, 平成 21 年 9 月 17 日.
13. 吉崎悟朗. 生殖細胞移植を用いた魚類の発生工学: サバからマグロは生まれるか? 日本発生生物学会秋季シンポジウム, 三島, 平成 21 年 11 月 28 日.
14. 中村將, 村田良介, Mohammad, A.A., 小林靖尚, ハタ科魚類の性および成熟に人為的制御について. 2010 生態工学会年次大会, 糸満, 平成 22 年 5 月 14-15 日.
15. 吉崎悟朗. 『サバがマグロを生む』養殖技法を実用に. 東京・テクノフォーラム 21—先端科学のさらに先へ—, 東京, 平成 22 年 6 月 3 日.
16. 長濱嘉孝. 生殖生物学研究のモデル生物としての魚類. 利尻島シンポジウム, 利尻, 平成 22 年 6 月 20 日.
17. 吉崎悟朗. Xenotransplantation of fish spermatogonia: Can salmon make trout? 魚類の異種間精原細胞移植: サケはマスを生むか? 第 43 回日本発生生物学会大会, 京都, 平成 22 年 6 月 21 日.
18. 吉崎悟朗. 『サバがマグロを生む』養殖技法を実用に. 東京・テクノフォーラム 21—先端科学のさらに先へ—, 大阪, 平成 22 年 7 月 6 日.
19. 長濱嘉孝. 魚の生殖研究 33 年. 北海道大学, 札幌, 平成 22 年 7 月 20 日.
20. 吉崎悟朗. 魚類の生殖細胞移植: その基礎と応用. 文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究配偶子幹細胞制御機構配偶子制御セミナー第 16 回, 岡崎, 平成 22 年 7 月 23 日.
21. 吉崎悟朗. サバからマグロは生まれるか? 第 43 回バイオ e カフェ, つくば, 平成 22 年 9 月 14 日.
22. 吉崎悟朗. 生物学はマグロの将来を救えるか? -サバにマグロを生ませる-. 体験! 生き物体験空間基礎生物学研究所一般公開, 岡崎, 平成 22 年 10 月 2 日.
23. 中村將. 魚類の性転換による性決定. 平成 22 年日本動物学会, 東京, 平成 22 年 10 月 22-25 日.
24. 吉崎悟朗. 魚類精原細胞の移植と凍結保存: 凍結精原細胞から卵は作れるか? 第 55 回日本生殖医学会総会学術講演会, 徳島, 平成 22 年 11 月 12 日.

## ② 口頭発表 (国内 39 件, 国際 24 件)

1. Usami, T., Okubo, K., Kobayashi, Y., Yambe, H., Sunobe, T., Nakamura, M. and Nagahama, Y. Molecular cloning of gonadotropin-releasing hormones in the serial sex changing gobiid fish, *Trimma okinawae*. The 5th Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for

Comparative Endocrinology. Bangkok, Thailand. February 7-10, 2006.

2. Wang, D.S., Kobayashi, T., Zhou, L.Y., Ijiri, S., Morohashi, K. and Nagahama, Y. Transcriptional regulation of aromatase (*Cyp19a1*) by Foxl2 and Dmrt1 in the gonads during sex differentiation in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. The 4th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination. Kona, Hawaii, USA. April 10-16, 2006
3. Ijiri, S., Kaneko H., Wang, D.S., Sakai, F. and Nagahama Y. Differential expression of genes in XX and XY gonads during the critical period of sex determination and differentiation in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. The 4th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination. Kona, Hawaii, USA. April 10-16, 2006
4. Bhandari, R.K., Nakamura, M. and Nagahama Y. Evidence for existence of sexual plasticity in the adult gonochoristic fish. The 4th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination. Kona, Hawaii, USA. April 10-16, 2006
5. Ohta, K., Sakai, F., Nakamura, M., Matsuyama, M. and Nagahama. Y. *In vitro* gonadal sex change controlled by the sex steroid hormones in the hermaphrodite fish, *Pseudolabrus Sieboldi*. The 4th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination. Kona, Hawaii, USA. April 10-16, 2006
6. Kobayashi, Y., Sunobe, T., Usami, T., Nagahama, Y. and Nakamura, M. Differential expression of gonadotropin receptors in the gonadal tissues of serial sex changing gobiid fish, *Trimma Okinawae*. The 4th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination. Kona, Hawaii, USA. April 10-16, 2006
7. Kobayashi, Y., Usami, T., Yambe, H., Sunobe, T., Nagahama, Y. and Nakamura, M. Quantification of FSH- and LH-receptor messenger RNA in gobiid fish (*Trimma okinawae*) during serial sex change. 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Saint Malo, France. June 3-8, 2007.
8. Paul-Prasanth, B., Matsuda, M., Suzuki, A. and Nagahama, Y. Functional analysis of the medaka sex determining gene, *DMY* reveals its role in the regulation of germ cell proliferation in the XY gonad. 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Saint Malo, France. June 3-8, 2007.
9. Shibata, Y., Zhou, L.Y., Hirai, T., Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. Change in steroidogenic enzyme, steroidogenic acute regulatory protein, steroid receptor, gonadotropin receptor and transcriptional factor mRNAs in ovarian follicles during oocyte growth and maturation of medaka (*Oryzias latipes*). 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Saint Malo, France. June 3-8, 2007.
10. Wang, D.S., Kobayashi, T., Zhou, L.Y., Paul-Prasanth, B., Ijiri, S., Sakai, F., Okubo, K., Morohashi, K-I. and Nagahama, Y. Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with Ad4BP/SF-1. 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Saint Malo, France. June 3-8, 2007.

11. Paul-Parasanth, B., Matsuda, M. and Nagahama, Y. Effects of diethylstilbestrol on the early sex differentiation of genetically male and female medaka larvae. 6th Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology. Siliguri, West Bengal, India. December 10-14, 2007.
12. Sakai, F. and Nagahama, Y. Organ culture and transplantation of tilapia (*Oreochromis niloticus*) gonads for the analysis of gonadal sex differentiation. 6th Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology. Siliguri, West Bengal, India. December 10-14, 2007.
13. Horiguchi, R. and Nakamura, M. Molecular characterization of estrogen receptor  $\alpha$ ,  $\beta 1$  and  $\beta 2$  and their expression patterns during sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. 5th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea. Jeju, Jeju Special Self-Governing Province, Korea. September 10-11, 2008.
14. Soyano, K., Inagami, Y., Takushima, M., Kohno, H., Kobayashi, Y. and Nakamura, M. Gonadal maturation and lunar-related spawning in the honeycomb grouper, *Epinephelus merra*. 5th World Fisheries Congress. Yokohama, Japan. October 20-25, 2008.
15. Kobayashi, Y., Alam, M.A., Shimizu, A. and Nakamura, M. Physiologic research on sex change in the important aquaculture fish: protandrous grouper, *Epinephelus merra*. 5th World Fisheries Congress. Yokohama, Japan. October 20-25, 2008.
16. Paul-Prasanth, B., Bhandari, R., Shibata, Y., Okubo, K., Usami, T., Nagahama, Y. Assessment of sexual plasticity using bio-imaging techniques. 16th International Congress of Comparative Endocrinology. Hong Kong, China. June 22-26, 2009.
17. Wang, D.S. and Nagahama, Y. Regulation of *Cyp19a1* expression in gonads by transcription factors during sex differentiation of the Nile tilapia. 16th International Congress of Comparative Endocrinology. Hong Kong, China. June 22-26, 2009.
18. Zhou, L.Y., Chakraborty, T., Wang, D.S. and Nagahama, Y. R-spondin1 is essential for ovarian differentiation in fish. 16th International Congress of Comparative Endocrinology. Hong Kong, China. June 22-26, 2009.
19. Nozu, R., Kojima, Y. and Nakamura, N. Cellular behavior in the gonad during sex change in the protogynous wrasse. 16th International Congress of Comparative Endocrinology. Hong Kong, China. June 22-26, 2009.
20. Kobayashi, Y., Usami, T., Sunobe, T., Nagahama, Y. and Nakamura, M. Physiological studies of the gobiid fish *Trimma Okinawae*: An animal model to investigate brain and gonadal sex change. The 6th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea. Nagasaki, Japan. September 24-27, 2009.
21. Sabina, R.N., Pandit, P. and Nakamura, M. Efficacy of exemestane, a new generation of aromatase inhibitor, on sex differentiation in a gonochoristic fish. The 6th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea. Nagasaki, Japan. September 24-27, 2009.
22. Narayan P.P., Sabina, R. and Nakamura, M. Effect of high water temperature on sex differentiation and gonadal development of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The 6th

International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea. Nagasaki, Japan. September 24-27, 2009.

23. Alam, M.A. and Nakamura, M. Endocrine control of protogynous sex change in grouper. The 7th International Workshop of the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea (2009 ECS WORKSHOP). Shanghai, China. December 4-5, 2009.
24. Nakajima, Y., Suwa, R., Murata, R. and Nakamura, M. Sexual differentiation and maturity in *Galaxea fascicularis*. The 7th International Workshop of the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea (2009 ECS WORKSHOP). Shanghai, China. December 4-5, 2009.
1. 大久保範聡, 会田勝美, 長濱嘉孝. トランスジェニックメダカを用いた GnRH ニューロンの発生解析. シンポジウム「生命の基本を司る本能的脳機構」, さいたま, 平成 18 年 1 月 6-7 日.
2. 太田耕平, 酒井章衣, 中村 將, 松山倫也, 長濱嘉孝. ホシササノハベラ生殖腺の器官培養および初代細胞培養と双方向性転換に関わるステロイド代謝酵素遺伝子の発現解析. 平成 18 年度日本水産学会, 高知, 平成 18 年 3 月 29 日-4 月 2 日.
3. 大久保範聡. メダカの脳における性差の分子メカニズム. 「性分化機構の解明」第 3 回会議, 淡路, 平成 18 年 9 月 11-13 日.
4. 松田勝, 王徳寿, 長濱嘉孝. メダカ性決定遺伝子とそのパラログ遺伝子の機能的差異を生むアミノ酸配列. 日本動物学会第 77 回大会シンポジウム「魚類研究のクロストーク」, 松江, 平成 18 年 9 月 21-24 日.
5. 大久保範聡, 長濱嘉孝. メダカを用いて生殖中枢の発生機構に迫る. 日本動物学会第 77 回大会シンポジウム「魚類研究のクロストーク」, 松江, 平成 18 年 9 月 21-24 日.
6. 小林靖尚, 中塚裕也, 中村將. 雌性先熟魚カンモンハタ *Epinephelus merra* における生殖腺刺激ホルモン GtH の発現. 第 77 回日本動物学会大会, 松江, 平成 18 年 9 月 21-24 日.
7. 酒井章衣, 長濱嘉孝. ティラピア生殖腺の器官培養と移植. 琉球大学熱帯生物圏研究センター平成 18 年度シンポジウム「沖縄県水産の活性化と地域連帯」, 本部町, 平成 18 年 12 月 14-15 日.
8. 宇佐美剛志, 大久保範聡, 小林靖尚, 山家秀信, 須之部友基, 中村將, 長濱嘉孝. 両方向性性転換魚オキナワベニハゼの脳内メカニズムに関する研究. 琉球大学熱帯生物圏研究センター平成 18 年度シンポジウム「沖縄県水産の活性化と地域連携」, 本部町, 平成 18 年 12 月 14-15 日.
9. 太田耕平, 酒井章衣, 中村將, 松山倫也, 長濱嘉孝. 無血清培養系を用いた *in vitro* における生殖腺の性転換誘導. 琉球大学熱帯生物圏研究センター平成 18 年度シンポジウム「沖縄県水産の活性化と地域連携」, 本部町, 平成 18 年 12 月 14-15 日.
10. 山家秀信, 小林靖尚, 宇佐美剛志, 須之部友基, 中村將, 長濱嘉孝. ベニハゼ類の性転換に伴った行動変化. 琉球大学熱帯生物圏研究センター平成 18 年度シンポジウム「沖

縄県水産の活性化と地域連携」, 本部町, 平成 18 年 12 月 14-15 日.

11. 稲上裕也, 秋山信彦, 河野裕美, 中村將, 征矢野清. 西表島及び瀬底島に棲息するカンモンハタの性成熟と産卵行動の特徴. 平成 19 年度日本水産学会春季大会 (日本農学大学水産部会), 東京, 平成 19 年 3 月 27-31 日.
12. 清水昭男, 大久保誠, 伊藤春香, 宇田川美穂, 濱口昌巳, 小林亨, 中村將. マミチョグの性分化と性成熟過程における FSH 細胞及び LH 細胞の変化. 平成 19 年度日本水産学会春季大会 (日本農学大学水産部会), 東京, 平成 19 年 3 月 27-31 日.
13. 小林靖尚, 中塚裕也, 清水昭男, 中村將. 雌性先熟魚カンモンハタ *Epinephelus merra* における生殖腺刺激ホルモン GTH の発現と役割. 平成 19 年度日本水産学会春季大会 (日本農学大学水産部会), 東京, 平成 19 年 3 月 27-31 日.
14. 佐藤茉菜, 東藤孝, 蘆田美沙, 山口直宏, 小林靖尚, 足立伸次, 山内皓平, 中村將. ミツボシキュウセンの生殖腺器官培養系を用いた性転換機構の解析. 平成 19 年度日本水産学会春季大会 (日本農学大学水産部会), 東京, 平成 19 年 3 月 27-31 日.
15. 中本正俊, 松田勝, 長濱嘉孝, 柴田直樹. ルソンメダカ *Oryzias luzonensis* の性分化過程における aromatase の発現解析. 日本動物学会第 78 回大会, 弘前, 平成 19 年 9 月 20-22 日.
16. 柴田安司, 荻原克益, 高橋孝行, 吉国通庸, 長濱嘉孝. メダカ卵濾胞の成長・成熟・排卵期における GTH 受容体、ステロイド関連遺伝子発現変化. 日本動物学会第 78 回大会, 弘前, 平成 19 年 9 月 20-22 日.
17. Alam, M.A. and Nakamura, M. The role of androgen in protogynous sex change of grouper. 第 31 回日本比較内分泌学会大会, 札幌, 平成 19 年 11 月 3-4 日.
18. 村田良介, ヤイトハタ *Epinephelus malabaricus* の性分化と雄性ホルモン処理による早期性転換誘導の試み. 海産無脊椎動物研究会, 愛媛, 平成 21 年 3 月 10 日.
19. 野津了, 雌性先熟魚ミツボシキュウセン *Halichoeres tirmaculatus* の性転換過程における細胞増殖. 海産無脊椎動物研究会, 愛媛. 平成 21 年 3 月 10 日.
20. 諏訪良太, 中村將. アザミサンゴ *Galaxea fascicularis* とコユビミドリイシ *Acropora digitifera* の生殖巣の発達過程と産卵様式. 海産無脊椎動物研究会, 愛媛. 平成 21 年 3 月 10 日.
21. 村田良介, 狩俣洋文, 中村將. ヤイトハタ *Epinephelus malabaricus* の性分化と雄生ホルモン処理による早期性転換誘導の試み. 平成 21 年度日本水産学会春期大会. 東京, 平成 21 年 3 月 27-31 日.
22. 小林靖尚. 魚類の生殖機構-基礎と応用-性転換魚類. 平成 21 年度日本水産学会春期大会. 東京. 平成 21 年 3 月 27-31 日.
23. 野津了, 小林靖尚, 小島豊, 中村將. 雌性先熟魚ミツボシキュウセンにおける性転換過程の生殖腺と体細胞の増殖. 平成 21 年度日本水産学会春期大会. 東京, 平成 21 年 3 月 27-31 日.



24. 大久保範聡. 脳内生殖関連ペプチドホルモン. 平成 21 年度日本水産学会春期大会. シンポジウム「魚類の生殖機構—基礎と応用—」, 東京, 平成 21 年 3 月 27-31 日.
25. 大久保範聡. メダカを用いた GnRH ニューロンの発生機構解析. 第 24 回下垂体研究会学術集会(シンポジウム「ゴナドトロピン分泌刺激を越えて新たな局面に向かう GnRH の機能研究」), 三沢, 平成 21 年 8 月 27-29 日.
26. 泉田大介, 村田良介, 中村將, 片山翔太, 征矢野清. カンモンハタの卵成熟及び排卵誘導におけるフェロモンの存在. 平成 21 年度日本水産学会秋季大会, 盛岡, 平成 21 年 9 月 30-10 月 3 日.
27. 大久保範聡. メダカの脳の性分化と性ステロイド. シンポジウム「内・外環境と生物応答」, 福岡, 平成 21 年 10 月 9-10 日.
28. 野津了, 中村將. 雌性先熟魚ミツボシキウセンの性転換におけるセルトリ細胞の起源を探る *Halichoeres trimaculatus* の性転換過程における DMRT1 発現変化. 平成 22 年度日本水産学会春季大会, 藤沢, 平成 22 年 3 月 26-30 日.
29. 村田良介, 狩俣洋文, 小林靖尚, 中村將. ヤイトハタの性分化過程におけるステロイド代謝酵素の発現局在. 平成 22 年度日本水産学会春季大会, 藤沢, 平成 22 年 3 月 26-30 日.
30. Narayan, P. P., Sabina, R., Nakamura, M. Sterilization of gonad of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by high temperature. 平成 22 年度日本水産学会春季大会, 藤沢, 平成 22 年 3 月 26-30 日.
31. 識名信也, 吉崎悟朗. in vitro で短期間培養したニジマス精原細胞は宿主生殖腺への高い生着能を獲得する. 平成 22 年度日本水産学会春季大会, 藤沢, 平成 22 年 3 月 26-30 日.
32. 谷田部誉史, 岩田岳, 壁谷尚樹, 矢澤良輔, 林誠, 古谷真城, 長谷川理, 竹内裕, 吉崎悟朗. 代理親魚養殖を目指した不妊海産魚宿主の開発. 平成 22 年度日本水産学会春季大会, 藤沢, 平成 22 年 3 月 26-30 日.
33. 矢澤良輔, 竹内裕, 岩田岳, 吉崎悟朗. 代理親魚技術を用いたクロマグロ種苗生産法の構築 (IV) ～ハガツオ仔魚へのクロマグロ精原細胞移植～. 平成 22 年度日本水産学会春季大会, 藤沢, 平成 22 年 3 月 26-30 日.
34. 久米佐知, 伊原祥子, 吉崎悟朗. ニジマスにおける Cre/loxP システムを用いた遺伝子導入の発現制御システムの開発. 日本繁殖生物学会第 103 回大会, 十和田, 平成 22 年 9 月 2 日.
35. 泉田大介, 村田良介, 中村將, 山田秀秋, 町口裕二, 征矢野清. カンモンハタ雌の最終成熟および排卵における性フェロモンの存在とその役割. 平成 22 年度日本水産学会秋季大会, 京都, 平成 22 年 9 月 22-25 日.
36. 金丸竜也, 村田良介, 中村將, Mohammad A.A., 香川浩彦. 非産卵期カンモンハタ

*Epinephelus merra* の成熟に及ぼす環境因子調節及び GnRH 投与の効果. 平成 22 年度日本水産学会秋季大会, 京都, 平成 22 年 9 月 22-25 日.

37. 柴田安司, 長濱嘉孝. メダカ卵成熟過程における遺伝子発現解析. 日本動物学会第 81 回大会, 東京, 平成 22 年 9 月 23-25 日.
38. 大久保範聡. メダカの脳における性差と性分化. 日本動物学会第 81 回大会 (シンポジウム「脊椎動物の性決定及び性分化機構」), 東京, 平成 22 年 9 月 23-25 日.
39. 林誠, 長坂安彦, 吉崎悟朗. Side population を指標にしたニジマス精原幹細胞の単離. 第 32 回日本分子生物学会年会, 神戸, 平成 22 年 12 月 9 日.

### ③ ポスター発表 (国内 42 件, 国際 35 件)

1. Kojima, Y., Kobayashi Y. and Nakamura, M. Estrogen induces sex change from mature testis to a normal ovary in protogynous wrasse. The 4th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination. Kona, Hawaii, USA. April 10-16, 2006.
2. Inagami, Y., Masumoto, T., Akiyama, N., Kono, H., Nakamura, M. and Soyano, K. Sex-maturation and spawning behavior of honeycomb grouper *Epinephelus merra*, at Iriomote and Sesoko Island, Okinawa, Japan. Korea-Japan, Japan-Korea Joint Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals. Jeju, Jeju Special Self-Governing Province, Korea. November 20-21, 2006.
3. Kobayashi, Y. and Nakamura, M. Endocrine mechanism of the sex change in the serial Sex changing Gobiid fish *Trimma okinawae*. Tropical Island Ecosystems and Sustainable Development. Moorea, Decemper 2-7, 2006.
4. Bhandari, R.K., Cui, J., Lau, E.L., Okubo, K. and Nagahama, Y. Generation of aromatase-GFP transgenic medaka (*Oryzias latipes*) lines with fluorescence in the somatic cells of the ovaries. 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Saint Malo, France. June 3-8, 2007.
5. Ijiri, S., Kaneko, H., Wang, D.S., Adachi, S. and Nagahama, Y. Gene expression profile in XX and XY gonads during sex differentiation in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Saint Malo, France. June 3-8, 2007.
6. Liu, Z., Wu, F., Jiao, B., Zhang, X., Hu, C., Huang, B., Zhou, L.Y., Huang, X., Wang, Z., Zhang, Y., Nagahama, Y., Cheng, C. and Wang, D. Molecular cloning of Dmrt1, Foxl2 and Cyp19 in Southern catfish and their possible roles in sex differentiation. 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Saint Malo, France. June 3-8, 2007.
7. Wang, D., Li, J., Zhou, L.Y., Guan, G. and Nagahama, Y. Roles and transcriptional regulation of Dmrt1 during gonadal sex differentiation in tilapia (*Oreochromis niloticus*). 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Saint Malo, France. June 3-8, 2007.
8. Zhao, H., Guan, G., Matsuda, M., Paul-Prasanth, B. and Nagahama, Y. O14E-T, a eukaryotic initial factor 4E binding protein of medaka fish (*Oryzias latipes*), interacts with Nanos and Vasa.

8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Saint Malo, France. June 3-8, 2007.

9. Zhou, L.Y., Wang, D. and Nagahama, Y. Cloning and characterization of 17 $\beta$ -HSD type 1, 3, 8 and 12 from tilapia. 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Saint Malo, France. June 3-8, 2007.
10. Miura, S. and Nakamura, M. The role of estrogen in gonadal sex differentiation in protandrous anemone fish *Amphiprion clarkii*. 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Saint Malo, France. June 3-8, 2007.
11. Horiguchi, R., Kobayashi, Y. and Nakamura, M. Molecular cloning and expression of three estrogen receptors in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Saint Malo, France. June 3-8, 2007.
12. Ogawa, S., Akiyoshi, M., Higuchi, M., Nakamura, M. and Hirai, T. Post-sex differential sex reversal in female common carp (*Cyprinus carpio*). 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Saint Malo, France. June 3-8, 2007.
13. Todo, T., Sato, M., Ashida, M., Yamaguchi, N., Kobayashi, Y., Adachi, S., Yamauchi, K. and Nakamura, M. *In vitro* induction of gonadal sex change in a protogynous fish, three-spotted wrasse (*Halichoeres trimaculatus*). 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Saint Malo, France. June 3-8, 2007.
14. Li, J.Z., Wang, D.S., Zhou, L.Y., Zhao, H.B., Sakai, F., Guan, G.J. and Nagahama, Y. Molecular cloning, characterization and expression of GATA4 in tilapia (*Oreochromis niloticus*). International Symposium on Sex Determination and Gametogenesis in Fish: Current Status and Future Directions. Honolulu, Hawaii, USA. May 30-June 1, 2008.
15. Sakai, F. and Nagahama, Y. Transplantation of tilapia gonads for the study of gonadal sex differentiation. International Symposium on Sex Determination and Gametogenesis in Fish: Current Status and Future Directions. Honolulu, Hawaii, USA. May 30-June 1, 2008.
16. Bhandari, R., Nakamura, M. and Nagahama, Y. Sex reversal of the adult gonochoristic fish, Nile tilapia: Evidence for the existence of sexual plasticity in adult gonads. International Symposium on Sex Determination and Gametogenesis in Fish: Current Status and Future Directions. Honolulu, Hawaii, USA. May 30-June 1, 2008.
17. Guan, G.J., Hong, Y.H., Chen, T.S., Yi, M.S., Lau, E.L., Zhao, H.B. Schartl, M. and Nagahama, Y. Targeted homologous recombination of nanos3 in medaka ES cell line (MES1). International Symposium on Sex Determination and Gametogenesis in Fish: Current Status and Future Directions. Honolulu, Hawaii, USA. May 30-June 1, 2008.
18. Shibata, Y., Hirai, T., Yoshikuni, M. and Nagahama, Y. Hormonal regulation of ovulation in medaka, *Oryzias latipes*. International Symposium on Sex Determination and Gametogenesis in Fish: Current Status and Future Directions. Honolulu, Hawaii, USA. May 30-June 1, 2008.
19. Masuyama, H., Nagahama, Y., Matsuda, M. Establishment of a transgenic line with the sex-determining gene, *DMY*, in the teleost fish medaka, *Oryzias latipes*. Fifth International Symposium on the Biology of vertebrate sex determination. Kona, Hawaii, USA. April 20-24, 2009.

20. Paul-Prasanth, B. and Nagahama, Y. Aromatase inhibition by exemestane initiates testicular differentiation in the ovaries of sexually mature medaka. 5th International Symposium on the Biology of vertebrate sex determination. Kona, Hawaii, USA. April 20-24, 2009.
21. Suzuki, A., Shibata, Y., Paul-Prasanth, B. and Nagahama, Y. Expression of gonadal soma derived factor (GSDF) is closely correlated with male sex-differentiation in medaka. 5th International Symposium on the Biology of vertebrate sex determination. Kona, Hawaii, USA. April 20-24, 2009.
22. Horiguchi, R., Ohashi, H., Kojima, Y., Kobayashi, Y. and Nakamura, M. Induction of sex change *in vitro* in protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. 5th International Symposium on the Biology of vertebrate sex determination. Kona, Hawaii, USA. April 20-24, 2009.
23. Suzuki, A., Shibata, Y., Maysuda, M., Paul-Prasanth, B., Nagahama, Y. Expression of gonadal soma derived factor (GSDF) is closely correlated with male sex-differentiation in medaka. 16th International Congress of Comparative Endocrinology. Hong Kong, China. June 22-26, 2009.
24. Murata, R., Karimata, H. and Nakamura, M. Gonadal sex differentiation in the protogynous malbar grouper, *Epinephelus malbaricus*. 16th International Congress of Comparative Endocrinology. Hong Kong, China. June 22-26, 2009.
25. Murata, R., Karimata, H. and Nakamura, M. The induction of precocious sex change in the protogynous Malabar grouper, *Epinephelus malabaricus*. The 6th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea. Nagasaki, Japan. September 24-27, 2009.
26. Izumida, D., Murata, R., Nakamura, M., Katayama, S. and Soyano, K. Influence of male on oocyte maturation and ovulation in honeycomb grouper, *Epinephelus merra*. The 6th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea. Nagasaki, Japan. September 24-27, 2009.
27. Izumida, D., Murata, R., Nakamura, M., Katayama, S. and Soyano, K. Chemical communication for ovulation and spawning between male and female in honeycomb grouper, *Epinephelus merra*. The 7th international Workshop of the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea (2009 ECS WORKSHOP). Shanghai, China. December 4-5, 2009.
28. Narayan P.P., Sabina, R. and Nakamura, M. Effect of high water temperature on gonadal differentiation and development in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. The 7th International Workshop of the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea (2009 ECS WORKSHOP). Shanghai, China. December 4-5, 2009.
29. Nozu, R., Horiguchi, R., Murata, R., Kojima, Y. and Nakamura, M. Origin of Sertoli cells in the gonad during sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. The 7th International Workshop of the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea (2009 ECS WORKSHOP). Shanghai, China. December 4-5, 2009.
30. Murata, R., Karimata, H., Kobayashi, Y. and Nakamura, M. Two types of steroid-producing

cells in the gonads during sex differentiation of protogynous Malabar grouper, *Epinephelus malabaricus*. The 7th International Workshop of the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea (2009 ECS WORKSHOP). Shanghai Ocean University Shanghai, P. R. China. 4-5 December 2009.

31. Sabina, R., Narayan, P.P. and Nakamura, M. Sex differentiation of gonochoristic fish using a new generation steroidal aromatase inhibitor. The 7th International Workshop of the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea (2009 ECS WORKSHOP). Shanghai, China. December 4-5, 2009.
  32. Alam, M.A. and Nakamura, M. Sex change in grouper-the endocrine prospective. Reproductive Biology of Aquatic Organisms. Motobu, Okinawa, Japan. June 30, 2010.
  33. Kobayashi, Y., Usami, T., Sunobe, T., Manabe, H., Nagahama, Y. and Nakamura, M. Reproductive role of urogenital papillae of gobiid fish: Histological observation of the genital ducts in *Trimma Okinawae*. Reproductive Biology of Aquatic Organisms. Motobu, Okinawa, Japan. June 30, 2010.
  34. Horiguchi, R., Ohashi, H., Kojima, Y., Kobayashi, Y. and Nakamura, M. Induction of sex change *in vitro* in protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. Reproductive Biology of Aquatic Organisms. Motobu, Okinawa, Japan. June 30, 2010.
  35. Sabina, R. and Nakamura, M. Sexual plasticity in the Nile tilapia, a gonochoristic fish. Reproductive Biology of Aquatic Organisms. Motobu, Okinawa, Japan. June 30, 2010.
1. 酒井章衣, 長濱嘉孝. 硬骨魚類ティラピア性分化解析における“異時間的”移植. 「性分化機構の解明」第3回会議, 淡路, 平成18年9月11-13日.
  2. 井尻成保, 金子裕代, 王徳寿, 長濱嘉孝. 性分化期のティラピア生殖腺における関連遺伝子の発現変化. 「性分化機構の解明」第3回会議, 淡路, 平成18年9月11-13日.
  3. 鈴木垂矢, 松田勝, 長濱嘉孝. 魚類生殖腺の性的可塑性保持に関する因子の検索. 「性分化機構の解明」第3回会議, 淡路, 平成18年9月11-13日.
  4. 宇佐美剛志, 大久保範聡, 小林靖尚, 山家秀信, 須之部友基, 中村將, 長濱嘉孝. 両方向性性転換魚オキナワベニハゼの脳における性的可塑性の分子メカニズムに関する研究. 「性分化機構の解明」第3回会議, 淡路, 平成18年9月11-13日.
  5. 太田耕平, 酒井章衣, 中村將, 松山倫也, 長濱嘉孝. ホシササノハベラをモデルとした魚類生殖腺の性転換機構の解析. 「性分化機構の解明」第3回会議, 淡路, 平成18年9月11-13日.
  6. 征矢野清, 田中英洋, 稲上裕也, 宅島めぐみ, 秋山信彦, 中村將. 月周期と同調したカンモンハタの成熟と産卵. 第77回日本動物学会大会, 松江, 平成18年9月21-24日.
  7. 菊野綾子, 中村將. 両方向性転換ゴンベ系魚類の生殖腺構造の比較検討. 琉球大学熱帯生物圏研究センター平成18年度シンポジウム, 本部町, 平成18年12月14-15.
  8. 小林靖尚, 中塚裕也, 清水昭夫, 中村將. 雌性先熟魚カンモンハタ *Epinephelus merra*

における生殖腺茂樹ホルモン GtH の役割 琉球大学熱帯生物圏研究センター平成 18 年度シンポジウム, 本部町, 平成 18 年 12 月 14-15 日.

9. 中塚裕也, 中村將. GnRHα 投与によるカンモンハタの性成熟誘導の試み. 琉球大学熱帯生物圏研究センター平成 18 年度シンポジウム. 本部町, 平成 18 年 12 月 14-15 日.
10. 三浦さおり, 小林靖尚, 中村將. 雄生先熟魚クマノミの成熟生殖腺におけるステロイド合成酵素 (P450<sub>scc</sub>, P450<sub>11β</sub>, P450<sub>arom</sub>) の免疫組織化学的観察. 琉球大学熱帯生物圏研究センター平成 18 年度シンポジウム, 本部町, 平成 18 年 12 月 14-15 日.
11. 堀口涼, 小林靖尚, 中村將. 雌性先熟魚ミツボシキュウセンのエストロゲン受容体のクローニング. 琉球大学熱帯生物圏研究センター平成 18 年度シンポジウム, 本部町, 平成 18 年 12 月 14-15 日.
12. 野津了, 小島豊, 中村將. 雌性先熟魚ミツボシキュウセン *Halichoeres trimaculatus* におけるアロマターゼ・インヒビターによる人為的性転換の誘導. 琉球大学熱帯生物圏研究センター平成 18 年度シンポジウム, 本部町, 平成 18 年 12 月 14-15 日.
13. 宮川知彦, 中村將. カンモンハタ *Epinephelus merra* の人為的性転換の試み. 琉球大学熱帯生物圏研究センター平成 18 年度シンポジウム, 本部町, 平成 18 年 12 月 14-15 日.
14. Alam, M.A., Nakamura, M. Molecular cloning of FoxL2 gene from protogynous honeycomb grouper *Epinephelus merra*. 琉球大学熱帯生物圏研究センター平成 18 年度シンポジウム, 本部町, 平成 18 年 12 月 14-15 日.
15. 稲上裕也, 増本貴士, 秋山信彦, 河野裕美, 中村將, 征矢野清. 西表島及び瀬底島に棲息するカンモンハタ *Epinephelus merra* の性成熟と産卵行動の特徴. 琉球大学熱帯生物圏研究センター平成 18 年度シンポジウム, 本部町, 平成 18 年 12 月 14-15 日.
16. 三浦さおり, 中村將. 雄生先熟魚クマノミの生殖腺の性分化過程における雌性ホルモンの役割. 平成 19 年度日本水産学会春季大会 (日本農学大学水産部会), 東京, 平成 19 年 3 月 27-31 日.
17. 小川智史, 秋吉実, 樋口正仁, 中村將, 平井俊朗. アロマターゼ阻害による性分化後のコイ雌における性転換. 平成 19 年度日本水産学会春季大会 (日本農学大学水産部会), 東京, 平成 19 年 3 月 27-31 日.
18. 関戸沙由里, 松岡浩, 樋口正仁, 原彰彦, 中村將, 平井俊朗. コイ (*Cyprinus carpio*) の生殖に及ぼす内分泌攪乱化学物質の影響評価に関する研究. 平成 19 年度日本水産学会春季大会 (日本農学大学水産部会), 東京, 平成 19 年 3 月 27-31 日.
19. 増山治男, 山田雅斗, 長濱嘉孝, 松田勝. 外来の性決定遺伝子 DMY を持った XX メダカ系統樹立. 日本動物学会第 78 回大会, 弘前, 平成 19 年 9 月 20-22 日.
20. 宇佐美剛志, 小林靖尚, 大久保範聡, 山家秀信, 須之部友基, 中村將, 長濱嘉孝. 両方向性性転換魚オキナワベニハゼにおける脳の性転換メカニズム. シンポジウム「水生動物神経系の多様性と進化」— 多様性の実態とその形成要因から生物学的意義にせまる—. 本部町, 平成 19 年 11 月 24 日.
21. 小林靖尚, 宇佐見剛士, 須之部友基, 長濱嘉孝, 中村將. オキナワベニハゼの両方向性転換時における生殖腺刺激ホルモン受容体の発現変化. シンポジウム「水生動物神経系の多様性と進化」— 多様性の実態とその形成要因から生物学的意義にせまる—. 本



部町. 平成 19 年 11 月 24 日.

22. 山田雅斗, 増山治男, 長濱嘉孝, 石川智子, 亀井保博, 藤堂剛, 松田勝. メダカの DMRT1 の突然変異は雄から雌への性転換を引き起こす. 特定領域「性分化機構の解明」第 3 回「冬のワークショップ」, 御殿場, 平成 20 年 3 月 3-5 日.
23. 荻原克益, 柴田安司, 長濱嘉孝, 高橋孝行. メダカ卵巣におけるプロゲステロン核内受容体の発現および機能解析. 日本動物学会第 78 回大会, 弘前, 平成 19 年 9 月 20-22 日.
24. Arin Ngamniyom, 長濱嘉孝, 笹山雄一. バンコク郊外に棲むタイメダカの性比: 特に間性の個体の鰭の形態に注目して. 日本動物学会第 78 回大会, 弘前, 平成 19 年 9 月 20-22 日.
25. 増山治男, 山田雅斗, 長濱嘉孝, 松田勝. 外来の性決定遺伝子 DMY を持った XX メダカ系統樹立. 日本動物学会第 78 回大会, 弘前, 平成 19 年 9 月 20-22 日.
26. 増山治男, 山田雅斗, 長濱嘉孝, 松田勝. 外来 DMY 遺伝子をゲノムにもつ XX メダカは雄になる. 特定領域「性分化機構の解明」第 3 回「冬のワークショップ」, 御殿場, 平成 20 年 3 月 3-5 日.
27. 柴田安司, 吉国通庸, 長濱嘉孝. メダカ卵成熟過程の解析. 日本動物学会第 79 回大会. 福岡, 平成 20 年 9 月 5-7 日.
28. 山田雅斗, 増山治男, 長濱嘉孝, 石川智子, 亀井保博, 藤堂剛, 松田勝. メダカの DMRT1 の突然変異は雄から雌への性転換を引き起こす. 日本動物学会第 79 回大会. 福岡, 平成 20 年 9 月 5-7 日.
29. 村田良介, 狩俣洋文, 小島豊, 中村將. ヤイトハタ *Epinephelus malabaricus* の性分化機構の解明と稚魚期での早期性転換誘導の試み. 熱帯生物圏研究センター平成 20 年度共同利用研究会, 西表, 平成 20 年 10 月 29-31 日.
30. 小林靖尚, 堀口涼, 野津了, 小島豊, 平井俊朗, 中村將. 雌性先熟魚ミツボシキューセンにおける Foxl2 の発現変化. 熱帯生物圏研究センター平成 20 年度共同利用研究会, 西表, 平成 20 年 10 月 29-31 日.
31. 小島豊, 中村將. 成魚雌ティラピアにおけるアロマターゼ阻害剤による性転換誘導. 熱帯生物圏研究センター平成 20 年度共同利用研究会, 西表, 平成 20 年 10 月 29-31 日.
32. 堀口涼, 小林靖尚, 中村將. 雌性先熟魚ミツボシキューセン DMRT1 のクローニング及び性転換過程における発現解析. 熱帯生物圏研究センター平成 20 年度共同利用研究会, 西表, 平成 20 年 10 月 29-31 日.
33. 識名信也, 吉崎悟朗. 代理親魚養殖を目指したニジマス精原細胞の in vitro 培養技術の開発-精原細胞の生存と分裂を促進する因子の探索. 第 102 回日本繁殖生物学会大会, 奈良, 平成 21 年 9 月 10 日.
34. 大久保範聡, 長濱嘉孝. *cyp19a2* の発現解析から見えてきたメダカの脳の性分化機構. 第 34 回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第 31 回大会合同大会. 豊中, 平成 21 年 10 月 23 日. (若手研究者最優秀発表賞).
35. 中島祐一, 諏訪僚太, 中村將. 造礁サンゴにおける卵黄タンパク質の局在. 日本サンゴ

礁学会第 12 回大会, 本部町, 平成 21 年 11 月 26-29 日.

36. 野中正法, 中村將. 琉球列島産宝石サンゴ類の生殖腺観察. 日本サンゴ礁学会第 12 回大会, 本部町, 平成 21 年 11 月 26-29 日.
37. 野津了, 堀口涼, 村田良介, 中村將. 雌性先熟魚ミツボシキュウセン *Halichoeres trimaculatus* の性転換過程における DMRT1 発現変化. 日本サンゴ礁学会第 12 回大会. 本部町, 平成 21 年 11 月 26-29 日
38. Sabina, R., Narayan, P.P., Nakamura, M. Uses of a new generation aromatase inhibitor on sex differentiation in gonochoristic. 日本サンゴ礁学会第 12 回大会, 本部町, 平成 21 年 11 月 26-29 日.
39. Narayan, P.P., Sabina, R., Nakamura, M. Heat-induced gonadal sterility in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). 日本サンゴ礁学会第 12 回大会, 本部町, 平成 21 年 11 月 26-29 日.
40. 村田良介, 岸本和雄, 清水昭男, 小林靖尚, 中村將. ヤイトハタの性分化に伴う生殖腺刺激ホルモンの発現解析. 平成 22 年度日本水産学会春季大会, 藤沢. 平成 22 年 3 月 26-30 日.
41. 壁谷尚樹, 奥津智之, 矢澤良輔, 長澤一衛, 樋口健太郎, 竹内裕, 吉崎悟朗. サバ科魚類 *vasa* cDNA クローニングおよびその配列多型を用いたクロマグロ生殖細胞検出系の構築. 平成 22 年度日本水産学会春季大会, 藤沢, 平成 22 年 3 月 26-30 日.
42. 岩崎佳子, 吉崎悟朗. ニジマス雌生殖腺へと移植された精原細胞の形態変化. 日本繁殖生物学会第 103 回大会, 十和田, 平成 22 年 9 月 4 日.

(3) 特許出願（SORST 研究の成果に関わる特許（出願人が JST 以外のものを含む））

|      | 件数  |
|------|-----|
| 国内出願 | 1 件 |
| 海外出願 | 0 件 |
| 計    | 1 件 |

(4) その他特記事項

○ 受賞：

吉崎 悟朗

第 16 回ゴールドメダル賞（東京テクノフォーラム 21）

生殖細胞の異種間移植による代理親魚養殖技術の実用化

○ 新聞報道：

Matsuda, M., Shinomiya, S., Kinoshita, M., Suzuki, A., Kobayashi, T., Paul-Prasanth, B., Lau, E.L., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M. and Nagahama, Y. (2007). DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 3865-3870.

著作権保護のため、非表示にしています。（科学技術振興機構）

## 9. 結び

1950-60年代に、性分化期のメダカを性ホルモン処理することにより性転換を起こすことに成功した報告がなされて以来、魚類は一般的に性的可塑性が高いと考えられてきた。そして、成熟した雌雄異体魚に性ホルモンを処理して性転換を試みた研究は数多くなされた。しかし、そのような試みはことごとく失敗したことから、魚類もマウスなどの哺乳類と同じように生殖腺の性的可塑性は発生初期の臨界期に限定され、それ以後は消失するものと考えられていた。ところが本研究で、2種の雌雄異体魚（メダカとティラピア）の成熟雌魚をAI処理により生殖腺内のエストロゲン産生を抑制するというアプローチを導入することにより成熟卵巣中に精巣組織を分化させ、成熟精巣へと性転換させることに脊椎動物で始めて成功した。この研究の過程で、成熟卵巣の周辺部に存在するシスト（生殖幹細胞とそれを取り囲む生殖腺体細胞）の体細胞が生殖腺内でのエストロゲン産生を抑制することによりセルトリ細胞へと分化し、このことが引き金となって生殖幹細胞が精原細胞へと分化し、精子形成を開始して、成熟精巣となることを突き止めることができた。また、同じようなことが社会環境の変化により雌から雄に性転換するミツボシキウセンでも見られることもわかった。この発見の基礎となったのは、胚・稚魚期のXYメダカ生殖腺に*Gsdf*が性・時期特異的に発現することを見出すことができたからである。

その一方で、思い通りに進まなかった研究もある。双方向性転換魚であるオキナワベニハゼでは、視覚刺激の後数時間で生殖腺における遺伝子発現のパターンの急激な変動が起きること、さらには、視覚から生殖腺に至るプロセスに脳型芳香化酵素が重要な役割を果たすことを示唆できたこと、高精度のマイクロアレイ系を構築できたこと、など今後のさらなる研究のための基盤を整えることができたが、脳の遺伝子発現を実験的解析により深く進めることができなかった。上手く進めることができなかった主な理由は、実験魚（オキナワベニハゼ）の供給に限りがあることである。受精卵からの水槽中での孵化、飼育を何度もその試みは成功しなかった。実験材料の重要性をあらためて痛感した。また、本研究の初期にメダカの脳で発見したY染色体上の*Snayly*には当初大きな期待がかかったが、残念ながら特殊な遺伝子構造を持つことが明らかになり、そのために機能解析を進めることができなかった。

本研究ではまた、性決定/分化や性の可塑性の分子メカニズムを研究するうえで不可欠な研究手法の開発という点からも大きな進展があった。RNAi法を用いた遺伝子ノックダウン法を開発し、確立することができたことは大きな収穫であった。これまで孵化直後までしか解析できなかった遺伝子破壊の影響を生涯にわたって調べることができるようになった。また、TILLING法が*Dmrt1*の機能解析に応用され、効果を発揮したことも特筆される。現在、卵巣型と脳型の芳香化酵素遺伝子、*R-spondin 1*、各種エストロゲン受容体遺伝子などの機能についてもTILLING法を用いての解析が進行している。すでに、卵巣型芳香化酵素遺伝子について卵巣分化との強い関わりを示唆する知見が得られている。さらに、遺伝子ノックアウト法についてもメダカで開発できる目処がついた。これらの研究手法の新たな開発は、メダカを用いた性的可塑性の分子メカニズムの研究をさらに発展させる上で強力なツールとなるばかりでなく、発生、医学生物学の研究分野の進展に大いに役立つものと期待される。

チーム研究討論会（平成 22 年 7 月 2 日、琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底実験所）

