

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06229

研究課題名(和文)アカエイの生殖腺形成に関する組織生理学的解析から迫る軟骨魚類の子宮内性分化

研究課題名(英文)Histological observation of gonadal sex differentiation in the cartilaginous fish, the red stingray (*Hemirhynchus akajei*).

研究代表者

小林 靖尚 (Kobayashi, Yasuhisa)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：10643786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨魚類の中ではサンプルの確保が比較的容易なアカエイは、子宮内にて胎子を育む卵胎生型の繁殖様式を持つ。子宮内の胎子は、母胎由来のエストロゲンに曝された状況で、自らの性を決定/分化させる。しかし胎子の生殖腺の性分化過程の実態に関しては、全く明らかにされていない。そこで本研究では、発達段階の異なる子宮内のアカエイ胎子を用いて生殖腺/生殖輸管の性分化過程を組織学的手法により解析した。その結果、鰭が伸長し体盤が形成される直前の発達段階にある胎子(全長2cm程度)の生殖腺において、生殖細胞の局在に性差が見られ、形態的な性分化過程を明らかにする事ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サメやエイが含まれる軟骨魚類は、非常にメジャーな存在である。しかし実験サンプルの確保が極めて困難なため、軟骨魚類に関する研究は少ない。そのため軟骨魚類の資源保護のために重要となる繁殖に関する基礎的な情報が不足している。本研究では哺乳類と同様に、母体子宮内で性分化/性決定を行うアカエイを用いて、子宮内胎子の生殖腺の性分化過程を組織学的に解析した。その結果、アカエイの生殖腺の性分化が起こる胎子の発育段階と、その形態的特徴を明らかにした。このような軟骨魚類の基礎的な知見を収集することにより、脊椎動物全般の性決定/性分化様式の多様性を理解する事に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The red stingray (*Hemirhynchus akajei*), relatively easy to collect among cartilaginous fishes, have an ovoviviparous reproductive system. In this stingray, the gonadal sex determination and differentiation of the embryo exposed to maternal estrogen have occurred in the uterus. In this study, we investigated the process of gonadal sex differentiation of red stingray embryos. Histological observations revealed that morphological sex difference of the gonads occurs in the embryo, which is about 2 cm in total length. These findings help to understand the reproduction of cartilaginous fish.

研究分野：魚類生殖生理学

キーワード：アカエイ 軟骨魚類 性分化

1. 研究開始当初の背景

(1) 軟骨魚類に関する研究背景:

軟骨魚類は、サメとエイを含む板鰓亜綱とギンザメを含む全頭亜綱で構成される脊椎動物有顎類の一つのグループである。軟骨魚類はメジャーな存在ではあるが、軟骨魚類の生殖や性分化に関する研究は極めて少なく、その詳細については殆どが謎に包まれている。これは軟骨魚類の実験サンプルを確保することが困難なためである。

(2) 子宮内で起こる胎仔の性分化:

本申請課題では、軟骨魚類の中ではサンプルの入手が容易なアカエイ (*Hemirhynchus akajei*) をモデルとして、胎仔の生殖器官の性分化を組織学的に解析した。研究開始前に、我々が明らかにしていた点を以下に述べる。

アカエイは卵胎生の繁殖様式を持ち、母体子宮内にて胎仔を育む (一匹当たりの子宮内の受精卵の数は、約 10-20 個)。子宮内の胎仔の外部形態を観察した結果、体盤形成が完了しつつある胎仔 (体長 3.5cm) の腹鰭の一部が伸長している事実が明らかになった (図 1)。これはオスの性徴であるクラスパー (交接器) の原基であると考えられた。次いで、このクラスパー原基を指標に、子宮内の胎仔の性比を調査したところ、オスとメスの性比が丁度 1:1 となっていた。そのためアカエイの胎仔は、哺乳類と同じく、母体のエストロゲンに曝露された状況で、自らの性を決定/分化させている事実を明らかとした。

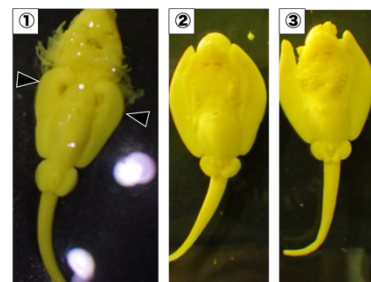


2. 研究の目的:

本研究では、母体の子宮内にて、個体の性が決定/分化するアカエイを用いて、子宮内胎仔の生殖器官の性分化過程を組織学的に明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法:

アカエイの妊娠の有無は、腹部の膨らみから識別可能で有る。しかし子宮内の胎仔の発達段階に関しては、腹部の触診を行っても判断できない。そのため異なる発達段階にあるアカエイ胎仔を、経時的にサンプリングする事は極めて困難で有る。そこで本研究では、胎仔のクラスパーが性分化する前後の胎仔を中心に解析した (図 2. ①体盤形成途上でクラスパーが未分化の胎仔、②クラスパーがメスへと性分化した胎仔、③同時期のオス胎仔)。



体盤形成	途上 (矢印)	ほぼ完了	
クラスパー	未分化	メス	オス

図2. 本研究にて解析したアカエイの子宮内胎仔。
① 体盤、クラスパー共に未分化。② 体盤形成がほぼ完了したメス胎仔。
③ 同子宮内のオス胎仔。

4. 研究成果

(1) アカエイ胎仔の生殖腺の性分化:

① 体盤形成途上のアカエイ胎仔の生殖腺構造:

体盤形成途中で、クラスパーが性的に未分化である胎仔 (図 2①) の組織観察結果を図 3 に示す。この発達段階の胎仔には、体腔上皮由来のエピゴナル器の原基が観察された (図 3-1)。この原基内には、左右共に大型の生殖細胞が少数散在していた (図 3a, b)。この発達段階の胎仔を多数観察したが、生殖腺の形態、生殖細胞の数や局在には、個体差は見られなかった。そのため、この発達段階の胎仔の生殖腺は、性的に未分化状態であると考えられた。

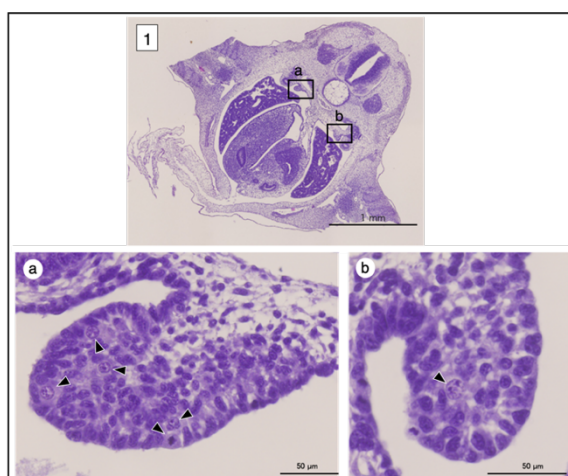


図3. クラスパーが未分化状態のアカエイ胎仔。
1: 体腔上皮由来のエピゴナル器の原基が観察される。
a, b: 原基内には大型の生殖細胞が少数存在する (矢頭)。

② アカエイのメス胎仔の生殖腺構造:

体盤形成が完了直前で、クラスパーの形状がメス (図 2 ②) である胎仔の生殖腺の組織切片を図 4-1 に示す。この発達段階の胎仔では、エピゴナル器が増大していた。また生殖細胞が、エピゴナル器の背側皮質部分に局在していたことから、生殖細胞が発生に伴って移動したと考えられた。

③ アカエイのオス胎仔の生殖腺構造:

上記のメス胎仔と同じ子宮内に存在し、クラスパの形状がオス(図 2 ③)であった胎仔の生殖腺を図 4-2 に示す。エピゴナル器の形態には差が見られなかった。しかし生殖細胞の局在がメスと大きく異なり、オス胎仔の生殖細胞はエピゴナル器内に散在し、背側皮質部分には観察されなかった。

以上の検察結果から、アカエイ胎仔の生殖腺の形態的性分化は、体盤形成が完了直前の胎仔で起こり、それは生殖細胞の局在の違いであることが明らかとなった。

(2) アカエイ胎仔の生殖輸管の分化と発達

併せて本研究では、生殖輸管の原基となる「ミューラー管: 輸卵管/子宮となる」と「ウォルフ管: 輸精管/貯精嚢となる」の分化・発達過程を観察したので以下に詳細を述べる。

アカエイのミューラー管原基は、鰓形成が完了した未熟な胎仔(全長 1 cm 程度)の腎臓原基の腹側に観察された(図 5-1)。この発達段階の胎仔においてウォルフ管は観察されなかった。ウォルフ管原基は、生殖腺の性分化が起きている胎仔(全長 2 cm 未満)の胎仔において観察された(図 5-2)。そのため他の脊椎動物とは異なり、アカエイではミューラー管の分化が先に起こる事が明らかになった。

その後、成長したメス胎仔(体盤長が 8cm 程度)において、ミューラー管が膨大し、子宮へと分化することが確認された。その際、ウォルフ管の退縮は観察されなかった。同様にオス胎仔においては、左右のウォルフ管の膨大が観察されたが、ミューラー管の退縮は見られなかった。これらの生殖輸管の発達には、生殖腺由来の内因性のステロイドホルモンが重要な働きを持つと考えられる。そこで、免疫組織学的手法を用いて、胎仔の生殖腺におけるステロイド産生細胞を探索したが、その存在は確認出来なかった。

以上、本研究ではアカエイの生殖腺と生殖輸管の形態的な性分化過程を明らかにした。加えて卵生種であるトラザメ(*Scyliorhinus torazame*)の生殖腺の性分化過程も観察した。その結果、トラザメの生殖腺の性分化は、アカエイと同様であることが確認された。そのため軟骨魚類全般で、生殖細胞の局在が異なることが最初に観察される性分化の形態的な特徴であると考えられる。今後は、形態的な性分化に先んじて起こると考えられる分子的な性分化を明らかにしていく必要がある。

(3) アカエイの卵巣構造について

さらに本研究では、アカエイの卵巣構造も解析した。その結果、アカエイの卵巣内には内部構造が大きく異なる二種類の卵胞が含まれている事が明らかになった(図 6)。そこで、他の軟骨魚の卵巣内にも同様に、二種類の卵胞が存在するかを確認するため、トラザメ、シビレエイ、コモンサカタザメ、ギンザメ、トビエイ、カスザメおよびツノザメの卵巣構造について解析を進めた。その結果、アカエイ以外の軟骨魚類の卵巣内には、二種類の卵胞の存在は確認出来なかった。そのためアカエイの卵胞形成は他魚種と大きく異なることが予想された。

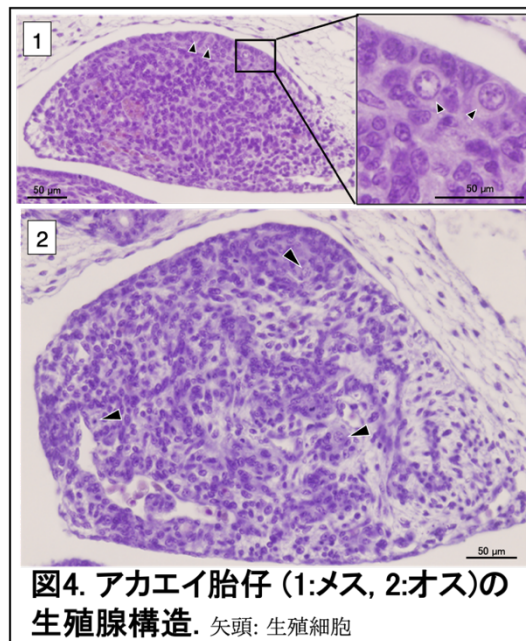


図4. アカエイ胎仔(1:メス, 2:オス)の生殖腺構造. 矢頭: 生殖細胞

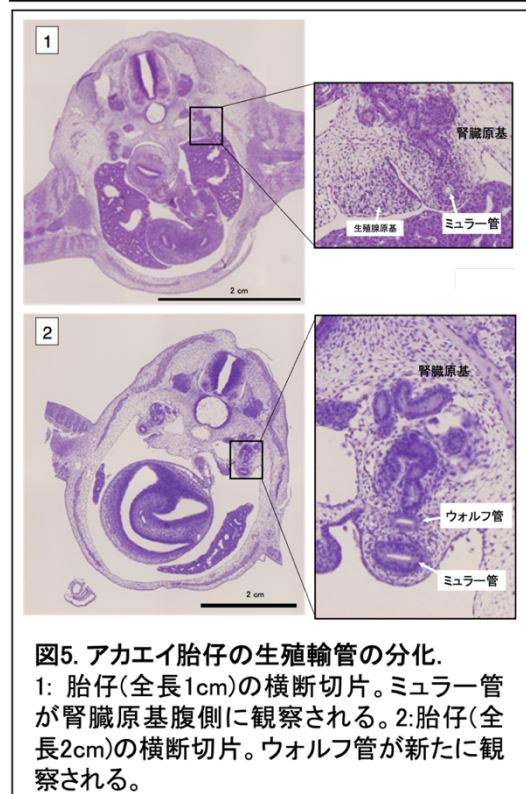


図5. アカエイ胎仔の生殖輸管の分化. 1: 胎仔(全長1cm)の横断切片。ミューラー管が腎臓原基腹側に観察される。2: 胎仔(全長2cm)の横断切片。ウォルフ管が新たに観察される。

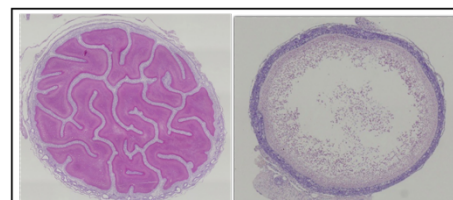


図6. アカエイ卵巣内に存在する二種類の卵胞.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Tomita Taketeru, Nakamura Masaru, Kobayashi Yasuhisa, Yoshinaka Atsushi, Murakumo Kiyomi	4. 巻 10
2. 論文標題 Viviparous stingrays avoid contamination of the embryonic environment through faecal accumulation mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-64271-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Iwamatsu Takashi, Oda Shoji, Kobayashi Hirokuni, Parenti Lynne R., Kobayashi Yasuhisa	4. 巻 238
2. 論文標題 Shift of the Vegetal Pole Area of Full-Grown Oocytes Toward the Ovulatory Site of the Ovary in the Medaka Fish, <i>Oryzias latipes</i> (Belontiiformes: Adrianichthyidae)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Biological Bulletin	6. 最初と最後の頁 80～88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1086/708304	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 MURATA RYOSUKE, KOBAYASHI YASUHISA, NOZU RYO, NAKAMURA MASARU	4. 巻 86
2. 論文標題 Morphological and physiological studies regarding gonadal differentiation and sex change in Serranidae	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NIPPON SUISAN GAKKAISHI	6. 最初と最後の頁 274～287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2331/suisan.20-00003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Murata Ryosuke, Nozu Ryo, Mushirobira Yuji, Amagai Takafumi, Fushimi Jun, Kobayashi Yasuhisa, Soyano Kiyoshi, Nagahama Yoshitaka, Nakamura Masaru	4. 巻 11
2. 論文標題 Testicular inducing steroidogenic cells trigger sex change in groupers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-90691-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hirooka Asuka, Hamada Mayuko, Fujiyama Daiki, Takanami Keiko, Kobayashi Yasuhisa, Oti Takumi, Katayama Yukitoshi, Sakamoto Tatsuya, Sakamoto Hirotake	4. 巻 11
2. 論文標題 The gastrin-releasing peptide/bombesin system revisited by a reverse-evolutionary study considering <i>Xenopus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13315-13315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92528-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Yasuhisa, Morishita Takamasa, Chuda Hisashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Effect of synthetic androgen treatment on the gonad of juvenile longtooth grouper (<i>Epinephelus bruneus</i>)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Aquatic Research	6. 最初と最後の頁 163-171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Aoshi, Hamada Mayuko, Yoshida Masa-aki, Kobayashi Yasuhisa, Tsutsui Naoaki, Sekiguchi Toshio, Matsukawa Yuta, Maejima Sho, Gingell Joseph J., Sekiguchi Shoko, Hamamoto Ayumu, Hay Debbie L., Morris John F., Sakamoto Tatsuya, Sakamoto Hirotake	4. 巻 8
2. 論文標題 Vasopressin-oxytocin?type signaling is ancient and has a conserved water homeostasis role in euryhaline marine planarians	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abk0331	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kobayashi Yasuhisa	4. 巻 -
2. 論文標題 Control of gonadal maturation and sex in grouper	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aquaculture and Fisheries	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aaf.2022.03.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小林靖尚、野津了、中村將	4. 発行年 2021年
2. 出版社 恒星社厚生閣	5. 総ページ数 258
3. 書名 第7章 軟骨魚類の繁殖と性分化 [e-水産学シリーズ2: 魚類の性決定・性分化・性転換-これまでとこれから]	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------