

# 環境水温と魚類の性分化との関係

山下 倫明\*・川口奈々美\*

## Relationship between Environmental Temperature and Sex Differentiation in Fish

Michiaki YAMASHITA\* and Nanami KAWAGUCHI\*

**Abstract** Heat stress and other environmental factors influence the determination of phenotypic sex in fish in addition to genetic sex determination. In this review, we focused on sex differentiation and sex reversal under high temperature and other stress conditions in fish. Heat-induced germ cell deficiency was found in males and females of the South American atherinid fish *Odontesthes bonariensis* and *Patagonia hatcheri*. Zebrafish are also sensitive to environmental factors that may influence sex determination, and oocyte apoptosis has been characterized in spermatogenesis during sex differentiation. Since heat shock and other environmental stresses induce apoptosis in various cell types, such stress conditions may induce oocyte apoptosis in the gonads during sex differentiation, followed by spermatogenesis and testicular formation, leading to sex-reversed phenotypic males. Therefore, temperature elevation by global climate change in the ocean may affect sex differentiation and sex reversal in various fish species during early life stages.

**Key words:** sex differentiation, temperature, environmental stress, apoptosis, zebrafish, spermatogenesis

### 1. 魚類の性分化

魚類における生殖腺の性分化は性染色体に規定される遺伝的プログラムによるだけでなく、性ホルモンの投与などの内分泌的な刺激や、水温などの環境条件に大きく影響されることが知られているが、このような性分化に関する特徴は、魚種ごとに大きく異なっており、魚類の性分化機構に関する研究は魚類生理学の大きな課題である (Chan and Yeung, 1983; Shapiro, 1990; Devlin and Nagahama, 2002)。メダカ、ゼブラフィッシュ、ニジマス、ティラピアなど多くの魚種で、エストロゲン (17 $\beta$ -エストラジオール) の投与によりメス化が生じる (Janz and Van Der Kraak, 1997; Nakamura and Takahashi, 1973; Yamamoto,

1953)、一方、高水温条件での飼育によりオス化する現象が知られている (Chardard *et al.*, 1995; Kitano *et al.*, 1999; Korpelainen, 1990; Struussmann *et al.*, 1998)。地球温暖化に伴って海水温の上昇が予測されているが、生育可能な上限域に生息する魚種では高水温によって性分化に影響する可能性が考えられる。わが国沿岸に分布する、マアジ、サンマなどの海産魚類でも性分化が環境水温の影響を強く受け、性分化期に高水温条件に置かれることにより、生殖腺の退行変性 (不妊化) あるいは著しいオス化 (単性化) が生じることも考えられる。その結果、高水温は魚類の資源量の変動や種の絶滅をもたらす可能性がある。このように、魚類資源への地球温暖化の影響を予測する上で、高水温による魚類の性転換と生殖細胞の退行変性の現象お

2006年1月6日受理 (Accepted on January 6, 2006)

\* 中央水産研究所 236-8648 横浜市金沢区福浦2-12-4 (National Research Institute of Fisheries Science, Fukuura, Kanazawa, Yokohama 236-8648, Japan).

よびそのメカニズムの解明は極めて重要な研究課題である。そこで、まず重要魚類資源を対象として、各魚種の性分化の分子メカニズムを解明するとともに、水温など環境条件が性分化に強く影響する発育段階を確認する必要がある。

## 2. 生殖細胞の生化学的マーカー

魚類の生殖腺は、将来、配偶子となる生殖細胞と、生殖細胞の分化および維持に関わる体細胞の二種類の細胞から構成される。生殖腺における生殖細胞の同定は、生殖腺の横断面の組織切片を顕微鏡観察することによって、細胞の形態から判断することが可能である。また、性分化期以降の生殖腺における生化学的マーカーとしてではチトクロムP450アロマターゼ (Chiang *et al.*, 2001; Kishida and Callard, 2001a,b; Trant *et al.*, 2001; Young *et al.*, 1983) や、エストロゲンレセプター (Pakdel *et al.*, 1989) などが発現していることから、これらを生化学的マーカーとして免疫組織化学染色法によって生殖腺の分化と発達の様子を観察することができる。胚期の未分化の生殖細胞の同定は、細胞の形態観察だけでは体細胞との判別が困難であるが、最近、生殖細胞に特異的に発現する *vasa* 遺伝子が、ゼブラフィッシュ、ニジマス、ティラピア等の魚類から単離され、RNAプローブによる *in situ* ハイブリダイゼーション法によって特異的に検出することが可能となってきた (Yoon *et al.*, 1997; Yoshizaki *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2000)。

マアジ、サンマ等の海産魚類についても、生殖腺特異的な遺伝子を単離同定することにより、これらに対する遺伝子プローブまたは遺伝子産物に対する抗体を用いて、未分化の生殖細胞および性分化後の生殖腺の各細胞を組織化学的に分離同定することが可能である。そのため、アロマターゼ、*vasa*などの遺伝子ホモログを単離するとともに、生殖細胞特異的な新たな遺伝子を同定するため、生殖腺からcDNA遺伝子ライブラリーを作製し、EST解析、ディファレンシャルスクリーニングなどの遺伝子解析手法により生殖腺における発現遺伝子のカタログ化が必要である。マイクロアレイ手法の活用によって、性分化の各ステージおよび発達の異常を計測する技術開発も可能となる。

## 3. 性決定メカニズム

哺乳類ではXY染色体による遺伝的な性決定の機構が明らかにされており、オスの個体では発生の過程でSry精巢決定遺伝子の作用によって精巢の分化が誘導

されることが知られている (Sinclair *et al.*, 1990; 中山, 1997)。一方、魚類にはSry遺伝子は存在しない。最近、メダカのY染色体が同定され、オス化を誘導する遺伝子として、DMY遺伝子が同定された (Matsuda *et al.*, 2002)。このDMY遺伝子はメダカの近縁種にしか分布しておらず、XY染色体による遺伝的性決定様式をもつ他の魚種での遺伝的性決定機構は依然不明のままである (Volf *et al.*, 2003)。しかしながら、生殖腺の分化および発達のパターンは、脊椎動物の種間で保存される点も多いことから、XY染色体による遺伝様式を示す魚種では、精巢の分化に関わる哺乳類SRY遺伝子・メダカDMY遺伝子と類縁の遺伝子あるいは同様の細胞内機構を有する関連遺伝子が、性決定遺伝子として機能するものと推測される。

メダカ、サケ科魚類などXY染色体による遺伝的性決定に対して、ペヘレイなど環境水温に依存して性分化が誘導される例は、温度依存型性決定として知られるが、その分子および細胞レベルでのメカニズムも不明である (中山, 1997)。ペヘレイでは飼育水温が17で全個体がメス化するが、水温に依存してオスの比率が高まり、24では50~70%がオス化し、29では全個体がオス化する現象が知られている (Strüssmann *et al.*, 1998)。また、ヒラメでは通常は遺伝的な性決定に従うが、温度の影響も受け (温度感受性型性決定)、ヒラメにおいても20以下ではメスが多いが、高水温ではオス化する現象が報告されている (Kitano *et al.*, 1999; 山本, 1999)。

ゼブラフィッシュの性分化過程を観察した例では、はじめ、すべての個体の生殖腺中の生殖原細胞の多くは卵母細胞へ分化する。孵化後3週間後に生殖腺の性分化が始まり、オスでは卵母細胞がアポトーシスによって消失したのち、精巢が形成され、メスでは卵母細胞が充実して卵巣に発達する (Takahashi, 1977; Uchida *et al.*, 2002)。この性分化時期に高水温で処理すると、オス化が誘導されることから、性分化期の高温ストレスは分化期にある生殖細胞または体細胞のアポトーシスを過剰に誘導するため、卵母細胞が消失して卵巣の形成が阻害され、エストロゲンの合成を抑制することが刺激となり、精巢形成が誘発される機構が推定される (Fig. 1)。

性決定の様式に関わらず、多くの魚種で17-エストラジオールの投与によりメス化する。一方、メチルテストステロンの投与によって未分化生殖腺が精巢に分化する。また、高温処理によってもオス化が誘導されることが知られており、生殖腺におけるアロマターゼによるエストロゲンの生合成の経路および高温ストレスによって誘導されるアポトーシスの経路が、魚類の

生殖腺の性分化に大きな役割を果たしている (Janz and Van Der Kraak, 1997; Nakamura and Takahashi, 1973; Yamamoto, 1953; Kitano *et al.*, 1999; D'Cotta *et al.*, 2001)。

このことから, マアジ, サンマ等海産魚類の性分化における高水温の影響を明らかにするためには, 水温の異なる条件で飼育管理された実験魚を用いて, 生殖腺の性分化を組織化学的に観察するとともに, 生殖腺におけるアロマトラーゼの発現パターン, エストロゲンレベルおよびアポトーシスの発現の魚種毎の相違を調べる必要がある。

#### 4. ストレスによる生殖腺異常

高温ストレスによるアポトーシスの発現は, 胚または生殖腺組織切片のTUNEL染色法 (細胞核における分解したDNA断片の特異的染色法) で観察することができる (Yabu *et al.*, 2001) 。また, 生化学的手法として, 生殖腺抽出物におけるアポトーシス誘導性酵素カスパーゼの活性を測定することができる (Yabu *et al.*, 2001) 。ストレス誘導性HSP70遺伝子の発現パターンをRT-PCR, ノーザンプロット等によって測定する実験手法も利用可能である。このようにして観察できるアポトーシスおよびストレス応答は, ストレス刺激の度合いに依存して, 強く生じることから, カスパーゼ活性, HSP70mRNAなどを定量的に計測することによって, 高水温条件によるストレスの度合いと生殖腺の異常発現を対比して観察する研究手法が期待できる。

#### 文 献

- Chan S. T. H. and Yeung W. S. B., 1983. : Sex control and sex reversal in fish under natural conditions. In *Fish Physiology*, vol. 9 Part B, (ed. W. S. Hoar, D. J. Randall, and E. M. Donaldson), pp. 171-222. New York, Academic Press.
- Chardard D., Desvages G., Pieau C., and Dournon C., 1995. : Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltl* (Urodele Amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. *Gen. Comp. Endocrinol.* **99**, 100-107.
- Chiang E. F., Yan Y. L., Guiguen Y., Postlethwait J., and Chung B. C., 2001: Two Cyp19 (P450 aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary and brain. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 542-550.
- D'Cotta H., Fostier A., Guiguen Y., Govoroun M., and Baroiller J.-F., 2001: Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol. Reprod. Dev.*, **29**, 265-276.
- Devlin R. H. and Nagahama Y., 2002: Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, **208**, 191-364.
- Janz D. M. and Van Der Kraak G., 1997: Suppression of apoptosis by gonadotropin, 17 $\beta$ -estradiol, and epidermal growth factor in rainbow trout

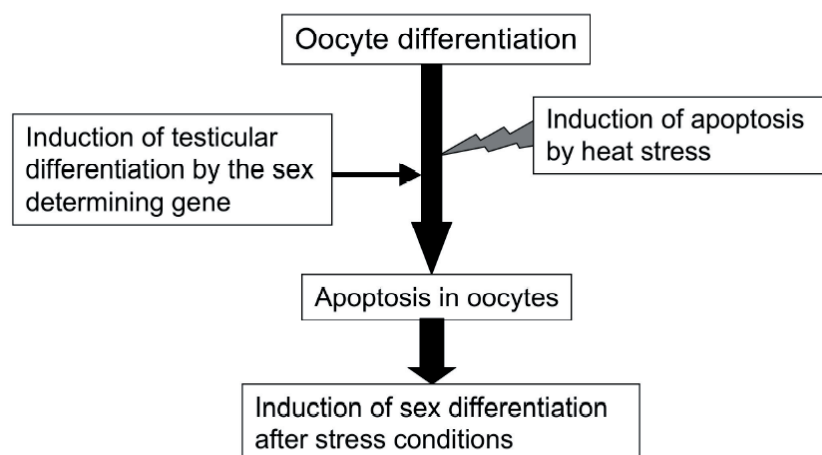


Fig. 1. Sex differentiation model under heat stress conditions in temperature-dependent sex determination mechanism in zebrafish.

- preovulatory ovarian follicles. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **105**, 186-193.
- Kishida M. and Callard G. V., 2001a: Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology*, **142**, 740-750.
- Kishida M., McLellan M., Miranda J. A., and Callard G. V., 2001b: Estrogen and xenoestrogens upregulate the brain aromatase isoform (P450arom B) and perturb markers of early development zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **129B**, 261-268.
- Kitano T., Takamune K., Kobayashi T., Nagahama Y., and Abe S. I., 1999: Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Mol. Endocrinol.*, **23**, 167-176.
- Kobayashi T., Kajiura-Kobayashi H., and Nagahama Y., 2000: Differential expression of *vasa* homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mech. Dev.*, **99**: 139-142.
- Korpelainen H., 1990: Sex ratios and conditions required for environmental sex determination in animals. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **65**, 147-184.
- Matsuda M., Nagahama Y., Shinomiya A., Sato T., Matsuda C., Kobayashi T., Morrey C. E., Shibata N., Asakawa S., Shimizu N., Hori H., Hamaguchi S., and Sakaizumi, M., 2002: DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, **417**, 559-563.
- Nakamura M. and Takahashi H., 1973: Gonadal sex differentiation in tilapia, with special regard to the time of estrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males. *Bull. Fac. Fish Hokkaido Univ.*, **24**, 1-13.
- 中山一郎, 1997: 性決定に関連するDNA/遺伝子。「魚類のDNA (青木宙, 隆島史夫, 平野哲也編) 恒星社恒星閣, p.391-413.
- Pakdel F., Le Guellec C., Vaillant C., Le Roux M. G., and Valotaire Y., 1989: Identification and estrogen induction of two estrogen receptors (ER) messenger ribonucleic acids in the rainbow trout liver: sequence homology with other ERs. *Mol. Endocrinol.*, **3**, 44-51.
- Shapiro D. Y., 1990: Sex-changing fish as a manipulable system for the study of the determination, differentiation, and stability of sex in vertebrates. *J. Exp. Zool.*, **Suppl. 4**, 132-136.
- Sinclair A., H., Berta P., Palmer M., S., Hawkins J., R., Griffiths B., L., Smith M., J., Foster J., W., Frischauf A., M., Lovell-Badge R., and Goodfellow P., N., 1990: A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology. *Nature*, **346**, 240-244.
- Strüssmann C. A., Saito T., and Takashima F., 1998: Heat-induced germ cell deficiency in the teleosts *Odontesthes bonariensis* and *Patagonia hatcheri*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **119A**, 637-644.
- Takahashi H., 1977: Juvenile hermaphroditism in the zebrafish *Brachydanio rerio*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **28**, 57-65.
- Trant J. M., Gavasso S., Ackers J., Chung B. C., and Place A. R., 2001: Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *J. Exp. Zool.*, **15**, 475-483.
- Uchida D., Yamashita M., Kitano T., and Iguchi T., 2002: Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *J. Exp. Biol.*, **205**, 711-718.
- Volff J., N., Kondo M., and Schartl M., 2003. Medaka dmY/dmrt1Y is not the universal primary sex-determining gene in fish. *Trends. Genet.*, **19**, 196-199.
- Yabu T., Todoriki S., and Yamashita M., 2001: Stress-induced apoptosis by heat shock, UV and  $\gamma$ -ray irradiation in zebrafish embryos detected by increased caspase activity and whole mount TUNEL staining. *Fish. Sci.*, **67**, 333-340.
- Yamamoto T., 1953: Artificial induced sex-reversal in genotypic males medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.*, **123**, 571-594.
- 山本栄一. 1999: ヒラメの全雌およびクローン魚作出技

- 術開発に関する研究. 日水誌, **64**, 638-641.
- Yoshizaki G., Sakatani S., Tominaga H., and Takeuchi T., 2000. : Cloning and characterization of a *vasa*-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Mol. Rep. Devl.*, **55**, 364-371.
- Yoon C., Kawakami K., and Hopkins N., 1997. : Zebrafish *vasa* homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development*, **124**, 3157-3165.
- Young G., Kagawa H., and Nagahama Y., 1983: Evidence for a decrease in aromatase activity in the ovarian granulosa cells of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) associated with final oocyte maturation. *Biol. Reprod.*, **29**, 310-315.