

サンゴ礁魚類の性分化 ,性転換機構の形態学的 ,生理学的研究

中村 將^{*1,2}・小林靖尚^{*1,2}・三浦さおり^{*1}

Morphological and Physiological Studies on Sex Differentiation and Sex Change in Coral Reef Fish

Masaru NAKAMURA^{*1,2,3}, Yasuhisa KOBAYASHI^{*1,2} and Saori MIURA^{*1,2}

Abstract In addition to gonochorism, several types of hermaphroditism are seen in fish. Individuals of some fishes bear gonads containing both mature ovary and mature testis. Some fishes change sex from male to female (protandrous sex change), others change from female to male (protogynous sex change), and a few can change sex either way and multiple times (bothway sex change). In many cases, sex change is cued by social factors, such as the disappearance of a male or female from a group. These phenomena reveal that the mechanisms of sex determination and sex differentiation in fishes, in being diverse and more plastic, differ from those of other higher vertebrates. First, our research focuses on analyzing the mechanism of sex differentiation in gonochoristic fish, using genetically controlled all-female and all-male tilapia *Oreochromis niloticus*. Second, we examined the sex change from an endocrinologic viewpoint, using morphological, physiological, and molecular techniques. In order to further characterize protandrous, protogynous, and bothway sex changes, we carry out experimental studies with the sea anemone fish *Amphiprion clarkii*, the three spotted wrasse *Halichoeres trimaculatus* and the honeycomb grouper *Epinephelus merra*, and the gobiid fish *Trimma okinawae*, respectively.

Key words: sex differentiation, sex change, hermaphrodite, estrogen, androgen, aromatase

はじめに

魚類では、雌雄異体現象の他に雌雄同体現象が多く知られている (Table 1)。雌雄同体現象には一個体の生殖腺内に成熟した卵巣と精巣を同時に持つ種 (同時的雌雄同体), 雌から雄 (雌性先熟), または雄から雌に性転換する種 (雄性先熟), 雄, 雌どちらに何度でも性転換する種 (両方向性転換) などが知られている (Atz, 1964; Yamamoto, 1969; 余呉, 1986; Devlin

and Nagahama, 2002)。この事実は、魚類の雌雄性は他の両生類以上の高等な脊椎動物とは異なり多様であり、著しい可塑性があることを示している。性転換する魚の殆どは熱帯、亜熱帯を中心としたサンゴ礁域に生息することが知られている。本来有性生殖は遺伝子の新しい組み合わせの頻度を高め生物多様性を育む根元となっているが、一生の間に雄と雌を経験する性転換魚ではより新しい遺伝子の組み合わせを可能にし、熱帯性魚類の多様性を加速させる要因となっているも

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

^{*1} 琉球大学熱帯生物圏研究センター, 瀬底実験所 〒905-0227 沖縄県国頭郡本部町瀬底3422番地 (Sesoko Station, Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus. 3422 Sesoko, Motobu, Okinawa 905-0227, Japan)

^{*2} CREST, JST, 科学技術振興機構 (Core Research for Evolutional Science and Technology)

^{*3} SORST, JST, 科学技術振興機構 (Solution Oriented Research for Science and Technology)

のと考える。これらを研究材料として、他の脊椎動物では実現困難な研究手法により、脊椎動物の性の可塑性や進化の解明に迫れるものとする。現在、雌から雄へ性転換する種としてペラ科のミツボシキウセン *Halicoeres trimaculatus*, ハワイのペラ *Thalassoma duperrey*, 雄から雌へ性転換する種としてズメダイ科のクマノミ *Amphiprion clarkii*, 両方向の性転換する種としてハゼ科のオキナワベニハゼ *Trimma okinawae* を用いて、性転換機構の形態学的、生理学的、分子生物学的解明に取り組んでいる。また、水産増殖上重要なハタの性転換技術の開発についてもハタ科のカンモンハタ *Epinephelus merra* を用いて取り組んでいる。

正常性分化と内因性性ホルモン

性転換の複雑な機構を解明するには、雌雄異体魚の性分化機構、即ち、発生に伴い未分化生殖腺が卵巢又は精巢に分化する機構を明らかにする必要があると考える。はじめに、雌雄異体魚の性分化機構について今までの研究成果を概説する。魚類の性分化過程の形態的観察についてはすでに総説 (Nakamura *et al.*, 1998; 中村, 2000; Strüssmann and Nakamura, 2002) としてまとめているのでそちらを参照して貰いたい。性分化期に性ホルモン処理すると遺伝的な性と反対の性に誘導することが可能である。このことから、内因性の性ホルモン (様物質) が性分化に関与していると考えられてきた (Yamamoto, 1969)。そこで、雌雄異体魚のティラピアとアマゴの性分化過程でのステロイドホルモンを合成する細胞であるステロイド産生細胞の分化を微細構造学的に調べた (Nakamura and Nagahama, 1985; Nakamura and Nagahama, 1989a; Nakamura and Nagahama, 1993)。その結果、

Table 1

魚類の雌雄性 (余呉, 1986 改変)。

- ・雌雄異体現象
- ・雌雄同体現象
 - A. 機能的雌雄同体
 - a. 同時的雌雄同体
 - b. 隣接的雌雄同体
 - 1. 雄性先熟
 - 2. 雌性先熟
 - 3. 両方向性転換
 - B. 痕跡的 (非機能的) 雌雄同体
 - a. 副雌雄同体現象
 - b. 幼時雌雄同体現象

性分化期にはすでにステロイド産生細胞が分化し、性分化に伴って急激に発達することが明らかとなった。性分化期の生殖腺は著しく小さいため合成されるホルモンを正確に測定することは困難である。そこで、遺伝的に産み分けられた全雌、全雄のティラピアを用いてステロイド合成酵素の発現を免疫組織化学的手法により明らかにすることを試みた (Nakamura *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2003)。本研究では、ステロイド合成酵素の中でコレステロール側鎖切断酵素 (P450scc), 17 β -水酸化酵素 (P450c17), 3 β -水酸化基脱水素酵素 (3 β -HSD), 女性ホルモン合成に必須のアロマターゼ (P450arom) に対する特異抗体を用いた。その結果、遺伝的雌では、性分化前の生殖腺にすべての酵素の発現が見られ、卵巢分化、発達に伴い陽性反応が強くなり、陽性細胞数が増加することが明らかとなった。これら酵素群の免疫組織化学的証明は、性的分化期以前の生殖腺ですでに女性ホルモンの合成が始まっていることを強く示している。この事実より遺伝的雌では女性ホルモンが卵巢分化誘導物質として働いているものと考えられる。一方、遺伝的雄の未分化生殖腺、精巢分化時及び分化直後の生殖腺にはこれら酵素の抗体の免疫陽性反応は見られなかった。このことから、男性ホルモンを含む性ホルモンが直接精巢分化に関与している可能性は少ないものと考えられる (Fig. 1)。

以上の様に内因性の女性ホルモンが卵巢分化に重要な働きをしているものと考えられた。卵巢分化時の女性ホルモンの機能を詳細に解明するために抗女性ホルモン物質を作用させ卵巢分化に及ぼす影響を実験的に調べた。はじめに、全雌を用いて性分化期にアロマター

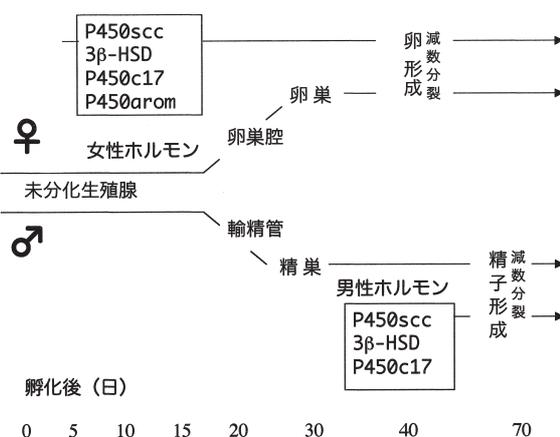


Fig. 1. ティラピアの性分化に伴うステロイド代謝酵素の発現。遺伝的雌の未分化生殖腺にアロマターゼ酵素を含む酵素群の発現が見られる。遺伝的雄では精巢分化前後でも発現は見られない。

ゼの酵素活性を阻害し女性ホルモンの合成を低下させるアロマターゼ・インヒビター (AI) 処理した (Nakamura *et al.*, 2000)。その結果、すべての個体は精巣を持つ雄へと転換した。卵巢分化時の女性ホルモンの合成が阻害されると性転換することが明らかとなった。AIと女性ホルモンのエストロール (E2) を同時投与すると性転換が抑制された。このことは、AIは内因性の女性ホルモンの合成を抑制するが、外因性の女性ホルモンにより再び卵巢に分化するものと考えられた。また、女性ホルモンの働きを拮抗阻害するタモキシフェンで処理すると卵巢腔の形成の遅れや卵巢中に成熟した精巣組織の分化が見られ、雄化することが確かめられた (Nakamura *et al.*, 2003)。以上の実験から、性分化期前後に合成される女性ホルモンの働きを阻害すると卵巢分化が抑制され精巣へ分化することが明らかになった。このことからティラピアの卵巢分化には女性ホルモンが決定的役割を果たしていると考えられた。ステロイド合成酵素の免疫組織化学的観察より精巣分化に男性ホルモンが関与していないと考えられたが、一般に遺伝的雌 (XX) に男性ホルモン処理すると雄へと性転換する。その理由は不明であった。全雌に男性ホルモンのメチルテストステロン (MT) を投与し性転換を誘導した。その性転換過程のアロマターゼを含むステロイド代謝酵素の発現を調べた (Bhandari *et al.*, 2006)。その結果、MT処理魚の生殖腺にはいずれのステロイド代謝酵素の発現が見られなかった。このことは、MTは、ステロイド代謝酵

素の発現抑制、女性ホルモンの合成の抑制を介して、精巣へと分化させるものと考えられた。

性分化後の生殖細胞、体細胞の両性能

雌雄異体魚は、性分化時に性ホルモン処理すると遺伝的性とは反対の性に容易に性転換を誘導することができる。しかし、性分化後に性ホルモン処理しても性転換することはない。このことから、生殖腺中の生殖細胞、体細胞は性分化後に両性能を失うものと考えられていた。しかしながら、最近、ティラピアの成熟直前の発達した卵巢を持つ雌であってもアロマターゼ・インヒビター処理し女性ホルモンを著しく低下させると精子形成を活発に行う精巣へと完全に転換することを発見した (Nakamura *et al.*, 2003)。このことは、少なくとも性分化後の卵巢にある卵原細胞の一部は、精子にも分化する両性能を持つこと、卵巢を構成する体細胞の一部の細胞もライデッヒ細胞、セルトリ細胞に分化する能力を持つことを示している。更に、卵巢中の卵原細胞、体細胞は卵巢で作られる女性ホルモンに絶えず曝されていなければ精巣へと分化してしまうことを示している。このことは次に説明する親での性転換機構と密接な関係を持つもの考える。

性転換魚の性分化、性転換と性ホルモンの役割

性転換魚の性分化過程についての観察は少ない。雄

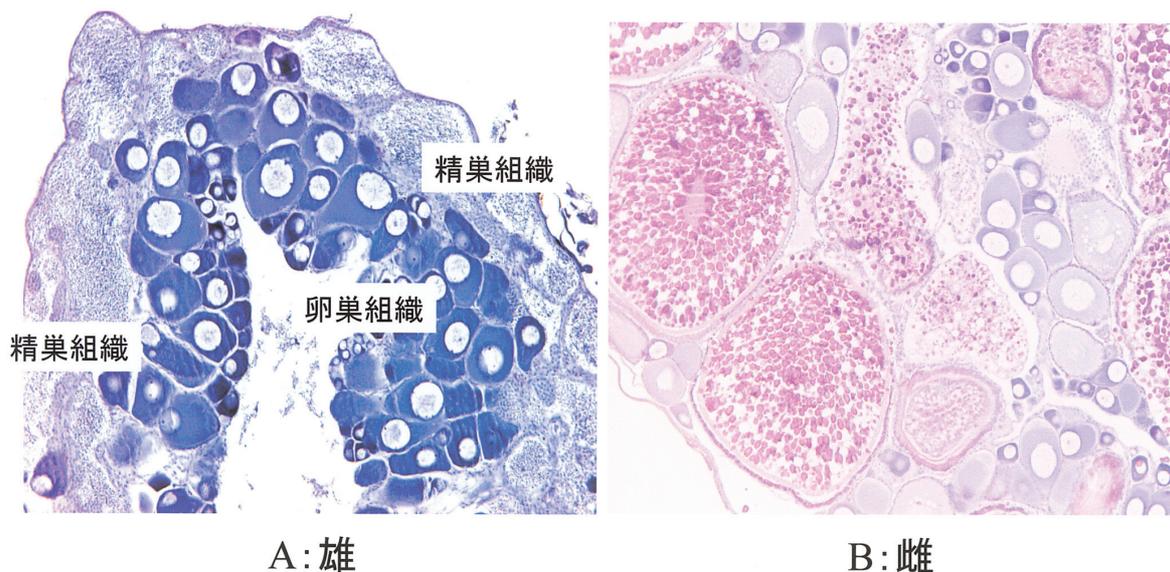


Fig. 2. クマノミの生殖腺。A: 雄の生殖腺, 成熟した精巣組織と未熟な卵巢組織を持つ両性生殖腺。B: 雌の生殖腺, 成熟した卵巢組織からなり精巣組織は見られない。

性先熟魚クマノミの雄期の生殖腺は成熟した精巢と未熟な卵巣を持つ両性生殖腺を示す (Fig. 2) (Nakamura *et al.*, 1994)。はじめに両性生殖腺の分化, 発達過程を組織学的に観察した (Miura *et al.*, 2003)。孵化後30日目までに始原生殖細胞は体腔上皮由来の体細胞に取り囲まれて生殖腺原基を形成した。孵化後61日目の個体では, 卵形成のための減数分裂期の生殖細胞の包囊の出現と, 卵巣腔形成のための体細胞の集塊が生殖腺基部と先端部に見られた。その後, 孵化後122~183日目の個体で卵母細胞の急激な増加と発達が見られた。孵化後214~273日目では, 卵巣組織を取り囲む状態で精巢組織が生殖腺の外縁部に初めて認められ, 完全な両性生殖腺が形成された。以上の結果から, クマノミでは, 未分化生殖腺は始めに卵巣へと分化し, その後しばらくして, 精巢組織が卵巣内に分化してきて両性生殖腺が形成されることが明らかとなった。精巢のみを持つ生まれつきの雄 (一次雄) は見られなかった。従って, 全ての雌は両性生殖腺を持つ雄から性転換して雌となる。雌は, 精巢組織を全く持たない卵巣をもつことから, 性転換後には精巢組織は消失する。現在, 性分化機構, 精巢組織の分化機構, 性転換機構の解明をおこなっている。

ハワイのペラの雌から雄への性転換過程の生殖腺の観察を行った (Nakamura *et al.*, 1989b)。雌の生殖腺には, 成熟した卵, 若い卵の他に生殖原細胞が見られるが, 精巢と判断される組織は全く見られない。性転換は成熟した卵, 未熟な卵が退化, 吸収により開始するがこの時期はまだ精巢組織は見られない。卵がほとんど無くなってくると, 今度は精子を作るための精原細胞が現れてくる。卵は完全になくなり活発な精子形成する完全な精巢へと転換する。卵巣から精巢へと性転換するまでには3から4週間かかる。

P450sccの抗体を用いてステロイドホルモン産生細胞の性転換過程の変化について免疫組織化学的に調べた (Morrey *et al.*, 1998)。主に免疫陽性細胞は成熟卵を取り囲む莢膜細胞層にみとめられた。性転換の開始に伴って莢膜細胞層より離れ卵巣薄板中央部分に集合する。その後, 精原細胞が出現する時期に増殖し集塊をなす様になる。精子形成の進行に伴い, 間質部分に分散する。このことから, 卵巣中の莢膜細胞は, 性転換後にライディッシュ細胞へと分化することが明らかになった。

性ホルモンの性転換に伴う変化について調べた。性転換の開始に伴い, 血中の女性ホルモン (E₂) が急激に低下した (Nakamura *et al.*, 1989b)。男性ホルモンの11-ケトテストステロン (11-KT) は性転換開始後しばらくしてから上昇した。このことから, 性転換の開始には男性ホルモンの上昇よりも女性ホルモンの

急激な低下が重要であると考えられた。そこで, ミツボシキウセンを用いてアロマトラーゼ・インヒビター (AI) を雌に投与することにより女性ホルモンを低下させ生殖腺に及ぼす影響を調べた (Higa *et al.*, 2003)。その結果, 全ての個体は, 成熟した精巢を持つ雄へと性転換した。AIとE₂を同時に投与した雌は性転換しなかった。このことから, 女性ホルモンの低下が性転換の引き金になるものと考えられる。

オキナワベニハゼは, 体長2~3cm程の小型のハゼで鹿児島・沖縄のサンゴ礁に生息している。この魚の大きな雌と小さな雌を同じ水槽に入れると, 大きな雌が性転換を起こし雄となる (Sunobe and Nakazono, 1993)。逆に, 大小の雄をペアにした状態では, 小さな雄が性転換し雌となる (Fig. 3)。このような飼育実験を繰り返す事により, オキナワベニハゼを何度でも両方向に性転換させることが可能である。この実験で, 性行動は性転換の方向に関係なく30分以内で性転換する。また, 生殖腺の性転換は雌から雄へは5日間, 雄から雌へは10日間で完了する。これらの素早い性転換は, 他の雌性先熟および雄性先熟型の性転換様式に比べ, 魚類の性転換機構を理解する上で大変都合が良い。

初めに我々は, オキナワベニハゼの生殖腺構造を詳細に観察した。その結果, オキナワベニハゼは同一個体内に精巢と卵巣を同時に持つことを明らかにした (Fig. 4)。雌として機能しているときは卵巣が成熟し,

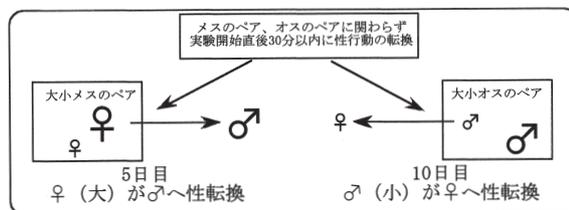


Fig. 3. オキナワベニハゼの両方向の性転換, 社会的に性が決まる。

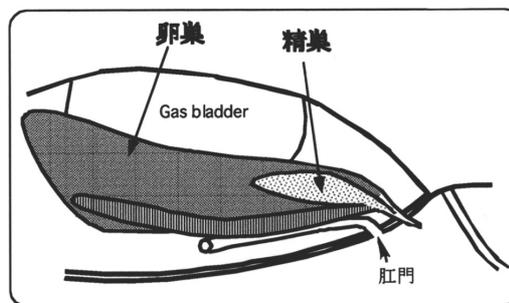


Fig. 4. オキナワベニハゼの生殖腺の形態, 卵巣と精巢を同時に持つ。

精巣は未発達であった。逆に機能的雄では精巣が発達し、卵巣が未熟であることが分かった。性転換時には、成熟していた卵巣又は精巣が退化し、未熟な精巣又は卵巣が成熟して完了することを組織学的に明らかにした (Kobayashi *et al.*, 2005a)。他の性転換魚と異なり退化した生殖腺が消失・吸収されなかったことから、この特殊な生殖腺構造がオキナワベニハゼの両方向性転換を可能にしていると考えられた。

続いて、女性ホルモン産生に必須なステロイド代謝酵素の P450arom の両方向性転換時の卵巣内における発現変化を調べた。その結果、P450arom の遺伝子発現には大きな変動が見られず、その発現は常に高かった。しかし、P450aromの蛋白発現を、特異抗体による免疫染色により調べた結果、雌機能時の卵巣で強く見られた発現が、雌から雄への性転換時や、雄機能時の卵巣では、消失していた (Kobayashi *et al.*, 2004; Sunobe *et al.*, 2005)。さらに、ステロイド代謝酵素調節因子の一つである Ad4BP/SF-1 の卵巣内での発現は、雌機能時には高く、雄機能時には低かった。また、それらの発現は、性転換の方向に従って変化し、雌から雄への性転換時には減少し、逆に雄から雌への性転換時には増加した (Kobayashi *et al.*, 2005b)。これらの結果から、P450aromの遺伝子から蛋白への翻訳調節や Ad4BP/SF-1 の遺伝子発現は、個体の優劣関係などの社会環境の変化により調節されており、このことが、卵巣の活性化や生殖腺の性転換に関与していると考えられた。

人為的性転換の誘導と水産増養殖への応用

熱帯、亜熱帯域の養殖対象魚として重要なハタ類も雌から雄へ性転換する。多くのハタでは全ての個体ははじめ雌として機能し、ある大きさになって性転換して初めて雄が出現する。2, 3メートルに成長する大型ハタでは雄が入手出来なくて養殖が困難となるケースが多い。このため、雌を雄にする技術開発が望まれている。小型のカンモンハタを用いて性転換の内分泌調節機構の解明と人為的性転換を試みてきた。雌期個体の卵巣には、ステロイド代謝酵素の P450_{scc} と雄性ホルモンの 11-KT の合成に重要な 11 β -水酸化酵素 (P450₁₁) の抗体とともに免疫陽性反応を示す細胞群が卵巣の外側を取り巻く卵巣白膜組織内に認められた。性転換に伴いこの細胞径が大きくなることを明らかにした。また、卵濾胞細胞層の莢膜細胞から由来すると考えられる細胞が性転換に伴い P450₁₁ 陽性反応を示す様になり、性転換後の精巣中のライディヒ細胞へと分化することを明らかにした (Alam *et al.*, 2005)。ハタの

自然の性転換過程の性ホルモンは、ベラ同様に性転換開始には E2 が低下し、性転換の後半で 11-KT が有意に上昇した (Bhandari *et al.*, 2003a)。雌のハタに AI 処理して性転換が誘導出来るか調べた (Bhandari *et al.*, 2003b; Bhandari *et al.*, 2004a; Bhandari *et al.*, 2004b; Bhandari *et al.*, 2005b)。その結果、ベラと同様に処理した全ての雌は成熟した雄へと性転換した。自然の性転換と同様に血中の E2 がはじめに低下し、その後、11-KT が上昇した。性転換した雄と雌との自然交配により受精卵を得ることができた。受精卵は、正常に胚発生して孵化した。

終わりに

性分化に女性ホルモンの有無が重要であること、性分化後の卵巣の維持に女性ホルモンが重要であること、性転換にも女性ホルモ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。今後は、女性ホルモンの合成を支配している機構の解明、及び女性ホルモンの下流にある機構の解明が性分化、性転換機構を解明する上で重要になってくるものと考えている。

文 献

- Alam M. A., Komuro H., Bhandari R. K., Nakamura S., Soyano K., and Nakamura M., 2005: Immunohistochemical evidence possibly identifying the site of androgen production in the ovary of the protogynous grouper *Epinephelus merra*. *Cell Tissue Res.*, **320**, 323-329.
- Atz J. W., 1964: Intersexuality, in fishes. In "Intersexuality Vertebrates Including Man" (ed. By Armstrong C. N., Marshall A. J.), Academic Press, London, pp. 147-232
- Bhandari R.K., Komuro H., Nakamura S., Higa M., and Nakamura M., 2003a: Gonadal restructuring and correlative steroid hormone profiles during natural sex change in honeycomb grouper (*Epinephelus merra*). *Zool. Sci.*, **20**, 1399-1404.
- Bhandari R.K., Higa M., Komuro H., Nakamura S., and Nakamura M., 2003b: Treatments with an aromatase inhibitor induces complete sex in protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*). *Fish Physiol. Biochem.*, **28**, 141-142.
- Bhandari R. K., Higa M., Nakamura S., and Nakamura M., 2004a: Aromatase inhibitor

- induces complete sex change in the protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*). *Mol. Repro. Devel.*, **67**, 303-307.
- Bhandari R. K., Komuro H., Higa M., and Nakamura M., 2004b: Sex inversion of sexually immature honeycomb grouper (*Epinephelus merra*) by aromatase inhibitor. *Zool. Sci.*, **21**, 305-310.
- Bhandari R. K., Nakamura M., Kobayashi T., and Nagahama Y., 2006: Suppression of steroidogenic enzyme expression during androgen-induced sex reversal. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **145**, 20-24.
- Bhandari R. K., Alam M. A., Higa M., Soyano K., and Nakamura M., 2005: Evidence that estrogen regulates the sex change of honeycomb grouper (*Epinephelus merra*), a protogynous hermaphrodite fish. *J. Exp. Zool.*, **303A**, 497-503.
- 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.
- Higa M., Ogasawara K., Sakaguchi A., Nagahama Y., and Nakamura M., 2003: Role of steroid hormones in sex change of protogynous wrasse. *Fish Physiol. Biochem.*, **28**, 149-150.
- Kobayashi Y., Kobayashi T., Sunobe T., Suzuki N., Nakamura M., and Nagahama Y., 2004: Characterization of two types of cytochrome P450 aromatase in the serial-sex changing gobiid fish. *Trimma okinawae*. *Zool. Sci.*, **21**, 417-425.
- Kobayashi Y., Sunobe T., Kobayashi T., Nagahama Y., and Nakamura M., 2005a: Gonadal structure of the serial-sex changing gobiid fish *Trimma okinawae*. *Develop. Growth Differ.*, **47**, 7-13.
- Kobayashi Y., Kobayashi T., Sunobe T., Suzuki N., Nakamura M., and Nagahama Y., 2005b: Ad 4 BP/SF-1 in the serial-sex changing fish, *Trimma okinawae*: Its cDNA cloning and expression in gonads during sex change. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **332**, 1073-1080.
- Miura S., Komatsu T., Higa M., Bhandari R. K., Nakamura S., and Nakamura M., 2003: Gonadal sex differentiation in protandrous anemone fish, *Amphiprion clarkii*. *Fish Physiol. Biochem.*, **28**, 165-166.
- Morrey C.E., Nakamura M., Kobayashi T., Grau E. G., and Nagahama Y., 1998: P450scc-like immunoreactivity throughout gonadal restructuring in the protogynous hermaphrodite *Thalassoma duerrey*. *Int. J. Dev. Biol.*, **42**, 811-816.
- 中村將, 2000: 魚類の性分化と生殖に関する内分泌学的研究. *日水誌*, **66**, 376-379.
- Nakamura M. and Nagahama Y., 1985: Steroid producing cells during ovarian differentiation of the tilapia, *Sarotherodon niloticus*. *Develop. Growth Differ.*, **27**, 701-708.
- Nakamura M. and Nagahama Y., 1989a: Differentiation of Leydig cells and, and changes of testosterone levels during testicular differentiation in tilapia, *Oncorhynchus rhodurus*. *Fish Physiol. Biochem.*, **7**, 211-219.
- Nakamura M. and Nagahama Y., 1993: Ultrastructural study on the differentiation and development of steroid-producing cells during ovarian differentiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*. *Aquaculture*, **112**, 237-251.
- Nakamura M., Hourigan T., Yamauchi K., Nagahama Y., and Grau G.E., 1989b: Histological and ultrastructural evidence for the role of gonadal steroid hormones in sex change in the protogynous wrasse *Thalassoma duperrey*. *Envir. Biol. Fish*, **24**, 117-136.
- Nakamura M., Kobayashi T., Chang X-T., and Nagahama Y., 1998: Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp. Zool.*, **281**, 362-372.
- Nakamura M., Mariko T., and Nagahama Y., 1994: Ultrastructure and in vitro steroidogenesis of the gonads in the protandrous anemonefish *Amphiprion frenatus*. *Jpn. J. Ichtyol.*, **41**, 47-56.
- Nakamura M., Kobayashi T., Yoshiura Y., and Nagahama Y., 2000: Role of endogenous steroid hormones on gonadal sex differentiation in fish. In "Proceedings of the Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish." (ed. by Norberg B., Kjesbu O. S., Taranger G. L., Andersson E. and Stefansson S. O.) Fish Symp 99, Bergen Norway, pp. 247-249.
- Nakamura M., Bhandari R. K., and Higa M., 2003: The role estrogens play in sex differentiation and in sex changes of fish. *Fish Physiol. Biochem.*, **28**, 113-117.

- Strüssmann C. A. and Nakamura M., 2002: Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol. Biochem.*, **26**, 13-29.
- Sunobe T. and Nakazono A., 1993: Sex change in both directions by alternation of social dominance in *Trimma okinawae*. *Ethology*, **94**, 339-345.
- Sunobe T., Nakamura M., Kobayashi Y., Kobayashi T., and Nagahama Y., 2005: Aromatase-like immunoreactivity and the role of enzymes in steroid pathways for inducing sex change in the hermaphrodite gobiid fish *Trimma okinawae*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **141A**, 54-59.
- Yamamoto T., 1969: Sex differentiation. In "Fish Physiology" (ed. By Hoar W. S. and Randall D.J.) Vol. .IIIA, Academic Press, New York, London, pp.117-175.
- 余呉 豊, 1986: 魚類に見られる雌雄同体現象とその進化, 魚類の性転換, 東海大学出版会, pp.1-47.