

# 生殖生理に関する研究手法と水産重要魚種の再生産研究高度化への応用

清水 昭男\*

## Application of Physiological and Biochemical Methods to the Advanced Study of Reproductive Biology in Resource Fishes

Akio SHIMIZU\*

**Abstract** Physiological and biochemical application to biology of resource fishes is an important matter for improving estimation and management of the resources. The female reproductive system is based on the integration of three systems; germ cell generating system (the ovary), the reproductive endocrine system, and the vitellogenic system. Specific chemical staining such as periodic acid-Schiff (PAS) reaction and immunocytochemical procedure such as immunostaining are convenient methods for detecting molecular markers of these systems. In the ayu, PAS staining evidently improved identification and detection of time-course changes of post-ovulatory follicles. In acanthopterygian fishes, universal antisera for immunocytochemical identification of FSH cells and LH cells have recently been obtained, and being successfully used for evaluating the activities of two different gonadotrophs in resource fishes such as mackerel, saury, and flounder. In the saury, antisera against vitellogenin can also be used for immunocytochemical evaluation of vitellogenic activity. Further integrative studies on the three systems will be important for improving evaluation of biological properties of resource fishes.

**Key words:** reproductive physiology, endocrinology, ovary, post-ovulatory follicle, gonadotropin, vitellogenin, immunocytochemistry, reproductive parameter

### 1. はじめに

魚類の生殖活性評価に関する生理学的、分子生物学的パラメータは原理的には様々なものが考えられ、実験魚類等では実際に多くの分子指標が使われているが、水産重要魚種に現時点で利用可能なものは多くない。近年のバイオテクノロジー等の著しい発達によって潜在的な可能性は極めて大きなものがあるが、水産重要魚種への適用に関しては、生体分子の種間差の問題等から応用面が著しく遅れていた。しかしながら、ユニバーサル抗体（ある物質に対する抗原抗体反応を、広い範囲の生物群由来のものに対して起こすことのでき

る抗体）の開発等によってこの問題も解決が見えつつある。本総説では、生理生化学的指標を用いた水産重要魚種の再生産研究高度化の具体例を、将来的な可能性を含めて述べる。

### 2. 真骨魚類雌における生殖現象とその内分泌支配

生理生化学的手法を水産重要魚種の再生産研究高度化に効率よく応用するためには、生殖現象の内分泌支配を十分理解することが必要である。雌魚の成熟過程とその内分泌的調節機構に関しては詳しい総説があり（会田, 1989; 会田ら, 1991; 長濱, 1991; 高野, 1989）,

本特集号（松山，2006）の記述にもあるのでここでは簡単に述べる（図1）。魚類の成熟関連の最上位中枢は間脳の視床下部（特に視索前野）にある。成熟開始時期になると、そこの特定のニューロンから生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH，10アミノ酸よりなるペプチドホルモン）の分泌が促進されると考えられている（奥澤，1991；天野，2006）。このニューロンの軸索は脳下垂体中に伸びており、脳下垂体の生殖腺刺激ホルモン分泌細胞を刺激して2種類の生殖腺刺激ホルモン（GtH）を分泌させる。GtHには濾胞刺激ホルモン（FSH）及び黄体形成ホルモン（LH）の2種類があり、どちらも分子量約3万の糖タンパク性ホルモンである。逆にGtHの分泌を抑制する視床下部因子も知られている（ドーパミン，GnIH等）。

生殖腺刺激ホルモンは血液中に放出されて卵巣に達し、卵巣の濾胞細胞中に存在するステロイド産生細胞を刺激する。この刺激によって、卵巣ではエストロジェン（エストラジオール $17\beta$ ）が分泌される。エストロジェンは肝臓を刺激してビテロジェニン（分子量数十万のホスホリポ糖タンパク）を活性に合成させる。血中に出されたビテロジェニンは卵巣の濾胞細胞と卵膜を通して卵母細胞中に取り込まれ、リポビテリンとフォスフィチン，'コンポーネントの3種類のタンパク質に開裂し、卵黄物質となる。

最終成熟期の近辺においてはエストロジェンの産生は弱まり、黄体ホルモン系ステロイド（ $17\beta$ ， $20\beta$ ジ

ヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン， $17\beta$ ， $20\beta$ ， $21$ トリヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン等）が産生され、雌においては卵母細胞の最終成熟を促進する。最終成熟が完了した卵は成熟卵または完熟卵と呼ばれる。

卵母細胞の最終成熟時に起こる現象は魚種によってかなりの差異があり、統一的な説明は困難である。最終成熟の根元的な定義は「媒精した場合に正常に受精して発生が可能になること」であるが（長浜，1991），これは実際には確認が難しい。共通するのは、第1減数分裂の前期にあった核（大型なので特に胚胞とよぶ）が中期に移行することによって核膜が消失する現象であり、胚胞崩壊（GVBD，Germinal Vesicle Breakdown）と呼ばれる。しかし、GVBDが完了してもさらに形態的变化が続く場合も多い。従って、「GVBDが完了して一連の外観上の変化が一時的に停止したもの」が実際的な定義となろう。ただし、完熟した卵も排卵あるいは産卵されずに時間が経過すると、油球分布の異常等特有の形態変化を伴う過熟と呼ばれる現象が起こり、正常発生能が低下または消失する（足立，2000）。卵成熟の段階で多くの魚では主として卵黄タンパクの部分分解によって、卵黄球の融合、透明化、吸水による卵径の著しい増大が起こる。このため、成熟卵のことを透明卵、吸水卵と呼ぶことも多い。しかしながら、魚種によってはこの過程がほとんど起こらない場合もあり、成熟卵すなわち透明卵及び吸水卵とするのは正確ではない。また、以上の定義からも、透明

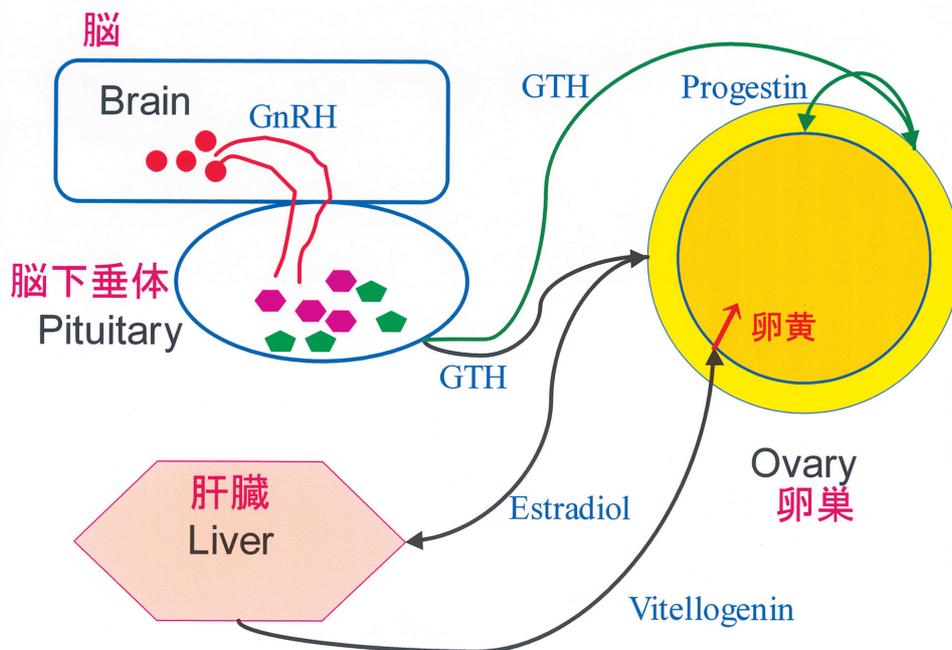


図1：真骨魚類の雌成魚における生殖現象の内分泌的制御機構。

卵や吸水卵は肉眼観察の結果に用い、成熟卵あるいは完熟卵は、顕微鏡観察等により胚崩壊等の細胞学的変化を確認した場合について用いるべきであろう。もちろん、同一魚種で肉眼観察と組織学的観察を併用、比較することによって、透明化あるいは吸水した卵が成熟卵であることが明らかになっている場合はこれらの用語を広く用いて良いと考えられる。

卵母細胞の最終成熟後、排卵（濾胞壁が破れて卵母細胞が卵巣腔または体腔内に排出されること）が起こる。排卵には生殖腺刺激ホルモン及びプロスタグランジンが働いている。残された濾胞組織は排卵後濾胞（Post-Ovulatory Follicle；POF）となり、徐々にまたは急速に（魚種や水温条件によって異なる）退縮する（栗田，2006；松山，2006）。

### 3. 生殖現象の生理・生化学的評価に有用な分子指標

上記のように、成熟は生殖腺と関連器官との密接な連携のもとに進行する現象であるため、生殖活性評価のための分子指標についてもこのことを考慮すべきである。

雌魚における生殖現象の生理学的評価に有用な分子指標の起源としては、卵巣そのもの、卵黄タンパク（ビテロジェニン）合成 - 蓄積系、生殖内分泌中枢（脳及び脳下垂体）の3つが挙げられる。これらの3系統はそれぞれ密接に関連して働いており総合的に考えることが重要であるが、最初の段階としてはそれぞれの系に特有な分子指標の探求が必要である。卵巣においては、排卵後濾胞の高感度高精度検出、プロモデオキシウリジン標識（DNAラベリング）による生殖細胞分裂活性の評価、生殖細胞や濾胞細胞のアポトーシス検出等が候補として挙げられる。その他の系においても、生殖腺刺激ホルモン等の各種ペプチドホルモンやビテロジェニン等、組織特異的に発現する分子、DNAラベリングによる細胞分裂活性の測定、アポトーシス特異的DNA断片等が有用な分子マーカーとして期待できる。また、マーカー分子が発現 - 作用するどの段階で検出・評価するかも問題である。実験生物においてはmRNA

の発現量が優れたマーカーとなっているが、mRNAは非常に壊れやすく、屋外サンプリングには困難を伴う。このため水産重要魚種に対しては、mRNAに対応するcDNA塩基配列情報を基にして作成した抗体によって、対応するタンパク質の免疫化学的検出を行うことが有効な戦略の一つである（表1）。

実験魚類においてはステロイドホルモンも重要な成熟関連の指標であるが、低分子のため、組織学的に局在を調べるのが困難である。従って、この物質の作用に関する適切な評価には血中濃度を測定する必要があり、採血を伴うため、現在のところ水産重要魚種に用いるにはあまり適しているとは言えない。しかしながら、真骨魚類の主要な雌性ホルモンは実質上エストラジオール17のみ、最終成熟を誘起する黄体ホルモン系ステロイドも17 $\beta$ 、20 $\beta$ ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン、17 $\beta$ 、20 $\beta$ 、21トリヒドロキシ-4-プレグネン-3-オンのほぼ2種類のみであり、同一系統のホルモンでも魚種によってアミノ酸配列が微妙に異なるタンパク系ホルモンと違って、魚種の違いによる分子の差をあまり考慮しなくて良いという長所がある。今後、技術の発達により、飼育魚を用いた再生産パラメーターの評価が普遍的に行えるようになれば、これらのステロイドホルモンも指標として非常に有用であろう。

#### 1) 排卵後濾胞

排卵後濾胞の存在は古くから知られており、その出現が産卵の確たる証明となることから生殖生物学上極めて重要である。特に近年は、新鮮な排卵後濾胞を検出することによってDEPM（Daily Egg Production Method）法で資源量の直接推定が可能なが示され、資源生物学上も重要な指標物となっている（Lasker, 1985；栗田，2006；松山，2006；渡邊，2006）。

排卵後濾胞の検出には通常はパラフィン切片の光学顕微鏡観察法を用いる。しかしながら、通常のヘマトキシリン-エオシン染色では、新しい排卵後濾胞は検出可能であるが、退縮するにつれて他の結合組織との区別が困難になり、判別不可能になることに限界があった。一方、近年になってPAS（Periodic Acid Schiff；

表1. mRNAとタンパク質の分子マーカーとしての特徴

	安定性	機能	配列決定	定量	局在
mRNA	極めて不安定	翻訳後	容易（cDNA）	ノーザン解析 定量的PCR	<i>in situ</i> パイブリダイゼーション
タンパク質	比較的安定	自身	容易でない	RIA, EIA, FIA	免疫組織化学

cDNA シークエンスデータの情報をを用いて抗体を作成し、免疫化学的に同定、定量するのが有効。

多糖類及びその関連物質に特異的な染色法)染色を行えば判別の感度が著しく上昇することが明らかとなった。完成した濾胞細胞は1層ではなく、結合組織性の夾膜細胞層と立方上皮性の顆粒膜細胞層とよりなっており、その間に非細胞性の基底膜が存在する。これは多糖類を多く含むためPAS反応に強陽性である。非常に薄いために未排卵濾胞では強拡大しないと観察しづらいが、排卵後は濾胞層全体が著しく収縮するために基底膜も凝縮し、観察が非常に容易になる(図2-a)。また、非細胞性のため再吸収も一般に遅れるので、アユではPAS染色を行うことによって古い排卵後濾胞も検出可能となり、退行段階の異なる新旧2種類あるいは3種類の排卵後濾胞を区別できるようになって、多回産卵が直接的に証明でき、バッチ産卵数の変化が明らかになる等、産卵回数に関する知見が著しく向上した(Shimizu *et al.*, 2005; 清水ら, 未発表)。古い排卵後濾胞の検出に関しては、退行卵との鑑別が重要であるが、退行卵には卵膜の残滓が必ず含まれており、アユの場合はこの残滓は長期間残り、しかも基底膜とは染色性や形態が異なるため、判別可能である。他の魚種に関しては、両者の形態的な変化を十分に把握して判別の可能性を確かめることが必要である。

より高度な手法としては排卵後濾胞に特異的に出現する分子を検出する方法が考えられる。メダカでは、特異的なプロテアーゼ(ゼラチナーゼB)が排卵後濾胞にのみ存在することが知られており(Matsui *et al.*, 2000)、近縁なサンマにおいても抗メダカゼラチナーゼB抗体による免疫染色によって排卵後濾胞が染色されることがわかっている(清水ら, 未発表)。しかしながらその反応は弱く、実用性に関しては今後の改良を待つ必要があるようである。

## 2) ビテロジェニン

ビテロジェンは卵の栄養蓄積に直結する物質であり、この動態は生殖活性の評価に重要である。実験魚等においては、一般的な卵黄合成活性の評価には、血漿中のビテロジェンを免疫化学的に測定することが多い。しかしながら、このためには採血が必要であり、水産重要魚種への適用としてはサンプリング実施上困難な場合がある。このような場合には、肝臓の組織標本を抗ビテロジェニン抗体で免疫染色してその動態を調べる手法が考えられる。

肝臓の組織像と血中ビテロジェニン量との関連に関しては今のところ十分な知見が得られているとは言えないが、同一種において血中ビテロジェニン量と肝臓組織像との対応を確かめておけば、将来的には免疫組織化学のみによって卵黄合成活性の評価を行うことも

可能になると考えられる。現在、サンマにおいて肝臓の抗ビテロジェニン抗体による免疫染色が可能となっており(図2-b)、また、ELISA(Enzyme Linked Immunosolvent Assay)による血漿中ビテロジェニンの測定系の開発が進行中で(原と巢山, 私信)、近い将来にはこの両者の解析及び比較が行えるようになる見込みである。

卵巢組織そのものでは、現在の成熟状態がわかっていても、それがどの方面に向かっているか、すなわち成熟に向かうか退縮に向かうかは必ずしも判断がつけがたい。卵黄合成活性の評価が出来るようになれば、それがかなりの程度まで可能になると思われる。実際、カダヤシにおいては、産卵期前の魚を成熟促進条件(高温長日)に移した場合、GSI上昇等の生殖腺の発達が

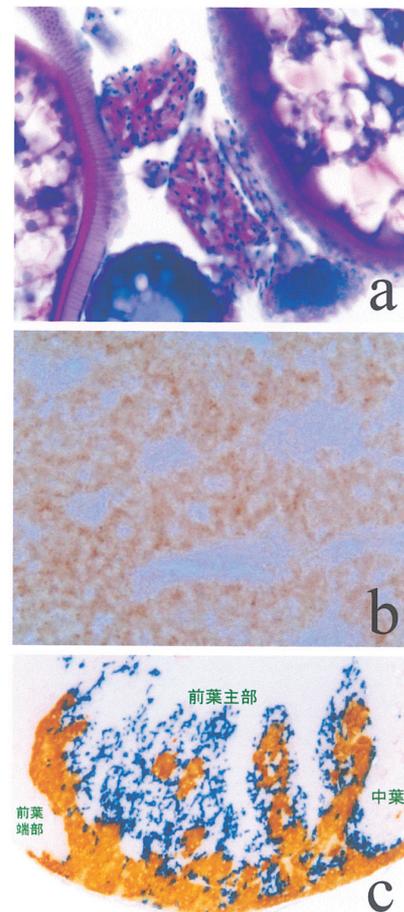


図2. : 生殖活性評価のための各種特異的染色。a: アユの古い排卵後濾胞(中央部の2個)のPAS染色像。凝集した基底膜が強く赤染している。b: 抗サンマビテロジェニンで免疫染色を行ったサンマ肝臓。茶色部分がビテロジェニンの免疫反応。c: 二重免疫組織化学により染色を行ったマミヨグ下垂体のFSH細胞(青色)とLH細胞(茶色)。

認められる前に血中ピテロジェニン濃度の上昇が起こることが明らかにされている (Koya *et al.*, 2003)

### 3) 生殖腺刺激ホルモン (GtH)

前述のとおり、生殖腺刺激ホルモン (FSHとLH) は生殖現象の大部分に関与している非常に重要な下垂体ホルモンである。真骨魚類におけるこのホルモンは、従来はLHに相当するもの一つのみが知られていたが、1988年にFSHに相当する分子 (当初はGtH-Iと呼ばれ、従来からのLHに相当する分子はGtH-IIと呼ばれた) が発見され、四足動物と同様、魚類においても2種類の分子があることが明らかとなった (Suzuki *et al.*, 1988a)。現在のところ、大部分の魚類において2種類の生殖腺刺激ホルモンが存在するものと考えられている。哺乳類においては、FSHとLHは同一の細胞で産生されると考えられているが、多くの魚類では別々の細胞で産生されている (Nozaki *et al.*, 1990; 小林と孫, 2000; Shimizu *et al.*, 2003b)。しかし、近年になって、FSHとLH両方を産生する細胞を持つ魚種の存在も報告されている (García-Hernández *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2003)。

#### (1) 生殖腺刺激ホルモンの生理作用

魚類の脳下垂体を摘出するといかなる成熟状態の魚でも生殖腺の急速な退縮が起こり、短期間のうちに極めて未熟な状態になってしまうという古くからの実験結果からも、ほとんど全ての成熟現象にGtHが直接あるいは間接的に関わっていることは明らかで、卵母細胞の成長、卵黄蓄積、ステロイド合成、卵成熟、排卵等の調節に関与していると考えられている (小林と孫, 2000; 田中, 1991)。

2種類のGtHの動態を調べることによって、卵黄合成活性と同様に、成熟がどの方面に向かっているかを知る手がかりになりうる。現在のところ、最大の問題は、FSH、LHそれぞれの生物活性が良く分かっていないこと、すなわち、GtH全体の役割としては比較的理解がなされているが、サケ科魚類を除いてFSHとLHの役割分担がほとんどわかっていないことである。大部分の魚類において、最終的な卵成熟にはLHが重要な働きをしていることは予想されているが (松山, 2006)、他の生殖現象に関しては、わずかな報告間の比較でも魚種による相当の違いがあり (Suzuki *et al.*, 1988b; Kagawa *et al.*, 1998, 2003; Van Der Kraak *et al.*, 1992)、魚類全体におけるFSHとLHの役割分担はかなり多様である可能性がある。

後述のユニバーサル抗体を用いた免疫組織化学的方法によると、同様の成熟状態の魚でも、魚種によって2種類のGtH細胞の分布密度が著しく異なることが明

らかとなっている。また、ELISA系などの開発による定量法の確立や*in vivo*または*in vitro*投与実験等による生理作用の解析がGtHの機能を明らかにするには必須であり、今後の研究展開に待つところが多い。

(2) 生殖腺刺激ホルモンの産生細胞の検出とその動態  
組織切片中のFSH及びLHを特異的に染める一般染色法は知られていない。従って、それぞれの生殖腺刺激ホルモン分泌細胞の検出には免疫組織化学等の手法が必要である。以前は、それぞれのGtHに対する特異的抗体が一部の魚種でしか得られておらず、染色可能な魚種が少ないことが問題であったが、cDNA塩基配列情報 (Lin *et al.*, 1994) を利用し、アミノ酸配列の保存性の高い領域に対応した合成ペプチドを抗原に用いたユニバーサル抗体の利用により、棘鱗上目魚類 (スズキ目、カレイ目、フグ目、カダヤシ目、ダツ目等を含む巨大な分類群) ではほぼ染色が可能となった (図 2-c; Shimizu *et al.*, 2003a,b)。また、これらの抗体を用いることによって、棘鱗上目魚類に属する水産重要魚種 (マサバ、ゴマサバ、サンマ、ヒラメ等) の2種類の生殖腺刺激ホルモン分泌細胞の同定と分布密度等の測定が可能となった (清水ら, 未発表)。

マミチヨグ (北米原産のカダヤシ目広塩魚) の脳下垂体の観察により、生殖年周期に伴って、FSH細胞とLH細胞のそれぞれが特徴的な変化を示すことが知られている (Shimizu *et al.*, 2003c)。特に、初秋 (産卵期終了後) の最も未熟な時期においては、FSH細胞は当歳魚、1歳魚ともわずかである一方、LH細胞は1歳魚ではかなり存在するが、当歳魚ではわずかしかなことが判明しており (清水, 未発表)、経産魚と未産魚の区別に使え可能性がある。また、長期にわたり多回産卵を行うハゼの一種チブにおいて、産卵期の前期と後期では主要なGtH細胞 (恐らくLH細胞; この報告の時点では、魚類のFSHはまだ知られていなかったためGtHと表現されている) の微細構造が異なることが明らかにされており (Kaneko *et al.*, 1986)、個体毎の産卵履歴の指標になりうる可能性が示唆される。さらに、カダヤシにおいては、産卵期前の自然条件から成熟促進条件 (高温長日) に移行後、生殖腺に変化の現れていない時期 (3日後) において既にFSH細胞の増加が観察されており (Koya *et al.*, 2003)、成熟状態変化のより鋭敏な指標となることが期待できる。

また、本特集号の記述 (奥沢, 2006) にあるように、初回成熟においては視床下部 脳下垂体系の発達がキーポイントとなっており、将来的には初回産卵年齢の変動を解析する手段としても活用可能と考えられる。

#### (3) 生殖腺刺激ホルモンの精製と定量

生殖腺刺激ホルモンの生理作用の研究や、生殖腺ホ

ルモン血中濃度の測定には、原則としてホルモンの精製が必要である。従来は、大量の脳下垂体の入手に大きな労力や費用を有すること、糖鎖部分の不均一性に基づく分離の困難性、精製途中におこるサブユニット解離、FSH及びLH特異的な生物活性評価の困難性の問題等のため、精製（特にFSHとLHの分離）が難しかったが、cDNA情報を利用した抗ペプチド抗体の利用や高速液体クロマトグラフィーの活用（特に疎水クロマトグラフィーの利用）によってこれらの問題も解決可能となってきた（Shimizu and Yamashita, 2002）。また、バイオテクノロジーの発達によってリコンビナントホルモン（遺伝子導入によって人為的に生産したホルモン）の利用も将来的には期待できる（吉崎ら, 2000）。現在、血中LH濃度の測定系は様々な魚種で開発されているが、血中FSH濃度の測定系はサケ科魚類（Govoroun *et al.*, 1998; Prat *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1988c）を除いて得られていない。これは、血中濃度測定系作製に必要なFSHの純品が得られた魚種が少ないことが主な原因である。しかしながら、精製法の発達やリコンビナントホルモンの利用などによって、今後は2種類のGtHの動態が多く魚種で明らかにされるようになるであろう。

#### 4) 将来の統合的研究に向けて

以上において代表的なものを例示した生殖生物学上重要な3系統であるが、将来的には、生殖システムとして統合的に解析・評価してゆくことが望ましい。現在のところ、水産重要魚種、特に大部分の多獲の浮魚類の生殖生理学的研究は著しく遅れており、統合的研究以前の個々の研究、すなわち、生理生化学的手法を用いた生殖腺の構造と機能に関する研究、生殖内分泌系及び卵黄合成系に関する生理学的研究等がまだ始められたばかりの段階である。従って、具体的な統合的研究のイメージをここに示すことは困難であるが、最も近いステップとしては、これら3系統の活性（見かけ上を含む）の乖離を見出し、その差を解析することが挙げられる。生殖現象がこれら3系統が密接に協同して働いている現象であれば、単純に、これらの活性はきれいに同調して変化するとみなされがちだが、上述したように実際はそうならない場合がしばしばある。これは、上位中枢からの情報が下位の器官に伝わって効果が現れるまでのタイムラグや、ホルモンとリセプターとの発現時期の食い違い、残滓的分子の存在による真の活性と見かけの活性との差等に起因するものと考えられる。そういった現象を追求することは、逆説的に聞かえるが、解析に効果的な切り口をつかむことにつながる。効果的な指標を探ることによって探求の

糸口をつかみ、時期特異的なマーカー分子の検出法の開発等、実際的な応用研究を行うとともに、3系統間を仲介する分子に関する基礎的研究を進めることが重要である。これをもとに仲介分子の機能と動態の解明という次の研究段階に進むことが可能となり、将来的には本格的な統合的研究が行えるようになってくるものと思われる。

#### 4. おわりに

水産重要魚種の生物特性に関する知見は、生態学的特性に関しては研究の蓄積がかなりあるが、生理学的特性については研究が極めて少ない。生理学的パラメーターは、遺伝子工学、バイオテクノロジー、ポストゲノム研究などの成果を活用することが出来るため、通常の生態学的手法では検出不可能な差異や変化を精度良く検出することが可能である。従って、将来の研究に期待するものが非常に大きい。

水産重要魚種（特に多獲性浮魚類）の生殖内分泌学的研究は、従来ほとんど手が付けられて来なかった分野で、現在始まったばかりの段階である。言うまでもなく、これらの魚種を用いることに対する手法上の困難性によるものであるが、資源評価対象魚種においてABC算出値の妥当性が求められており、その精度向上が今後必須の課題であること、このために生物学的知見のさらなる向上が求められていることを考えると、この方向の研究の重要性は今後ますます増大して行くものと考えられる。

#### 文 献

- 会田勝美, 1989: 成熟・産卵の内分泌支配, 「水族繁殖学」(隆島史夫, 羽生 功編), 緑書房, 東京, pp. 65-102.
- 会田勝美, 小林牧人, 金子豊二, 1991: 内分泌, 「魚類生理学」(板沢靖男, 羽生 功編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.167-241.
- 足立伸次, 2000: 成熟・産卵の人為的制御と卵質. 月刊海洋, 32, 120-126.
- 天野勝文, 2006: 魚類の性成熟と生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH). 水研センター研報, 別冊第4号, 71-73.
- García-Hernández M. P., García-Ayala, A., Matthijs A., Zandbergen, M. A., Agulleiro, B., 2002: Investigation into the duality of gonadotropic cells of Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerilii*, Risso 1810): immunocytochemical and ultrastructural studies. *Gen. Comp. Endocrinol.* 128,

- 25-35.
- Govoroun M., Chyb J., and Breton B., 1998: Immunological cross-reactivity between rainbow trout GTH I and GTH II and their subunits: application to the development of specific radioimmunoassays. *Gen. Comp. Endocrinol.* **111**, 28-37.
- Kagawa H., Gen K., Okuzawa K., and Tanaka H., 2003: Effects of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on aromatase activity and P450 aromatase gene expression in the ovarian follicle of red seabream, *Pagrus major*. *Biol. Reprod.* **68**, 1562-1568.
- Kagawa H., Tanaka H., Okuzawa K., and Kobayashi M., 1998: GTH II but not GTH I induces final maturation and the development of maturational competence of oocytes of red seabream *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **112**, 80-88.
- Kaneko T., Aida K., and Hanyu I., 1986: Ultrastructural changes in the pituitary gonadotropes during the annual reproductive cycle of the female chichibu goby *Tridentiger obscurus*. *Cell Tissue Res.*, **246**, 137-144.
- 小林牧人, 孫 永昌, 2000: 生殖腺刺激ホルモン. 月刊海洋, **32**, 74-80.
- Koya Y., Sawaguchi S., Shimizu K., and Shimizu A., 2003: Endocrine changes during the onset of vitellogenesis in spring in the mosquitofish. *Fish Physiol. Biochem.*, **28**, 349-350.
- 栗田 豊, 2006: 野外調査と飼育実験を併用した魚類の繁殖特性研究. 水研センター研報, 別冊第4号, 87-99.
- Lasker R. (ed.), 1985: An egg production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: application to the northern anchovy, *Engraulis mordax*. NOAA Technical Report NMFS **36**, NOAA, 190pp.
- Lin Y.-W. P., Rupnow B. A., Price D. A., Greenberg R. M., and Wallace R. A., 1992: *Fundulus heteroclitus* gonadotropins. 3. Cloning and sequencing of gonadotropic hormone (GTH) I and II subunits using the polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Endocrinol.* **85**, 127-139.
- Matsui H., Ogiwara K., Ohkura R., Yamashita M., and Takahashi T., 2000: Expression of gelatinases A and B in the ovary of the medaka fish *Oryzias latipes*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4658-4668.
- 松山倫也, 2006: 多獲性浮魚類の再生産研究高度化に向けての生殖生理学的手法の適用. 水研センター研報, 別冊第4号, 51-62.
- 長浜嘉孝, 1991: 生殖: 配偶子形成の制御機構, 「魚類生理学」(板沢靖男, 羽生 功編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.243-286.
- Nozaki M., Naito N., Swanson P., Miyata K., Nakai Y., Oota Y., Suzuki K., and Kawauchi H., 1990: Salmonid pituitary gonadotropins I. Distinct cellular distributions of two gonadotropins, GTH I and GTH II. *Gen. Comp. Endocrinol.* **77**, 348-357.
- 奥澤公一, 1991: 生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン, 「海産魚の成熟・産卵リズム」(廣瀬慶二編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 27-37.
- 奥澤公一, 2006: 魚類の初回成熟. 水研センター研報, 別冊第4号, 75-85.
- Prat F., Sumpter J. P., and Tyler C. R., 1996: Validation of radioimmunoassay for two salmon gonadotropins (GTH I and GTH II) and their plasma concentrations during the reproductive cycle of male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Reprod.* **54**, 1375-1382.
- Shimizu A. and Yamashita M., 2002: Purification of mummichog (*Fundulus heteroclitus*) gonadotropins and their subunits, using an immunochemical assay with antisera raised against synthetic peptides. *Gen. Comp. Endocrinol.* **125**, 79-91.
- Shimizu A., Kagawa H., and Tanaka H., 2003a: Immunocytochemical identification of gonadotrophs (FSH cells and LH cells) in various perciform fishes using antisera raised against synthetic peptides. *Fish Physiol. Biochem.*, **28**, 109-110.
- Shimizu A., Sakai T., Nashida K., and Honda H., 2003b: Universal antisera for immunocytochemical identification of two different gonadotrophs in acanthopterygian fishes. *Fish Physiol. Biochem.*, **29**, 275-287.
- Shimizu A., Tanaka H., and Kagawa H., 2003c: Immunocytochemical applications of specific antisera raised against synthetic fragment peptides of mummichog GtH subunits: examining

- seasonal variations of gonadotrophs (FSH cells and LH cells) in the mummichog and applications to other acanthopterygian fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **132**, 35-45.
- Shimizu A., Uchida K., Abe S., Udagawa M., Sato T., and Katsura K., 2005: Evidence of multiple spawning in wild amphidromous type ayu. *Fish. Sci.*, **71**, 1379-1381.
- Suzuki K., Kawauchi H., and Nagahama Y., 1988a: Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **71**, 292-301.
- Suzuki K., Nagahama Y., and Kawauchi H., 1988b: Steroidogenic activities of two distinct salmon gonadotropins. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **71**, 452-458.
- Suzuki K., Kanamori A., Nagahama Y., and Kawauchi H., 1988c: Development of salmon GTH I and GTH II radioimmunoassays. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **71**, 459-467.
- 高野和則, 1989: 卵巣の構造と配偶子形成, 「水族繁殖学」(隆島史夫, 羽生 功編), 緑書房, 東京, pp.3-34.
- 田中秀樹, 1991: 生殖腺刺激ホルモン, 「海産魚の成熟・産卵リズム」(廣瀬慶二編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.38-49.
- Van Der Kraak G., Suzuki K., Peter R. E., Itoh H., and Kawauchi H., 1992: Properties of common carp gonadotropin I and gonadotropin II. *Gen. Comp. Endocrinol.* **85**, 217-229.
- 渡邊千夏子, 2006: 資源学的立場からみたマサバ太平洋系群の生殖生態研究の現状と問題点. 水研センター研報, 別冊第4号, 101-111.
- 吉崎悟朗, 森田哲朗, 竹内 裕, 竹内俊郎, 小林牧人, 2000: 遺伝子導入魚を利用した生殖腺刺激ホルモン生産の試み. 月刊海洋, **32**, 127-131.