

博士論文

ブリの配偶子形成および産卵に及ぼす制限給餌の影響と
その内分泌メカニズムに関する研究

Effects of restricted feeding regimes
on gametogenesis and reproductive endocrine system in the yellowtail,
Seriola quinqueradiata

2016 年 10 月

長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科

樋口 健太郎

目 次

第1章 緒言	1
第2章 ブリの親魚養成における給餌の低コスト化技術の開発	6
第1節 制限給餌時期の違いがブリの成熟に及ぼす影響	6
1-1 材料および方法	7
1-2 結果	10
1-3 考察	18
第2節 成熟開始前の長期間の制限給餌がブリの成熟・産卵に及ぼす影響	27
2-1 材料および方法	27
2-2 結果	33
2-3 考察	49
第3章 ブリの成熟内分泌機構に及ぼす成長誘導因子（IGF）の生理作用	58
第1節 ブリの生殖周期に伴う卵巢中 IGF-1 および IGF-2 の遺伝子発現および 発現部位の変化	59
1-1 材料および方法	60
1-2 結果	65
1-3 考察	67

第2節	IGF-1がブリの性ステロイド合成に及ぼす影響	77
2-1	材料および方法	77
2-2	結果	80
2-3	考察	81
第3節	ブリの生殖周期に伴う精巢の発達と内分泌学的変化	88
3-1	材料および方法	88
3-2	結果	91
3-3	考察	97
第4章	総合考察	106
	謝辞	112
	引用文献	114

第1章 緒言

近年、世界の水産物需要が急激に増加している。欧米における健康ブームや中国等の経済発展により、世界の水産物消費量は年々増加しており、世界の一人当たりの年間水産物消費量は約50年間で2倍に増加している（水産庁，2014）。これに伴って、世界の養殖生産量は増加の一途をたどっており、平成24年には養殖生産量が天然海域で水産物を漁獲する漁船漁業を含めた総生産量の42.2%に達し、過去最高を記録している（FAO, 2014）。我が国においても、漁業生産全体のうち養殖生産、特に海面養殖による生産量の占める割合が年々増加している。近年では、遠洋漁業や沖合漁業による漁獲量の大幅な低下の影響もあり、平成19年には海面養殖による生産量は全体の20%以上にまで増加している（水産庁，2014）。このように、世界的な人口増加や魚食指向の高まりとともに、乱獲や気候変動による天然水産資源の枯渇が懸念されている現状を考慮すると、今後養殖の重要性はますます高まっていくものと予想される。

これまでに多くの魚類養殖の現場では、天然海域で捕獲した幼魚を養殖種苗として利用してきた。しかし、天然種苗の確保は資源状況に大きく左右されるため不安定であり、かつ資源への影響も懸念される（Sadovy and Liu, 2008）。このため、過去50年ほどの間に多くの魚種において、卵から人工的に育てた幼魚を種苗に用いる完全養殖技術の開発およびその普及が精力的に進められてきた。特に、クロマグロ（*Thunnus orientalis*）やブリ（*Seriola quinqueradiata*）、カンパチ（*Seriola dumerili*）といった大型海産魚類の養殖では、養殖種苗のほとんどを天然種苗に依存しているため、人工種苗の供給体制の構築が喫緊の課題となっている（浜田・虫明，2006；Masuma et al., 2011；Nuji et al., 2016）。しかし、このような大型海産魚類では、養殖種苗のもととなる卵の生産に要する膨大なコストがボトルネックとなっており、商業レベルでの完全養殖技術の確立には至っていない。卵の生産にかかるコストのほとんどを占めているのは親魚の餌料費であるが、現状では親魚に飽食給餌し、大きく太らせることで産卵を促している。例えば、体重100

kg 以上に成長してから成熟・産卵するクロマグロの場合、十分量の卵を得るためには年間 1,000 万円（1 尾に対して年間 10～20 万円）にもおよぶ給餌コストが必要となっている（Masuma et al., 2011）。したがって、大型海産魚類において人工種苗の供給体制を構築し、完全養殖技術を確立するために、親魚養成にかかわる給餌の低コスト化を図ることで、効率よく良質卵を生産する技術の開発が強く求められている。

親魚養成にかかわる給餌の低コスト化を実現するためには、給餌量の削減、すなわち制限給餌を行う一方、成熟の進行や産卵に影響を与えることなく良質卵を得る技術の開発が必要である。一般に、魚類の成熟の進行や産卵は、体重や脂質等の蓄積エネルギーといった親魚の栄養状態によって大きく左右される。これまでの研究から、成熟の進行や産卵の可否はある特定の時期の親魚の栄養状態に強く依存することが明らかになってきた（栗田，2010）。例えば、タイセイヨウサケ（*Salmo salar*）を用いた研究では、卵形成が開始される直前に制限給餌によって栄養状態が低下した場合に、その後の成熟が著しく抑制されることが報告されており、成熟開始前の栄養状態がその後の成熟の進行に極めて重要であることが明らかになっている（Thorpe et al., 1990）。親魚の栄養状態は給餌量に極めて強く依存することから、親魚養成にかかわる給餌の低コスト化技術を開発するためには、親魚の栄養状態が成熟や産卵に重要な特定の時期以外に制限給餌を行うことが重要であると考えられる。

これまでの研究から、親魚の栄養状態と成熟や産卵の関係は魚種によって大きく異なることと、これらの関係は成熟・産卵様式と強く関連していることが明らかになっている。一般に、魚類の成熟・産卵様式は以下の 3 タイプに大別される（高野，1989）。すなわち、1) すべての卵母細胞が同期的に発達して、一群となって産卵される同期発達型（synchronous oocyte development）、2) 卵母細胞の一部が卵形成を開始し、一群となって発達を続け、当該産卵期に一回あるいは複数回に分けて産卵する卵群同期発達型（group-synchronous oocyte development）、3) 成熟した卵巣内にほとんどすべての発達段階の卵母細胞が同時に出現し、当該産卵期に複数回連続して産卵する非同期発達型

(asynchronous oocyte development) である。これまでの研究から、サケ類に代表される同期発達型およびタイセイヨウマダラ (*Gadus morhua*) 等に代表される卵群同期発達型の魚類は、事前に魚体に蓄積した栄養を用いて卵を生産する性質が強いことが知られている (capital breeder) (Thorpe et al., 1998 ; Jorgensen et al., 2006)。反対に、非同期発達型の成熟・産卵様式を有するカタクチイワシ (*Engraulis japonicus*) を用いた研究では、卵形成が進行する成熟期に制限給餌によって親魚の栄養状態が低下した場合にその後の産卵数が減少すること、絶食条件下では卵形成の進行が遅滞し、短期間のうちに産卵停止に至ることが報告されており、非同期発達型の魚類は成熟期あるいは産卵期に摂取したエネルギーに依存して卵を生産する性質が強いことが明らかとなっている (income breeder) (Yoneda et al., 2014)。クロマグロやブリといった多くの大型海産魚類は非同期発達型の成熟・産卵様式を有しており (Okochi et al., 2016 ; Higuchi et al., 2016), 成熟期あるいは産卵期の親魚の栄養状態が成熟や産卵に重要であると予想される。しかし、体内に多くのエネルギーを蓄積可能な大型の魚類がカタクチイワシ等の小型の魚類と同じ性質を有しているかについては全く不明であり、親魚の栄養状態が大型海産魚類の成熟や産卵にどのような影響を及ぼすかについて研究された例は見当たらない。

一方で、上述したように親魚の栄養状態は成熟や産卵と密接に関連しているが、個体の栄養状態がどのような内分泌メカニズムで成熟内分泌機構に伝達され、成熟の進行や産卵を左右するかについては不明な部分が多い。一般に、栄養状態に依存して、体成長や体内の恒常性維持を促すホルモン等の成長誘導因子が産生されるが、近年の哺乳類や一部の魚類を用いた研究から成長誘導因子が成熟の進行にも重要な役割を果たしていることが明らかになってきた (Bondy et al., 2006 ; Reinecke, 2010)。このことから、親魚の栄養状態は成長内分泌機構を介して成熟の進行や産卵の可否にも影響を及ぼしている可能性が考えられる。しかし、クロマグロやブリ類を含む大型海産魚類において、成長内分泌機構が成熟に果たす内分泌的役割についてほとんどわかっていない。これらの内分泌学的な基礎情報は、親魚の栄養状態が成熟や産卵に及ぼす影響を体系的に理解す

の一助となり、親魚養成にかかわる給餌の低コスト化技術を開発、さらには高度化するうえでの不可欠な学術基盤になると考えられる。

近年、一部の魚類を用いた研究から、成長内分泌機構の主要なホルモンであるインシュリン様成長因子 (insulin-like growth factor, IGF) が成熟に重要な役割を果たしていることが明らかになっている (Reinecke, 2010)。一般に、IGF は栄養状態に依存して肝臓で合成された後、血流を介して多種多様な細胞に対して増殖、成長、分化およびアポトーシスの抑制等の生理作用を示すことで体成長に主要な役割を果たしている (Wood et al., 2005)。また、IGF は肝臓以外の様々な組織でも発現していることが明らかになっており、自己分泌あるいは傍分泌を介して各組織の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが報告されている (Wood et al., 2005 ; Reindl and Sheridan, 2012)。興味深いことに、これら IGF は卵巣においても発現していることが一部の魚類で報告されており、卵濾胞における性ステロイド合成および卵母細胞の最終成熟の誘導に関与していることが明らかとなっている (Reinecke, 2010)。したがって、成長内分泌機構は、卵巣における IGF を中心とする成長誘導因子を介して成熟の進行に重要な役割を果たしていると考えられる。

以上の背景から、本研究では、大型海産魚類における完全養殖技術の確立を目指して、養殖種苗のもととなる卵の安定的かつ効率的確保のために、親魚養成にかかわる給餌の低コスト化技術の開発を行った。一般に、親魚の栄養状態は給餌量に極めて強く依存する。そこでまず、制限給餌による飼育試験を行い、親魚の栄養状態がブリの成熟や産卵にどのような影響を及ぼすかを調べることで、親魚養成にかかわる給餌の低コスト化技術の開発を試みた (第 2 章)。また、親魚の栄養状態が成熟や産卵に影響を及ぼす内分泌的メカニズムを解明するために、ブリの成熟内分泌機構に及ぼす成長誘導因子 IGF の生理作用の解明を試みた (第 3 章)。本研究の供試魚には大型海産魚類のモデル魚種としてブリを用いた。ブリは国内で最も多く養殖されている水産重要魚種であり、繁殖生理学的な知見も多く集積されている (Ouchi et al., 1985 ; Matsuyama et al., 1996 ; Rahman

et al., 2001 ; Rahman et al., 2002)。また、ブリは分離浮遊卵を年多回産卵する等の繁殖特性がクロマグロをはじめとする多くの大型海産魚類と共通していることから、本研究で得られる知見は他の大型海産魚類へ十分に応用可能であると考えられる。

第2章 ブリの親魚養成における給餌の低コスト化技術の開発

一般に、魚類の成熟の進行や産卵は、体重や脂質等の蓄積エネルギーといった親魚の栄養状態によって大きく左右される（栗田，2010）。これまでの研究から、サケ等に代表される同期発達型およびタイセイヨウマダラ等に代表される卵群同期発達型の成熟・産卵様式を有する魚類は、成熟を開始する前の栄養状態に依存して卵を生産する性質が強いことが明らかになっている（Thorpe et al., 1998 ; Jorgensen et al., 2006）。一方で、カタクチイワシのように非同期発達型の成熟・産卵様式を有する魚類は、卵形成が進行する成熟期の栄養状態に依存して卵を生産する性質が強いことが明らかになっている（Yoneda et al., 2014）。ブリは非同期発達型の成熟・産卵様式を有していることが明らかになっており（松山ら，1996）、カタクチイワシのように成熟期の栄養状態に依存して成熟・産卵する性質が強いと予想される。しかし、体内に多くのエネルギーを蓄積可能な大型海産魚類において、親魚の栄養状態が成熟や産卵にどのような影響を及ぼすかについてほとんど明らかになっていない。

そこで本研究では、ブリの親魚養成における給餌の低コスト化技術を開発するために、まず制限給餌時期の違いが成熟に及ぼす影響を調べることで、成熟開始前あるいは成熟期のどちらの栄養状態に依存して成熟が進行するかを調べた（第1節）。次に、親魚の栄養状態が成熟の進行に重要な時期以外に制限給餌を行い、成熟や産卵にどのような影響が生じるかを調べることで、親魚養成における給餌の低コスト化技術の開発を試みた（第2節）。

第1節 制限給餌時期の違いがブリの成熟に及ぼす影響

本研究では、成熟開始前および成熟期のどちらの栄養状態がブリの成熟の進行に重要であるかを明らかにするために、制限給餌時期の違いがブリ雌および雄の成熟に及ぼす

影響を調べた。

1-1 材料および方法

供試魚およびサンプリング

本研究には、国立研究開発法人水産研究・教育機構西海区水産研究所五島庁舎において海面小割生簀 (5 m×5 m×5 m) 内で天然種苗から育成したブリ 2 歳魚を用いた。2012 年 11 月に筋肉中に PIT タグ (BIO12A, BIO MARK) を装着したブリの雌 13 尾, 雄 12 尾ずつを 3 つの生簀に收容した後, 生簀ごとに以下の試験区を設けて産卵期となる 2013 年 4 月まで飼育した。試験区は, 1) 試験期間中飽食給餌を行う試験区 (飽食給餌区), 2) 成熟開始前 (11~1 月) に飽食給餌区と比較して 30%量の給餌を行う試験区 (成熟開始前制限給餌区), 3) 成熟期 (2~4 月) に飽食給餌区の 30%量の給餌を行う試験区 (成熟期制限給餌区) とした。試験期間中は, 市販配合飼料 (ハマチスペシャル, 日清丸紅飼料) を上述の給餌方法で週 3 回給餌した。2012 年 11 月 9 日, 2013 年 1 月 24 日および 4 月 15 日に, すべての供試魚を海面小割生簀からタモで 1 尾ずつ捕獲し, ヘパリン処理した注射器を用いて尾柄部より採血した後, 尾叉長および体重を測定し, 肥満度 (肥満度 = 体重 (kg)/(尾叉長 (cm)/100)³) を算出した。採取した血液は, 1,500 g で 15 分間遠心分離し, 血漿を -80℃にて保存した。また, 制限給餌が成熟に及ぼす影響を調べるため, 4 月 15 日には各試験区雌 5 尾, 雄 3 尾をサンプリングし, 生殖腺重量を測定した。生殖腺中央部の組織片をブアン氏液 (飽和ピクリン酸 : 中性ホルマリン原液 : 酢酸 = 15 : 5 : 1) で 4℃にて一晩固定した後, 70%エタノールに置換して 4℃にて保存した。また, 卵巣の一部を RNAlater (Ambion) で 4℃にて一晩処理した後, -30℃にて保存した。さらに, 採取した卵巣片は万能投影機 (V-12, ニコン) を用いて卵母細胞の中で最大径を有する 30 粒を測定し, 平均値を求めることで最大卵巣卵群の平均卵径を算出した。

生殖腺組織切片の作製

固定した生殖腺組織片をエタノール系列で脱水し、ブタノールによる透徹を行った後、定法に従ってパラフィン包埋した。包埋した卵巢片を厚さ 5 μm 、精巢片を 3 μm でそれぞれ薄切し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施した。作製した組織切片を光学顕微鏡 (BX43, オリンパス) で観察し、卵巢は Higuchi et al. (2016)、精巢は Schulz et al. (2010) の報告に従って生殖腺の発達ステージを判定した。

血中性ステロイド濃度の測定

血漿を 10 倍量のジエチルエーテルで 3 回抽出し、アッセイ緩衝液 (EIA buffer, Cayman Chemical) に溶解した。E2 および 11-KT の測定は、市販の ELISA (Enzyme Linked Immunosolvent Assay) 法による測定キット (Estradiol EIA kit, 11-keto Testosterone EIA kit, Cayman Chemical) を用いて行った。

血中濾胞刺激ホルモン (FSH) および黄体形成ホルモン (LH) 濃度の測定

FSH および LH の測定は、ブリと同属であるカンパチの FSH および LH 抗体を用いた ELISA 法により、Nyuji et al. (2016) の方法に従って行った。

リアルタイム PCR による遺伝子発現量解析

採取した組織片から ISOGEN II (ニッポンジーン) を用いて total RNA を抽出し、Poly(A) Purist MAG kit (Ambion) を用いて mRNA を精製した。得られた mRNA 50 ng を使用し、Omniscrypt RT kit (キアゲン) にて逆転写反応を行った。リアルタイム PCR による遺伝子発現量解析は、TaqMan プローブを用いた相対定量法により定量した。特異的プライマーおよび TaqMan プローブは Primer Express software v. 2.0 (Applied Biosystems) を用いて設計し、Integrated DNA Technologies 社から購入した (Table 1)。PCR 反応は、前述の cDNA 溶液 5 μl を鋳型として、0.5 μM の各プライマー、0.2 μM の TaqMan プロ

Table 1 Quantitative PCR primer and probe sequences for targeted genes, and PCR product sizes.

Targeted gene	GenBank accession no.	Primer/probe sequence (5'-3')	Product size (bp)
FSH β	LC102206	Forward: TCCACCATATGTGGCAGGACAGT	91
		Probe: FAM-AGGACCCGGTCTACATCAGCGACTA-IBFQ	
		Reverse: AGTCCCCGTTACAGGTCTTCTG	
LH β	LC102207	Forward: CGCAGTGGAAACCAACCATCT	102
		Probe: FAM-CTGCATCACCAAGGACCCCGT-IBFQ	
		Reverse: TCCCGGTACGTGCACACAT	
StAR	LC102214	Forward: CAGGACGGCTGGACCATAGA	74
		Probe: FAM-ACTGTAGCTGCAAAACGGAGACAAAAGTCCTGA-IBFQ	
		Reverse: CCAACGTCAGGCAACACCTT	
P450 sc	LC102215	Forward: CCAGCATCACTGAGCTAATGG	83
		Probe: FAM-CTGGAGGATAGATACAACITCTATAACGCTGCTGT-IBFQ	
		Reverse: GTGCCTGGCTAGTTCATACAATG	
P450 $c17$	LC102217	Forward: GGGCCGTCATCTACCTCATTC	79
		Probe: FAM-ACCCACAGGTGCAGAAACGTATCCAGG-IBFQ	
		Reverse: CCTGCCCCCACTTACTGT	
3 β -HSD	LC102216	Forward: CAGTGGATACAGTGAGATATATGG	85
		Probe: FAM-CAATGTCAAAAGGAACACACAGGTCTTCTGG-IBFQ	
		Reverse: ACCACGTTCTCCTGGATACATG	
P450 $arom$	LC102218	Forward: GTGGAAAAAAGATGCGCACCTA	71
		Probe: FAM-TTCACCAAAGCCCTGACAGGTCCAG-IBFQ	
		Reverse: AAACCTCCACTGCTCTTGCAAA	
EF1 α	AB032900	Forward: AAGAGAAACCATCGAGAAAGTTCCA	72
		Probe: FAM-AGCCGCCGAGATGGGCAAGG-IBFQ	
		Reverse: CACCCAGGCATACITTGAA GGA	

ープ, 10 μ l の FastStart Essential DNA Probes Master (Roche Diagnostics), 4 μ l の蒸留水を含む 10 μ l の反応混合液中で, 95°C で 10 分間熱変性を行った後, 一連のサイクル (95°C 10 秒, 58°C 30 秒) を 45 回繰り返した。標的遺伝子の部分配列を組み込んだプラスミド (pGEM-T Easy, Promega) を用いて 10 倍希釈ごとに 1×10^8 から 1×10^2 コピーの希釈系列を用いて検量線を作成した。また, EF1 α 遺伝子をリファレンス遺伝子として用いて標準化した飽食給餌区の平均値を 1.0 として各試験区の相対発現量を算出した。なお, すべてのサンプルは 2 回試行で解析を行った。また, 標的遺伝子が増幅されたかを確認するために, 得られた増幅産物のシーケンスを行った。

統計処理

得られたデータは一元配置分散分析に処した後, 飽食給餌区との間で有意差 ($P < 0.05$) が生じているかを Dunnett の多重比較で判定した (GraphPad Prism 6.0 software, La Jolla)。

1-2 結果

1-2-1 制限給餌時期の違いがブリ雌の成熟に及ぼす影響

制限給餌時期の違いが成長および卵巣の発達に及ぼす影響

試験期間を通して, 成熟開始前および成熟期制限給餌区の尾叉長は, 飽食給餌区と比較して有意な変化は認められなかった (Fig. 1A)。しかし, 成熟開始前および成熟期制限給餌区の体重は, 各制限期間中の増加は認められず, 試験終了時には飽食給餌区, 成熟開始前制限区および成熟期制限区でそれぞれ 6.62 ± 0.26 (平均値 \pm 標準誤差), 5.98 ± 0.12 および 5.83 ± 0.29 kg となり, 飽食給餌区と比較して有意に低くなった ($n = 10$, $P < 0.05$, Fig. 1B)。また, 成熟開始前および成熟期制限給餌区の肥満度は, 各制限期間中の増加は認められず, 試験終了時には飽食給餌区, 成熟開始前制限区および成熟期制限区でそれぞれ 21.9 ± 0.5 , 20.1 ± 0.6 および 19.7 ± 0.6 となり, 飽食給餌区と比較して有意に低くなった ($n = 10$, $P < 0.05$, Fig. 1C)。

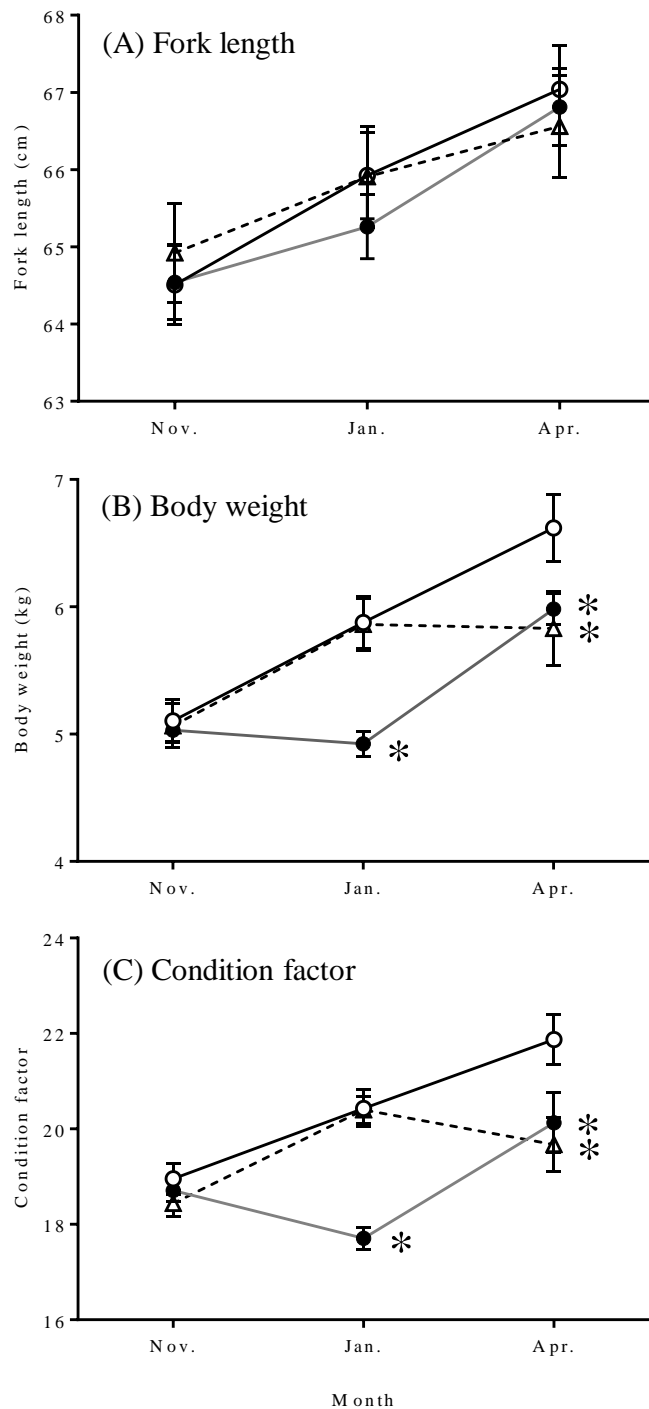


Fig. 1 Changes in fork length (A), body weight (B), and condition factor (C) for the yellowtail females during experimental period. The data represent means \pm SEM ($n = 13$ fish on November and January, $n = 10$ fish on April). Open, closed circles, and open triangles indicate control group, restricted feeding group during immature phase, and restricted feeding group during vitellogenic phase, respectively. An asterisk indicates a significant difference between control group and each restricted feeding group at a particular time point ($P < 0.05$).

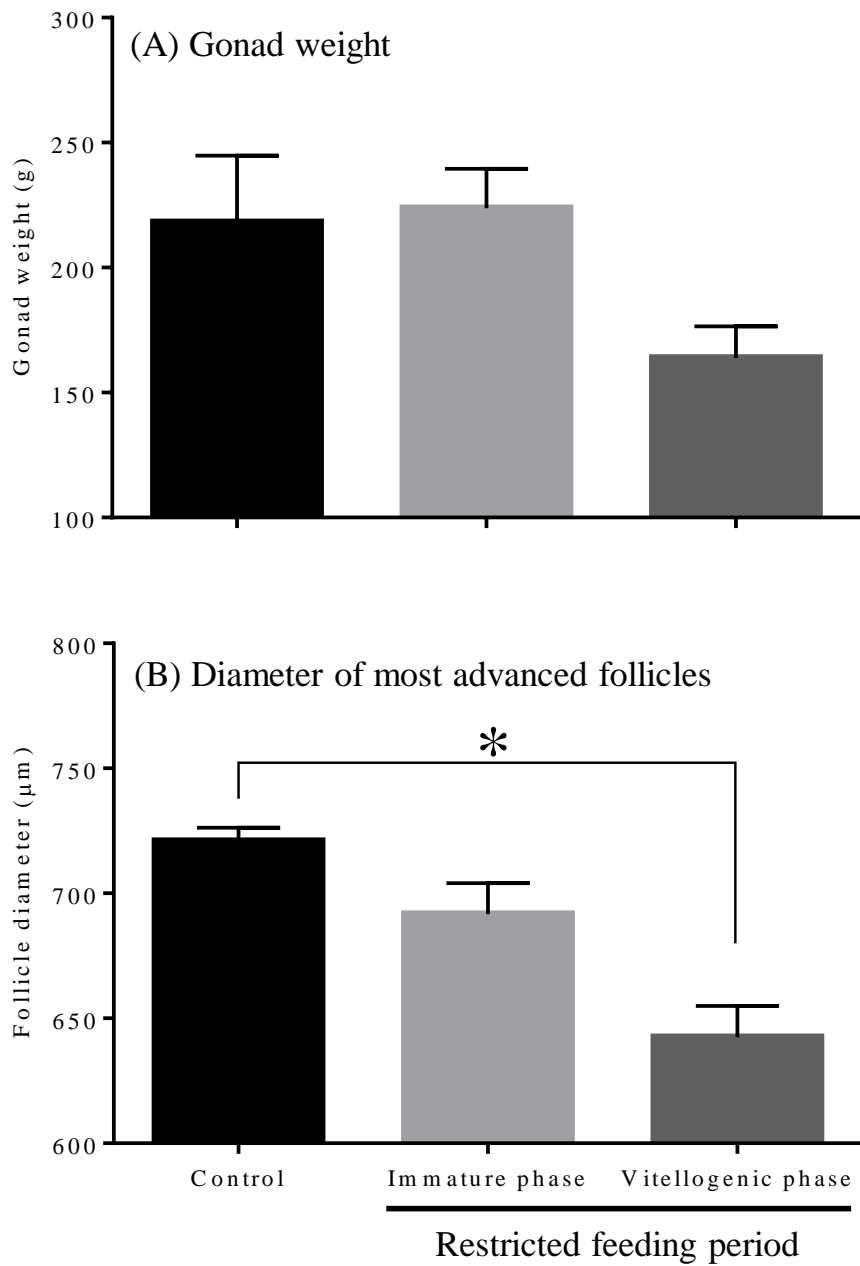


Fig. 2 Effects of timing of restricted feeding on gonad weight (A) and mean diameter of most advanced follicles (B) of yellowtail females at spawning period. The data represent means \pm SEM ($n = 5$ fish). An asterisk indicates a significant difference between control group and each restricted feeding group ($P < 0.05$).

試験終了時の卵巣重量は、飽食給餌区、成熟開始前および成熟期制限給餌区でそれぞれ 218.1 ± 26.7 , 223.7 ± 15.8 および 163.9 ± 12.6 g となり、成熟期制限給餌区のみで低くなる傾向が認められた (Fig. 2A)。また、最大卵巣卵群の平均卵径は、飽食給餌区、成熟開始前および成熟期制限給餌区でそれぞれ 720.8 ± 5.4 , 691.7 ± 12.9 および 642.4 ± 12.6 μm となり、成熟期制限給餌区のみで飽食給餌区と比較して有意に低くなった ($n = 5$, $P < 0.05$, Fig. 2B)。

試験終了時の卵巣の組織学的観察を行ったところ、各試験区のすべての個体が卵黄蓄積を完了した第三次卵黄球期の卵母細胞を有していた。

制限給餌時期の違いが血中 E2 濃度に及ぼす影響

血中 E2 濃度はいずれの試験区においても 11 月以降徐々に増加した後、1 月から 4 月にかけて急激に増加して最大となった (Fig. 3)。11 月および 1 月の血中 E2 濃度は各試験区間で有意な差は認められなかったが、4 月の血中 E2 濃度は成熟期制限給餌区のみで飽食給餌区と比較して有意に低くなった ($n = 10$, $P < 0.05$)。

制限給餌時期の違いが血中 FSH および LH 濃度に及ぼす影響

産卵期における血中 FSH および LH 濃度は、いずれの制限給餌区においても飽食給餌区と比較して有意な差は認められなかった (Fig. 4)。

制限給餌時期の違いが生殖腺刺激ホルモン β サブユニットおよび性ステロイド合成関連遺伝子の発現量に及ぼす影響

脳下垂体における生殖腺刺激ホルモン β サブユニット遺伝子の発現解析では、各試験区間で産卵期の FSH β および LH β 遺伝子発現量に変化は認められなかった (Fig. 5)。

一方で、卵巣における StAR およびステロイド代謝酵素群遺伝子の発現解析では、試験区間で有意な差は認められなかったものの、成熟期制限給餌区の StAR, P450_{scc} お

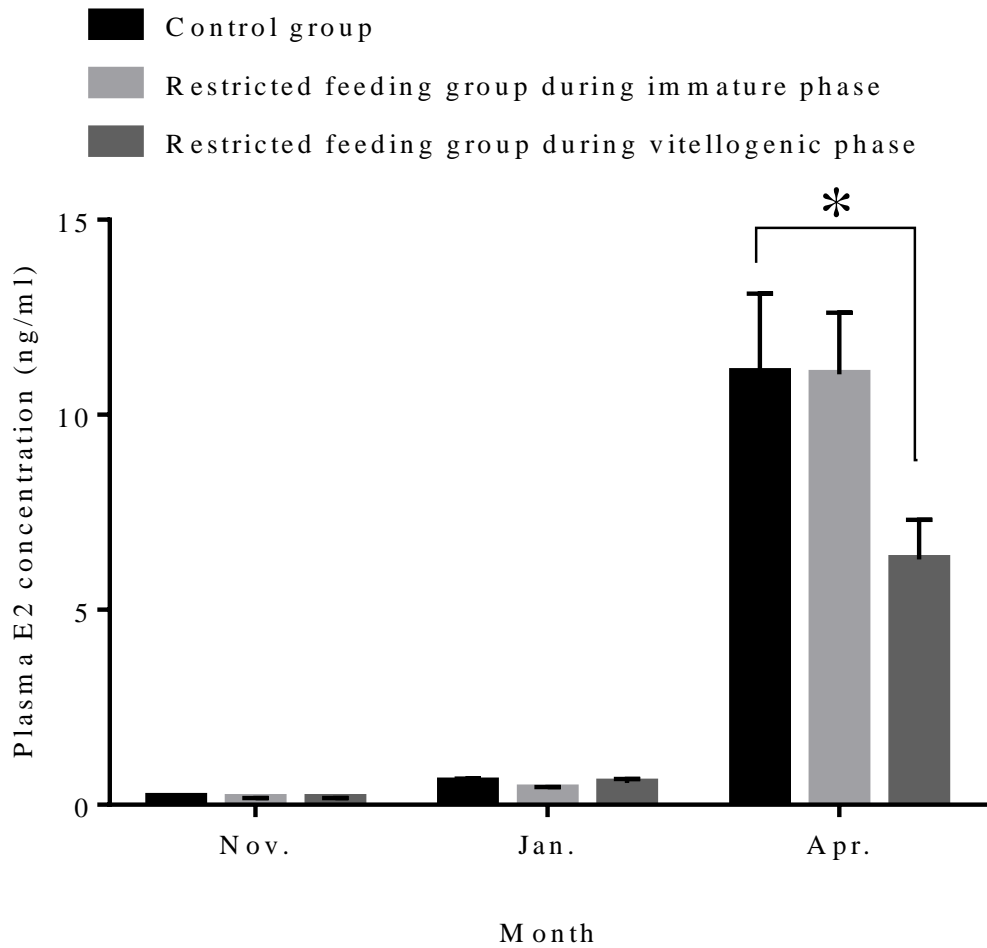


Fig. 3 Changes in plasma estradiol-17 β levels for the yellowtail females during experimental period. The data represent means \pm SEM ($n = 13$ fish on November and January, $n = 10$ fish on April). An asterisk indicates a significant difference between control group and each restricted feeding group at a particular time point ($P < 0.05$).

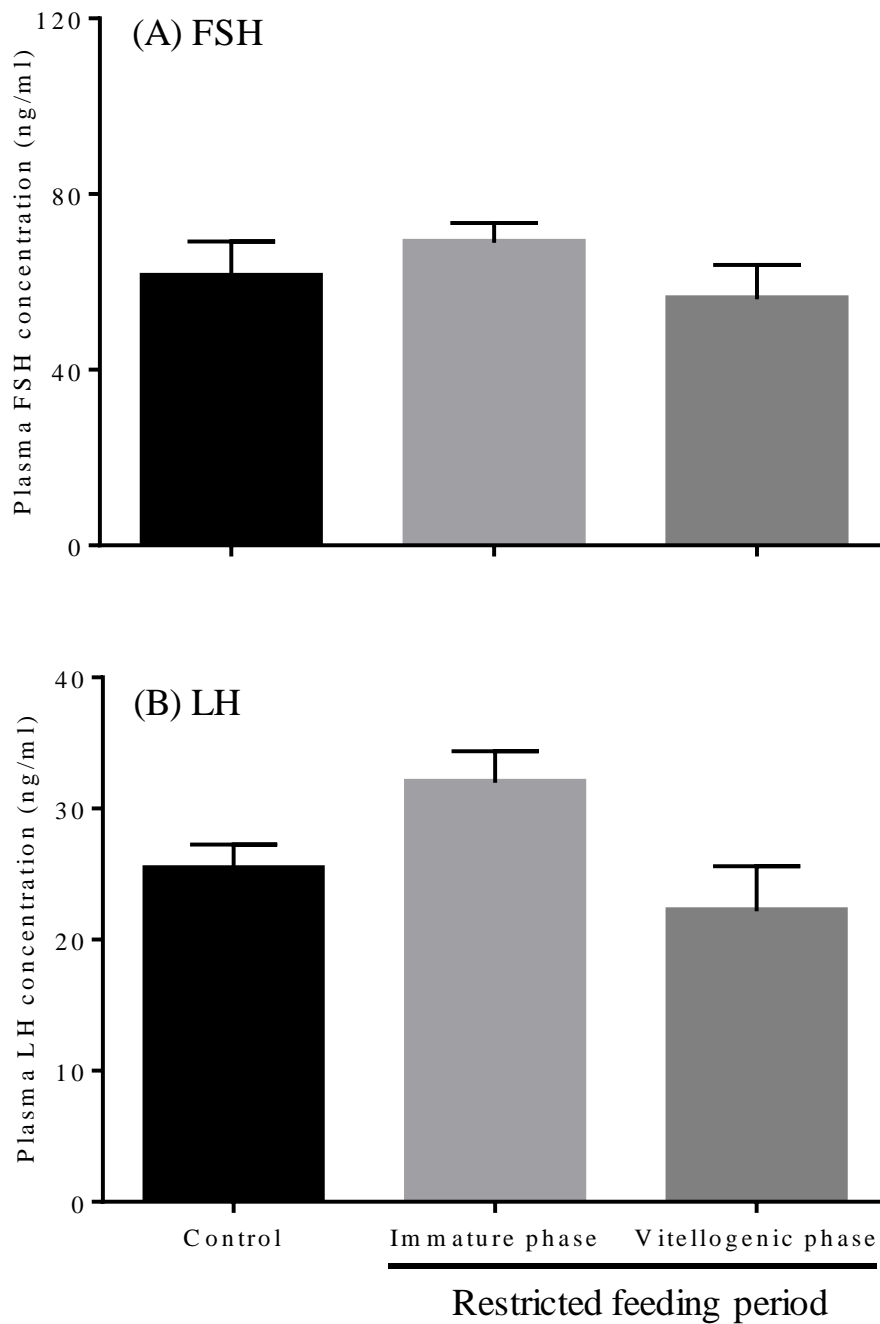


Fig. 4 Effects of timing of restricted feeding on plasma FSH (A) and LH concentration (B) of yellowtail females at spawning period. The data represent means \pm SEM ($n = 10$ fish). No significant difference between control group and each restricted feeding group was detected ($P < 0.05$).

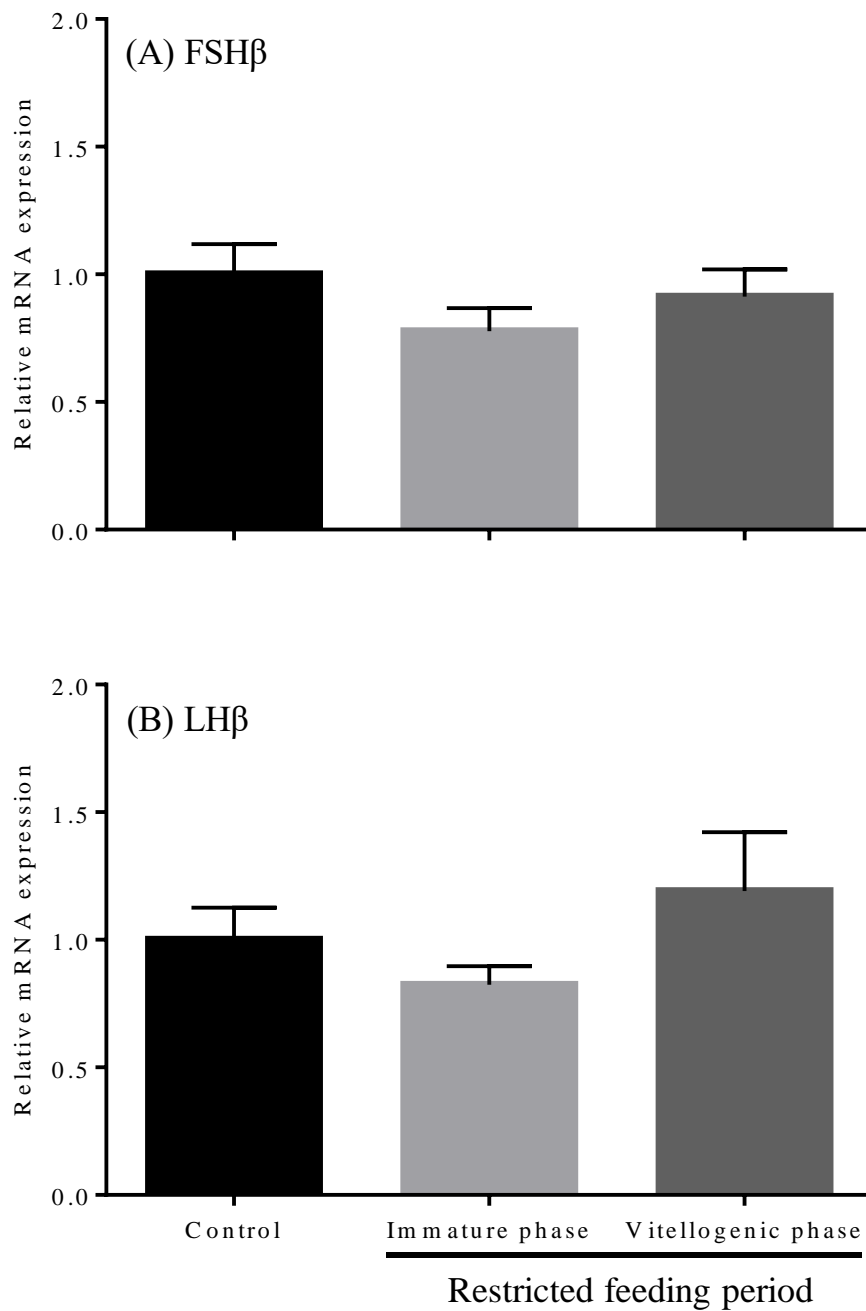


Fig. 5 Effects of timing of restricted feeding on pituitary transcripts for FSH β (A) and LH β (B) of yellowtail females at spawning period. The data represent means \pm SEM ($n = 5$ fish). No significant difference between control group and each restricted feeding group was detected ($P < 0.05$).

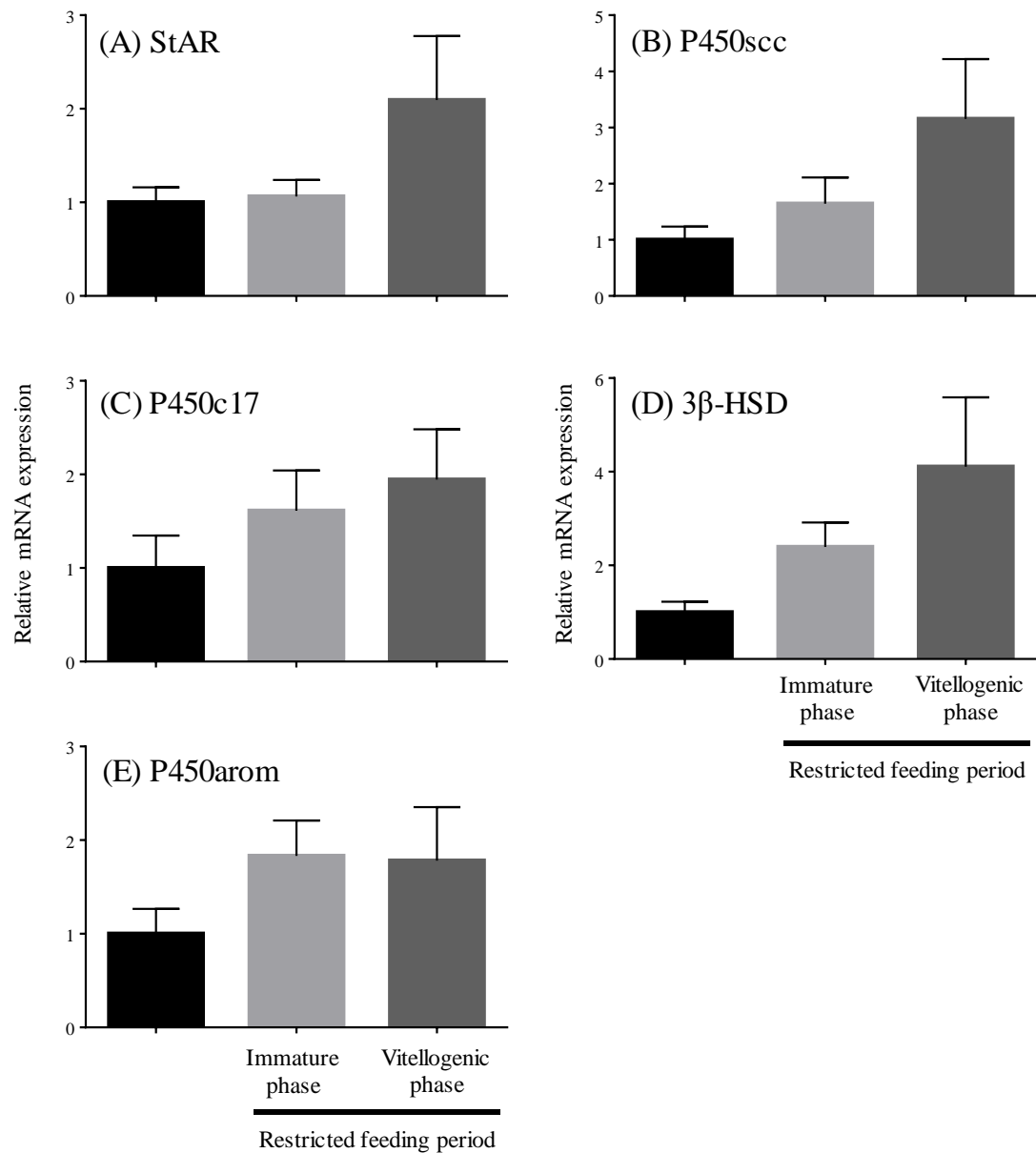


Fig. 6 Effects of timing of restricted feeding on ovarian transcripts for steroidogenesis-related genes, StAR (A), P450scc (B), P450c17 (C), 3β-HSD (D) and P450arom genes (E) of yellowtail females at spawning period. The data represent means \pm SEM ($n = 5$ fish). No significant difference between control group and each restricted feeding group was detected ($P < 0.05$).

および 3 β -HSD 遺伝子の発現量は飽食給餌区と比較して高くなる傾向が認められた (Fig. 6)。

1-2-2 制限給餌時期の違いがブリ雄の成熟に及ぼす影響

制限給餌時期の違いが成長および精巢の発達に及ぼす影響

試験期間を通して、成熟開始前および成熟期制限給餌区の尾叉長は、飽食給餌区と比較して有意な変化は認められなかった (Fig. 7A)。しかし、成熟開始前および成熟期制限給餌区の体重および肥満度は、各制限期間中の増加は認められず、特に試験終了時の体重は飽食給餌区と比較して有意に低くなった (Fig. 7BC)。

試験終了時の精巢重量は、飽食給餌区、成熟開始前および成熟期制限給餌区でそれぞれ 255.3 ± 37.0 , 280.2 ± 19.4 および 161.6 ± 20.3 g となり、成熟期制限給餌区のみで低くなる傾向が認められた (Fig. 8)。

試験終了時の精巢の組織学的観察を行ったところ、各試験区のすべての個体が精巢内を精子で満たされた成熟した精巢を有していた。

制限給餌時期の違いが血中 11-KT 濃度に及ぼす影響

血中 11-KT 濃度はいずれの試験区においても 11 月以降徐々に増加した後、1 月から 4 月にかけて急激に増加して最大となった (Fig. 9)。11, 1 および 4 月において、いずれの制限給餌区の血中 11-KT 濃度は飽食給餌区と比較して有意な差は認められなかった。

制限給餌時期の違いが血中 FSH および LH 濃度に及ぼす影響

産卵期における血中 FSH および LH 濃度は、いずれの制限給餌区においても飽食給餌区と比較して有意な差は認められなかった (Fig. 10)。

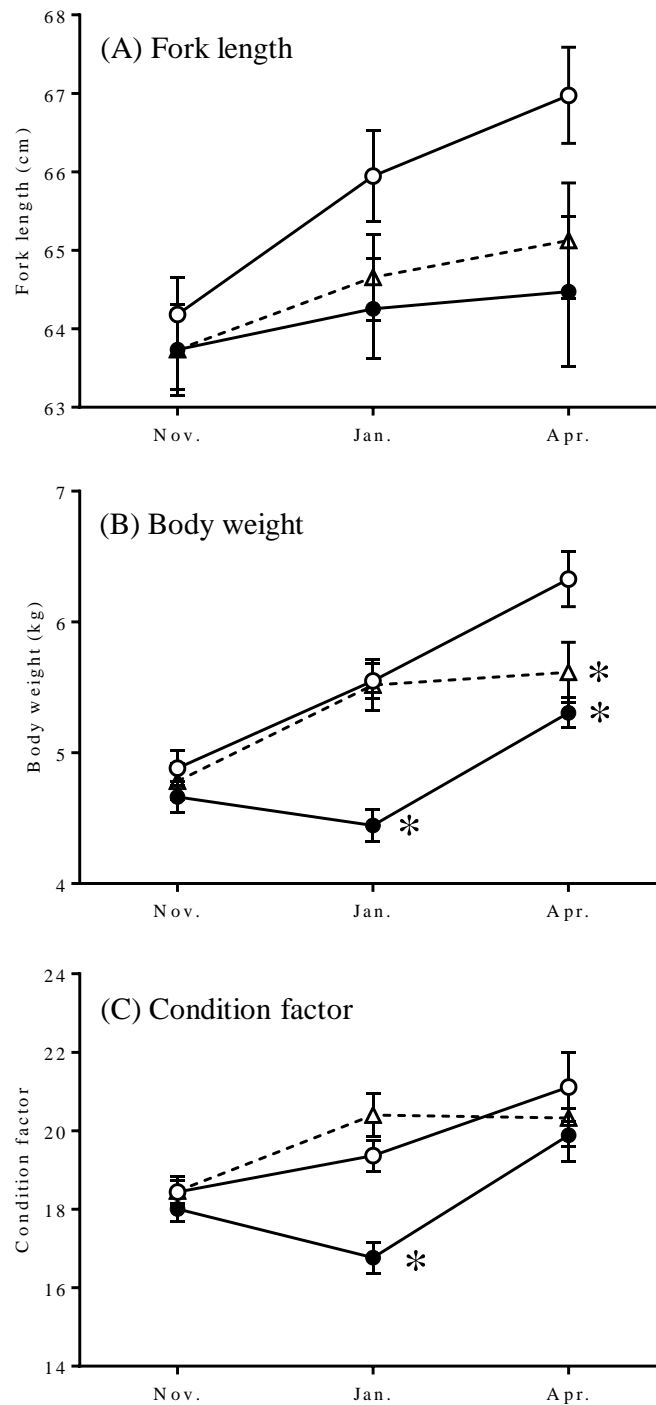


Fig. 7 Changes in fork length (A), body weight (B), and condition factor © for the yellowtail males during experimental period. The data represent means \pm SEM ($n = 12$ fish on November and January, $n = 8$ fish on April). Open, closed circles, and open triangles indicate control group, restricted feeding group during immature phase, and restricted feeding group during vitellogenic phase, respectively. An asterisk indicates a significant difference between control group and each restricted feeding group at a particular time point ($P < 0.05$).

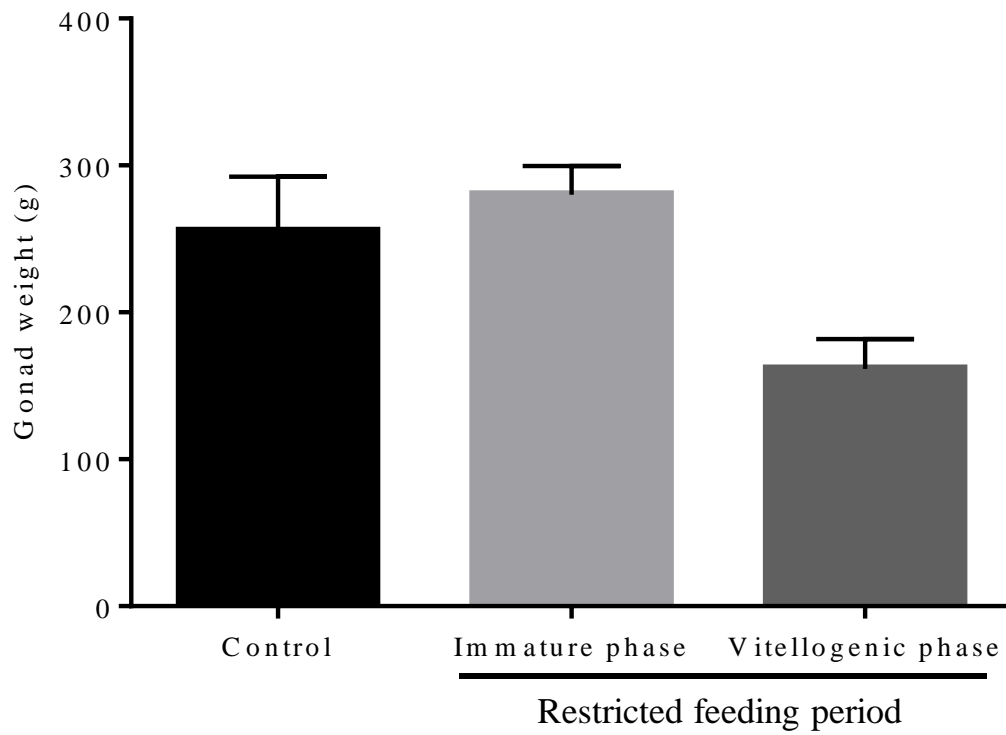


Fig. 8 Effects of timing of restricted feeding on gonad weight of yellowtail males at spawning period. The data represent means \pm SEM ($n = 3$ fish). No significant difference between control group and each restricted feeding group was detected ($P < 0.05$).

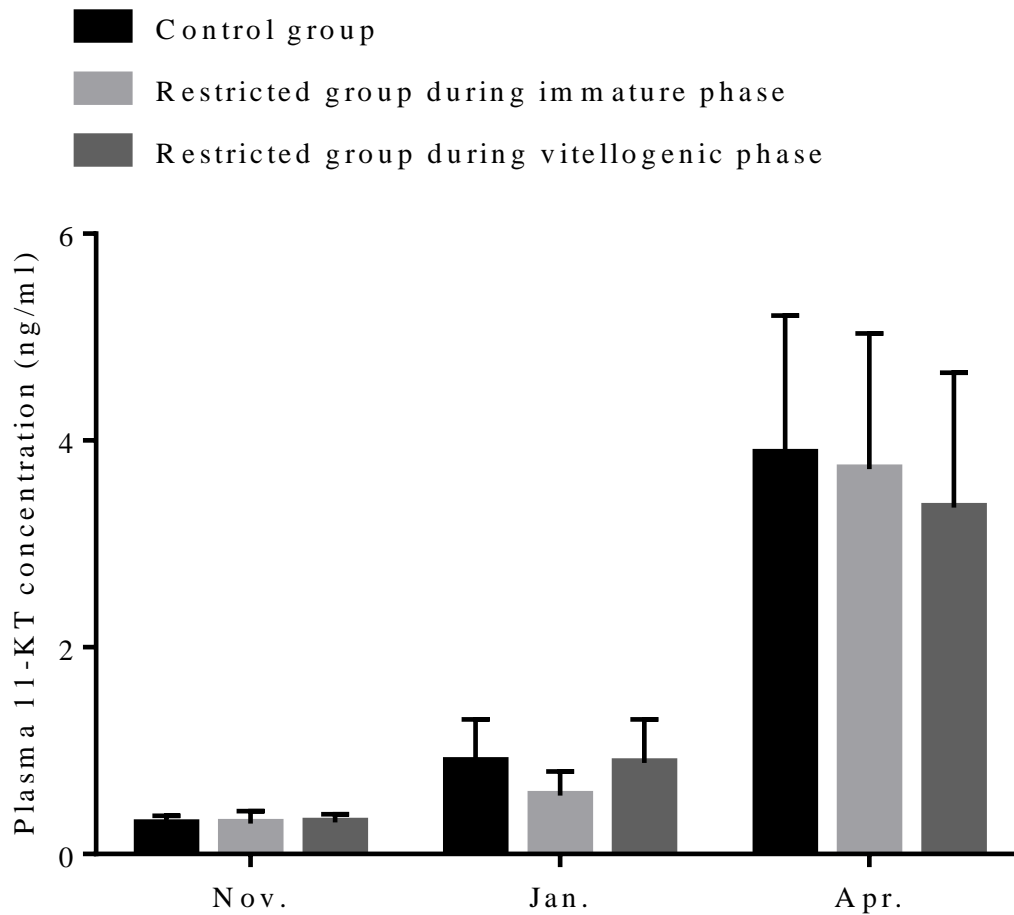


Fig. 9 Changes in plasma 11-ketotestosterone (11-KT) levels for the yellowtail males during experimental period. The data represent means \pm SEM ($n = 12$ fish on November and January, $n = 8$ fish on April). No significant difference between control group and each restricted feeding group at a particular time point was detected ($P < 0.05$).

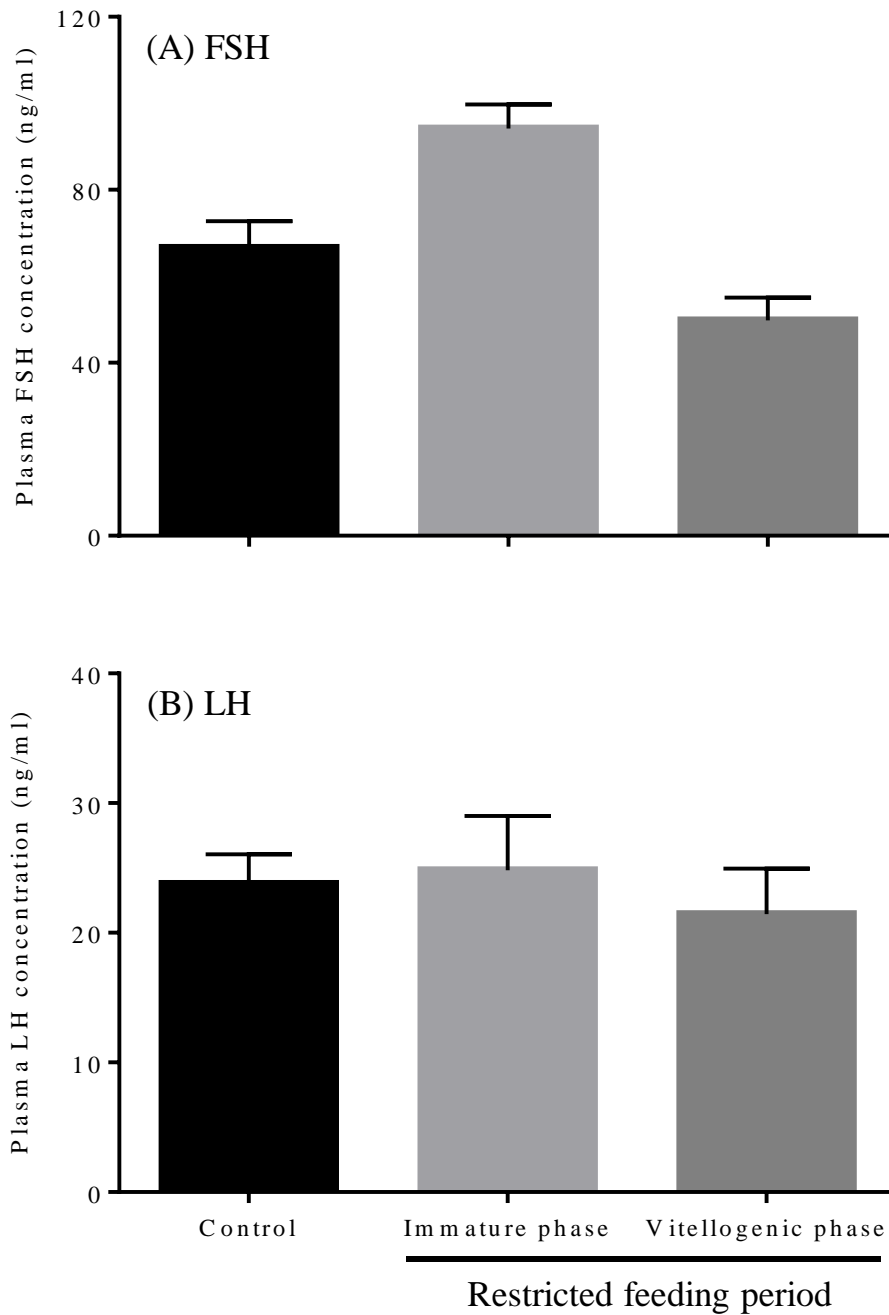


Fig. 10 Effects of timing of restricted feeding on plasma FSH (A) and LH concentration (B) of yellowtail males at spawning period. The data represent means \pm SEM ($n = 10$ fish). No significant difference between control group and each restricted feeding group was detected ($P < 0.05$).

1-3 考察

1-3-1 制限給餌時期の違いがブリ雌の成熟に及ぼす影響

本研究において、成熟開始前あるいは成熟期にそれぞれ制限給餌を行ったところ、飽食給餌を行った場合と比較して体重および肥満度の増加が抑制された。一方で、成熟期に制限給餌を行った場合のみで、産卵期の卵巣重量の低下および卵母細胞の発達の抑制が認められた。これらの結果は、制限給餌による成熟期の体重および肥満度の低下、すなわち栄養状態の低下によって成熟の進行が抑制されたことを示しており、成熟期の栄養状態がその後のブリの成熟の進行に重要であることを示唆している。これまでの研究から、カタクチイワシのように成熟した卵巣内にほとんどすべての発達段階の卵母細胞が同時に出現し、1年に複数回の産卵を行う非同期発達型の産卵様式を有する魚類は、成熟・産卵中に摂取したエネルギーに依存して卵を生産する性質が強いことが明らかになっている (Yoneda et al., 2014)。本研究の結果から、ブリのように体内に多くのエネルギーを蓄積可能な大型の魚類であっても、非同期発達型の成熟・産卵様式を有する魚種は成熟期の栄養状態に依存して卵を生産する *income breeder* の性質を強く有していることが示唆された。

本研究では、飽食給餌区と比較して成熟期制限給餌区のみで産卵期の血中 E2 濃度が有意に低くなった。この結果は、成熟期の制限給餌によって卵巣の性ステロイド合成が抑制されたことを示している。性ステロイドは、卵巣で合成された後、血流を介して肝臓に作用して卵黄タンパク質前駆体であるビテロジェニンを産生させ、卵形成の進行を促している (Lubzens et al., 2010)。したがって、成熟期の制限給餌によって卵巣の性ステロイド合成が抑制されたため、その結果として卵巣重量の低下や卵母細胞の発達の抑制が引き起こされたと考えられる。

一般に、魚類を含む脊椎動物の性ステロイド合成は、脳下垂体で合成・分泌される2種類の生殖腺刺激ホルモン、すなわち FSH および LH によって主に調節されており、これら生殖腺刺激ホルモンは血流を介して卵巣の性ステロイド合成を活性化している

(Lubzens et al., 2010)。しかし、本研究において、成熟期の制限給餌によって性ステロイド合成が抑制されたものの、血中における FSH および LH 濃度や脳下垂体における FSH および LH β サブユニット遺伝子の発現量は飽食給餌区と比較して有意な変化は認められなかった。Yamamoto et al. (2011) は、ギンザケ (*Oncorhynchus kisutch*) を用いた研究において、成熟期の無給餌飼育によって血中 E2 濃度が低下するが、血中 FSH 濃度に変化がないことを報告している。これに加えて、成熟期の無給餌飼育によって脳下垂体中の FSH レベルが低下していたことから、血中の性ステロイド濃度の低下がネガティブフィードバックの抑制を誘導し、脳下垂体の FSH の放出を促すことで血中の FSH レベルが維持されていたと推察している。一方で、卵巣における FSH 受容体遺伝子の発現量が低下していたことから、制限給餌は卵巣における生殖腺刺激ホルモンの受け手側の応答性を低下させることで E2 合成を抑制したことが示唆されている。したがって、本研究の結果から、ブリにおいても成熟期の制限給餌は生殖腺刺激ホルモンレベルに影響を及ぼさないと考えられ、直接卵巣に作用して性ステロイド合成を抑制すると考えられる。

一方で、成熟期の制限給餌によって産卵期の StAR, P450_{scc} および 3 β -HSD 遺伝子の発現量が増加する傾向が認められた。この結果と一致して、産卵期の最大卵巣卵群の平均卵径は飽食給餌区と比較して成熟期制限給餌区のみで有意に低かったが、両試験区ともに卵黄蓄積を完了した第三次卵黄球期の卵母細胞を有していたことから、最大卵巣卵群の平均卵径の違いがこれらステロイド代謝酵素群の遺伝子発現量に影響を及ぼした可能性は低いと考えられる。このことから、成熟期の制限給餌は直接卵巣のステロイド代謝酵素群の遺伝子発現パターンに影響を及ぼしたと考えられる。しかし、上述のように、成熟期の制限給餌によって卵巣の性ステロイド合成が低下することが示された一方、性ステロイド合成を中心的に担っているステロイド代謝酵素群の活性が増加することは考えにくい。一般に、タンパク合成は mRNA の転写、mRNA からの翻訳および翻訳後の修飾等の様々なステップで制御されており、必ずしも遺伝子発現量とタンパクの活

性は相関しないことが知られている。実際に、ギンザケを用いた研究では、成熟期の無給餌飼育によって StAR およびステロイド代謝酵素である P450scc, P450c17, P450arom の遺伝子発現量が低下することが報告されている (Yamamoto et al., 2011)。このため、本研究において、飽食給餌区と比較して顕著な遺伝子発現変化が認められなかった成熟期制限給餌区の P450c17 および P450arom については、酵素活性が低下していた可能性も考えられる。一部の魚類を用いた研究から、P450arom は性ステロイド合成の律速段階となり得る “key enzymes” であることが知られており、P450arom 活性の有無によって E2 合成が左右されていることが報告されている (Gen et al., 2001 ; Kagawa et al., 2003 ; Lubzens et al., 2010)。このため、もし制限給餌によって P450arom 活性が特異的に低下していたとすれば、卵巣内のフィードバックによって他のステロイド代謝酵素群の遺伝子発現量が増加したと考えられるかもしれない。今後、制限給餌条件下におけるステロイド代謝酵素の活性を詳細に調べる必要があるだろう。

1-3-2 制限給餌時期の違いがブリ雄の成熟に及ぼす影響

本研究において、成熟開始前あるいは成熟期にそれぞれ制限給餌を行ったところ、飽食給餌を行った場合と比較して体重および肥満度の増加が抑制される傾向が認められた。一方で、成熟期に制限給餌を行った場合のみで、産卵期の精巣重量が低下する傾向が認められた。この結果は、雄においても、制限給餌による成熟期の体重の減少といった栄養状態の低下によって成熟の進行が抑制されたことを示しており、成熟期の栄養状態がブリ雄の成熟にも重要であることを示唆している。上述の結果から、非同期発達型の成熟・産卵様式を有するブリにおいて、卵巣の発達には卵形成が進行する成熟期に摂取したエネルギーに依存して進行する性質が強いことが明らかになっている。これまでに、制限給餌時期の違いが精巣の発達に及ぼす影響について研究された例は見当たらないが、雌と同様に雄についても *income breeder* の性質を強く有していると考えられる。

本研究において、産卵期である 4 月の精巣の組織学的観察を行ったところ、すべての

試験区においても精巣内に精子で満たされている成熟した精巣を有していた。また、制限給餌が成熟内分泌機構に及ぼす影響を調べるため、血中 11-KT 濃度を測定したところ、試験期間を通して成熟開始前および成熟期の両制限給餌区の血中 11-KT 濃度は飽食給餌区と比較して変化が認められなかった。一般に、魚類を含む多くの脊椎動物において、11-KT は精巣内に存在する最も未分化の雄性生殖細胞（精原細胞）の増殖を促進することで、精子形成を誘導する主要なホルモンであることが知られている（Schulz et al., 2010）。実際に、ブリにおいても精子形成の進行に伴って血中 11-KT 濃度が増加することが明らかとなっており、11-KT が精子形成を促進していることが推察されている（Higuchi et al., 2016）。さらに、脳下垂体で合成・分泌される生殖腺刺激ホルモンは血流を介して精巣に作用することで、11-KT 合成を調節する主要なホルモンであるが、各試験区における血中生殖腺刺激ホルモン濃度に変化は認められなかった。したがって、成熟期の制限給餌は精巣自体の発達を抑制するものの、成熟内分泌機構やそれによって誘導される精子形成の進行には影響を及ぼさない可能性が考えられた。今後は、制限給餌が精子の運動能や受精能といった精子の機能に及ぼす影響を調べる必要があるだろう。

1-3-3 結論

本研究の結果から、雌雄ともに配偶子形成が進行する成熟期の栄養状態が成熟の進行に重要であることが明らかになった。このことから、ブリは *income breeder* の性質を強く有しており、*capital breeder* とは異なって、成熟期の十分な給餌によって速やかに配偶子形成が再開され、正常な成熟の進行が促されると考えられる。したがって、成熟の進行や産卵に影響を及ぼすことなく親魚養成にかかわる給餌の低コスト化を図るためには、配偶子形成が進行する成熟期以外の時期、すなわち成熟開始前に制限給餌を行うことが重要であると考えられる。

第2節 成熟開始前の長期間の制限給餌がブリの成熟・産卵に及ぼす影響

成熟の進行や産卵に影響を及ぼすことなく、親魚養成にかかわる給餌の低コスト化を図るためには、親魚の栄養状態が成熟や産卵に重要な特定の時期以外に制限給餌を行うことが重要であると考えられる。第1節の結果より、ブリの場合、配偶子形成が進行する成熟期の栄養状態がその後の成熟に重要であることが明らかになった。そこで本研究では、親魚の栄養状態がその後の成熟や産卵に比較的影響を及ぼさない成熟開始前に長期間の制限給餌を行い、成熟の進行や産卵に及ぼす影響を解析することで、親魚養成にかかわる給餌の低コスト化が可能であるかを調べた。

2-1 材料および方法

供試魚およびサンプリング

本研究には、国立研究開発法人水産研究・教育機構西海区水産研究所五島庁舎において海面小割生簀(5 m×5 m×5 m)内で天然種苗から育成したブリ2歳魚を用いた。2014年7月2日に筋肉中にPITタグを装着したブリ親魚の雌30尾、雄5尾ずつを3つの生簀に収容した後、生簀ごとに以下の試験区を設けて産卵期となる2015年4月まで飼育した。試験区は、1)試験期間中飽食給餌を行う試験区(飽食給餌区)、2)成熟開始前(7~12月)に飽食給餌区と比較して50%量の給餌を行う試験区(50%給餌区)、3)成熟開始前に飽食給餌区と比較して25%量の給餌を行う試験区(25%給餌区)とした。試験期間中は、市販配合飼料(ハマチスペシャル)を上述の給餌方法で週3回給餌した(Table 2)。毎月すべての個体を海面小割生簀からタモで1尾ずつ捕獲し、尾叉長および体重を測定し、肥満度を算出した。また、2014年11月4日、2015年1月14日、2月24日および4月20日にはすべての個体からヘパリン処理した注射器を用いて尾柄部より採血を行った。採取した血液は、1,500 gで15分間遠心分離し、血漿を-80℃にて保存した。成熟開始前の制限給餌が成熟に及ぼす影響を調べるため、2015年1月14日お

Table 2 Darily feeding rate and total feeding amount during experimental period.

Group	Daily feeding rate based on the mass of the fish (% biomass)												Total feeding amount (kg)
	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.			
Satiation	2.0	2.1	2.0	2.2	2.2	2.3	2.2	2.6	1.3	1.1	351.5		
50%	0.9	1.0	1.1	1.1	1.1	1.3	3.6	4.2	2.3	1.7	231.4		
25%	0.5	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	3.8	5.1	3.5	2.8	176.0		

よび2月24日に各試験区雌7尾、4月20日に各試験区雌7尾および雄5尾をサンプリングし、肝臓および生殖腺重量を測定した。採取した生殖腺の中央部の組織片をブアン氏液で4℃にて一晩固定した後、70%エタノールに置換して4℃にて保存した。また、採取した卵巢はRNAlaterで4℃にて一晩処理した後、-30℃にて保存した。さらに、採取した卵巢片は万能投影機(V-12)を用いて卵母細胞の中で最大径を有する30粒を測定し、平均値を求めることで最大卵巢卵群の平均卵径を算出した。

生殖腺組織切片の作製

固定した生殖腺組織片をエタノール系列で脱水し、ブタノールによる透徹を行った後、定法に従ってパラフィン包埋した。包埋した卵巢片を厚さ5 μm で、精巣片を3 μm でそれぞれ薄切し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施した。作製した組織切片を光学顕微鏡(BX43)で観察し、卵巢は卵巢内で最も発達の進んだ卵母細胞の発達段階を指標に、雌の成熟度を次の5段階に区分した(Higuchi et al., 2016)。卵母細胞の発達段階は既報(小林・足立, 2002)を参考に特定した。

周辺仁期(Perinucleolar stage, Pn)：第一次成長期の卵母細胞のみが認められる。卵母細胞の細胞質はヘマトキシリンに濃染され、核内には核膜に接してエオシン可染の複数の仁が認められる。

卵黄胞期(Yolk vesicle stage, Yv)：第二次成長の初期段階で、細胞質の周辺部に卵黄胞が散在する卵黄胞期の卵母細胞が認められる。

第一次卵黄球期(Primary yolk stage, Py)：卵黄蓄積が開始され、卵黄球が細胞質周辺部のみにみられる第一次卵黄球期の卵母細胞が認められる。

第二次卵黄球期(Secondary yolk stage, Sy)：卵黄蓄積が進行し、卵黄球が核の周辺までみられる第二次卵黄球期の卵母細胞が認められる。

第三次卵黄球期(Tertiary yolk stage, Ty)：卵黄蓄積がほぼ完了し、卵成熟直前の第三次卵黄球期の卵母細胞が認められる。

精巢は Schulz et al. (2010) の報告に従って生殖腺の発達ステージを判定した。

血中性ステロイド濃度の測定

血漿を 10 倍量のジエチルエーテルで 3 回抽出し、アッセイ緩衝液 (EIA buffer) に溶解した。E2 および 11-KT の測定は市販の ELISA 法による測定キット (Estradiol EIA kit, 11-keto Testosterone EIA kit) を用いて行った。

リアルタイム PCR による遺伝子発現量解析

採取した組織片から ISOGEN II を用いて total RNA を抽出し、Poly(A) Purist MAG kit を用いて mRNA を精製した。得られた mRNA 50 ng を使用し、Omniscript RT kit にて逆転写反応を行った。リアルタイム PCR による遺伝子発現量解析は、TaqMan プローブを用いた相対定量法により定量した。特異的プライマーおよび TaqMan プローブは Primer Express software v. 2.0 を用いて設計し、Integrated DNA Technologies 社から購入した (Table 1)。PCR 反応は、前述の cDNA 溶液 5 μ l を鋳型として、0.5 μ M の各プライマー、0.2 μ M の TaqMan プローブ、10 μ l の FastStart Essential DNA Probes Master、4 μ l の蒸留水を含む 10 μ l の反応混合液中で、95°C で 10 分間熱変性を行った後、一連のサイクル (95°C 10 秒, 58°C 30 秒) を 45 回繰り返した。標的遺伝子の部分配列を組み込んだプラスミド (pGEM-T Easy) を用いて 10 倍希釈ごとに 1×10^8 から 1×10^2 コピーの希釈系列を用いて検量線を作成した。また、EF1 α 遺伝子をリファレンス遺伝子として用いて標準化した 2015 年 1 月 14 日の飽食給餌区の平均値を 1.0 として各試験区の相対発現量を算出した。なお、すべてのサンプルは 2 回試行で解析を行った。また、標的遺伝子が増幅されたかを確認するために、得られた増幅産物のシーケンスを行った。

ホルモン投与および人工授精

2015 年 4 月 21 日に各試験区雌 7 尾を用いて HCG (human chorionic gonadotropin, あ

Table 3 Fork length, body weight, condition factor and daimeter of most advanced oocytes in yellowtail females treated with HCG.

Group	Fork length (cm)	Body weight (kg)	Condition factor	Oocyte daimeter (µm)
Satiation	66.0	6.70	23.3	660
	64.0	6.15	23.5	672
	66.0	6.20	21.6	668
	66.0	7.00	24.3	670
	66.2	7.20	24.8	674
	68.6	8.15	25.2	681
	65.6	6.70	23.7	631
50%	64.2	6.30	23.8	704
	65.2	6.20	22.4	727
	65.4	6.15	22.0	669
	65.3	6.15	22.1	705
	67.6	6.35	20.6	687
	66.5	6.05	20.6	659
	70.2	7.05	20.4	689
25%	65.2	5.15	18.6	667
	65.8	5.65	19.8	630
	68.8	6.40	19.7	605
	69.0	7.10	21.6	679
	64.3	5.15	19.4	686
	63.6	5.80	22.5	703
	67.0	5.55	18.5	665

すか製薬) 投与を行い、排卵を誘導した (Table 3)。HCG は 0.6% NaCl 溶液で溶解し、供試魚への注入量が 600 IU / kg となるように調整して、親魚の背筋部に注射して投与した。HCG を投与した雌は、水温 18°C に調整した角型コンクリート水槽 (容量 90 kl) に収容し、排卵まで養成した。HCG 投与 45 時間後、タモで雌個体を 1 尾ずつ捕獲し、腹部を圧迫することで卵の搾取を行った。得られた卵は直ちに乾導法により人工授精を行った。媒精は、すべての雌個体から得られた卵に対して、飽食給餌区の雄 5 個体から採取した精液を等量ずつ混合して用いた。人工授精により得られた卵は、浮上卵と沈下卵に分離して 1 l メスシリンダーを用いた容積法 (700 粒 / ml) により、浮上卵数、沈下卵数および浮上卵率を算出した。受精率は、人工授精 4 時間後の 16 あるいは 32 細胞期に、浮上卵約 100 粒のうち発生が進んでいる個体の割合で算出した。また、排卵された卵の卵径を測定するとともに (30 粒)、油球が異常分割している個体の割合 (油球異常率) を個体毎に算出した。卵のふ化管理は、人工授精を行った個体別に約 200 粒の浮上卵を UV 殺菌海水が入った 500 ml ポリエチレン製容器に収容して密栓し、UV 殺菌海水が入った 1 kl アルテミアふ化水槽内に浮かべてふ化まで管理した。ふ化管理中は、1 日 2 回ポリエチレン製容器内の海水を半量ずつ交換した。また、エアーストーンによる通気でアルテミアふ化水槽内の海水を攪拌して容器を常時振盪させた。なお、ふ化管理は水温 20°C で行い、各個体に対して 2 個の容器を用いてふ化管理を行った ($n=2$)。受精 80 時間後、各容器にホルマリン原液を 10 ml ずつ添加して試料を固定した後、形態的な異常が認められない正常にふ化した仔魚を計数し、正常ふ化率を算出した。

卵の脂肪酸およびアミノ酸分析

受精卵の粗脂肪は、Folch et al. (1957) の報告に従い、クロロホルム : メタノール混液で抽出して定量した。脂肪酸組成は、Furuita et al. (2014) の報告に従い、三フッ化ホウ素によりメチル化した後、ガスクロマトグラフ (GC-2010, 島津製作所) を用いて分析を行った。

受精卵の遊離アミノ酸組成は、Matsunari et al. (2013)の報告に従い、0.6 N 過塩素酸で抽出した後、高速アミノ酸分析計 (L-8500, 日立ハイテクサイエンス) を用いて分析を行った。

統計処理

得られたデータは一元配置分散分析に処した後、各試験区の間で有意差 ($P < 0.05$) が生じているかを Tukey の多重比較で判定した (GraphPad Prism 6.0 software)。

2-2 結果

2-2-1 成熟開始前の長期間の制限給餌がブリ雌の成熟・産卵に及ぼす影響

成熟開始前の制限給餌が成長に及ぼす影響

供試魚の尾叉長は、試験期間を通してすべての試験区間で有意な差は認められなかった (Fig. 11A)。体重は、50%および25%給餌区で7月から1月までの制限給餌期間を通して低下し、9月以降で飽食給餌区と比較して有意に低くなった (Fig. 11B)。飽食給餌に切り替えた1月以降は、すべての試験区で体重の急激な増加が認められたが、試験終了時には飽食給餌区、50%給餌区および25%給餌区でそれぞれ 6.64 ± 0.16 , 6.25 ± 0.14 および 5.73 ± 0.22 kg となり、25%給餌区で有意に体重が低くなった。肥満度についても体重の変化と同様の傾向が認められ、試験終了時には飽食給餌区、50%給餌区および25%給餌区でそれぞれ 22.7 ± 0.4 , 21.2 ± 0.3 および 19.4 ± 0.4 となり、成熟開始前の制限給餌によって肥満度の有意な低下が認められた (Fig. 11C)。

成熟開始前の制限給餌が卵巣の発達に及ぼす影響

成熟開始前の制限給餌が卵巣の発達に及ぼす影響を組織学的観察により調べた結果を Fig. 12 に示した。1月において、飽食給餌区では卵黄胞期の卵巣を持つ雌が1尾のみ認められたが、成熟開始前に制限給餌を行った試験区ではすべての雌で未熟な周辺仁期

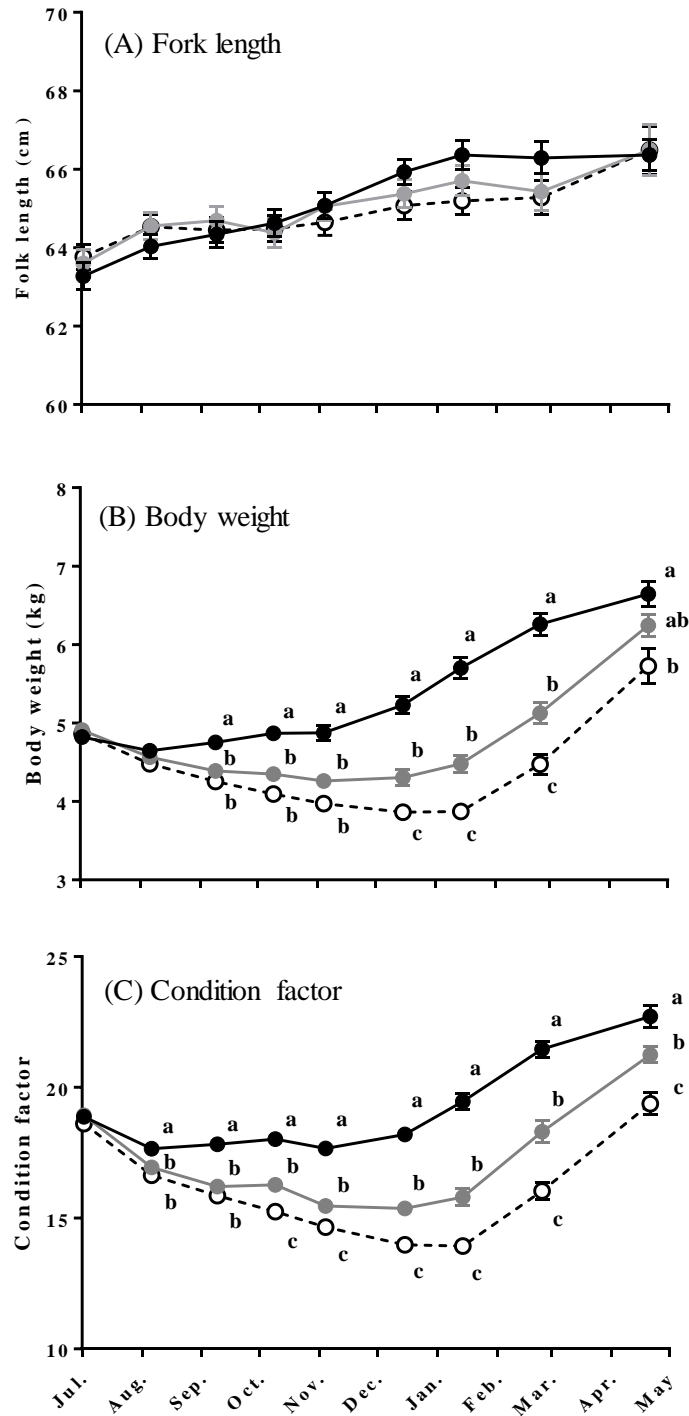


Fig. 11 Changes in fork length (A), body weight (B), and condition factor (C) for the yellowtail females during experimental period. The data represent means \pm SEM ($n = 28$ to 30 fish on November to January, $n = 21$ fish on February, $n = 14$ fish on April). Closed, gray, and open circles indicate satiation, 50%, and 25% feeding group during immature phase (July to December), respectively. Different letters indicate significant differences among each feeding group at particular time point ($P < 0.05$).

の卵巣が認められた。2月において、飽食給餌区では第一次卵黄球期および卵黄胞期の卵巣を持つ雌が多く認められたが、50%給餌区では第一次卵黄球期の卵巣を有する雌の割合が少なく、25%給餌区ではほとんどの雌で周辺仁期の卵巣が認められた。しかし、4月ではすべての試験区の雌で卵黄蓄積を完了した第三次卵黄球期の卵巣が認められた。

成熟開始前の制限給餌が肝臓重量、卵巣重量および最大卵巣卵群の平均卵径に及ぼす影響

肝臓重量は、すべての試験区において1月から4月にかけて増加したが、いずれの測定月においても50%および25%給餌区では飽食給餌区と比較して有意に低くなった (Fig. 13A)。卵巣重量は、すべての試験区において1月以降徐々に増加し、2月から4月にかけて急激に増加して最大となった (Fig. 13B)。2月において、50%および25%給餌区の卵巣重量は飽食給餌区と比較して有意に低くなったが、産卵期である4月ではすべての試験区間で有意な差は認められなかった。最大卵巣卵群の平均卵径は、すべての試験区において1月以降徐々に増加し、2月から4月にかけて急激に増加して最大となった (Fig. 13C)。卵巣重量と同様に、2月において、50%および25%給餌区の平均卵径は飽食給餌区と比較して有意に低くなったが、産卵期である4月ではすべての試験区間で有意な差は認められなかった。

成熟開始前の制限給餌が血中 E2 濃度に及ぼす影響

血中 E2 濃度は、すべての試験区においても11月以降に徐々に増加した後、1月から4月にかけて急激に増加して最大となった (Fig. 14)。1月および2月の血中 E2 濃度は、50%および25%給餌区で飽食給餌区と比較して有意に低くなったが、産卵期である4月の血中 E2 濃度は各試験区間で有意な差が認められなかった。

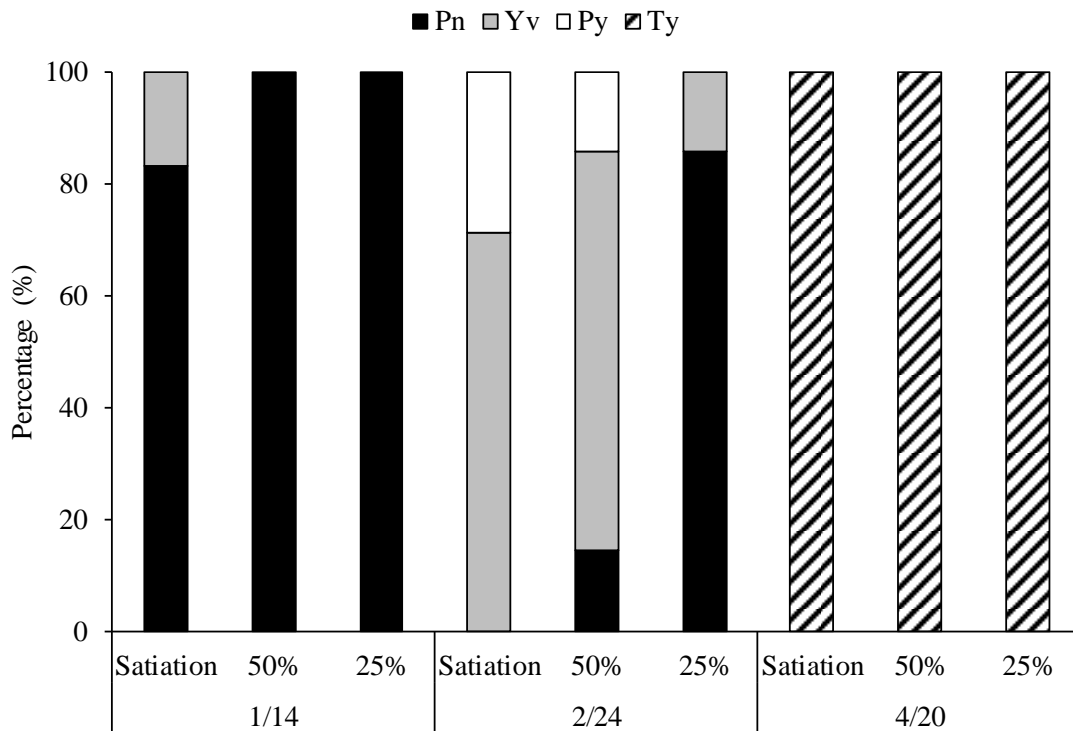


Fig. 12 Changes in ovarian developmental stages in yellowtail females maintained under restricted feeding protocols during immature phase over six months ($n = 7$ fish at particular time point). Female maturity was classified into the perinucleolar stage (Pn), yolk vesicle stage (Yv), primary yolk stage (Py) and tertiary yolk stage (Ty) according to the most advanced type of oocytes found.

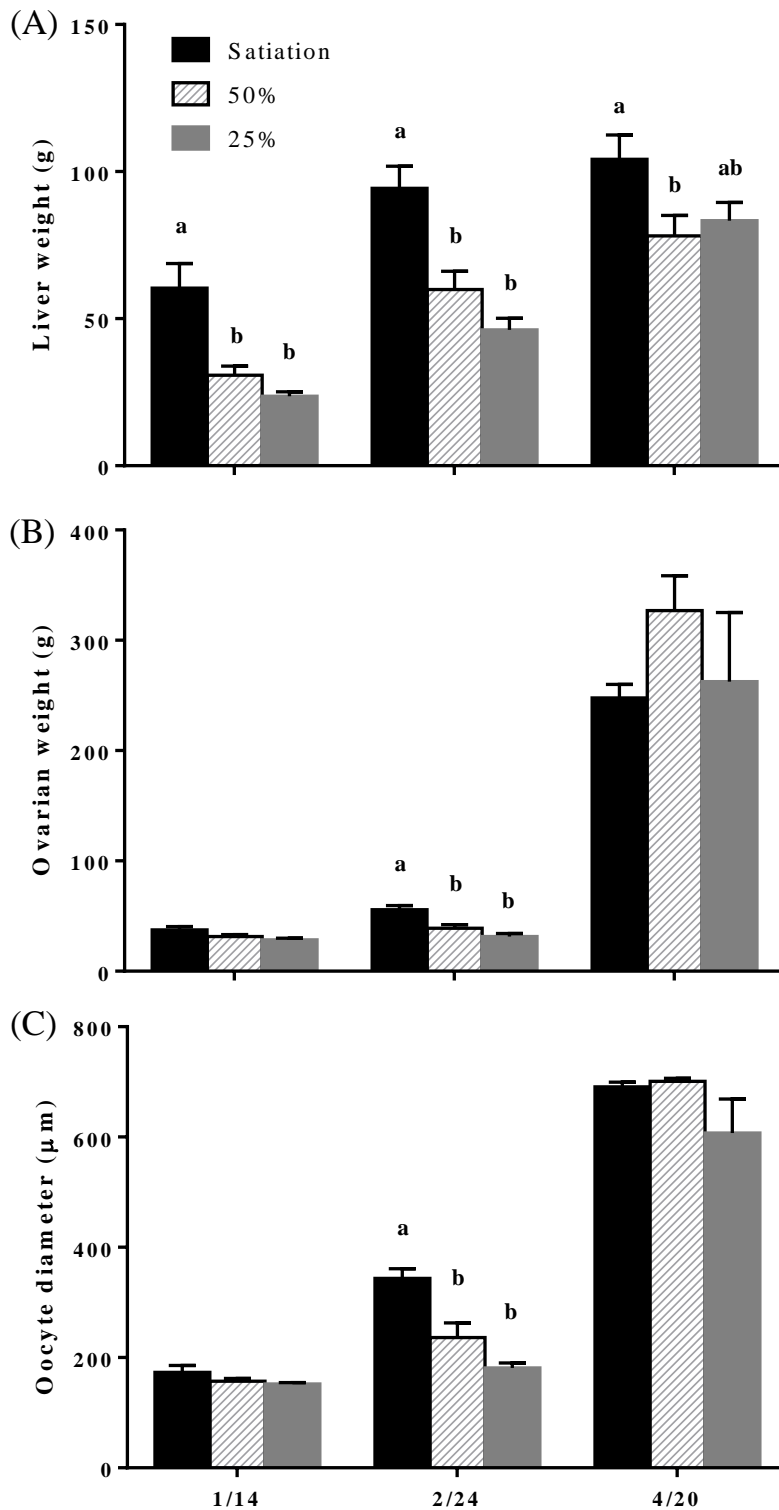


Fig. 13 Profile of liver weight (A), ovary weight (B), and mean diameter of most advanced oocytes (C) in yellowtail females maintained under restricted feeding protocols during immature phase over six months. The data represent means \pm SEM ($n = 7$ fish at particular time point). Different letters indicate significant differences among each feeding group at particular time point ($P < 0.05$).

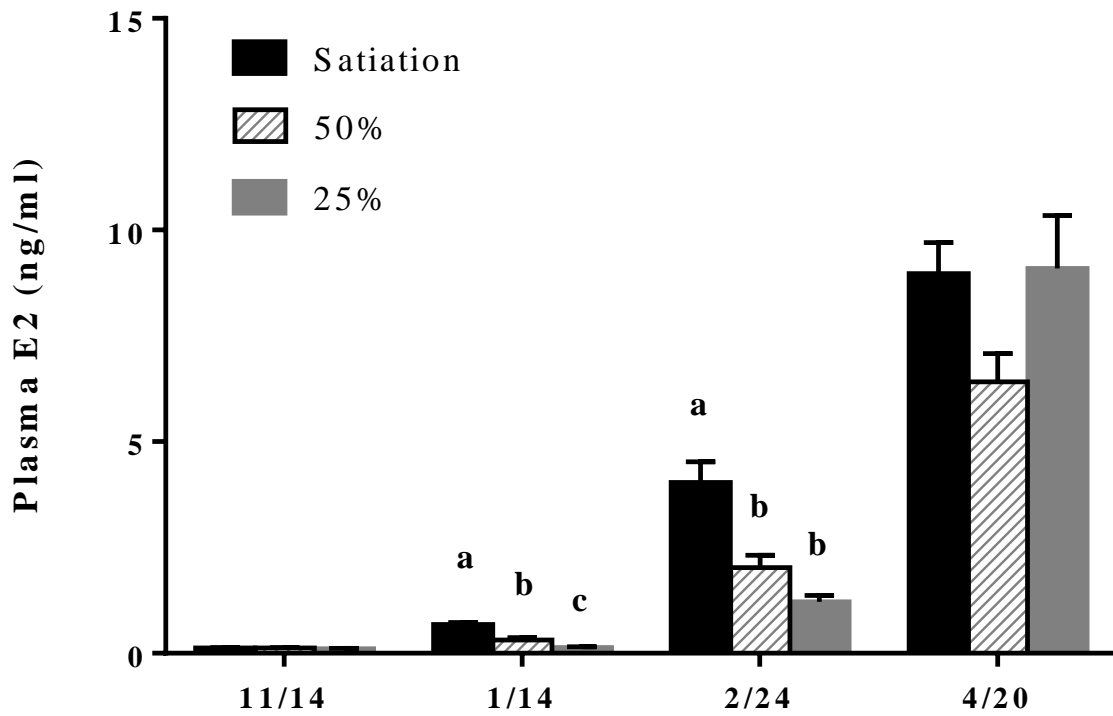


Fig. 14 Profile of plasma estradiol-17 β (E2) levels in yellowtail females maintained under restricted feeding protocols during immature phase over six months. The data represent means \pm SEM ($n = 28$ fish on 11/14, $n = 21$ fish on 1/14 and 2/24, $n = 14$ on 4/20). Different letters indicate significant differences among each feeding group at particular time point ($P < 0.05$).

成熟開始前の制限給餌が脳下垂体の生殖腺刺激ホルモン β サブユニット遺伝子発現に及ぼす影響

脳下垂体における FSH および LH β 遺伝子の発現量は、すべての試験区においても 1 月から 4 月にかけて増加し、産卵期となる 4 月に最大となった (Fig. 15)。1 月の FSH および LH β 遺伝子の発現量は、50%および 25%給餌区で飽食給餌区と比較して有意に低くなったが、2 月および 4 月の遺伝子発現量は各試験区間で有意な差は認められなかった。

成熟開始前の制限給餌が卵巣のステロイド代謝酵素群の遺伝子発現に及ぼす影響

卵巣における P450 $_{scc}$, P450 $_{c17}$ および P450 $_{arom}$ 遺伝子の発現量は、すべての試験区においても 1 月から 4 月にかけて増加し、産卵期となる 4 月に最大となった (Fig. 16)。1 月の P450 $_{scc}$ および P450 $_{arom}$ 遺伝子の発現量は、50%および 25%給餌区で飽食給餌区と比較して有意に低くなり、引き続き 2 月のステロイド代謝酵素遺伝子の発現量においても、50%および 25%給餌区で飽食給餌区よりも低くなる傾向が認められた。しかし、産卵期である 4 月では、25%給餌区の P450 $_{c17}$ および P450 $_{arom}$ 遺伝子発現量が他の試験区と比較して有意に高くなった。

成熟開始前の制限給餌が採卵数、卵径、浮上卵率、受精率、油球異常率およびふ化率に及ぼす影響

各試験区における得られた卵数、浮上卵率、受精率およびふ化率を Fig. 17 に示した。1 尾当たりの採卵数は、飽食給餌区、50%給餌区および 25%給餌区でそれぞれ 227.5 ± 55.1 , 390 ± 86.3 および 237.5 ± 47.3 千粒であり、各試験区間で有意な差は認められなかった。浮上卵率は、飽食給餌区、50%給餌区および 25%給餌区でそれぞれ 92.7 ± 2.6 , 87.3 ± 7.3 および $87.4 \pm 2.3\%$ といずれの試験区も高く、各試験区間で有意な差は認められなかった。受精率は、飽食給餌区、50%給餌区および 25%給餌区でそれぞれ 78.2 ± 4.5 ,

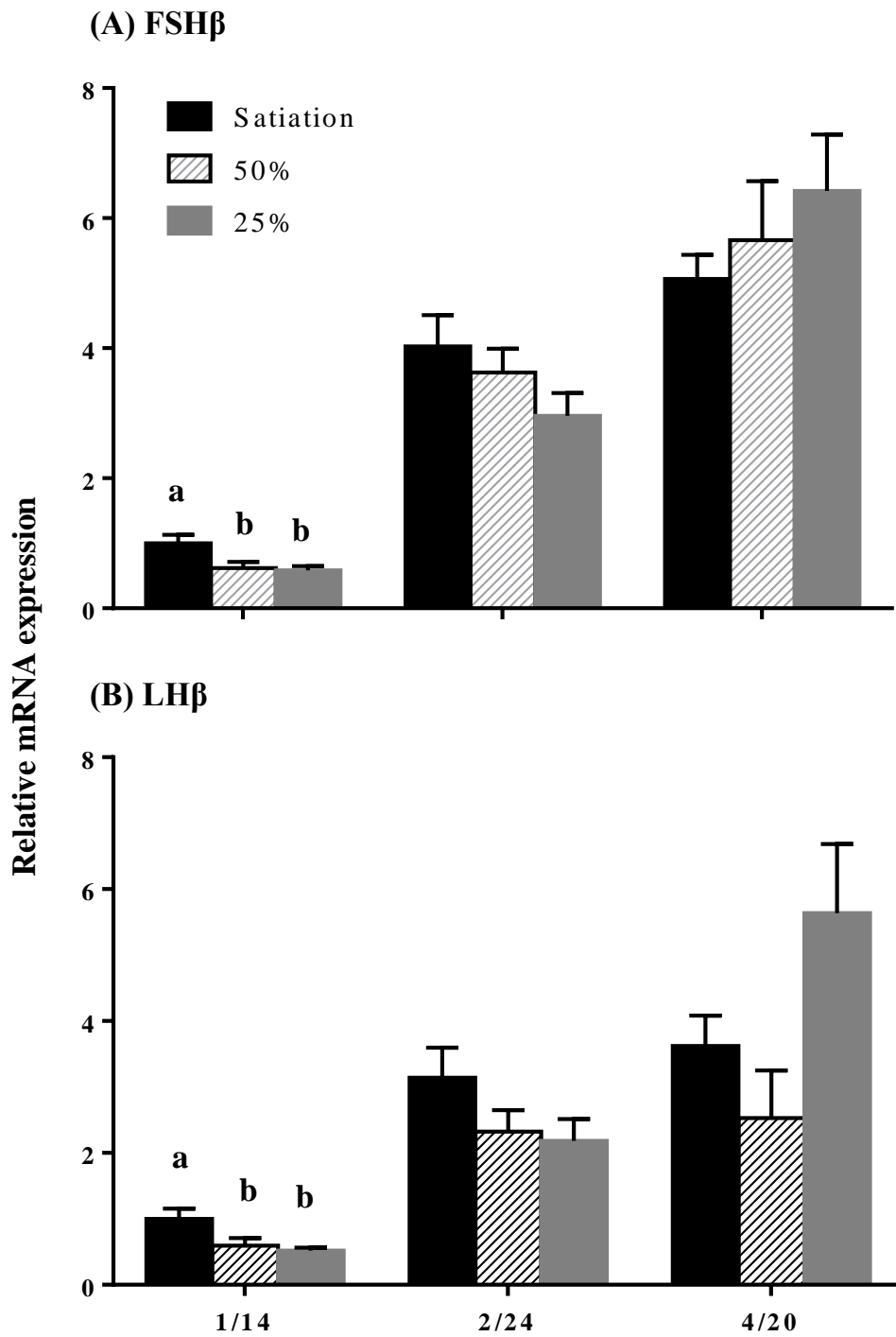


Fig. 15 Changes in pituitary transcripts of FSH β (A) and LH β gene (B) in yellowtail females maintained under restricted feeding protocols during immature phase over six months. The data represent means \pm SEM ($n = 7$ fish). Different letters indicate significant differences among each feeding group at particular time point ($P < 0.05$).

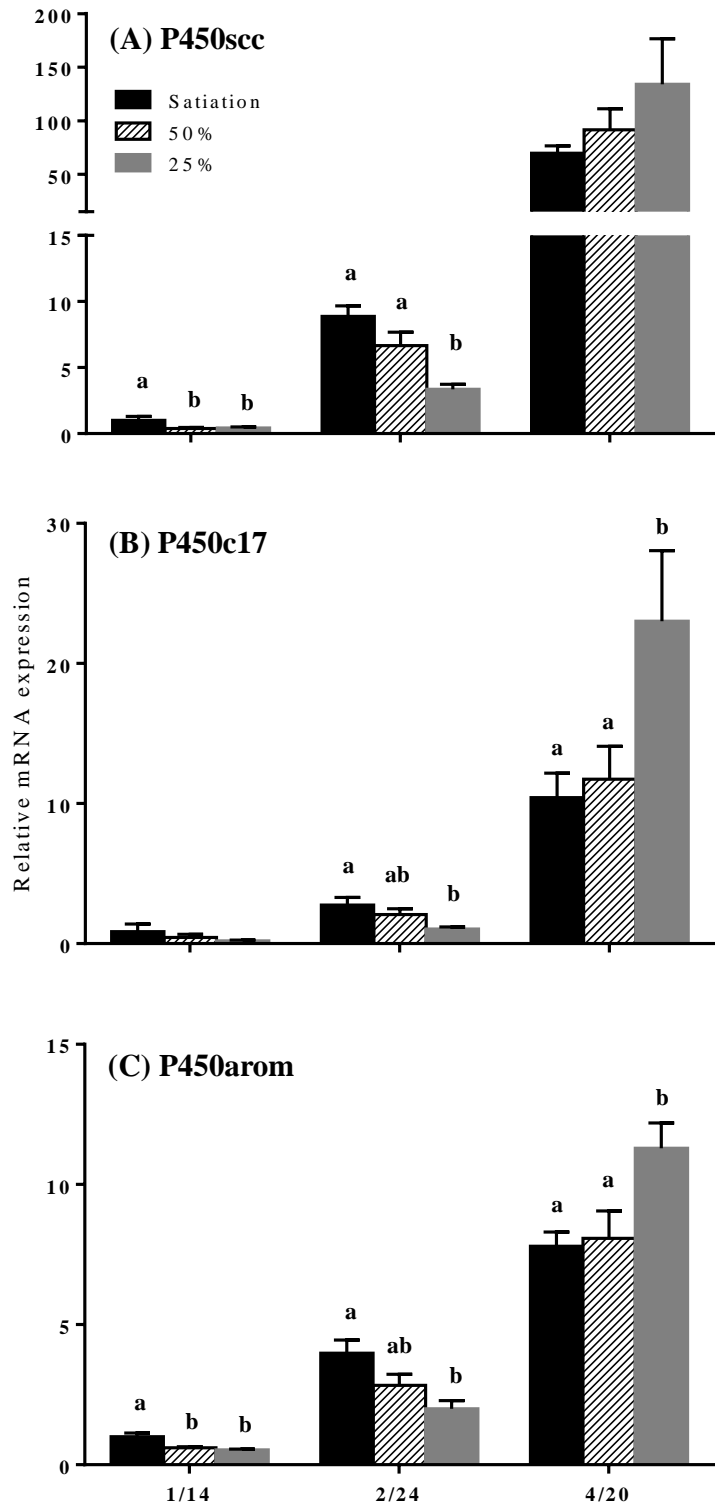


Fig. 16 Changes in ovarian transcripts of P450scc (A), P450c17 (B) and P450arom gene (C) in yellowtail females maintained under restricted feeding protocols during immature phase over six months. The data represent means \pm SEM ($n = 7$ fish). Different letters indicate significant differences among each feeding group at particular time point ($P < 0.05$).

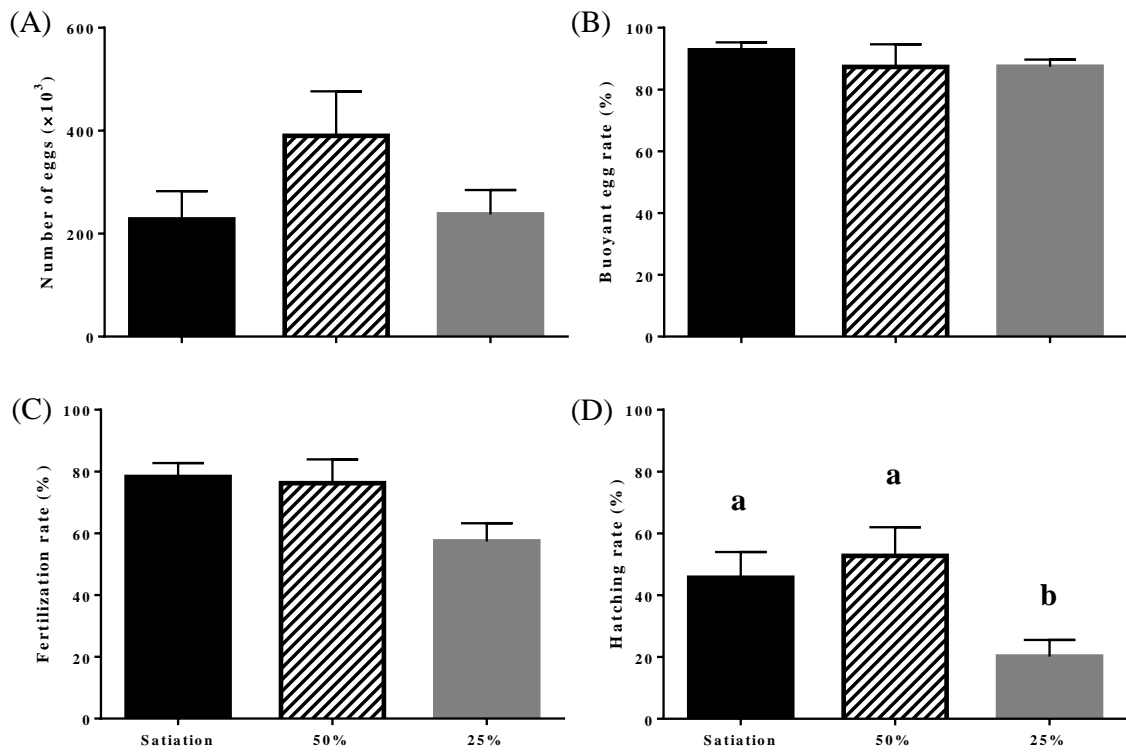


Fig. 17 Effects of restricted feeding during immature phase over six months on number of ovulated eggs (A), buoyant egg rate (B), fertilization rate (C), and hatching rate (D) in yellowtail females. The data represent means \pm SEM ($n = 7$ fish). Different letters indicate significant differences among each feeding group ($P < 0.05$).

76.2 ± 7.7 および 57.4 ± 5.9% であり、25%給餌区のみで低くなる傾向が認められた。ふ化率は、飽食給餌区、50%給餌区および 25%給餌区でそれぞれ 45.6 ± 8.3, 52.7 ± 9.3 および 20.1 ± 5.4% であり、25%給餌区のみで有意に低くなった。

得られた受精卵の油球異常率は、飽食給餌区、50%給餌区および 25%給餌区でそれぞれ 15.5 ± 6.8, 2.3 ± 1.9 および 1.9 ± 0.7% であり、有意差は認められなかったものの、飽食給餌区で高くなる傾向が認められた (Fig. 18)。

得られた受精卵の卵径は、飽食給餌区、50%給餌区および 25%給餌区でそれぞれ 1226.4 ± 7.4, 1205.8 ± 11.5 および 1192.1 ± 6.2 μm であり、25%給餌区のみで有意に小さくなった (Fig. 19)。

成熟開始前の制限給餌が卵の脂肪酸およびアミノ酸組成に及ぼす影響

得られた受精卵の水分含量および粗脂肪含量において、各試験区間で有意な差は認められなかった (Table 4)。また、脂肪酸およびアミノ酸組成を調べたところ、各試験区間で有意な差は認められず、成熟開始前の制限給餌が受精卵の脂肪酸およびアミノ酸組成に及ぼす影響は見られなかった (Table 5 および 6)。

2-2-2 成熟開始前の長期間の制限給餌がブリ雄の成熟に及ぼす影響

成熟開始前の制限給餌がブリ雄の成長に及ぼす影響

供試魚の尾叉長は、12 および 2 月において 50% および 25% 給餌区で飽食給餌区と比較して有意に小さかったが、試験終了時ではすべての試験区間で有意な差は認められなかった (Fig. 20A)。体重は、50% および 25% 給餌区で 7 月から 1 月までの制限給餌期間を通して低下し、50% 給餌区では 9 月以降、25% 給餌区では 8 月以降で飽食給餌区と比較して有意に低くなった (Fig. 20B)。飽食給餌に切り替えた 1 月以降は、すべての試験区で体重の急激な増加が認められたが、試験終了時には飽食給餌区、50% 給餌区および 25% 給餌区でそれぞれ 7.06 ± 0.19, 6.18 ± 0.20 および 5.71 ± 0.15 kg となり、成熟開始前

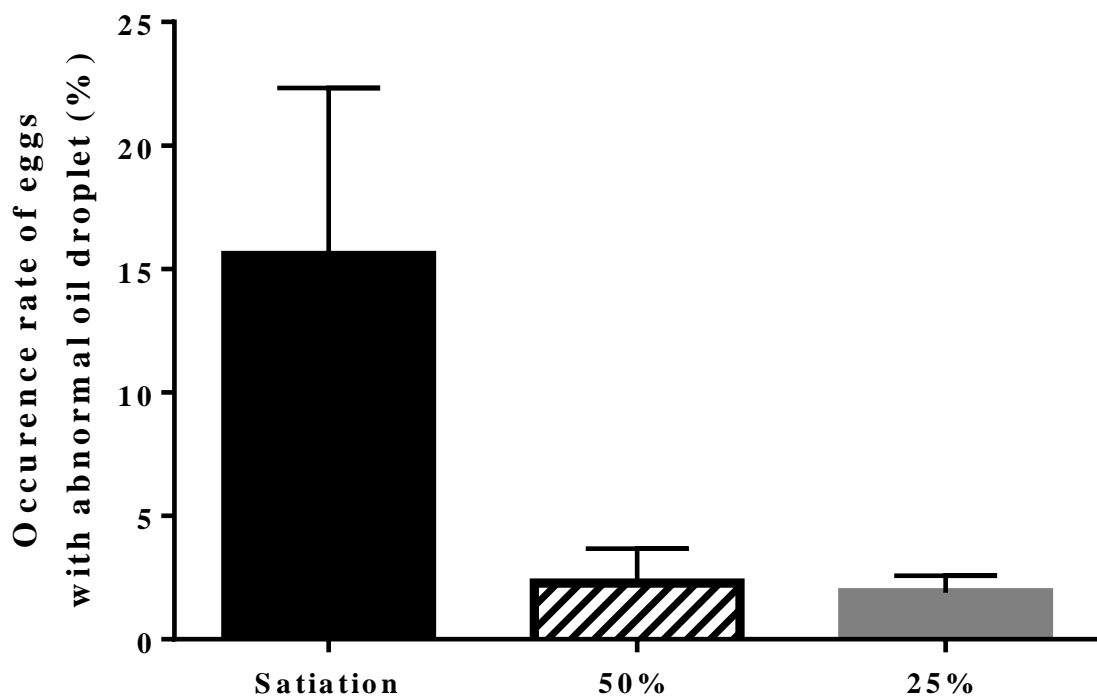


Fig. 18 Effects of restricted feeding during immature phase over six months on occurrence rate of ovulated eggs with abnormal oil droplet in yellowtail females. The data represent means \pm SEM ($n = 7$ fish). Different letters indicate significant differences among each feeding group ($P < 0.05$).

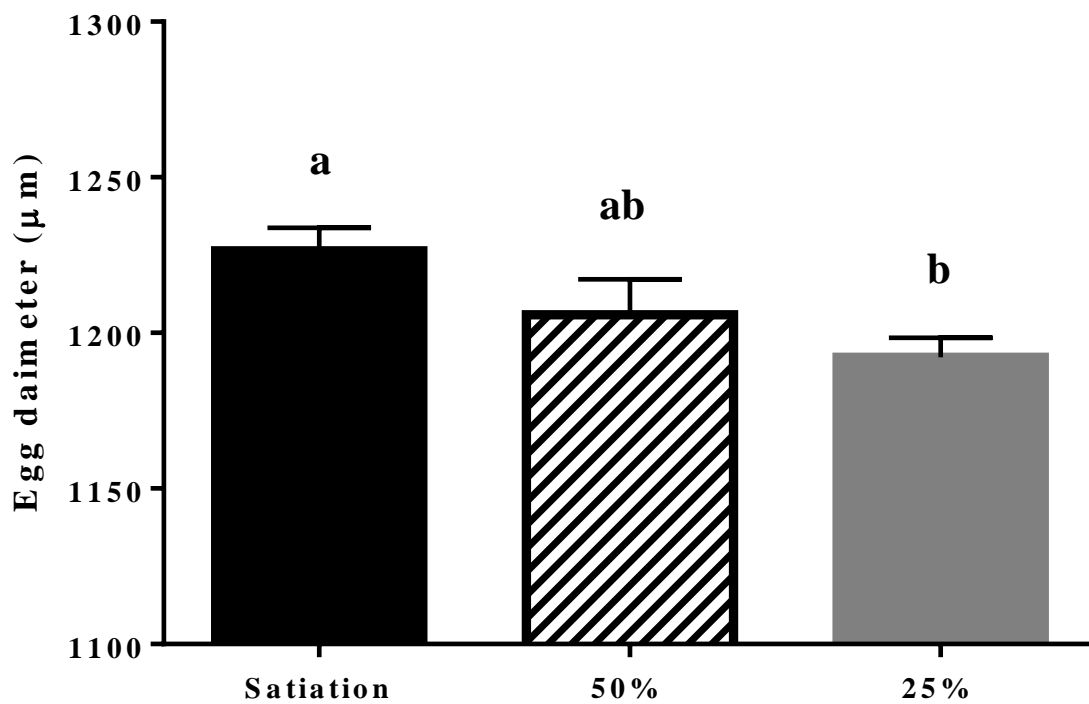


Fig. 19 Effects of restricted feeding during immature phase over six months on mean diameter of ovulated eggs in yellowtail females. The data represent means \pm SEM ($n = 7$ fish). Different letters indicate significant differences among each feeding group ($P < 0.05$).

Table 4 Moisture and crude fat composition of ovulated eggs (Mean \pm standard error).

	Feeding regime		
	Satiation	50%	25%
Moisture (%)	91.6 \pm 0.1	91.8 \pm 0.1	91.8 \pm 0.1
Crude fat (%)	1.87 \pm 0.02	1.78 \pm 0.05	1.83 \pm 0.05
n	7	7	7

Table 5 Fatty acid composition of ovulated eggs (Mean \pm standard error).

	Feeding regime		
	Satiation	50%	25%
Crude fat (g/100g of dry weight)	22.4 \pm 0.4	21.8 \pm 0.6	22.4 \pm 0.8
Fatty acid (area, %)			
18:1	19.45 \pm 0.12	19.46 \pm 0.39	19.68 \pm 0.18
18:2n-6	6.96 \pm 0.13	5.32 \pm 0.86	6.72 \pm 0.12
18:3n-3	0.83 \pm 0.01	0.66 \pm 0.11	0.85 \pm 0.01
20:4n-6	1.37 \pm 0.03	1.48 \pm 0.03	1.42 \pm 0.01
20:5n-3	4.34 \pm 0.07	4.69 \pm 0.07	4.57 \pm 0.08
22:5n-3	1.57 \pm 0.04	1.90 \pm 0.07	1.72 \pm 0.06
22:6n-3	17.69 \pm 0.28	19.09 \pm 0.51	17.84 \pm 0.15
Σ n-3HUFA	24.10 \pm 0.34	26.21 \pm 0.56	24.66 \pm 0.25
Fatty acid (% of dry weight)			
22:5n-3	0.97 \pm 0.02	1.02 \pm 0.02	1.03 \pm 0.04
22:6n-3	3.95 \pm 0.08	4.16 \pm 0.13	4.00 \pm 0.02
Σ n-3HUFA	5.39 \pm 0.10	5.71 \pm 0.17	5.53 \pm 0.23
n	7	7	7

Table 6 Amino acid composition of ovulated eggs (Mean \pm standard error).

Amino acid (mg/g, dry of weight)	Feeding regime		
	Satiation	50%	25%
Tryptophan	1.43 \pm 0.10	1.73 \pm 0.22	1.61 \pm 0.11
Phenylalanine	8.21 \pm 0.11	8.15 \pm 0.23	7.94 \pm 0.31
Leucine	19.61 \pm 0.35	20.11 \pm 0.93	19.81 \pm 0.81
Lysine	15.16 \pm 0.20	15.50 \pm 0.59	15.52 \pm 0.67
Threonine	7.80 \pm 0.24	7.98 \pm 0.23	8.05 \pm 0.34
Isoleucine	12.25 \pm 0.29	12.78 \pm 0.55	12.60 \pm 0.68
Methionine	4.81 \pm 0.15	5.32 \pm 0.41	4.00 \pm 0.63
Valine	10.50 \pm 0.25	10.91 \pm 0.56	10.70 \pm 0.48
Histidine	4.39 \pm 0.06	4.53 \pm 0.17	4.43 \pm 0.21
Arginine	10.50 \pm 0.25	10.91 \pm 0.56	10.70 \pm 0.48
Taurine	4.86 \pm 0.10	4.89 \pm 0.30	5.17 \pm 0.29
Alanine	13.33 \pm 0.33	13.75 \pm 0.52	13.63 \pm 0.57
Glycine	3.66 \pm 0.05	3.90 \pm 0.15	3.73 \pm 0.16
Glutamic acid	3.57 \pm 0.22	4.05 \pm 0.28	3.99 \pm 0.35
Serine	13.33 \pm 0.34	14.03 \pm 0.41	13.88 \pm 0.75
Aspartic acid	0.89 \pm 0.06	1.05 \pm 0.09	1.00 \pm 0.12
Asparagine	11.21 \pm 0.16	11.77 \pm 0.40	11.66 \pm 0.66
Proline	3.40 \pm 0.27	3.37 \pm 0.26	4.04 \pm 0.30
Tyrosine	7.26 \pm 0.22	7.85 \pm 0.22	7.26 \pm 0.39
n	7	7	7

の制限給餌によって体重の増加が有意に抑制された。肥満度についても体重の変化と同様の傾向が認められ、試験終了時には飽食給餌区、50%給餌区および25%給餌区でそれぞれ 22.8 ± 0.4 、 21.7 ± 0.7 および 20.0 ± 0.5 となり、25%給餌区で飽食給餌区と比較して肥満度の有意な低下が認められた (Fig. 20C)。

成熟開始前の制限給餌が肝臓重量および精巣重量に及ぼす影響

試験終了時の肝臓重量は、飽食給餌区、50%および25%給餌区でそれぞれ 113.5 ± 19.4 、 80.7 ± 10.5 および 56.7 ± 4.4 g となり、25%給餌区で飽食給餌区と比較して有意に低下した (Fig. 21A)。

試験終了時の精巣重量は、飽食給餌区、50%および25%給餌区でそれぞれ 354.2 ± 18.4 、 350.7 ± 24.6 および 434.9 ± 65.9 g となり、すべての試験区間で有意な差は認められなかった (Fig. 21B)。

成熟開始前の制限給餌が血中 11-KT 濃度に及ぼす影響

血中 11-KT 濃度は、すべての試験区においても11月から2月にかけて増加して最大となり、産卵期である4月にやや低下した (Fig. 22)。1月の血中 11-KT 濃度は、50%および25%給餌区で飽食給餌区と比較して有意に低くなったが、2および4月の血中 11-KT 濃度は各試験区間で有意な差は認められなかった。

2-3 考察

2-3-1 成熟開始前の長期間の制限給餌がブリ雌の成熟・産卵に及ぼす影響

本研究において、成熟開始前に制限給餌を行った場合でも、産卵期における卵巣の発達ステージ、卵巣重量および最大卵巣卵群の平均卵径は飽食給餌を行った場合と比較して全く変化が認められなかった。また、卵巣で産生される E2 は血流を介して肝臓に作用し、卵黄タンパク質前駆体 (ビテロジェニン) の合成を促進することで卵形成を促す

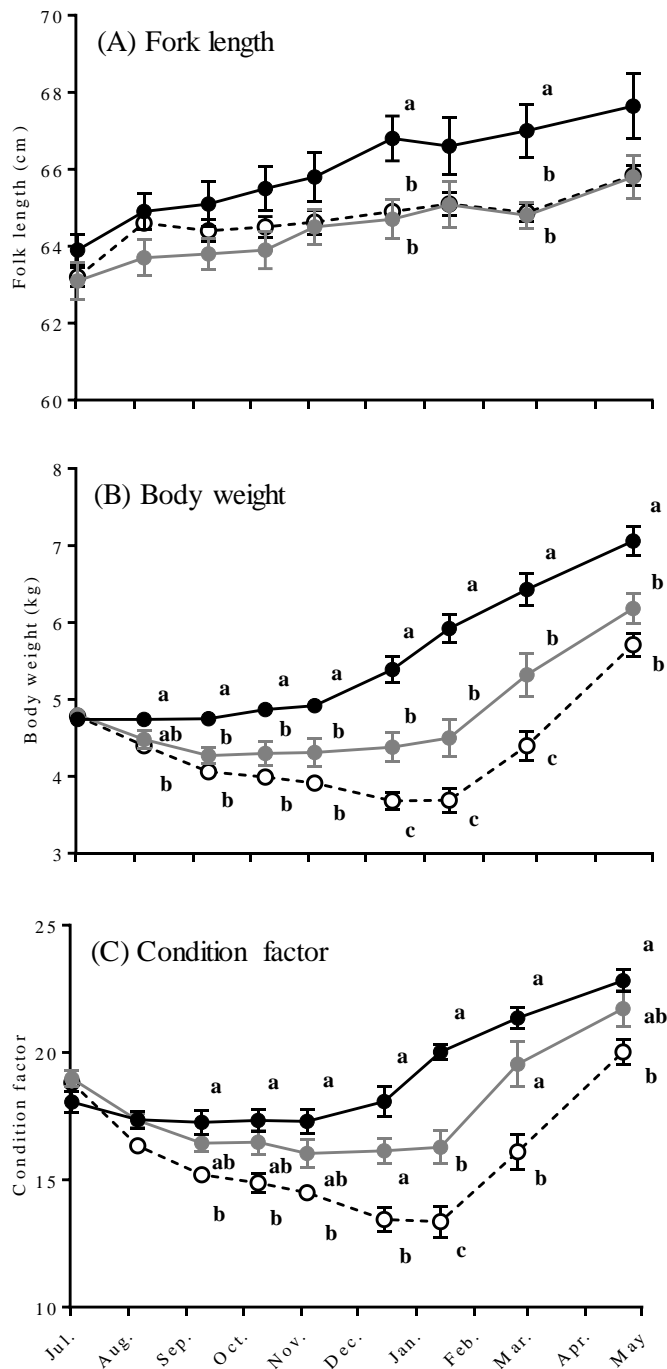


Fig. 20 Changes in fork length (A), body weight (B), and condition factor (C) for the yellowtail males during experimental period. The data represent means \pm SEM ($n = 5$ fish). Closed, gray, and open circles indicate satiation, 50%, and 25% feeding group during immature phase (July to December), respectively. Different letters indicate significant differences among each feeding group at particular time point ($P < 0.05$).

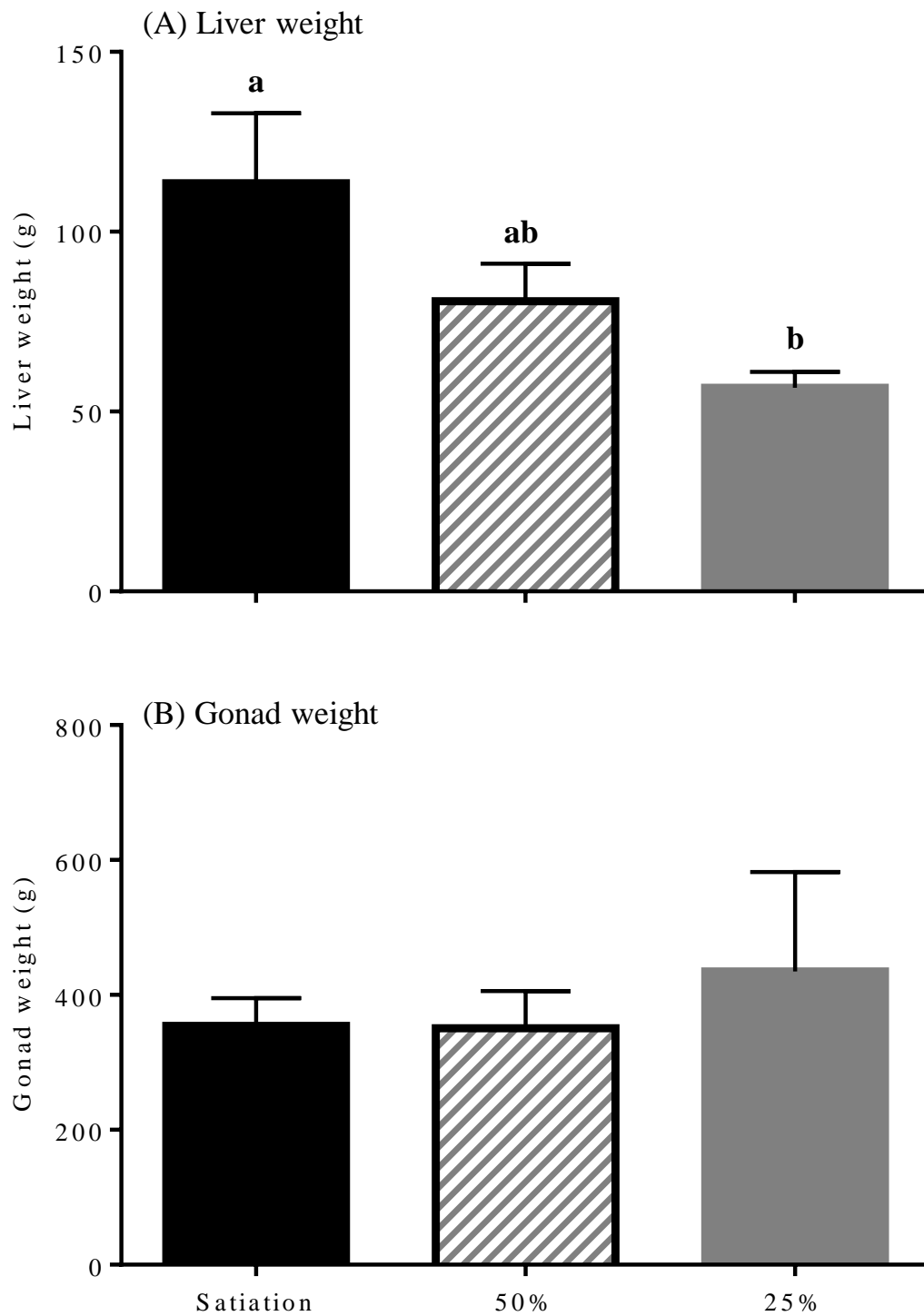


Fig. 21 Profile of liver weight (A) and testis weight (B) at spawning period in yellowtail males maintained under restricted feeding protocols during immature phase over six months. The data represent means \pm SEM ($n = 5$ fish). Different letters indicate significant differences among each feeding group ($P < 0.05$).

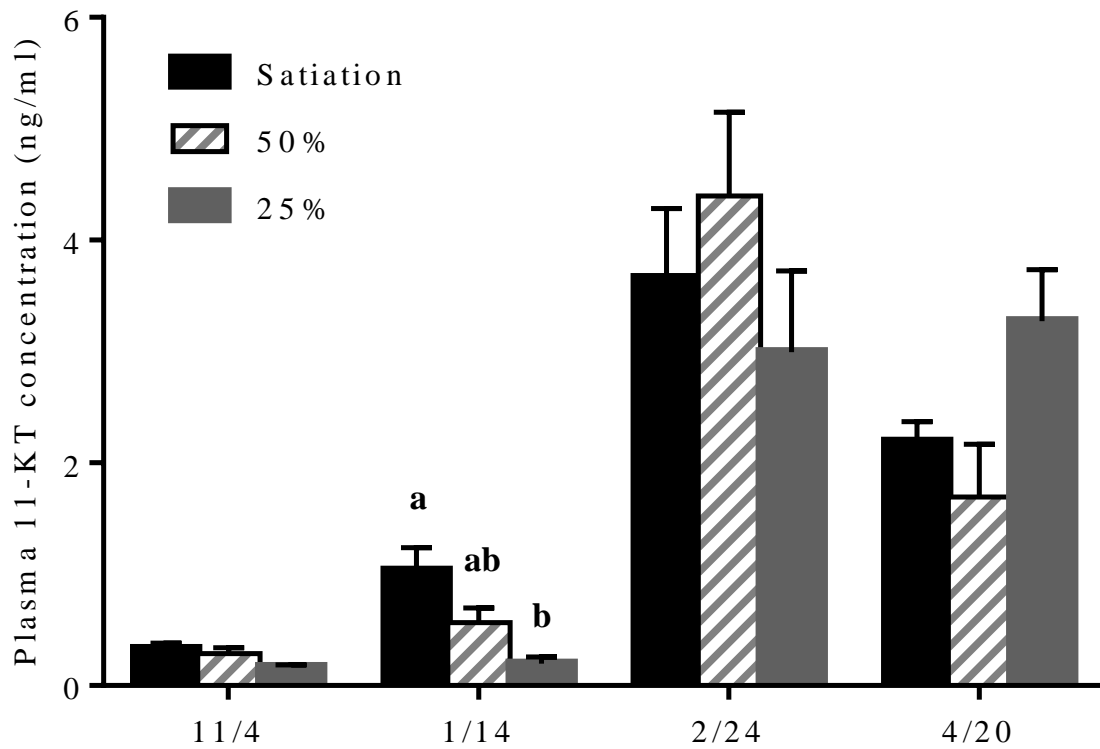


Fig. 22 Profile of plasma 11-ketotestosterone (11-KT) levels in yellowtail males maintained under restricted feeding protocols during immature phase over six months. The data represent means \pm SEM ($n = 5$ fish each). Different letters indicate significant differences among each feeding group at particular time point ($P < 0.05$).

主要なホルモンであるが (Lubzens et al., 2010), 産卵期における各試験区間の血中 E2 濃度に変化が認められなかった。これらの結果は, 成熟開始前に長期間の制限給餌を行っても, 卵形成が進行する成熟期に十分な給餌を行えば, 正常な卵形成の誘導が可能であることを示している。第 1 節で述べたように, ブリのように 1 年に複数回の産卵を行う非同期発達型の産卵様式を持つ魚類は, 成熟・産卵中に摂取したエネルギー, すなわち親魚の栄養状態に依存して卵を生産する性質が強い (income breeder) (栗田, 2010)。実際に, 第 1 節の実験において, 卵形成が進行する 2~4 月の成熟期に制限給餌を行った場合に卵巣の発達が抑制されたのに対して, 成熟が開始される直前となる 11~1 月に制限給餌を行った場合では, その後の成熟の進行には全く影響が認められなかった。したがって, 本研究の結果から, 成熟開始前の 6 か月間にわたる長期間大幅な給餌量の削減を行った場合でも, 卵形成が進行する成熟期の十分な給餌によって速やかに卵形成が再開され, 正常な卵形成が進行することが明らかになった。

これまでの研究から, ブリの卵形成は冬至後の 1 から 2 月にかけて開始されることが明らかとなっている (泉田ら, 未発表)。本研究において, 成熟開始前に制限給餌を行った試験区では飽食給餌区と比較して 2 月における卵巣の発達が遅延したことに加えて, 卵巣重量および最大卵巣卵群の平均卵径が有意に小さくなった。また, 成熟開始前に制限給餌を行った試験区では, 1 および 2 月の血中 E2 濃度が飽食給餌区と比較して有意に低下した。さらに, 成熟開始前に制限給餌を行った試験区では, 1 月の FSH および LH β サブユニット遺伝子, 1 および 2 月のステロイド代謝酵素群の遺伝子が飽食給餌区と比較して有意に低かった。一般に, 魚類を含む脊椎動物では, 脳下垂体で産生される 2 種類の生殖腺刺激ホルモン (FSH および LH) が血流を介して卵巣の濾胞細胞に作用し, ステロイド代謝酵素群を活性化することで E2 合成を促している (Lubzens et al., 2010)。以上の結果から, 成熟開始前の長期間の制限給餌が脳下垂体における FSH および LH β 遺伝子発現に影響を及ぼした結果, 卵形成の開始が遅延したと考えられ, 成熟開始前の親魚の栄養状態が生殖腺刺激ホルモンの合成, ひいては, 成熟の開始に重要で

あることを示唆している。これまでに多くの魚種において、親魚の栄養状態と初回成熟の関係について研究が行われてきた (Taranger et al., 2010)。サケ類を用いた研究では、成熟開始前の制限給餌によって成長や脂肪の蓄積が抑制されるとともに、初回成熟年齢が高くなることが報告されており、親魚の栄養状態は成熟の開始に重要な要素であることが明らかとなっている (Shearer et al., 2006)。また、ヨーロッパシーバス (*Dicentrarchus labrax*) を用いた研究では、精子形成が開始される半年前から産卵期までの9か月間に飽食量に対して25%および12.5%量の給餌を行った場合、精子形成の開始が遅延したことを報告している (Escobar et al., 2014)。上述の魚種は同期発達型の産卵様式を持ち、卵形成が開始される前に魚体に蓄積した栄養を用いて卵を生産する性質が強い (capital breeder) が、非同期発達型の産卵様式を持つブリにおいても、成熟開始前に制限給餌によって初回成熟雌の卵形成を完全に抑制できることが明らかとなっている (Miura et al., 2014)。本研究では、一度成熟・産卵を経験した経産親魚において初回成熟魚と同じような現象が認められたことから、経産親魚においても成熟の開始には体内の栄養状態が重要であると考えられる。

成熟開始前の制限給餌が産卵に及ぼす影響を調べたところ、各試験区間で採卵量、浮上卵率および受精率に差が認められなかったが、25%給餌区のみでふ化率が有意に低下した。また、いくつかの魚種において、受精卵径の大きい卵からは栄養分をより多く含む大型の仔魚が得られることが明らかとなっており、結果として高い成長および生残を示すことが報告されている (Chambers and Waiwood, 1996; Rideout et al., 2005)。本研究において、25%給餌区で得られた受精卵の直径は飽食給餌区と比較して有意に小さかった。したがって、これらの結果は成熟開始前の過剰な制限給餌が卵の質に悪影響を及ぼす可能性があることを示している。これまでに、卵における特定の脂肪酸およびアミノ酸含量がふ化仔魚の生残および成長と相関していることが報告されており、これらの生化学的な要素は卵の質を評価するための指標とされている (Ronnestad and Fyhn, 1993; Bell and Sargent, 2003; Tveiten et al., 2004)。特に、胚体の発達や仔魚の成長にはドコサヘキサ

エン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA), アラキドン酸 (AA) といった不飽和脂肪酸が非常に重要であること (Almansa et al., 1999; Salze et al., 2005), DHA, EPA および AA 含量のバランスが重要であること等が報告されている (Bell and Sargent, 2003)。しかし, 本研究において, 得られた卵の脂肪酸およびアミノ酸組成には各試験区間で差は全く認められなかった。一方で, 上述のように, 成熟開始前に制限給餌を行った試験区では, 飽食給餌を行った試験区と比較して卵形成の開始が遅延したにもかかわらず, 産卵期の卵巣重量や血中 E2 濃度を指標とした成熟度合いは飽食給餌区と同等であった。これらの結果は, 成熟開始前に制限給餌を行った場合でも, 成熟期の十分や給餌によって短期間で急激に卵形成が進行したことを示している。特に, 25%給餌区では, 産卵期においてステロイド代謝酵素遺伝子の高い発現が認められたことから, 卵形成に不可欠な性ステロイドを短期間で多量に合成したと考えられる。以上の結果から, 25%給餌区における卵質の低下は, 卵に含まれる栄養成分の違いではなく, 卵形成の急激な進行によって生じた可能性が考えられた。

飽食給餌区において, 得られた受精卵の油球異常率が他の試験区と比較して高い傾向が認められた。これまでの研究から, 油球異常率は卵の質を評価する指標の一つとして考えられている。例えば, マアジ (*Trachurus japonicus*) やカンパチを用いた研究では, ホルモン投与によって人為的に成熟や産卵を誘導した場合に, 複数の油球を持つ卵が多く認められ, その後のふ化率や仔魚の生残率が低いことが報告されていることから, 油球異常の卵は異常卵とされている (青海・北島, 1980; 土津井ら, 1979)。また, 水槽内で自然産卵されたマダイ卵においても油球異常卵が認められる場合が報告されているが, これらの浮上卵率やふ化率は低く, そのふ化仔魚の多くには脊索の屈曲が認められている (清野, 1974)。したがって, 正常ふ化率が高かった飽食給餌区と 50%給餌区では, 飽食給餌区の方が 50%給餌区と比較しての卵の質が劣ると考えられ, 必要以上の給餌は卵の質を低下させる可能性があることが示唆された。今後は, 得られた仔魚を用いて種苗生産試験を行い, 給餌量が仔魚の成長や生残に及ぼす影響を調べる必要があるだ

ろう。

2-3-2 成熟開始前の長期間の制限給餌がブリ雄の成熟に及ぼす影響

本研究において、成熟開始前に制限給餌を行った場合でも、産卵期における精巣の発達ステージおよび精巣重量は飽食給餌を行った場合と比較して全く変化が認められなかった。また、精巣で産生される 11-KT は精巣内に存在する最も未分化の雄性生殖細胞（精原細胞）の増殖を促進することで精子形成を誘導する主要なホルモンであるが（Schulz et al., 2010）、産卵期における各試験区間の血中 11-KT 濃度に変化は認められなかった。これらの結果は、成熟開始前に長期間の制限給餌を行い栄養状態が低下した場合でも、精子形成が進行する成熟期に十分な給餌を行えば、正常な精巣の発達を誘導可能であることを示している。上述で述べたように、ブリのように 1 年に複数回の産卵を行う非同期発達型の産卵様式を持つ魚類は、成熟・産卵中に摂取したエネルギーに依存して卵を生産する性質が強い（income breeder）（栗田，2010）。実際に、第 1 節の結果から、2～4 月の成熟期に制限給餌を行った場合に精巣の発達が抑制されたのに対して、成熟が開始される直前となる 11～1 月に制限給餌を行った場合では、その後の成熟の進行に全く影響が認められなかった。したがって、成熟開始前に 6 か月にわたる長期間大幅な給餌量の削減を行った場合でも、精巣が発達する成熟期の十分な給餌によって精子形成が再開され、正常に進行することが明らかとなった。

成熟開始前に制限給餌を行った試験区では、1 月の血中 11-KT 濃度が飽食給餌区と比較して有意に低下した。これまでの研究から、ブリの精子形成は冬至後の 1 から 2 月にかけて開始されることが明らかとなっている（Higuchi et al., 2016）。また、上述の通り、11-KT は精巣内に存在する精原細胞の増殖を促進することで、精子形成の開始を誘導することが知られており、ブリにおいても同様の内分泌的役割を担っていると推察されている（Higuchi et al., 2016）。したがって、これらの結果は、成熟開始前の制限給餌によって 11-KT 合成が抑制された結果、精子形成の開始が遅延したと考えられ、成熟開始前の

親魚の栄養状態が雄の成熟の開始においても重要であることを示唆している。ヨーロッパシーバスを用いた研究では、精子形成が開始される6か月前から産卵期までの9か月間に飽食量に対して25%および12.5%量の給餌を行った場合、精子形成の開始が遅延したことを報告している (Escobar et al., 2014)。したがって、雌と同様に雄においても、成熟の開始には成熟開始前の親魚の栄養状態が重要であると考えられる。

2-3-3 結論

成熟開始前に飽食給餌区と比較して50%量の制限給餌を行った場合でも、雌雄両者の成熟を正常に促し、雌については良質卵を得ることが可能であることが明らかになった。また、成熟開始前に50%量の制限給餌を行うことで、年間給餌量を34.2%削減可能であることが明らかになった。さらに、成熟開始前の制限給餌によって、試験終了時の体重が低くなる傾向が認められた。このことから、制限給餌によって親魚の成長抑制を図ることで、これまで過剰に大きくしていた親魚のサイズを小型化することが可能であり、さらなる親魚養成の低コスト化が期待される。以上の一連の結果から、成熟開始前の制限給餌によって、ブリの親魚養成にかかわる給餌の低コスト化が可能であることが明らかになった。

第3章 ブリの成熟内分泌機構に及ぼす成長誘導因子（IGF）の生理作用

第2章の結果から、成熟開始前の制限給餌によって、成熟および産卵に影響を及ぼすことなく、ブリの親魚養成にかかわる給餌の低コスト化が可能であることが明らかとなった。一方で、給餌量の削減に伴う親魚の栄養状態の低下は卵巣の発達段階に応じて成熟や産卵に様々な影響を及ぼすことが明らかになった。しかし、現状では、給餌量に依存して変化する親魚の栄養状態がどのような内分泌メカニズムで成熟内分泌機構に伝達され、成熟の進行や産卵に影響を及ぼすかについては不明な部分が多い。

一般に、栄養状態に依存して、体成長や体内の恒常性維持を促す成長誘導因子が産生される。近年の哺乳類や一部の魚類を用いた研究から、主要な成長誘導因子であるIGFが成熟の進行に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた（Bondy et al., 2006 ; Reinecke, 2010）。IGFは、栄養状態に依存して主に肝臓で合成された後、血流を介して多種多様な細胞に対して増殖、成長、分化およびアポトーシスの抑制等の生理作用を示すことで体成長における主要な役割を果たしている（Wood et al., 2005）。興味深いことに、IGFは卵巣においても発現していることがいくつかの魚類で報告されており、卵濾胞における性ステロイド合成および卵母細胞の最終成熟の誘導に関与していることが明らかになっている（Reinecke, 2010）。したがって、親魚の栄養状態は卵巣で発現する成長誘導因子IGFを介して成熟の進行や産卵を左右していると予想される。ブリにおいても、親魚の栄養状態に依存してIGFが産生されると考えられるが、成熟や産卵に及ぼすIGFの生理作用についてはほとんどわかっていない。

そこで本研究では、親魚の栄養状態が成熟や産卵に及ぼす内分泌メカニズムを解明することを目的に、ブリの成熟内分泌機構に及ぼすIGFの生理作用を明らかにすることを目的とした研究を行った。まず、ブリの卵巣の発達に伴う卵巣中IGFの遺伝子発現量および発現部位の解析を行い（第1節）、得られた知見をもとにIGFが成熟の進行に及ぼす生理作用を明らかにした（第2節）。また、これまで不明であったブリ雄の成熟特

性を明らかにするとともに、精巣の発達に伴う精巣中 IGF 遺伝子の発現解析を行った (第3節)。

第1節 ブリの生殖周期に伴う卵巣中 IGF-1 および IGF-2 の 遺伝子発現量および発現部位の変化

これまでの研究から、いくつかの魚種で卵巣の発達にかかわる IGF の生理作用が明らかとなっている。例えば、white perch (*Morone americana*) の卵巣では、IGF-1 がテストステロンおよび E2 合成を誘導するのに対して (Weber et al., 2007)、マダイの卵巣ではテストステロン合成は誘導せず、アロマトラーゼを活性化してテストステロンから E2 への代謝のみを誘導することが明らかとなっている (Kagawa et al., 2003)。これらの結果とは逆に、mummichog (*Fundulus heteroclitus*) およびゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) の卵巣を用いた研究では、IGF-1 はいずれの性ステロイドの合成を誘導しないことが報告されている (Negatu et al., 1998 ; Nelson and Van Der Kraak, 2010a)。このように、卵巣内における IGF の生理作用、特に性ステロイド合成に関する効果は魚種によって大きく異なることが考えられる。一方で、卵巣内の IGF の発現パターンは魚種ごとに大きく異なることが知られている (Wood et al., 2005)。例えば、性ステロイド合成に対する IGF-1 の生理作用が認められなかったゼブラフィッシュをはじめ、ヨーロッパヘダイ (*Sparus aurata*) やギンザケの卵巣では、IGF-1 遺伝子の発現は検出されず、IGF-2 遺伝子のみが発現していることが明らかとなっている (Perrot et al., 2000 ; Nelson and Van Der Kraak, 2010b ; Yamamoto et al., 2011)。また、カワスズメ (*Oreochromis mossambicus*) や shi drum (*Umbrina cirrosa*) の卵巣では IGF-2 よりも IGF-1 の方が高い遺伝子発現量を示すことが報告されている (Schmid et al., 1999 ; Patruno et al., 2006)。これらの結果から、魚種特異的な IGF の生理作用は IGF の発現パターンの違いに依存していると推察されるが、魚類において卵巣の発達に伴う詳細な IGF の遺伝子発現量や発現部位の変化といった

基礎的知見はほとんど得られていない。特に、自己分泌あるいは傍分泌を介して卵巢で機能するホルモンの生理作用を解明するためには、当該ホルモンの発現部位を明らかにし、卵母細胞とそれらを取り囲む卵濾胞、または莢膜細胞と顆粒膜細胞間の内分泌学的な関係性を理解することは極めて重要であると考えられる。

本研究では、IGF が成熟に及ぼす生理作用を解明する第一段階として、ブリの成熟周期に伴う卵巢中 IGF-1 および IGF-2 の遺伝子発現量および発現部位の変化を調べた。

1-1 材料および方法

供試魚およびサンプリング

本研究には、国立研究開発法人水産研究・教育機構西海区水産研究所五島庁舎において海面小割生簀（5 m×5 m×5 m）内で天然種苗から育成したブリ 2 歳魚を用いた。各組織における IGF-1 および IGF-2 遺伝子発現量を比較するため、2014 年 1 月 24 日に雌 4 尾から脳、脳下垂体、鰓、心臓、肝臓、頭腎、体腎、胃、脾臓、筋肉、卵巢を採取した。採取した各組織はそれぞれ RNAlater で 4℃にて一晩処理した後、-30℃にて保存した。次に、成熟に伴う卵巢中 IGF-1 および IGF-2 の遺伝子発現量および発現部位の変化を調べるため、2012 年 7 月から 2013 年 5 月まで様々な卵巢の発達段階を持つ雌 88 尾をサンプリングした。サンプリングは、海面小割生簀からタモで 1 尾ずつ捕獲し、ヘパリン処理した注射器を用いて尾柄部より採血した後、と殺した。魚体重および卵巢重量を測定し、生殖腺体指数（gonad-somatic index, GSI）（ $GSI = \text{卵巢重量 (g)} \times 100 / \text{魚体重 (g)}$ ）を算出した。採取された卵巢は RNAlater で 4℃にて一晩処理した後、-30℃にて保存した。また、卵巢中央部の組織片をブアン氏液で 4℃にて一晩固定した後、70% エタノールに置換して 4℃にて保存した。採取した血液は、1,500 g で 15 分間遠心分離し、血漿を -80℃にて保存した。

卵巢組織切片の作製と雌の成熟度の区分

固定した卵巣片をエタノール系列で脱水し、ブタノールによる透徹を行った後、定法に従ってパラフィン包埋した。包埋した卵巣片を厚さ 5 μm で薄切し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施し、光学顕微鏡 (BX43) で組織観察を行った。卵巣内で最も発達の進んだ卵母細胞の発達段階を指標に、非同期発達型の成熟・産卵様式を持つブリの雌の成熟度を次の 5 段階に区分した (Rahman et al., 2003 ; Nuji et al., 2012 ; Elisio et al., 2014 ; Nyuji et al., 2016)。卵母細胞の発達段階は既報 (小林・足立, 2002) を参考に特定した (Fig. 22)。

周辺仁期 (Perinucleolar stage, Pn) : 第一次成長期の卵母細胞のみが認められる。卵母細胞の細胞質はヘマトキシリンに濃染され、核内には核膜に接してエオシン可染の複数の仁が認められる。

卵黄胞期 (Yolk vesicle stage, Yv) : 第二次成長の初期段階で、細胞質の周辺部に卵黄胞が散在する卵黄胞期の卵母細胞が認められる。

第一次卵黄球期 (Primary yolk stage, Py) : 卵黄蓄積が開始され、卵黄球が細胞質周辺部のみにみられる第一次卵黄球期の卵母細胞が認められる。

第二次卵黄球期 (Secondary yolk stage, Sy) : 卵黄蓄積が進行し、卵黄球が核の周辺までみられる第二次卵黄球期の卵母細胞が認められる。

第三次卵黄球期 (Tertiary yolk stage, Ty) : 卵黄蓄積がほぼ完了し、卵成熟直前の第三次卵黄球期の卵母細胞が認められる。

血中 E2 濃度の測定

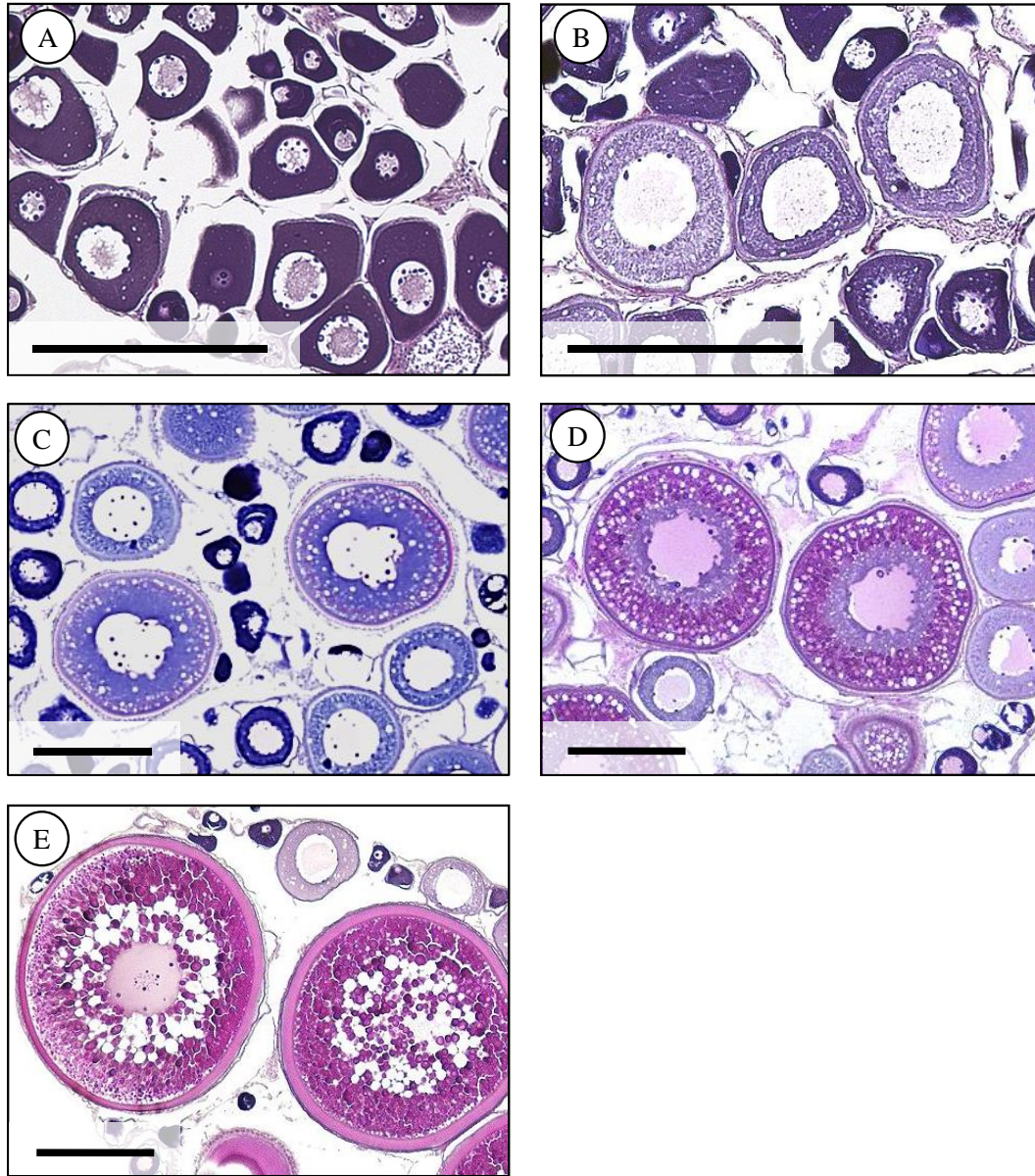


Fig. 22 Histological sections of yellowtail ovaries at different stages of oocyte development: perinucleolar stage (A), yolk vesicle stage (B), primary yolk stage (C), secondary yolk stage (D) and tertiary yolk stage (E). Sections were stained with hematoxylin-eosin. Scale bars: 200 μm .

血漿を 10 倍量のジエチルエーテルで 3 回抽出し、アッセイ緩衝液 (EIA buffer) に溶解した。E2 の測定は、市販の ELISA 法による測定キット (Estradiol EIA kit) を用いて行った。

リアルタイム PCR による遺伝子発現量解析

採取した組織片から ISOGEN II を用いて total RNA を抽出し、Poly(A) Purist MAG kit を用いて精製した。得られた mRNA を 50 ng 使用し、Omniscript RT kit にて逆転写反応を行った。リアルタイム PCR による遺伝子発現量解析は、TaqMan プローブを用いた絶対定量法により定量した。IGF-1 および IGF-2 遺伝子特異的プライマーおよび TaqMan プローブは Primer Express software v. 2.0 を用いて設計し、Integrated DNA Technologies 社から購入した (Table 7)。PCR 反応は、前述の cDNA 溶液 5 μ l を鋳型として、0.5 μ M の各プライマー、0.2 μ M の TaqMan プローブ、10 μ l の FastStart Essential DNA Probes Master, 4 μ l の蒸留水を含む 10 μ l の反応混合液中で、95°C で 10 分間熱変性を行った後、一連のサイクル (95°C 10 秒, 58°C 30 秒) を 45 回繰り返した。IGF-1 および IGF-2 遺伝子の部分配列を組み込んだプラスミドを用いて 10 倍希釈ごとに 1×10^8 から 1×10^2 コピーの希釈系列を用いて検量線を作成した。なお、すべてのサンプルは 2 回試行で解析を行った。また、標的遺伝子が増幅されたかを確認するために、得られた増幅産物のシーケンスを行った。

免疫組織化学染色

上述と同様の方法で卵巣片を包埋し、厚さ 7 μ m で薄切し、スライドガラスに貼付した。キシレンで透徹し、エタノール系列で親水した後、HistoVT One (ナカライテクス) を用いて 90°C にて 20 分間反応させ、抗原賦活処理を行った。非特異的抗原をブロックするために、10% ヤギ正常血清 (ニチレイバイオサイエンス) を用いて室温にて 10 分間反応させた後、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution A (東洋紡) で 400 倍

Table 7 Quantitative PCR primer and probe sequences for the yellowtail IGF-1 and IGF-2 genes, PCR product size, and mean cycle threshold (C_T) values for all ovarian cDNA samples measured.

Targeted gene	GenBank accession no.	Primer/probe sequence (5'-3')	Product size (bp)	Mean C_T
IGF-1	AB439208	Forward:	95	27.1
		Probe:		
		Reverse:		
IGF-2	LC055103	Forward:	77	31.7
		Probe:		
		Reverse:		

希釈したウサギ抗ヒト IGF-1 ポリクローナル抗体 (PABCa, GroPep Bioreagents) あるいはウサギ抗ヒト IGF-2 ポリクローナル抗体 (AS-2796, Research Diagnostic Antibodies) を用いて 4°C にて一晩抗原抗体反応させた。TBST で洗浄後、抗ウサギ IgG 抗体 (シンプレステイン AP (R), ニチレイバイオサイエンス) を用いて室温にて 30 分間抗原抗体反応させた。TBST で洗浄後、Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit (SK-5100, Vector laboratories) を用いて染色を行った。なお、作製した隣接切片をヘマトキシリン・エオシン染色し、免疫組織化学染色された部位およびその卵母細胞の発達段階を特定した。

本研究で用いた免疫組織化学染色の特異性を確認するために以下の陰性対照を設けて実験を行った。(1) 一次抗体の代わりに TBST を用いる陰性対照, (2) 一次抗体の代わりにウサギ正常血清を用いる陰性対照, (3) 一次抗体の代わりにヤギ正常血清を用いる陰性対照, (4) 二次抗体の代わりにヤギ正常血清を用いる陰性対照。なお、いずれの陰性対照において非特異的な染色は認められなかった。さらに、125 µg/ml のヒトリコンビナント IGF-1 (Bachem AG) および IGF-2 (シグマアルドリッチ) を吸着させた一次抗体を用いた免疫組織化学染色においても非特異的な染色は認められなかった (Schmid et al., 1999)。

統計処理

得られたデータは一元配置分散分析に処した後、各組織および発達段階の間で有意差が生じているかを Tukey-Kramer の多重比較で判定した (GraphPad Prism 6.0 software)。

1-2 結果

各組織における IGF-1 および IGF-2 遺伝子発現量

IGF-1 遺伝子の発現は頭腎および体腎、胃を除くすべての組織で認められた (Fig. 23)。肝臓において最も高い発現が認められ、卵巣においても比較的高い発現が認められた。

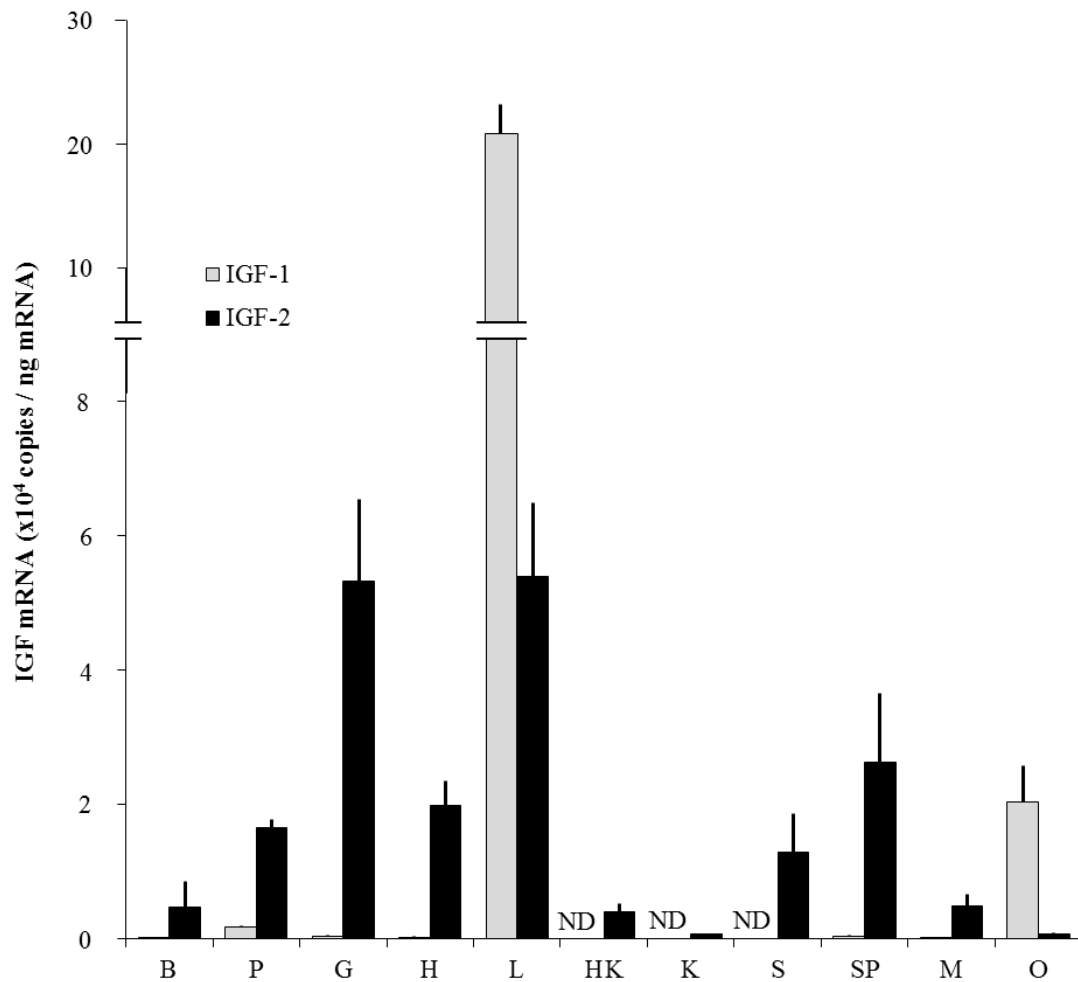


Fig. 23 Tissue distribution of IGF-1 and IGF-2 mRNA in the adult yellowtail. The data represent means \pm SEM ($n = 4$). The solid bars represent the mRNA levels of IGF-1. The gray bars represent the mRNA levels of IGF-2. B, brain; P, pituitary gland; G, gill; H, heart; L, liver; HK, head kidney; K, body kidney; S, stomach; SP, spleen; M, muscle; O, ovary. ND indicates that an IGF was not detected.

また、その他の組織での発現量は非常に低かった。

IGF-2 遺伝子の発現はすべての組織で認められ、特に肝臓および鰓において最も高い発現が認められた (Fig. 23)。次に、脳下垂体および心臓、胃、脾臓での遺伝子発現が高く、これらの組織における遺伝子発現量は脳および頭腎、体腎、筋肉、卵巢の遺伝子発現量よりも高かった。

卵巢の発達に伴う卵巢 IGF-1 および IGF-2 遺伝子発現の変化

GSI は Pn から Py まで有意な変化は認められなかったが、Py 以降に急激に増加し、Ty では 3.34 ± 0.25 と最大となった (Fig. 24A)。血中 E2 濃度は Pn 以降で卵巢の発達に伴って急激に増加し、Ty において 4.42 ± 0.70 ng/ml と最大となった (Fig. 24B)。IGF-1 遺伝子はすべての発達段階の卵巢において恒常的に高い発現を示したが、Py から Ty にかけて増加する傾向が認められ、Ty において $16.20 \pm 0.88 \times 10^3$ コピー/ng mRNA と最大となった (Fig. 24C)。IGF-2 遺伝子発現量は Pn 以降で卵巢の発達に伴って増加し、Ty において $0.85 \pm 0.09 \times 10^3$ コピー/ng mRNA と最大となった (Fig. 24D)。

卵巢の発達に伴う卵巢 IGF-1 および IGF-2 の発現部位の変化

抗ヒト IGF-1 抗体を用いた免疫組織化学染色では、卵黄胞期 (Fig. 25A-C)、第一次卵黄球期 (Fig. 25D-F) および第三次卵黄球期 (Fig. 25G-I) の卵母細胞の莢膜細胞で特異的な陽性反応が認められた。また、第三次卵黄球期の卵母細胞のみにおいて、一部の顆粒膜細胞で陽性反応が認められた (Fig. 26)。

抗ヒト IGF-2 抗体を用いた免疫組織化学染色では、第三次卵黄球期の卵母細胞の顆粒膜細胞層で陽性反応が認められた (Fig. 27)。

1-3 考察

ブリ雌を用いて、IGF-1 および IGF-2 遺伝子の各組織における発現量解析を行ったと

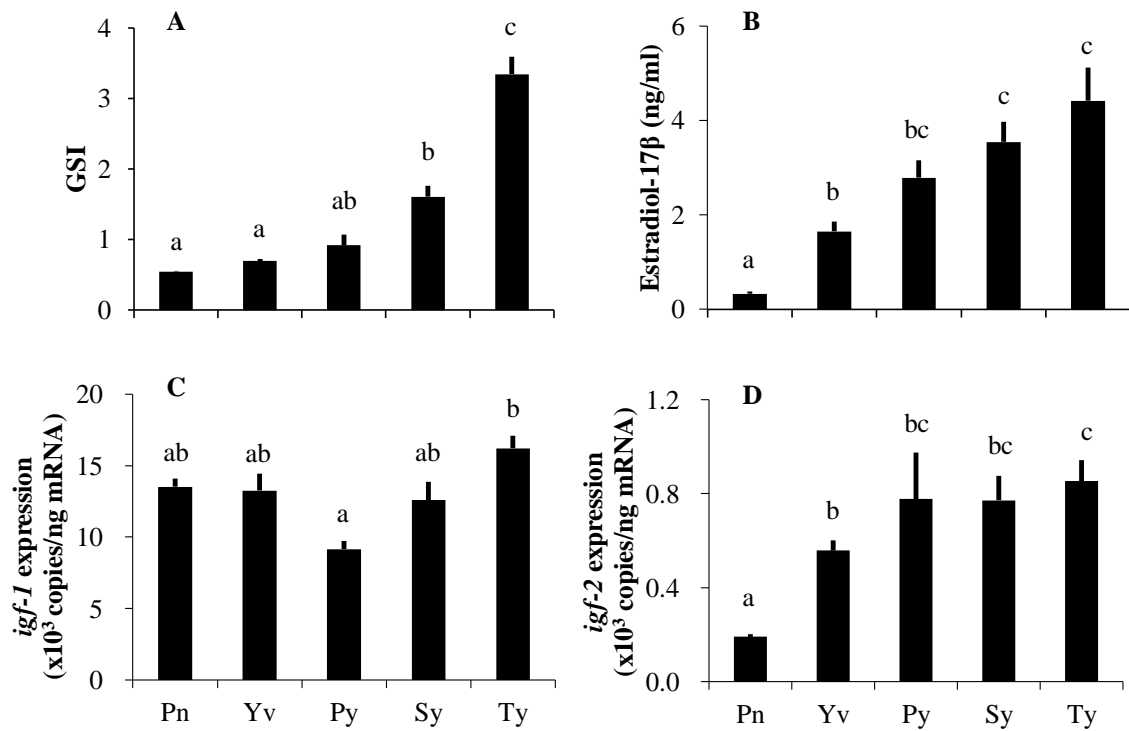


Fig. 24 Changes in GSI (A), plasma estradiol-17β (B) and ovarian transcripts of the IGF-1 (C) and IGF-2 gene (D) of yellowtail females during ovarian development. Female maturity was classified into the perinucleolar stage (Pn), yolk vesicle stage (Yv), primary yolk stage (Py), secondary yolk stage (Sy) and tertiary yolk stage (Ty) according to the most advanced type of oocytes found. The data represent means \pm SEM ($n = 48$, Pn; $n = 10$, Yv; $n = 3$, Py; $n = 8$, Sy; $n = 12$, Ty). Significant differences among stages of ovarian development are indicated by different letters ($P < 0.05$, ANOVA followed by Tukey-Kramer test).

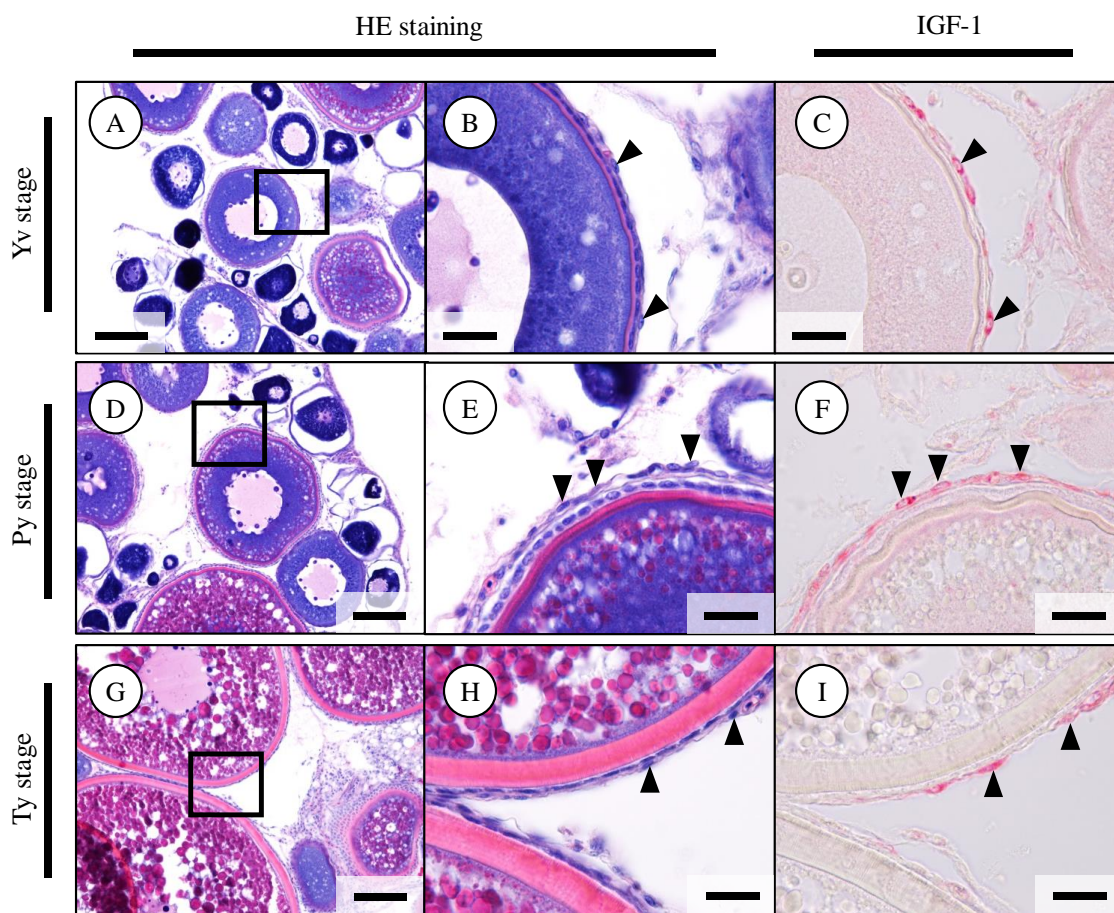


Fig. 25 Immunohistochemical localization of IGF-1 in the theca cell layer of ovarian follicles at the yolk vesicle stage (A-C), primary yolk stage (D-F) and tertiary yolk stage (G-I). Sections (B, E, H) are high magnification images of the inset in sections on the left (A, D, G), stained with hematoxylin-eosin. The serial sections of the ovaries were immunostained with anti-human IGF-1 (C, F, I). Scale bars: 100 μ m (A, D, G) and 20 μ m (B, C, E, F, H, I).

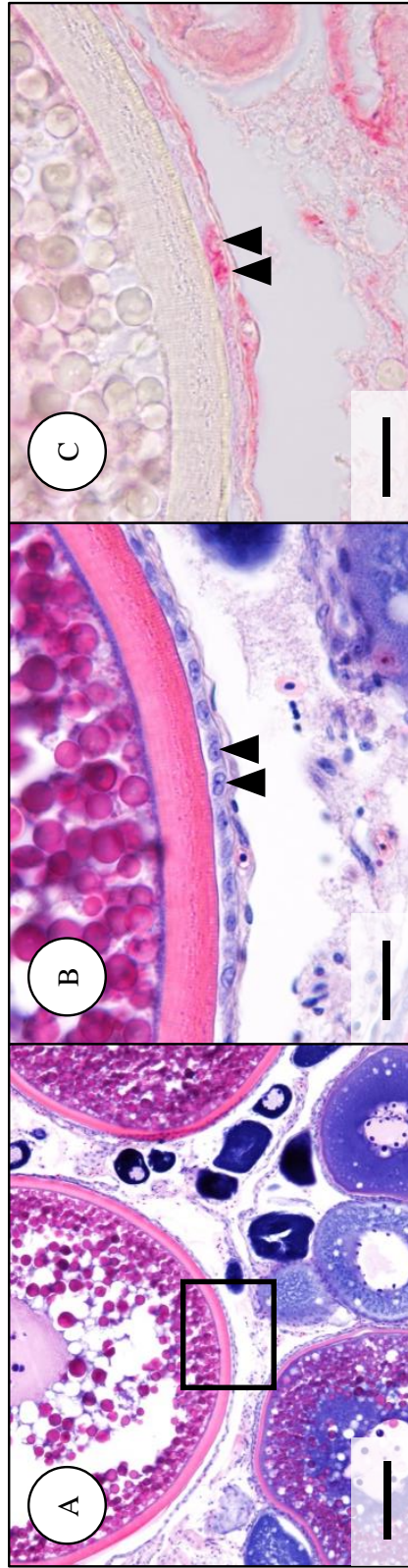


Fig. 26 Immunohistochemical localization of IGF-1 in part of the granulosa cells of ovarian follicles at the tertiary yolk stage. Section (B) is a high magnification image of the inset in section on the left (A), stained with hematoxylin-eosin. Serial sections of the ovaries were immunostained with anti-human IGF-1 (C). Scale bars: 100 μ m (A) and 20 μ m (B, C).

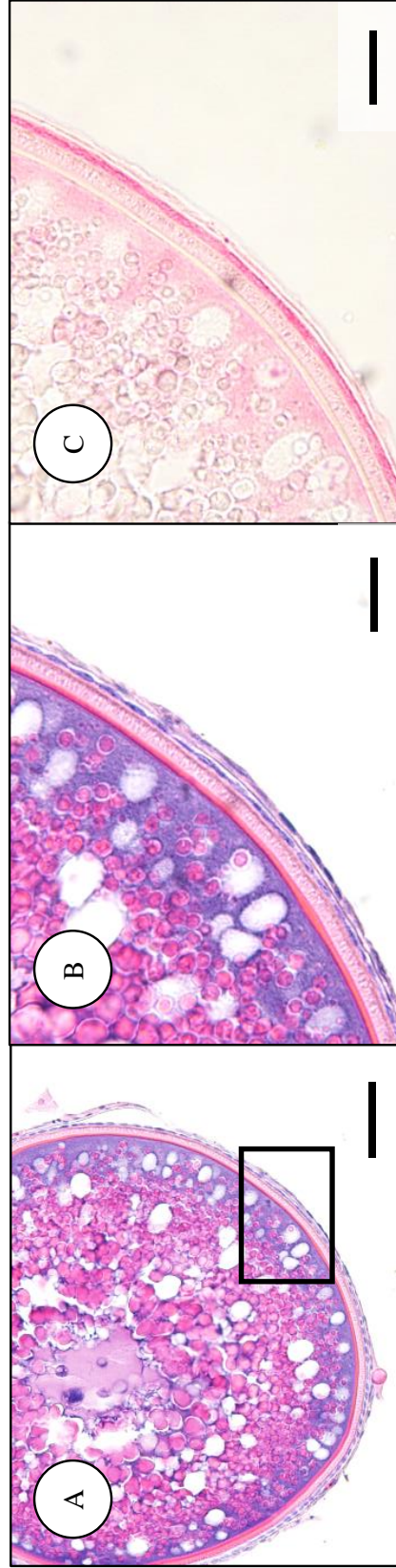


Fig. 27 Immunohistochemical localization of IGF-2 in all granulosa cells of ovarian follicles at the tertiary yolk stage. Section (B) is a high magnification image of the inset in section on the left (A), stained with hematoxylin-eosin. Serial sections of the ovaries were immunostained with anti-human IGF-2 (C). Scale bars: 100 μm (A) and 20 μm (B, C).

ころ、両遺伝子ともに肝臓で最も高い発現を示した。この結果は、IGF-1 および IGF-2 が主に肝臓で合成されていることを示しており、コイ (*Cyprinus carpio*) (Vong et al., 2003) およびカワスズメ (Caelers et al., 2004), shi drum (Patruno et al., 2006), ブリ幼魚 (Fukada et al., 2012) を用いた既往の知見と一致している。また、IGF-1 および IGF-2 遺伝子は肝臓以外の多くの組織でも発現しており、ニジマスおよびカワスズメ, daddy sculpin (*Cottus scorpius*), コイを用いた研究においても同様の結果が報告されている (Wood et al., 2005)。一般に、肝臓で合成された IGF は血流を介して各組織におけるタンパク合成やアポトーシスの抑制、細胞の分裂および分化、生残、移動等を調節している。しかし、本研究の結果から、肝臓以外の組織で合成された IGF に関しても自己分泌あるいは傍分泌を介して各組織における標的細胞の恒常性の維持や成長を促していることが示唆された (Wood et al., 2005 ; Reindl and Sheridan, 2012)。

本研究において、IGF-1 遺伝子はすべての発達段階の卵巣において恒常的に高い発現を示したが、有意差は認められなかったものの、卵黄蓄積が進行する Py から Ty にかけて発現量の増加が認められた。また、IGF-1 遺伝子は IGF-2 遺伝子と比較して遺伝子発現量が約 10 倍高かった。ニジマス (Lankford and Weber, 2010), サケ (Fukada et al., 2003) および sterlet (*Acipenser ruthenus*) (Wuertz et al., 2007) を用いた研究では、IGF-1 遺伝子の発現は卵巣の発達に伴って増加することが報告されている。また、いくつかの魚種において、IGF-1 は卵濾胞における性ステロイド合成や卵母細胞の成熟能獲得、最終成熟を誘導することが知られている (Reinecke, 2010)。したがって、ブリの卵巣中 IGF-1 は性ステロイド合成や卵母細胞の最終成熟に重要な役割を果たしているかもしれない。一方で、サケを用いた研究では、卵黄胞出現後の油球期の卵母細胞を有する発達段階の卵巣において、IGF-1 遺伝子の一時的な発現量の増加が報告されている (Campbell et al., 2006)。こうした現象は哺乳類でも報告されており (Zhou et al., 1997 ; Chandrashekar et al., 2004), ブリにおいても同様に卵巣中 IGF-1 が卵母細胞の発達促進だけでなく、生殖腺刺激ホルモン受容体の遺伝子発現調節や性ステロイド合成の開始に重要な役割を果た

している可能性も考えられる。

また、興味深いことに、卵巢中 IGF-1 は卵形成が開始される以前である Pn の卵巢においても比較的高い発現を示した。未熟な卵巢において IGF-1 がどのような生理学的な役割を果たしているかは不明だが、Bhatta et al. (2012) はカワスズメの生殖腺で合成される GH および IGF が直接体成長を促していることを報告している。一般に、IGF-1 は肝臓で合成され、血流を介して体成長を促していることが多くの *in vivo* および *in vitro* における魚類研究から明らかとなっている (Reindl and Sheridan, 2012)。しかし、本研究の結果から、ブリにおいて、肝臓で合成された IGF-1 に加えて、肝臓以外で合成された IGF-1 も直接成長を促している可能性が考えられた。

IGF-1 抗体を用いた免疫組織化学染色において、主に卵濾胞の莢膜細胞で免疫陽性反応が認められた。この結果は、ブリの卵巢において、IGF-1 の主要な産生部位が性ステロイド産生細胞である莢膜細胞であることを示しており (Nagahama, 1994; ; Young and McNeilly, 2010) , 卵巢中 IGF-1 は性ステロイド合成に関与している可能性が考えられる。しかし、本研究の結果は、他魚種で報告されている卵巢中 IGF-1 の産生部位と大きく異なっている。例えば、ヨーロッパヘダイの卵巢では、一部の莢膜細胞においても免疫陽性細胞が観察されるものの、IGF-1 の主要な産生部位が顆粒膜細胞であることが明らかとなっている (Perrot et al., 2000) 。また、マダイやカワスズメの卵巢を用いた免疫組織化学染色では、顆粒膜細胞のみで IGF-1 抗体の陽性反応が認められている (Kagawa et al., 1995; ; Schimide et al., 1999) 。さらに、マダイの卵巢を用いた生体外培養系において、IGF-1 は顆粒膜細胞でのアロマトラーゼ活性を増加させ、テストステロンから E2 への代謝を促進するが、テストステロン合成は活性化しないこと報告されている (Kagawa et al., 2003) 。一般に、魚類の莢膜細胞はテストステロンの合成を行い、その後顆粒膜細胞で発現するアロマトラーゼによってテストステロンから E2 を合成することから (Lubzens et al., 2010) , マダイの IGF-1 の産生部位とその機能は理論的に一致していると言える。これらを考慮すると、本研究で得られた IGF-1 の発現パターンは、ブリの卵

巢で発現する IGF-1 が他魚種と全く異なる性ステロイド合成に関する機能を有していることを意味しているかもしれない。実際に、これまでの研究から、性ステロイド合成に及ぼす IGF-1 の生理作用は魚種間で大きく異なることが報告されている。サケを用いた研究では、排卵直前の卵母細胞を含む卵巣に IGF-1 を添加して生体外培養を行ったところ、マダイと同じように E2 および成熟誘起ステロイド (MIH) の合成能が増加した (Maestro et al., 1997)。また、striped bass (*Morone saxatilis*) の卵巣を用いた研究においても同様に、IGF-1 は E2 および MIH の合成能を増加させる一方、莖膜細胞におけるテストステロン合成を低下させることが報告されている (Weber and Sullivan, 2000)。さらに、コイや white perch の卵巣を用いた研究では、IGF-1 は E2 およびテストステロンの両方の合成能を増加させた (Weber et al., 2007 ; Paul et al., 2010)。一方で、上述の性ステロイド合成における IGF-1 の生理作用とは全く異なって、mummichog およびゼブラフィッシュを用いた研究では、卵巣の発達段階に関わらず IGF-1 の E2 合成能の活性化効果は認められなかった (Negatu et al., 1998 ; Nelson and Van Der Kraak, 2010a)。これらの魚種における卵巣中 IGF-1 の詳細な遺伝子発現パターンは報告されていないが、魚種特異的な IGF-1 の性ステロイド合成能は IGF-1 遺伝子の発現パターンに依存しているものと考えられる。

IGF-1 抗体を用いた免疫組織化学染色において、第三次卵黄球期の卵母細胞のみで一部の顆粒膜細胞に陽性反応が認められた。第三次卵黄球期の卵母細胞は、卵黄球の取り込みが完了しており、MIH に反応して最終成熟できる (中田ら, 2001)。したがって、顆粒膜細胞で発現する IGF-1 は最終成熟能獲得あるいは最終成熟に関与していると考えられる。実際に、これまでにマダイ (Kagawa et al., 1994)、striped bass (Weber and Sullivan, 2000)、コイ (Mukherjee et al., 2006)、*Heteropneustes fossilis* (Chourasia and Joy, 2008) およびゼブラフィッシュ (Nelson and Van Der Kraak, 2010a) を用いた *in vivo* あるいは *in vitro* 実験によって、IGF-1 が卵母細胞の卵核胞崩壊 (GVBD) を誘導し、最終成熟を促すことが示されている。また、IGF-1 はマダイの顆粒膜細胞間あるいは顆粒膜細

卵と卵母細胞間のギャップジャンクションの密度を増加させることが報告されている (Patino and Kagawa, 1999)。さらに、IGF-1 は顆粒膜細胞における MIH 合成を促すことが報告されていることから (Weber and Sullivan, 2000)、魚類の卵巢中 IGF-1 は MIH 合成を介して卵母細胞の GVBD を誘起するものと考えられる。

本研究において、卵巢中 IGF-2 遺伝子は Yv ステージから発現量の増加が認められ、卵黄蓄積が進行する Py から Ty ステージで最大となった。ニジマスを用いた研究では、卵巢中 IGF-2 遺伝子の発現量は卵巢の発達に伴って増加することが示されている (Lankford and Weber, 2010)。したがって、ブリの卵巢中 IGF-2 は第二次卵成長期の卵巢の発達に重要な役割を果たしていることが考えられる。これまでに魚類を用いた研究において、IGF-2 が性ステロイド合成を活性化するという報告例はないが、哺乳類において IGF-2 が顆粒膜細胞で発現する IGF-1 受容体を介して性ステロイド合成を増加させることが報告されている (Adashi et al., 1990; Willis et al., 1998)。しかし、本研究において、卵巢を用いた IGF-2 遺伝子発現解析では Yv ステージ以降で発現量の増加が認められたにも関わらず、免疫組織化学染色では第三次卵黄球期の卵母細胞のみで陽性反応が認められ、IGF-2 が第三次卵黄球期の顆粒膜細胞で合成されていることが示唆された。この遺伝子発現とタンパク合成のミスマッチの理由は不明だが、本研究で明らかとなった IGF-2 の合成部位はいくつかの魚類における知見と一致している。例えば、カワスズメ (Schmid et al., 1999) およびヨーロッパヘダイ (Radaelli et al., 2003) を用いた研究では、卵黄蓄積が十分に進行した卵母細胞の顆粒膜細胞のみで IGF-2 の mRNA あるいはタンパクが認められている。したがって、成熟における IGF-2 の生理作用は、IGF-1 の場合と異なり、多くの魚種で共通している可能性が考えられる。実際に、マダイ (Kagawa et al., 1994)、striped bass (Weber and Sullivan, 2000)、ゼブラフィッシュ (Nelson and Van Der Kraak, 2010a) および southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) (Picha et al., 2012) を含む多くの魚種において、IGF-2 は GVBD を誘導し、最終成熟を促すことが報告されている。しかし、上述のように IGF-1 は MIH 産生を介して最終成熟を誘起しているの

に対して、IGF-2 は striped bass の卵巣において MIH 合成を全く活性化しないことが報告されている (Weber and Sullivan, 2000)。一方で、Picha et al. (2012) は、southern flounder の卵巣を用いて IGF-2 がプロゲステロン受容体 α の発現を制御していることを明らかにしている。したがって、ブリの顆粒膜細胞で発現する IGF-2 はプロゲステロン受容体の活性化を介して最終成熟に関与している可能性が考えられる。

本研究において、IGF-1 および IGF-2 遺伝子がブリの卵巣の発達に伴って発現し、これらのタンパクが第二次卵成長期の卵濾胞で合成されていることが明らかとなった。これまでに魚類の生殖腺における IGF-2 受容体の発現について報告された例はないが、いくつかの魚種では IGF-1 受容体が卵巣で発現していることが知られている (Maestro et al., 1997 ; Perrot et al., 2000 ; Wuertz et al., 2007)。特に、sterlet の卵巣で発現する IGF-1 受容体遺伝子は卵巣の発達に伴って発現量が増加することが明らかとなっている (Wuertz et al., 2007)。一方で、哺乳類の IGF-1 および IGF-2 は両者ともに顆粒膜細胞で発現する IGF-1 受容体を活性化することが報告されている (Adashi et al., 1990; Willis et al., 1998)。したがって、本研究の結果から、ブリの卵巣で発現する IGF-1 および IGF-2 は、卵濾胞における自己分泌あるいは傍分泌を介して性ステロイド合成や最終成熟、さらには他のホルモンに対する応答性向上に関与していると考えられる。

第2節 IGF-1がブリの性ステロイド合成に及ぼす生理作用

第1節の結果から、IGF-1はブリの卵巢の発達に伴って卵濾胞の莢膜細胞で発現していることが明らかとなった。莢膜細胞は、性ステロイド合成を主に担っているステロイド産生細胞であることから、IGF-1は自己分泌あるいは傍分泌を介してブリの性ステロイド合成に関与していることが考えられる。そこで本研究では、IGF-1が性ステロイド合成に及ぼす生理作用を明らかにするために、ステロイド代謝酵素群の遺伝子発現および酵素活性に及ぼすIGF-1の影響をブリの卵巢を用いた生体外培養系により解析した。

2-1 材料および方法

供試魚およびサンプリング

本研究には、国立研究開発法人水産研究・教育機構西海区水産研究所五島庁舎において海面小割生簀（5 m×5 m×5 m）内で天然種苗から育成したブリ2歳魚を用いた。雌個体をと殺後、卵巢を摘出し、以下の実験に供試した。また、卵巢中央部の組織片をブアン氏液で4℃にて一晩固定し、上述の方法に従って組織切片を作製した。作製した組織切片をヘマトキシリン・エオシン染色し、光学顕微鏡（BX43）で組織観察することで卵母細胞の発達ステージを判定した。

卵巢組織片の生体外培養

生体外培養は、第二次卵黄球期のブリ卵巢片（50 mg）を48穴組織培養用プレートに添加したLeibovitz's L-15（Gibco, Gaithersburg, MD）を基本とする培養液（1.0% bovine serum albumin (BSA), 10 mM HEPES, 100 U/ml ペニシリンおよび0.1 mg/ml ストレプトマイシンを添加, pH7.4）500 μl 中で20℃にて培養することで行った。なお、培養を行う前に卵巢片をL-15培養液中で3回リンスした。

IGF-1がステロイド代謝酵素群の遺伝子発現に及ぼす時間依存的効果を調べるため、

卵巣片をヒトリコンビナント IGF-1 (100nM) を添加した L-15 培養液中で 0, 8, 16, 24 および 48 時間培養した。また, IGF-1 がステロイド代謝酵素群の遺伝子発現に及ぼす濃度依存的効果を調べるため, 卵巣片を 0, 1, 10 および 100 nM ヒトリコンビナント IGF-1 をそれぞれ添加した L-15 培養液中で 8 時間培養した。培養後, 卵巣片を RNAlater で 4°C にて一晩処理した後, - 30°C にて保存した。

IGF-1 が性ステロイド代謝経路における 17 α -hydroxylase/17,20-lyase 活性に及ぼす効果を調べるため, 卵巣片を IGF-1 (100 nM) の添加に加えて, アンドロステンジオンの前駆体であるプロゲステロン (100 ng/ml) および 17 α -ヒドロキシプロゲステロン (100 ng/ml) を添加した L-15 培養液中で 24 時間培養した。培養後, 培養液を回収し, - 30°C にて保存した。

なお, すべての実験は各群 3 回試行で行った。

リアルタイム PCR による遺伝子発現量解析

卵巣片から ISOGEN II を用いて total RNA を抽出し, TURBO DNase (Ambion) を用いてゲノム DNA の除去および精製を行った。得られた total RNA を 1.0 μ g 使用し, Omniscript RT kit にて逆転写反応を行った。リアルタイム PCR による遺伝子発現量解析は, Table 1 に示したプライマーおよび TaqMan プローブを用いて行い, β -actin 遺伝子をリファレンス遺伝子とした相対定量法により定量した (Table 8)。PCR 反応は, 前述の cDNA 溶液 5 μ l を鋳型として, 0.5 μ M の各プライマー, 0.2 μ M の TaqMan プローブ, 10 μ l の FastStart Essential DNA Probes Master, 4 μ l の蒸留水を含む 10 μ l の反応混合液中で, 95°C で 10 分間熱変性を行った後, 一連のサイクル (95°C 10 秒, 58°C 30 秒) を 45 回繰り返した。ターゲットとなるステロイド代謝酵素および β -actin 遺伝子の部分配列を組み込んだプラスミドを用いて 10 倍希釈ごとに 1×10^8 から 1×10^1 コピーの希釈系列を用いて検量線を作成し, 相対発現量を算出した。時間依存的効果の実験では培養 8 時間後の対照区, 濃度依存的効果の実験では 0 nM 区を相対発現量 1 として表記した。また,

Table 8 Quantitative PCR primer and probe sequences for the yellowtail β -actin gene, and PCR product size for ovarian cDNA samples measured.

Targeted gene	GenBank accession no.	Primer/probe sequence (5'-3')	Product size (bp)
β -actin	AB179839	Forward:	137
		Probe:	
		Reverse:	

標的遺伝子が増幅されたかを確認するために、得られた増幅産物のシーケンスを行った。

培養液中のアンドロステンジオン量の測定

培養液中のアンドロステンジオン濃度は時間分解蛍光免疫測定法 (TRFIA) によって測定した。培養液に対して 10 倍量のジエチルエーテルで 3 回抽出し、アッセイ緩衝液 (0.05 M Tris, 0.9% NaCl, 0.5% BSA, 0.05% NaN₃, 0.01% Tween 40, 20 μM diethylenetriamine-N,N,N',N'',N'''-pentaacetic acid, pH 7.75) に溶解した。Asahina et al. (1995) の方法に従って調整した BSA-conjugated AD antigen を固相化させた 96 穴プレートにスタンダードあるいはサンプルをアンドロステンジオン抗体 (コスモ・バイオ) とともに添加し、20°C にて 4 時間振盪させながら免疫反応を行った。洗浄後、ユーロピウム標識した goat anti-rabbit IgG (Perkin-Elmer) を各 well に添加し、20°C にて 1 時間振盪した。その後、enhancement solution (Perkin-Elmer) を加え、Infinite F200 (TECAN) を用いて蛍光強度を測定した。

統計処理

IGF-1 がステロイド代謝酵素遺伝子発現に及ぼす時間依存的効果を調べるため、各培養時間において IGF-1 添加区と対照区の間で有意な差が生じているかを *t*-検定で判定した。また、IGF-1 がステロイド代謝酵素遺伝子発現に及ぼす濃度依存的効果を調べるため、得られたデータを一元配置分散分析に処した後、各試験区の間で有意差が生じているかを Tukey の多重比較で判定した。さらに、IGF-1 が 17 α -hydroxylase/17,20-lyase 活性に及ぼす効果を調べるため、得られたデータを IGF-1 の有無および前駆体の種類を要因とした二元配置分散分析に処した後、各試験区の間で有意な差が生じているかを Tukey の多重比較で判定した (GraphPad Prism 6.0 software)。

2-2 結果

IGF-1 がステロイド代謝酵素遺伝子発現に及ぼす効果

IGF-1 が StAR およびステロイド代謝酵素遺伝子発現に及ぼす時間依存的効果を調べたところ、P450c17 遺伝子のみで IGF-1 を加えていない対照区と比較してすべての培養時間で遺伝子発現量が有意に増加した (Fig. 28)。

IGF-1 が P450c17 遺伝子発現に及ぼす濃度依存的効果を調べたところ、添加した IGF-1 濃度に依存して P450c17 遺伝子発現量が有意に増加した (Fig. 29)。

IGF-1 が 17 α -hydroxylase/17,20-lyase 活性に及ぼす効果

アンドロステンジオンの前駆体であるプロゲステロンおよび 17 α -ヒドロキシプロゲステロン存在下において、培養後のアンドロステンジオン量は IGF-1 の添加によって増加する傾向が認められた (Fig. 30)。二元配置分散分析の結果、IGF-1 の有無および前駆体の種類間で有意な差が認められ、IGF-1 あるいは前駆体の添加によって培養後のアンドロステンジオン量が増加することが明らかになった (Table 9)。また、交互作用に有意な差が認められたため、各試験区間において多重比較を行ったところ、17 α -ヒドロキシプロゲステロン存在下で IGF-1 を添加した試験区のアンドロステンジオン量は IGF-1 を添加しなかった試験区と比較して有意に増加した。

2-3 考察

本研究において、生体外培養系を用いて IGF-1 が StAR およびステロイド代謝酵素群の遺伝子発現に及ぼす効果を調べたところ、P450c17 遺伝子のみで発現量の増加が認められた。また、IGF-1 は濃度依存的に P450c17 遺伝子発現量を増加させた。P450c17 遺伝子を含む多くのステロイド代謝酵素群はステロイド産生細胞である莢膜細胞で発現しているが (Nagahama et al., 1994)、これまでにブリを用いた研究から、IGF-1 は性ステロイド合成が活発に行われる卵黄胞期以降の莢膜細胞で主に発現していることが明らかとなっている (Higuchi et al., 2016) したがって、これらの結果は、ブリの卵巣では、

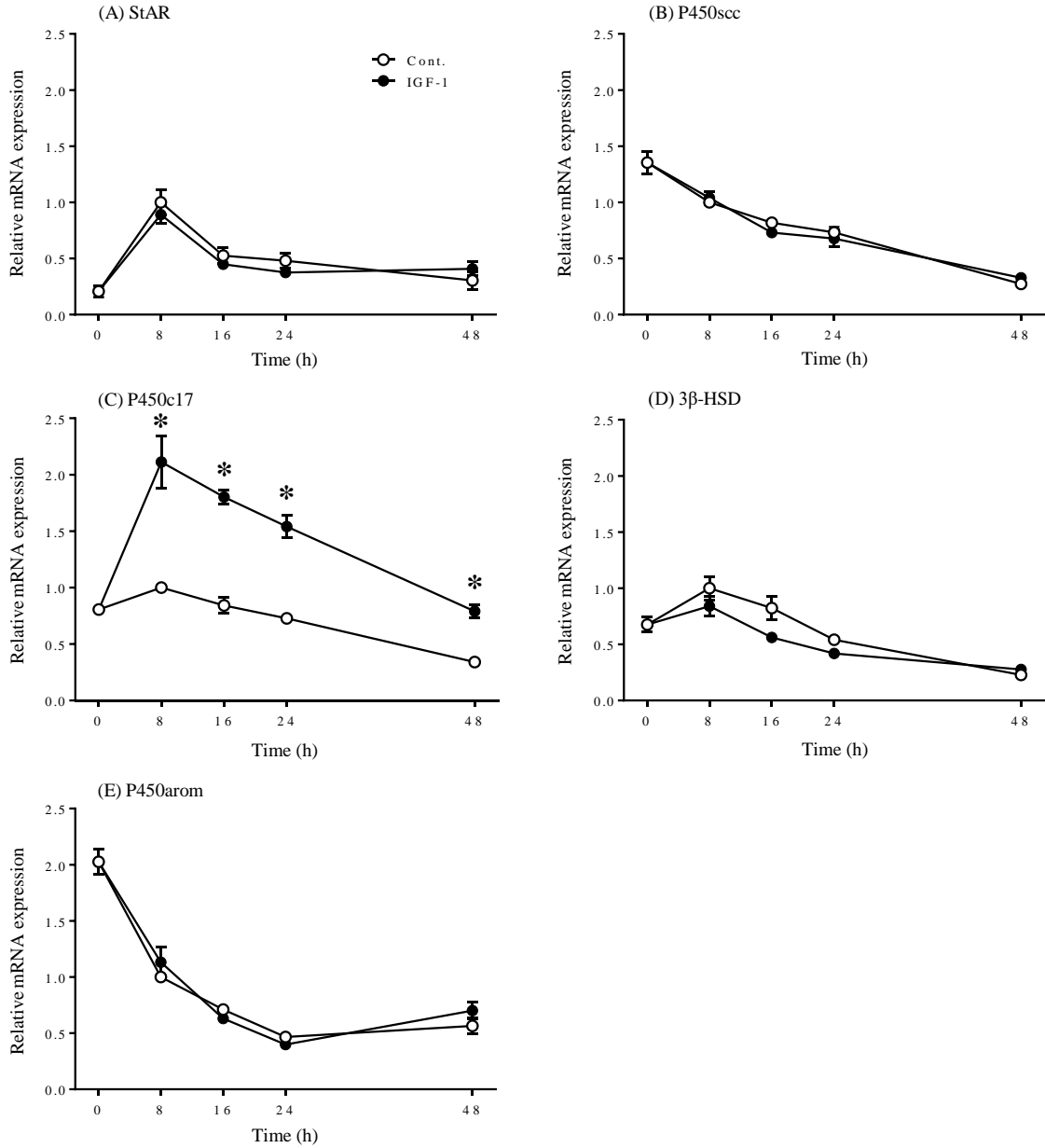


Fig. 28 Effects of IGF-1 (100 nM) on steroidogenesis related gene mRNA levels in secondary yolk stage ovarian follicles of the yellowtail. Quantitative PCR data for genes of interest were normalized to β -actin gene mRNA levels. The data expressed as the mean \pm SEM ($n = 3$). An asterisk indicates a significant difference between control and IGF-1 treated groups at each time point ($P < 0.05$, t -test).

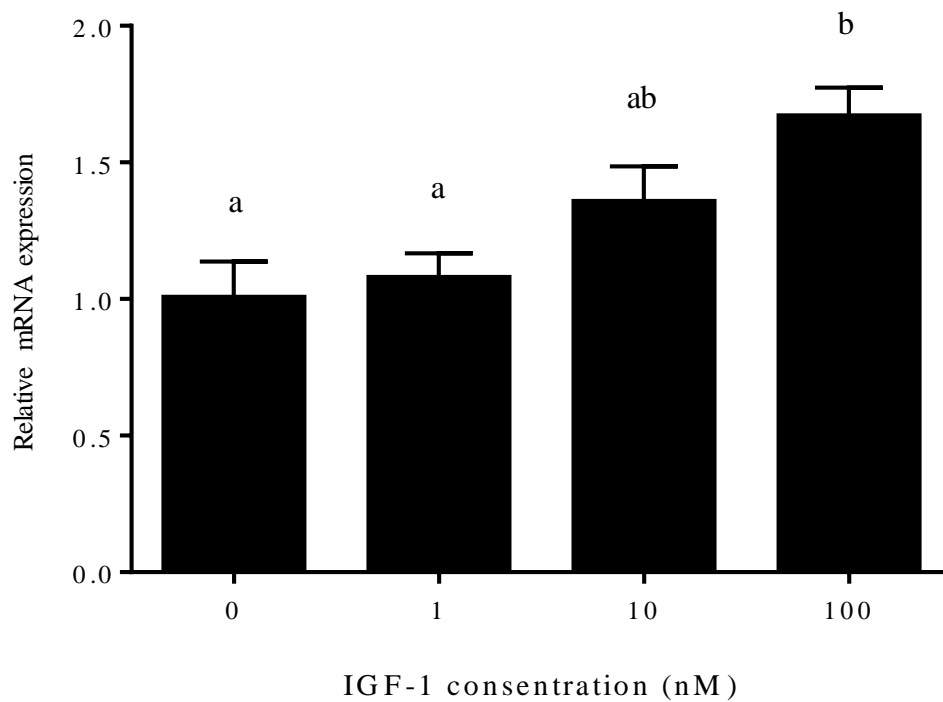


Fig. 29 Effects of different IGF-1 concentration for 8 h on P450c17 gene mRNA levels in secondary yolk stage ovarian follicles of the yellowtail. Quantitative PCR data for gene of interest were normalized to β -actin gene mRNA levels. The data expressed as the mean \pm SEM ($n = 3$). Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test).

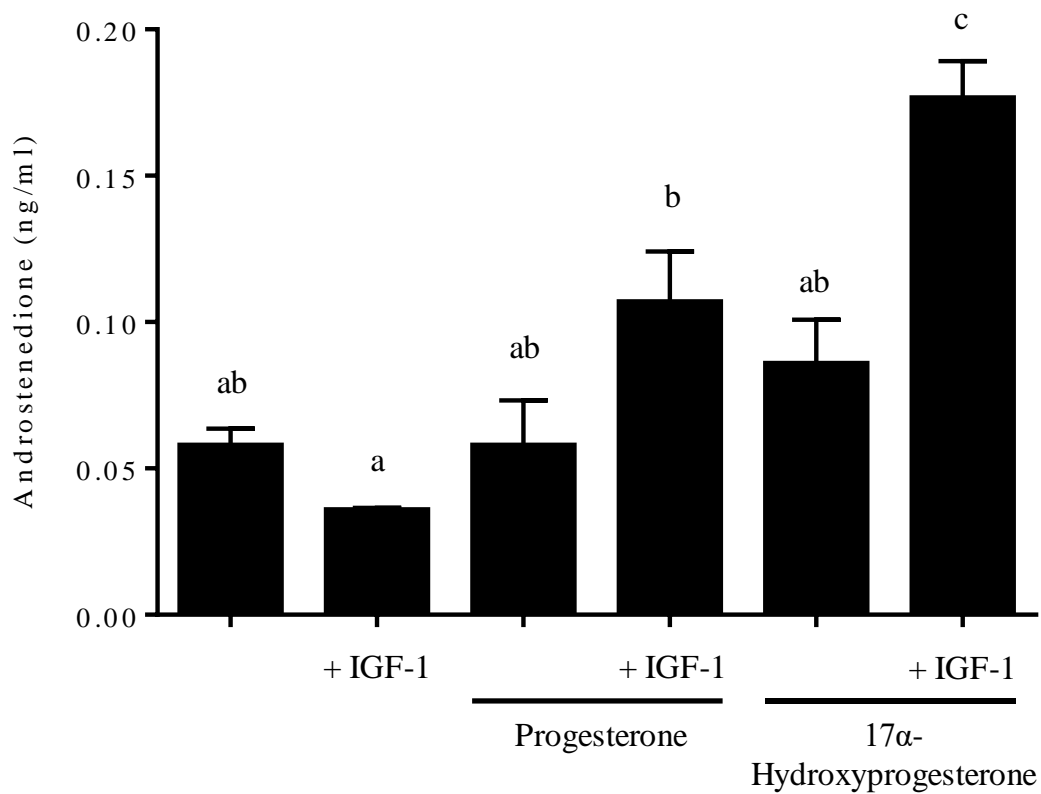


Fig. 30 Effects of IGF-1 on 17 α -hydroxylase/17,20-lyase activity in secondary yolk stage ovarian follicles of the yellowtail. Ovarian follicles were incubated in 0.5 ml incubation medium containing progesterone or 17 α -hydroxyprogesterone alone (100 ng/ml) or in combination with IGF-1 (100nM) for 24 h at 20°C. The data expressed as the mean \pm SEM ($n = 3$). Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$, two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test).

莖膜細胞で発現する IGF-1 が自己分泌あるいは傍分泌を介して P450c17 遺伝子発現量を特異的に増加させることで性ステロイド合成を活性化していることを示している。これまでに、生体外培養系を用いて、IGF-1 が性ステロイド合成に及ぼす効果を遺伝子発現レベルで調べられた研究例は少ないが、本研究の結果は少なくとも魚類を用いた既報の研究結果と大きく異なっている。例えば、コイの卵巣を用いた生体外培養系において、IGF-1 は顆粒膜細胞で発現する P450arom 遺伝子発現を増加させることで、E2 合成を促していることが報告されている (Paul et al., 2010)。同様に、マダイの卵巣を用いた研究においても IGF-1 が P450arom 遺伝子発現を増加させ、顆粒膜細胞におけるアロマターゼを活性化させることで、テストステロンから E2 への代謝を促進させることが明らかとなっている (Kagawa et al., 2003)。特に、マダイでは、IGF-1 が顆粒膜細胞のみで発現していることが明らかとなっており (Kagawa et al., 1995)、マダイの IGF-1 の産生部位とその生理作用は理論的に一致していると言える。したがって、IGF-1 が StAR およびステロイド代謝酵素群の遺伝子発現に及ぼす効果は魚種によって大きく異なるものの、IGF-1 の産生部位とその生理作用には一定の関係があることが示唆された。

一般に、魚類の性ステロイド合成過程において、ステロイド代謝酵素 P450c17 は異なる二つの触媒作用 (17 α -hydroxylase および 17, 20-lyase 活性) を有していることが知られている。P450c17 は 17 α -hydroxylase 活性によってプロゲステロンのステロイド D 環の C17 位に水酸基を付加することで 17 α -ヒドロキシプロゲステロンへ転換する触媒作用を示した後、17, 20-lyase 活性によって C17-20 位の炭素結合を開裂することでアンドロステンジオンへ代謝する (Yanase, 1995 ; Trant, 1995 ; Halm et al., 2003)。特に、17, 20-lyase 活性はチトクローム b5 を共発現している生殖腺においてのみ発現することが明らかとなっており、成熟の進行に極めて重要な E2 の合成に重要な役割を果たしている (Zhou et al., 2007)。本研究において、IGF-1 は 17 α -ヒドロキシプロゲステロン存在下でアンドロステンジオンへの代謝を促進したことに加えて、有意な差は認められなかったものの、プロゲステロンからアンドロステンジオンへの代謝を増加させた。したがって、

これらの結果は、ブリの卵巣において、IGF-1 は P450c17 遺伝子発現を増加させることで、17 α -hydroxylase / 17, 20-lyase の両触媒作用の活性化に関与していることを示している。最近の研究から、P450c17 のサブタイプ (P450c17-II) が新たにクローニングされ、従来のタイプ (P450c17-I) とは異なり、チトクローム b5 存在下においても 17, 20-lyase 活性を持たないことが明らかとなっている (Zhou et al., 2007 ; Jin et al., 2012)。カワスズメを用いた研究では、卵母細胞の最終成熟過程において、卵巣における P450c17-I 遺伝子発現量が低下する一方、P450c17-II 遺伝子発現が増加することが報告されている (Zhou et al., 2007)。魚類では、この最終成熟過程において、E2 を合成する代謝経路から 17 α -ヒドロキシプロゲステロンを前駆体として最終成熟誘起ホルモン (DHP) を合成する代謝経路へシフトすることから、17, 20-lyase 活性を持たない P450c17-II の発現は DHP の前駆体である 17 α -ヒドロキシプロゲステロンを多量に合成し、ステロイド代謝経路をシフトさせることに重要な役割を果たしていると示唆されている (Zhou et al., 2007)。第 1 節の結果から、ブリの卵巣では、成熟の進行に伴って IGF-1 および IGF-2 遺伝子の発現量が増加し、第三次卵黄球期の卵巣で最大となることが明らかとなっていることから (Higuchi et al., 2016)、IGF-1 あるいは IGF-2 が P450c17-II 遺伝子の発現調節に関与してステロイド代謝経路のシフトに関わっている可能性も考えられる。今後、IGF-1 あるいは IGF-2 が P450c17-II 遺伝子発現および 17, 20-lyase 活性に及ぼす影響を詳細に調べる必要があるだろう。

本研究の結果から、ブリ卵巣の卵濾胞で発現する IGF-1 が自己分泌あるいは傍分泌を介してステロイド代謝酵素 P450c17 遺伝子発現を特異的に増加させ、17 α -hydroxylase / 17, 20-lyase 活性を高めることで、成熟の進行に極めて重要な E2 の合成を促していることが明らかとなった。一般に、卵巣における IGF-1 産生は、肝臓における IGF-1 と同様に、GH の作用によって調節される (Reinecke, 2010 ; Wood et al., 2005)。カワスズメを用いた研究では、成長ホルモン受容体 (GHR) が成熟期の莢膜細胞および顆粒膜細胞において IGF-1 と共発現していることが明らかになっている (Schmid et al., 1999 ; Kajimura

et al., 2004)。また, Eppler et al. (2009) は, 生涯にわたって GH を過剰発現させたトランスジェニックカワスズメの生殖腺において, IGF-1 および IGF-2 遺伝子の発現量が増加することを報告している。実際に, いくつかの魚種を用いた *in vivo* および *in vitro* 実験において, GH が卵巣における IGF-1 遺伝子発現を増加させることも報告されている (Biga et al., 2004 ; Gioacchini et al., 2005 ; Berishvili et al., 2010)。したがって, これらの成長内分泌機構は, IGF を介して, ブリの卵巣の発達に重要な役割を果たしていることが強く示唆される。今後は, GH や GHR を中心に, 卵巣における IGF の調節機構を明らかにすることで, 成熟に及ぼす IGF の生理作用を詳細に検討していく必要があるだろう。

第3節 ブリの生殖周期に伴う精巢の発達と内分泌学的変化

これまでの研究から、魚類の精巢の発達においても IGF が重要な働きをしていることが示唆されている。ニジマスやカワスズメを用いた研究では、IGF-1 および IGF-1 受容体が精巢内の生殖細胞やセルトリ細胞で発現していることが明らかとなっており (Le Gac et al., 1996 ; Berishvili et al., 2006), 精原細胞の増殖や分化に関与していることが実験的に明らかとなっている (Loir and Le Gac, 1994 ; Vinas and Piferrer, 2008)。また、精巢で発現する IGF-1 は 11-KT 産生を促すことで、精子形成に重要な役割を果たしていることも報告されている (Nee Pathak et al., 2015)。したがって、成長内分泌機構が精巢の発達に果たす役割を解明するためには、成長誘導因子 IGF が精子形成にどのような役割を果たしているかを明らかにすることが重要であると考えられる。しかし、多くの魚類と同じように、ブリにおいても精子形成がどのような成熟内分泌機構によって調節されているかは不明な部分が多い。そこで本研究では、まず日長や水温といった飼育環境の季節変動に伴ってブリの精巢がどのように発達していくかを調べ、精巢の発達に伴う生殖腺刺激ホルモンおよび性ステロイド代謝酵素群といった成熟内分泌機構の遺伝子発現パターンを調べた。次に、精巢の発達に伴う精巢中 IGF-1 および IGF-2 遺伝子の発現動態を調べ、IGF がこれらブリ雄の成熟内分泌機構にどのような役割を果たしているかを調べた。

3-1 材料および方法

供試魚およびサンプリング

本研究には、国立研究開発法人水産研究・教育機構西海区水産研究所五島庁舎において海面小割生簀 (5 m×5 m×5 m) 内で天然種苗から育成したブリ 2 歳魚を用いた。自然環境下における精巢の発達過程を調べるため、2009 年 8 月から 2010 年 8 月まで毎月雄 5 尾をサンプリングした。サンプリングは、海面小割生簀からタモで 1 尾ずつ捕獲

し、ヘパリン処理した注射器を用いて尾柄部より採血した後、と殺した。魚体重および精巣重量を測定し、GSIを算出した。精巣中央部の組織片をブアン氏液で4℃にて一晩固定した後、70%エタノールに置換して保存した。採取した血液は、1,500 gで15分間遠心分離し、血漿を-80℃にて保存した。次に、成熟に伴う成熟誘導遺伝子およびIGF遺伝子の発現変化を調べるため、2013年12月から2014年4月まで毎月雄7尾をサンプリングした。上述と同様の方法で、採血を行うとともに、精巣中央部の組織片をブアン氏液で固定した。また、採取された脳下垂体および精巣をRNAlaterで4℃にて一晩処理した後、-30℃にて保存した。

精巣組織切片の作製と雄の成熟度の区分

固定した精巣片をエタノール系列で脱水し、ブタノールによる透徹を行った後、定法に従ってパラフィン包埋した。包埋した精巣片を厚さ3 μmで薄切し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施した。作製した組織切片を光学顕微鏡で観察し、Schulz et al. (2010)の報告に従ってブリの雄の成熟度を次の6段階に区分した (Fig. 31)。

ステージ I：精巣内に A 型精原細胞のみが認められる。

ステージ II：精巣内には主に A 型精原細胞が認められるが、一部に体細胞分裂によって分化の進んだ B 型精原細胞が認められる。

ステージ III：精子形成の初期段階で、減数分裂過程にある精母細胞のシストが認められる。

ステージ IV：精子形成の後期段階で、精母細胞および精細胞が精巣内を優占しており、一部に成熟した精子が認められる。

ステージ V：精巣内は成熟した精子によって満たされている。

ステージ VI：精子形成後の退行段階で、残留した精子と A 型精原細胞のみが認められる。

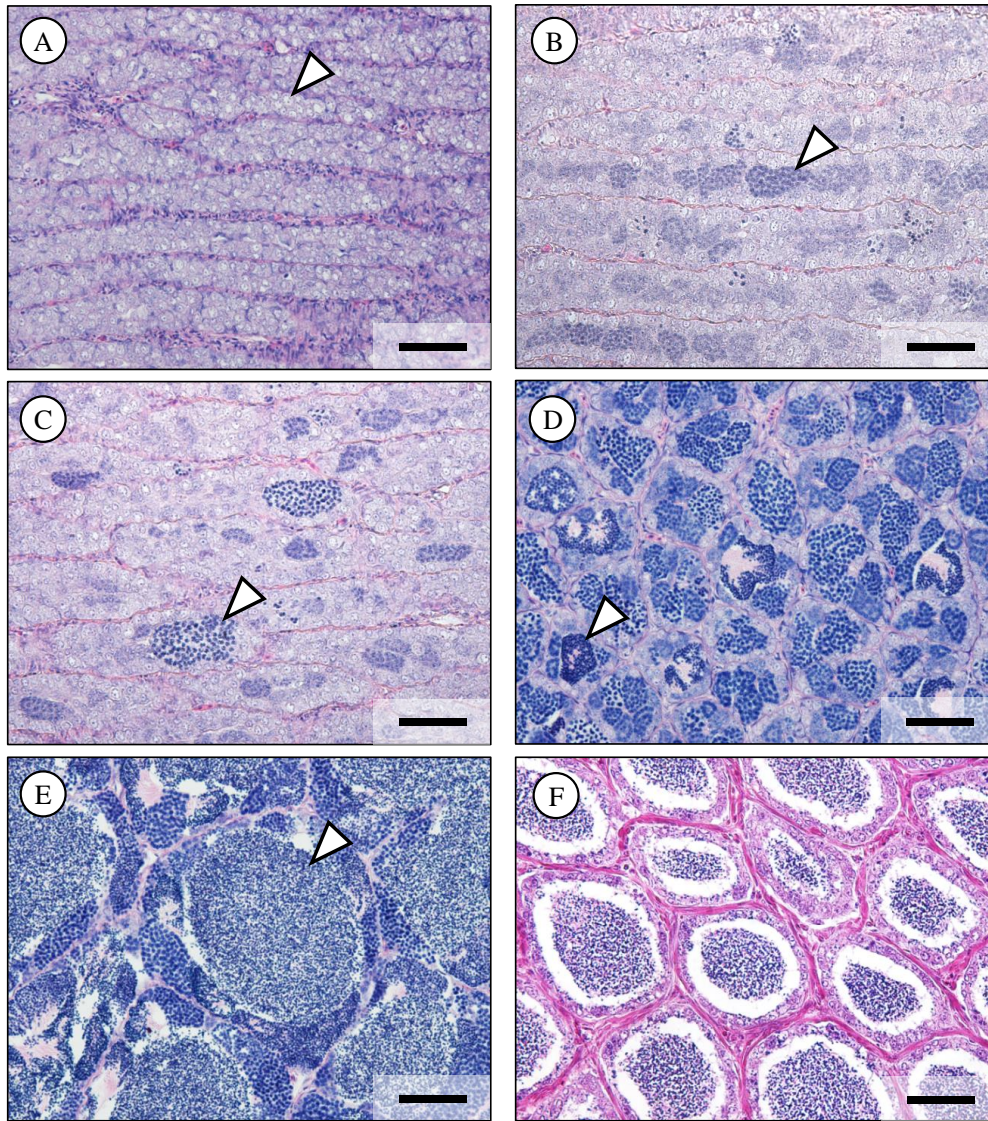


Fig. 31 Histological sections of yellowtail testes at different spermatogenic stages. (A) Stage I, an immature differentiated testis with seminiferous tubules containing only A-type spermatogonia (arrowhead). (B) Stage II, a testis in active mitotic division phase having the cysts of late B-type spermatogonia as the most advanced germ cell type (arrowhead), but mainly contained A-type spermatogonia. (C) Stage III, an early spermatogenic testis in meiotic division phase characterized by cysts of spermatocytes (arrowhead). (D) Stage IV, a late spermatogenic testis with spermatocytes and spermatids (arrowhead) being the dominant germ cell type, and a minor proportion of spermatozoa. (E) Stage V, a mature testis filled with functional spermatozoa (arrowhead). (F) Stage VI, a testis with only two types of germ cells, large numbers of spermatozoa and type-A spermatogonia after completion of spermatogenesis. Bars = 50 μ m.

血中 11-KT 濃度の測定

血漿を 10 倍量のジエチルエーテルで 3 回抽出し、アッセイ緩衝液 (EIA buffer) に溶解した。11-KT の測定は市販の ELISA 法による測定キット (11-Keto Testosterone EIA kit) を用いて行った。

リアルタイム PCR による遺伝子発現量解析

採取した脳下垂体および精巣片から ISOGEN II を用いて total RNA を抽出し、Poly(A) Purist MAG kit を用いて精製した。得られた mRNA を 50 ng 使用し、Omniscrypt RT kit にて逆転写反応を行った。リアルタイム PCR による遺伝子発現量解析は、TaqMan プローブを用いた絶対定量法により定量した。特異的プライマーおよび TaqMan プローブは Primer Express software v. 2.0 を用いて設計し、Integrated DNA Technologies 社から購入した (Table 1 および 7)。PCR 反応は、前述の cDNA 溶液 5 μ l を鋳型として、0.5 μ M の各プライマー、0.2 μ M の TaqMan プローブ、10 μ l の FastStart Essential DNA Probes Master, 4 μ l の蒸留水を含む 10 μ l の反応混合液中で、95°C で 10 分間熱変性を行った後、一連のサイクル (95°C 10 秒, 58°C 30 秒) を 45 回繰り返した。標的遺伝子の部分配列を組み込んだプラスミドを用いて 10 倍希釈ごとに 1×10^8 から 1×10^2 コピーの希釈系列を用いて検量線を作成した。なお、すべてのサンプルは 2 回試行で解析を行った。また、標的遺伝子が増幅されたかを確認するために、得られた増幅産物のシーケンスを行った。

統計処理

GSI および血中 11-KT 濃度、脳下垂体および精巣における遺伝子発現量は一元配置分散分析に処した後、各月および発達段階の間で有意差が生じているかを Tukey の多重比較で判定した (GraphPad Prism 6.0 software)。

3-2 結果

水温および日長の季節変動に伴う GSI, 血中 11-KT 濃度および精巢の組織学的変化

西海区水産研究所五島庁舎地先の水温は, 14°C (2月) から 29°C (8月) の間で変動した。日長は, 12月に最も短日となった後 (10L : 14D), 徐々に長日化し, 6月に最も長日となった (14L : 10D) (Fig. 32)。

GSI は, 8月から12月まで変化が認められなかったが (0.09~0.10), 1月に初めて増加が認められ (0.19 ± 0.05), 4月に最大となった (7.93 ± 0.43) (Fig. 33A)。血中 11-KT 濃度は, 1月以降急激に増加し, 2月に最大となった後 (4.6 ± 0.5 ng/ml), 4月まで高いレベルを維持した (Fig. 33B)。

季節変動に伴う精巢の組織学的変化を Fig. 34 に示した。8月から12月のすべての雄は精巢内に A 型精原細胞のみを有するステージ I の精巢を有していた。1月になると, B 型精原細胞や精母細胞が精巢内に認められるステージ II あるいはステージ III の発達段階の雄が出現し, 2月にはすべての雄が精子形成の後期段階であるステージ IV の精巢を有するまで発達した。4月には成熟した精子で満たされたステージ V の精巢がすべての雄に認められた。産卵終了後の5月には退行中であるステージ VI の精巢が認められ, 6月にはすべての雄でステージ I の精巢が認められた。

精子形成に伴う GSI および血中 11-KT 濃度の変化

GSI はステージ I からステージ III まで有意な変化は認められなかったが, ステージ IV 以降に急激に増加し, ステージ V では 3.69 ± 0.35 と最大となった (Fig. 35A)。血中 11-KT 濃度は精子形成の進行に伴って徐々に増加し, ステージ IV で 1.40 ± 0.11 ng/ml と最大となった後, ステージ V まで高いレベルを維持した (Fig. 35B)。

精子形成に伴う生殖腺刺激ホルモン β サブユニット, StAR, 性ステロイド代謝酵素群および IGF 遺伝子発現量の変化

脳下垂体における生殖腺刺激ホルモン β サブユニット遺伝子 (FSH および LHβ 遺伝

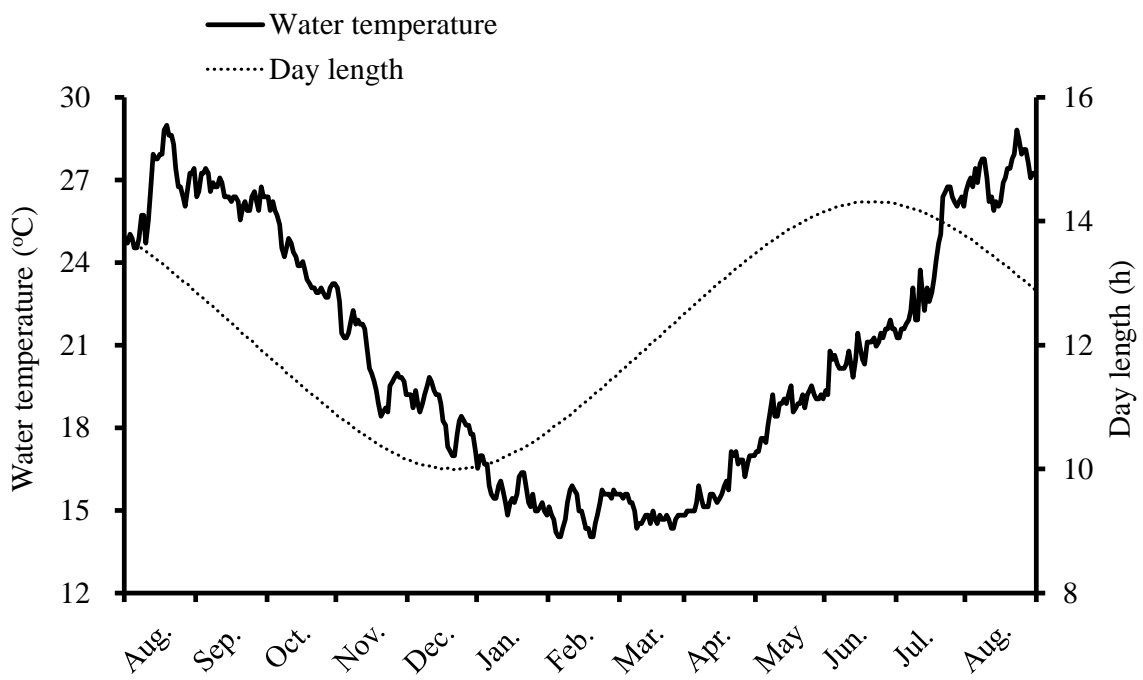


Fig. 32 Seasonal changes in water temperature and day length from August 2009 to August 2010.

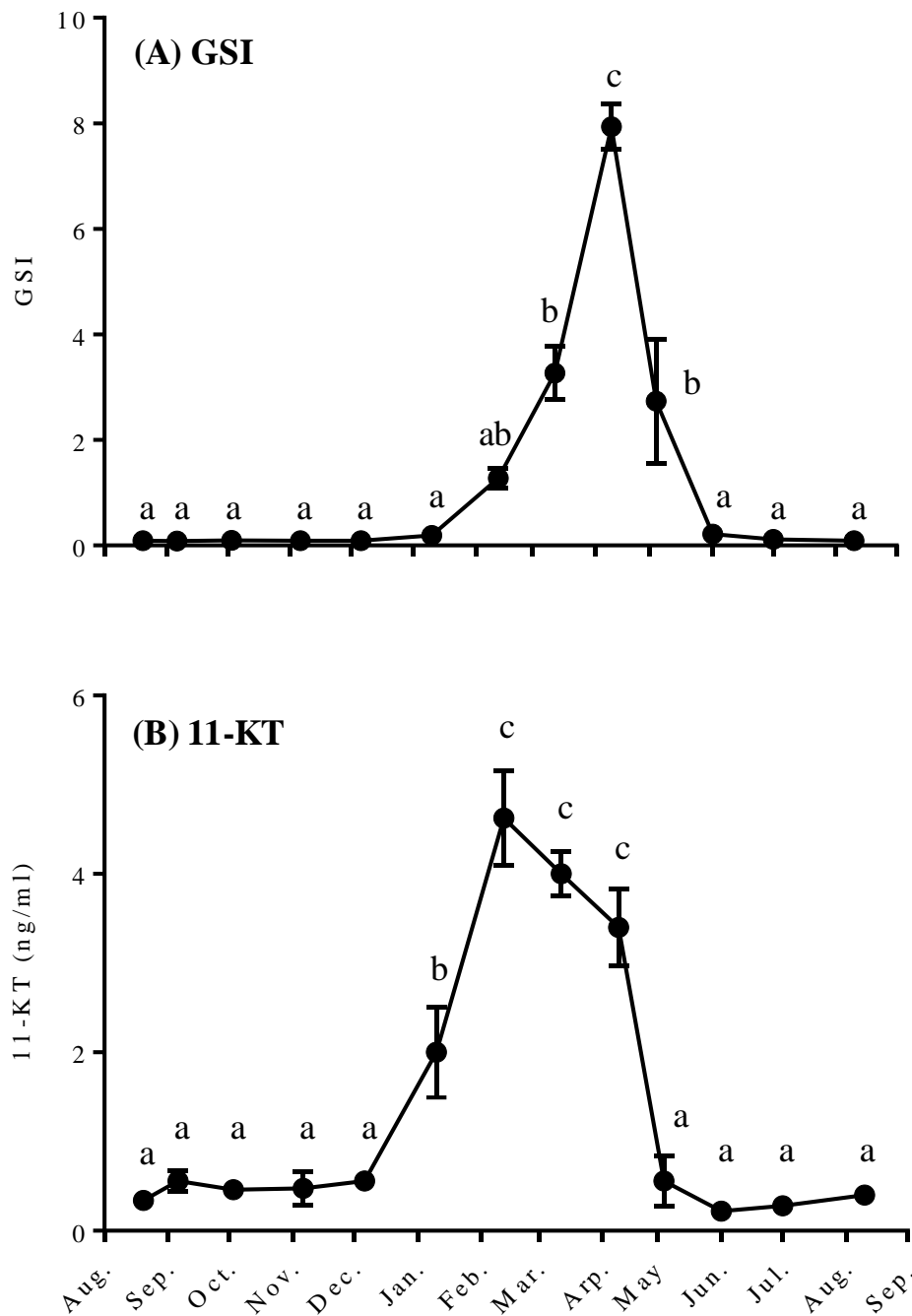


Fig. 33 Changes in GSI (A) and plasma 11-KT (B) of yellowtail males from August 2009 to August 2010. Data are presented as mean \pm SEM ($n = 5$ fish/time point). Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test).

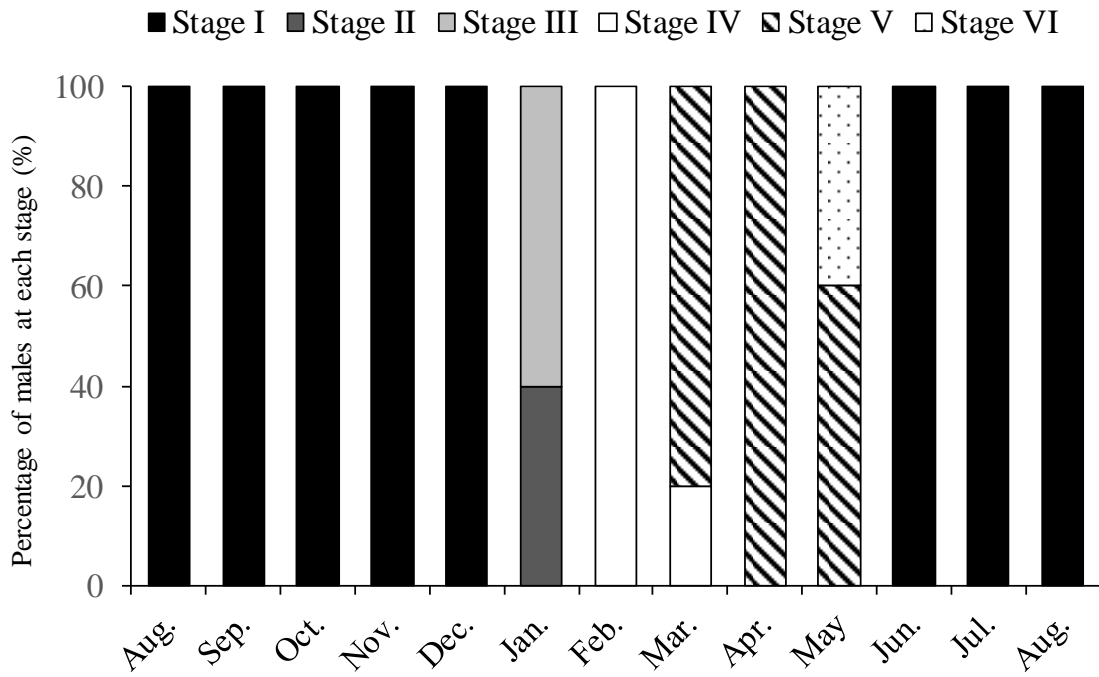


Fig. 34 Monthly percentage of yellowtail males at different spermatogenic stage in captivity, August 2009 to August 2010 ($n = 5$ fish/time point).

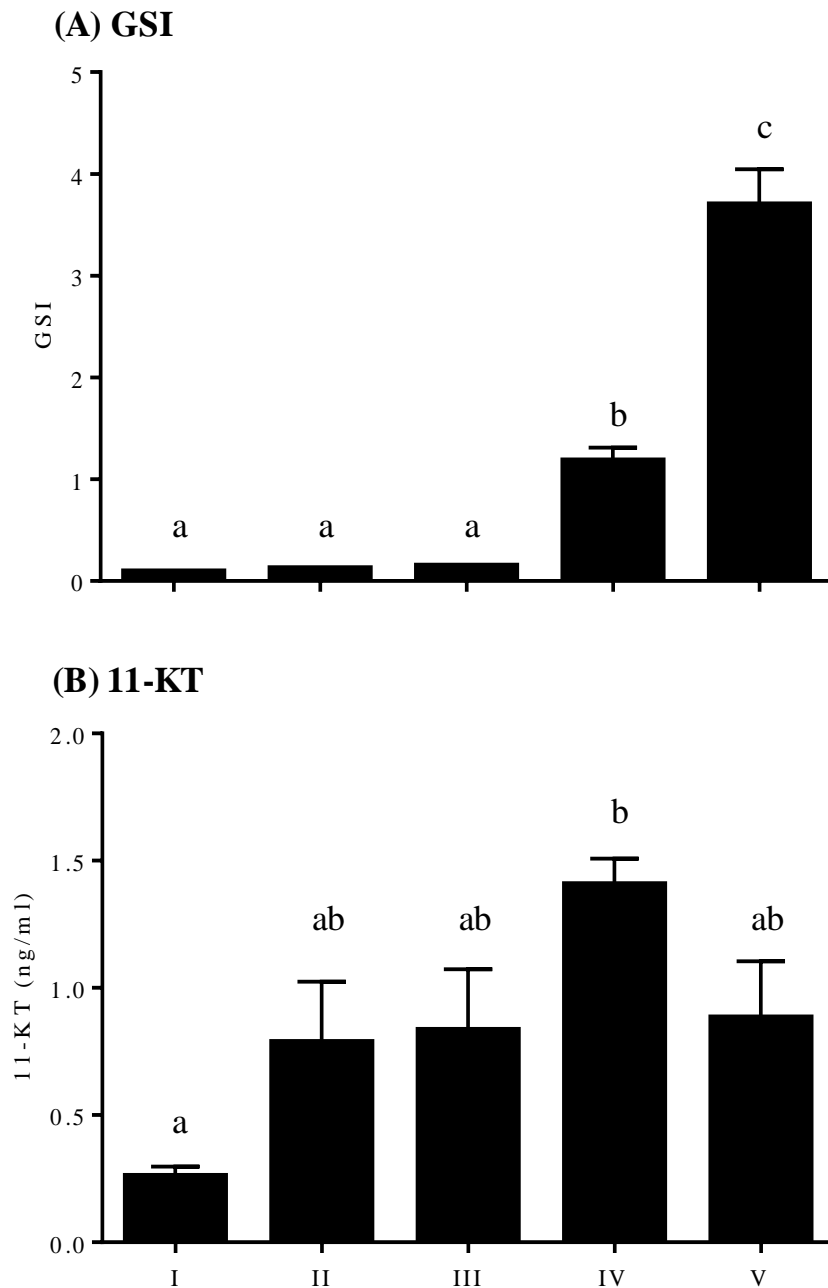


Fig. 35 Changes in GSI (A) and plasma 11-KT (B) of yellowtail males at different spermatogenic stages of the testes, December 2013 to April 2014. Stage I, immature phase with only A-type spermatogonia; stage II, mitotic proliferation phase with B-type spermatogonia; stage III, early spermiogenic phase with primary spermatocytes; stage IV, late spermiogenic phase with haploid spermatids; stage V, full mature phase with functional spermatozoa. Data are presented as mean \pm SEM ($n = 7$ fish in stage I, $n = 3$ fish in stage II and III, $n = 13$ fish in stage IV and $n = 5$ fish in stage V). Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test).

子) の発現量はステージ I からステージ III まで変化が認められなかったが、その後ステージ IV およびステージ V において急激な増加が認められた (Fig. 36)。

精巣におけるステロイド代謝酵素 P450_{scc} および P450_{c17} の遺伝子発現量はステージ I で比較的高かったものの、ステージ II で有意に低下した。しかし、ステージ III で急激に増加した後、ステージ V まで徐々に低下した (Fig. 37BC)。また、StAR および 3 β -HSD 遺伝子についても同様の発現パターンを示したが、精巣の各発達段階で有意な差は認められなかった (Fig. 37AD)。精巣における IGF-1 遺伝子発現量はステージ I からステージ III で非常に低かったが、ステージ III 以降急激に増加し、ステージ V で最大となった (Fig. 38A)。一方で、精巣における IGF-2 遺伝子発現は StAR および性ステロイド代謝酵素遺伝子と同様の発現パターンを示した (Fig. 38B)。

3-3 考察

本研究において、ブリの精子形成の進行には明確な季節性が認められた。例えば、最も短日となる冬至を経験した後の 1 月において初めて GSI の増加が認められた。また同様に、1 月にサンプリングされた雄において、成熟開始の指標とされている B 型精原細胞および精母細胞が精巣内に初めて出現した。これらの結果はブリの精子形成は冬至以降に日長の長日化によって引き起こされたことを示唆している。一般に、季節性繁殖の魚類において、日長は成熟の開始および完遂に極めて重要な環境要因であることが知られている (Taranger et al., 2010)。また、Duston and Bromage (1986) は成熟の進行に重要なのは絶対的な日長時間ではなく、日長時間の変化であると提案している。例えば、夏至後に成熟を開始し、冬場に産卵するヨーロッパアンシーバスの場合、精子形成開始前、精子形成期あるいはその両方の期間中に日長時間を 24 時間に切り替えるとその後の成熟が著しく抑制される (Begtashi et al., 2004 ; Felip et al., 2008)。また、European perch (*Perca fluviatilis*) を用いた研究では、13L : 11D の日長条件から 16L : 8D に 3 時間長日化して 2 週間飼育した後人為成熟誘導を試みたところ、長日化しなかった試験区と

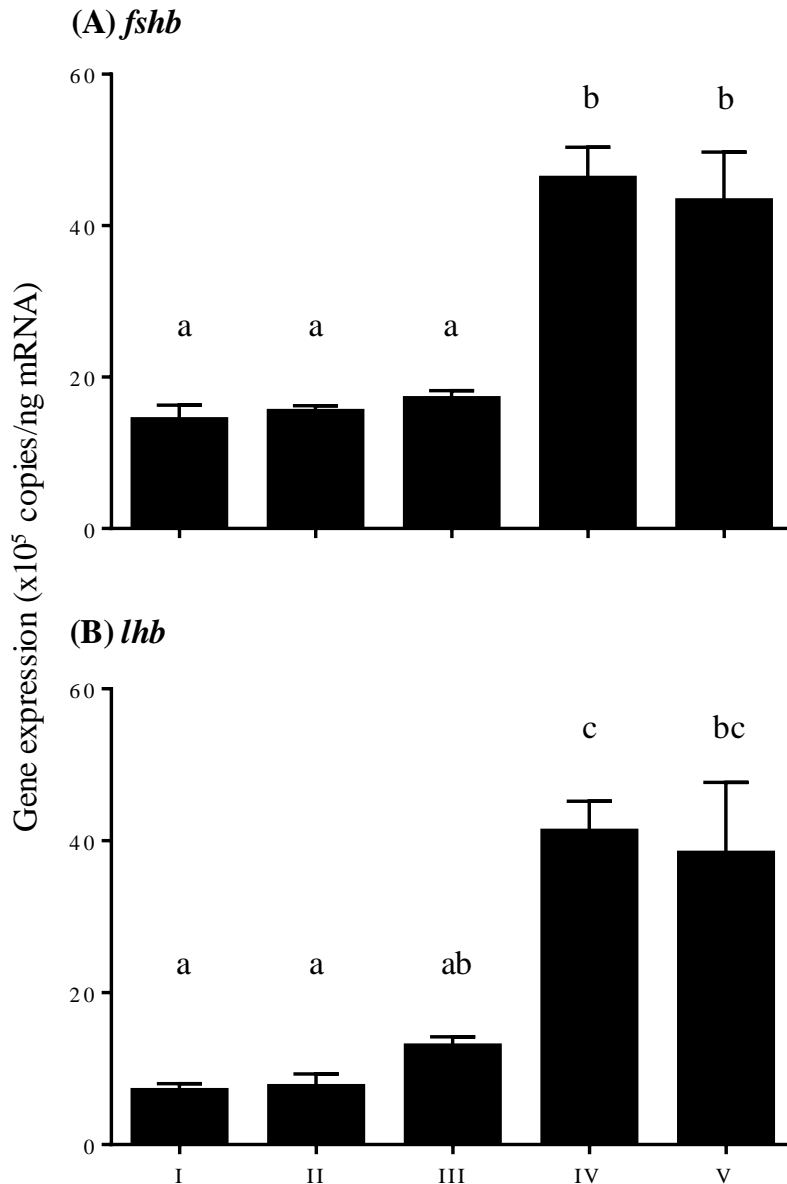


Fig. 36 Changes in pituitary transcripts of *fshb* (A) and *lhb* (B) of yellowtail males at different spermatogenic stages of the testes, December 2013 to April 2014. Stage I, immature phase with only A-type spermatogonia; stage II, mitotic proliferation phase with B-type spermatogonia; stage III, early spermiogenic phase with primary spermatocytes; stage IV, late spermiogenic phase with haploid spermatids; stage V, full mature phase with functional spermatozoa. Data are presented as mean \pm SEM ($n = 7$ fish in stage I, $n = 3$ fish in stage II and III, $n = 13$ fish in stage IV and $n = 5$ fish in stage V). Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test).

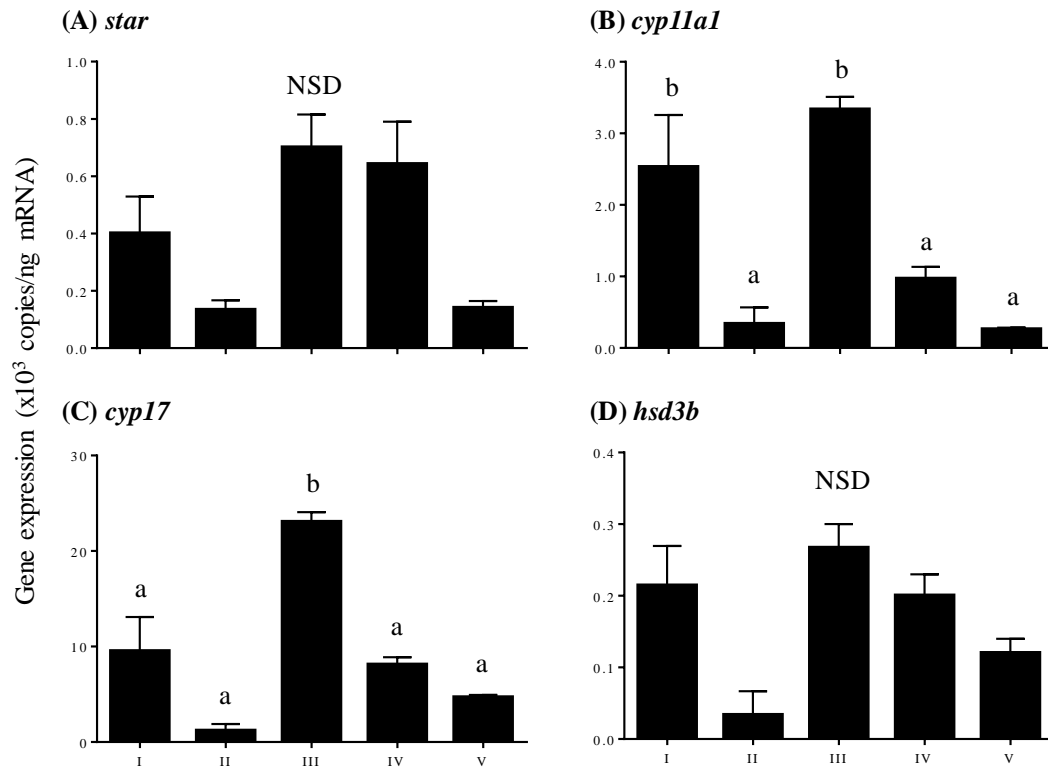


Fig. 37 Changes in transcripts of *star* (A) and steroidogenic enzyme *cyp11a1* (B), *cyp17* (C) and *hsd3b* (D) of yellowtail males at different spermatogenic stages of the testes, December 2013 to April 2014. Stage I, immature phase with only A-type spermatogonia; stage II, mitotic proliferation phase with B-type spermatogonia; stage III, early spermiogenic phase with primary spermatocytes; stage IV, late spermiogenic phase with haploid spermatids; stage V, full mature phase with functional spermatozoa. Data are presented as mean \pm SEM ($n = 7$ fish in stage I, $n = 3$ fish in stage II and III, $n = 13$ fish in stage IV and $n = 5$ fish in stage V). Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test).

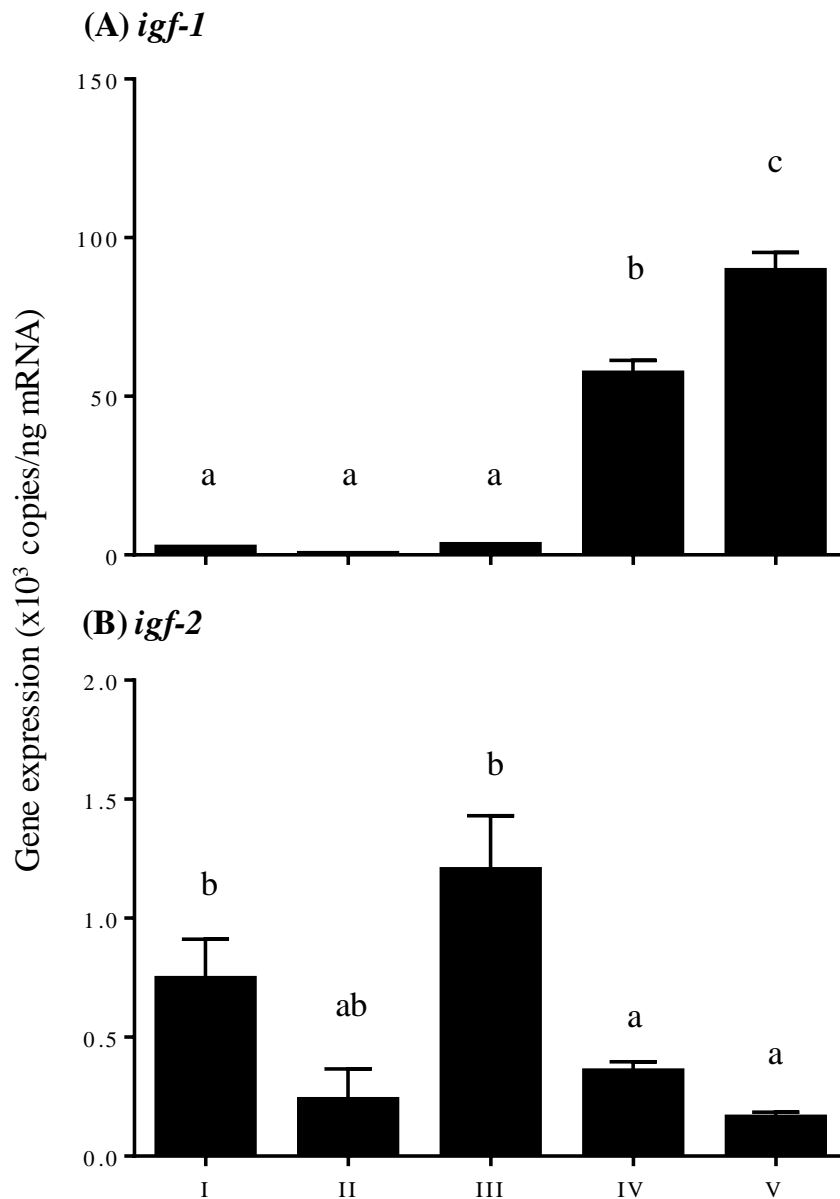


Fig. 38 Changes in transcripts of *igf-1* (A) and *igf-2* (B) of yellowtail males at different spermatogenic stages of the testes, December 2013 to April 2014. Stage I, immature phase with only A-type spermatogonia; stage II, mitotic proliferation phase with B-type spermatogonia; stage III, early spermiogenic phase with primary spermatocytes; stage IV, late spermiogenic phase with haploid spermatids; stage V, full mature phase with functional spermatozoa. Data are presented as mean \pm SEM ($n = 7$ fish in stage I, $n = 3$ fish in stage II and III, $n = 13$ fish in stage IV and $n = 5$ fish in stage V). Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$, ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test).

比較して成熟の進行が著しく抑制された (Fontaine et al., 2006)。これまでに魚類を用いた研究において、長日化によって成熟の開始が誘導されたという報告は少ないが、ブリにおいて 8L : 16D から 18L : 6D に長日化するとともに水温を 18°C に加温することで成熟の開始を誘導し、本来の産卵期である 4 月よりも早い時期に産卵させることに成功している (Mushiake et al., 1998 ; 浜田・虫明, 2006)。したがって、ブリの成熟開始は短日から長日への日長変化が主要因となっていることが強く示唆される。

ブリ雄の血中 11-KT 濃度は、体細胞分裂によって分化の進んだ B 型精原細胞および精母細胞が精巣内に初めて出現した 1 月に有意な増加が認められた。また、血中 11-KT 濃度は精巣が B 型精原細胞および精母細胞の最も多く含まれるステージ IV に発達する 2 月に最大となった。これらの結果は、11-KT が精原細胞の体細胞分裂の活性化に重要な役割を果たしていることを示している。実際に、ウナギの精巣を用いた生体外培養系において、11-KT が精原細胞の増殖を促進し、精子形成を誘導することが明らかとなっており (Miura et al., 1991)、このような現象はキンギョ (*Carassius auratus*) (Kobayashi et al., 1991) やイトウ (*Hucho perryi*) (Amer et al., 2001) 等でも明らかとなっている。

ブリ雄の精子形成に伴う生殖腺刺激ホルモン β サブユニットの遺伝子発現を定量したところ、FSH および LH β 遺伝子の発現パターンは極めて類似しており、これら遺伝子の発現量はステージ IV およびステージ V で最大となった。これまでの研究から、ブリの精巣における FSH 受容体遺伝子は精子形成の初期から後期段階にかけて強く発現し、精子形成過程における血中 11-KT 濃度の変化と類似した発現パターンを示すことが明らかとなっている (Rahman et al., 2003)。一方で、ブリ雄の LH 受容体遺伝子は精子形成の後期段階および排精精巣で最も発現量が高くなり、FSH 受容体と異なる発現パターンを示すことがわかっている (Rahman et al., 2003)。したがって、ブリの精子形成に及ぼす生殖腺刺激ホルモンの生理作用は FSH と LH で異なることが予想され、FSH は主に 11-KT 合成に関与していることが示唆される。たしかに、いくつかの魚種を用いた *in vitro* および *in vivo* 実験では、FSH および LH の両方が精巣での 11-KT 合成を誘導

することが報告されており (Kazeto et al., 2008 ; Chauvigne et al., 2012), 魚類の FSH 受容体は FSH のみならず, LH によっても活性化されることが知られている (Oba et al., 1999 ; Bogerd et al., 2001 ; So et al., 2005)。しかし, LH によって FSH 受容体が活性化されるには極めて高濃度の LH 量が必要であり, ニジマス (Sambroni et al., 2007), Manchurian trout (*Brachymystax lenok*) (Ko et al., 2007) およびヨーロッパアンシーバス (Moles et al., 2011) では LH による FSH 受容体の活性化作用は認められない。近年では, ブリと近縁種であるカンパチにおいても, FSH 受容体は FSH によってのみ活性化されることが明らかとなっている (Nyuji et al., 2016)。さらに, 最近の研究では, 精巣における性ステロイド産生細胞であるライディッヒ細胞において, LH 受容体だけではなく, FSH 受容体も発現していることが明らかとなっている (Ohta et al., 2007 ; Chauvigne et al., 2012)。以上の結果を総合すると, ブリの精巣において FSH のみがライディッヒ細胞で発現する FSH 受容体を介して 11-KT 合成に関与していると考えられる。今後, ブリの精子形成に伴う FSH および LH のタンパク量の変化や 11-KT 合成に及ぼす生理作用の解明が望まれる。

本研究において, ブリの精子形成における血中 11-KT 濃度の変化と, StAR および性ステロイド代謝酵素群の遺伝子発現量の変化に相関は認められなかった。StAR および性ステロイド代謝酵素群の遺伝子発現量はステージ II を除く精子形成の初期段階で最も高くなり, 精巣の発達の進行に伴って低下したのに対して, 血中 11-KT 濃度は精子形成の後期段階で最大となった。こうした性ステロイド量とその代謝酵素群の遺伝子発現パターンの違いはヨーロッパアンシーバスの精子形成にも認められている (Rocha et al., 2009)。一般に, 精子形成の後期段階になると, 精子を含む生殖細胞数が急激に増加するのに対して, セルトリ細胞やライディッヒ細胞といった体細胞数は相対的に減少することが知られている (Schulz et al., 2010)。すなわち, ステージ IV やステージ V における性ステロイド代謝酵素群の遺伝子発現量の低下はそれら遺伝子を発現している体細胞数が減少したことが要因と考えられる。一方で, 性ステロイド代謝酵素群の中でも

P450c17 遺伝子のみにおいて、ステージ I からステージ III にかけて有意に発現量が増加していた。ニジマスを用いた過去の報告においても、精子形成過程における P450_{sc}, P45011 β および 11 β -HSD 遺伝子の発現量にほとんど変化は認められないのに対して、P450c17 遺伝子のみが発現量が有意に増加し、血中 11-KT 濃度の変化と強い相関が認められ、ステロイド代謝酵素 P450c17 に依存して 11-KT が合成されていることが示唆されている (Kusakabe et al., 2006)。したがって、本研究の結果から、ステロイド代謝酵素 P450c17 がブリ雄の性ステロイド合成において極めて重要な役割を果たしていることが示唆される。

ブリの LH β 遺伝子の発現量は精子形成の後期段階および排精精巣で最も高くなった。この結果は、多くの魚類の精子形成過程における LH β 遺伝子発現パターンと一致している (Swanson et al., 1991 ; Hassin et al., 2000 ; Mateos et al., 2003 ; Hellqvist et al., 2006 ; Acharjee et al., 2015)。また、血中 LH 濃度の変化もその遺伝子発現と同様のパターンを示すことが明らかとなっている (Prat et al., 1996 ; Gomez et al., 1999 ; Campbell et al., 2003 ; Rocha et al., 2009 ; Shimizu et al., 2012)。実際に、ブリの精巣においても LH 受容体の遺伝子発現量が精子形成の後期段階および排精精巣で最大になることが報告されている (Rahman et al., 2003)。一般に、魚類の LH 受容体は哺乳類と同様に LH 特異的な生理作用を受けることが知られている (Schulz et al., 2010)。したがって、ブリの LH も他魚種と同じように精子の最終成熟や排精過程に重要な役割を果たしていると考えられる。

興味深いことに、ブリの精巣における IGF-1 遺伝子発現が精細胞や精子の出現に伴って特異的に増加した。また、ニジマスやヨーロッパヘダイ等の魚類の精巣において、IGF-1 受容体が発現していることが報告されている (Le Gac et al., 1996 ; Perrot et al., 2000)。このことから、精巣中 IGF-1 は精細胞あるいは精子で主に発現しており、自己分泌あるいは傍分泌を介して精子の最終成熟に関与している可能性が考えられる。しかし、本研究で見られたブリの精巣中 IGF-1 の遺伝子発現パターンは過去の魚類を用いた研究報告と大きく異なる。例えば、ヨーロッパシーバスでは、精巣からマイクロダイゼクシ

ョン法によって得られた精原細胞を含む生殖細胞のシストにおいて IGF-1 の遺伝子発現が認められている (Vinas and Piferrer, 2008)。また, Perrot et al. (2000) は, ヨーロッパヘダイの精巣では IGF-1 が主にセルトリ細胞および A 型精原細胞で発現していることを報告している。さらに, ニジマスを用いた研究では, パーコール法によって単離されたセルトリ細胞あるいは精原細胞を多く含む細胞集団において IGF-1 遺伝子発現が検出されることが明らかとなっている (Le Gac et al., 1996)。実際に, これらの遺伝子発現パターンと一致して, ニジマスおよびサメ類 (*Squalus acanthias*) の精巣を用いた生体外培養実験において, IGF-1 が生殖細胞の増殖を促すことを示している (Loir, 1994 ; Dubois and Callard, 1993)。一方で, ブリの精巣中 IGF-2 遺伝子は StAR および性ステロイド代謝酵素遺伝子と極めて類似した発現パターンを示した。この結果は, IGF-2 が性ステロイド合成に関与していることを意味しているかもしれない。これまでにコイ (Tse et al., 2002) およびカワスズメ (Caelters et al., 2004) の精巣において IGF-2 遺伝子が発現していることが知られているが, その発現部位や生理作用について研究された例は全くない (Reinecke, 2010)。したがって, 将来ブリのみならず魚類全般においても新規となる IGF-1 および IGF-2 の精子形成に及ぼす生理作用の解明が望まれる。

本研究の結果から, ブリの精子形成の開始は冬至以降の長日化によって誘導されることが示唆された。また, 精子形成の初期段階は FSH の作用による性ステロイド代謝酵素 P450c17 の活性化を介して合成される 11-KT によって進行すること, 精子の最終成熟や排精は LH によって促進されることが示唆された。さらに, IGF-1 および IGF-2 は自己分泌あるいは傍分泌を介してそれぞれ異なる生理作用によって精巣の発達に関与している可能性が示された。近年, 様々な生物において, 成熟の進行には生殖腺刺激ホルモン等といった成熟内分泌機構による制御だけではなく, IGF をはじめとする成長内分泌機構との協調作用も不可欠な要素であることが明らかとなりつつある。IGF-1 のノックアウトマウスを用いた研究では, 卵巣における FSH 受容体遺伝子の発現量が有意に低下することが知られており, IGF-1 は顆粒膜細胞の FSH 受容体の応答性を増加させ

ることで FSH と協調して卵形成を促していることが示唆されている (Zhou et al., 1997)。また、マダイやコイといった魚類においても、IGF-1 が顆粒膜細胞で発現するアロマターゼを活性化させ、LH の作用と協調して E2 合成を促進していることが明らかとなっている (Kagawa et al., 2003 ; Paul et al., 2010)。さらに、近年では、魚類の生殖腺で特異的に発現する新規の IGF、すなわち IGF-3 が見つかっており (Wang et al., 2008)、ゼブラフィッシュを用いた研究では、IGF-3 は IGF-1 および IGF-2 と違って FSH によって誘導され、精原細胞の増殖および分化を促し、減数分裂を誘導することが明らかとなっている (Nobrega et al., 2015)。したがって、IGF-3 を含む IGF ファミリーがブリの精子形成に果たす役割を明らかにするとともに、IGF の成熟内分泌機構との相互作用を解明していくことは重要な研究要素となるだろう。将来、IGF を中心とする成長内分泌機構が生殖腺刺激ホルモン、性ステロイドとどのように協調して魚類の精子形成を制御しているかを明らかにすることが望まれる。

第4章 総合考察

クロマグロやブリ、カンパチといった大型海産魚類の養殖では、その親魚養成に膨大な餌料費が不可欠となることが問題となっている。このため、親魚養成の低コストおよび省力化のために、成熟の進行や産卵に影響を及ぼすことなく、親魚養成における給餌の低コスト化を図ることが強く求められている。本研究では、ブリを大型海産魚類のモデル魚種として用い、異なる卵巣の発達段階における様々な期間の制限給餌が成熟の進行や産卵に及ぼす影響を形態学および内分泌学的な実験手法を用いて評価することで、親魚の栄養状態が成熟や産卵に及ぼす影響の解明を試みた。また、これらの知見を応用して、親魚養成における給餌の低コスト化技術の開発を目指した。さらに、給餌量に依存して変化する親魚の栄養状態が成熟や産卵を左右する内分泌メカニズムを解明するために、ブリの成熟内分泌機構に及ぼす成長誘導因子 IGF の生理作用の解明を試みた。

第2章では、ブリの親魚養成における給餌の低コスト化技術を開発するために、まず制限給餌時期の違いが成熟に及ぼす影響を調べることで、成熟開始前および成熟期のどちらの栄養状態に依存して成熟が進行するかを調べた。その結果、雌雄ともに、配偶子形成が進行する成熟期に制限給餌を行った場合のみで生殖腺の発達が抑制されたことから、ブリは成熟期に摂取したエネルギーに依存して配偶子形成および生殖腺の発達を進行させる *income breeder* の性質が強いことが明らかとなった。特に、雌において、成熟期の制限給餌は卵巣の性ステロイド合成を抑制することで、卵巣の発達に影響を及ぼすことが明らかとなった。次に、これらの知見をもとに、親魚の栄養状態が成熟の進行に影響しなかった成熟開始前に長期間（6 か月間）の制限給餌を行い、成熟および産卵に影響を及ぼすことなく給餌の低コスト化を図ることが可能かを調べた。その結果、成熟開始前の給餌量を飽食の 50% 量削減した場合でも、正常に成熟が進行し、雌については良質卵を得ることが可能であることが明らかとなった。以上の結果から、成熟開始前

の制限給餌によって、親魚養成にかかわる給餌の低コストが可能であることが明らかとなった。

第3章では、親魚の栄養状態が成熟の進行や産卵に影響を及ぼす内分泌メカニズムの解明に向けた基礎知見を収集するため、主要な成長誘導因子である IGF に着目し、これまで海産魚類においてほとんど不明であった成熟内分泌機構に及ぼす成長誘導因子の生理作用の解明に向けた研究を行った。まず、ブリの生殖周期に伴う卵巣中 IGF-1 および IGF-2 の遺伝子発現量および発現部位の変化を調べた。その結果、卵巣中 IGF-1 および IGF-2 が卵巣の発達に伴って発現し、性ステロイド合成部位である卵濾胞で産生されていることが明らかとなった。特に、IGF-1 は自己分泌あるいは傍分泌を介して 17α -hydroxylase / 17, 20-lyase 活性を高めることで、成熟の進行に極めて重要な E2 の合成を促していることが明らかとなった。一方で、精巣における IGF-1 および IGF-2 の遺伝子発現に関しても、生殖周期との関連性が認められ、精巣の発達に関与している可能性が強く示唆された。以上の結果から、成長内分泌機構の主要なホルモンである IGF が成熟の進行に重要な役割を果たしており、親魚の栄養状態といった生理情報は IGF を介して成熟内分泌機構へ伝達される可能性が強く示唆された。

本研究において、卵形成が進行する成熟期に制限給餌を行った場合に卵巣の性ステロイド合成が抑制され、成熟の進行に悪影響が生じた。第3章の結果から、卵巣で発現する IGF-1 が 17α -hydroxylase / 17, 20-lyase 活性を高めることで性ステロイド合成に関与していることが明らかとなった。一般に、IGF といった成長誘導因子は栄養状態に依存して産生されることから、卵巣における性ステロイド合成能の低下は成熟期の制限給餌によって卵巣の IGF の発現レベルが低下したことが原因の一つと考えられる。魚類を含む脊椎動物の IGF は、主に脳下垂体で合成・分泌される GH によって調節されているが (Wood et al., 2005)、絶食や制限給餌を行った場合、IGF の主要な合成器官である肝臓の GH 受容体の遺伝子発現が低下し、これに伴って血中 IGF レベルが低下することが明らかとなっている (Reindl and Sheridan, 2012)。興味深いことに、魚類の卵巣における卵

濾胞でも GH 受容体が発現していることが報告されており (Filby and Tyler, 2007 ; Zhou et al., 2016), 絶食条件下において, 肝臓以外の組織でも GH 受容体遺伝子の発現量が低下することが明らかとなっている (Reindl and Sheridan, 2012)。したがって, 肝臓と同様に生殖腺においても GH 受容体遺伝子の発現低下により IGF レベルの低下が生じている可能性が考えられる。絶食条件下で飼育されたギンザケの研究では, GH 受容体遺伝子の発現量は調べられていないものの, 卵巣の IGF 遺伝子の発現量が低下することが報告されている (Yamamoto et al., 2011)。これらの結果を考慮すると, ブリにおいて, 制限給餌によって引き起こされた栄養状態の低下は, 生殖腺で発現する IGF の発現レベルの低下を引き起こすことで成熟の進行に影響を及ぼしている可能性が推察される。本研究では, 成熟期に制限給餌を行った場合, 産卵期の P450c17 遺伝子発現量の低下は認められなかったが, 生体内における mRNA 発現とタンパク合成は必ずしも一致しないことが報告されているため, P450c17 の酵素活性が低下していた可能性も考えられる。今後, 親魚の栄養状態が成熟や産卵を左右する内分泌メカニズムを詳細に明らかにするために, 制限給餌条件下における卵巣の GH 受容体や IGF の発現解析, さらにステロイド代謝酵素群の活性評価を含めた検討を行っていく必要があるだろう。

本研究の結果から, 成熟開始前の過剰な制限給餌によって卵形成の開始時期が遅延し, 結果として卵の質が低下することが明らかとなった。成熟開始前に制限給餌を行った場合, 卵形成が開始される直前である 1 月において脳下垂体の生殖腺刺激ホルモン遺伝子の発現量が飽食給餌を行った場合と比較して有意に低かった。このことから, 成熟開始前の栄養状態の低下によって生殖腺刺激ホルモンの合成・分泌が抑制され, 卵形成が開始されなかったと考えられる。近年, サケ科魚類を用いた研究から, 脳下垂体において, IGF-1 が生殖腺刺激ホルモンの分泌にかかわる生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (Gonadotropin releasing hormone, GnRH) に対する感受性を上昇させること, 脳下垂体の FSH および LH β 遺伝子発現量を増加させることが報告されており, IGF-1 は卵形成開始時の生殖腺刺激ホルモン合成に重要な役割を果たしていると考えられている (Weil

et al., 1999 ; Baker et al., 2000 ; Luckenbach et al., 2010)。一般に、魚類を含む脊椎動物では、制限給餌によって血中 IGF-1 量が低下する (Wood et al., 2005)。したがって、成熟開始前に制限給餌を行った場合、血中 IGF レベルの低下によって引き起こされる生殖腺刺激ホルモンの合成の抑制がブリの成熟開始を遅延させた原因の一つとして推察される。今後は、卵巣に加えて、ブリの脳下垂体における IGF の生理作用を解明していく必要があるだろう。

上述したように、本研究の結果から、成熟開始前あるいは成熟期といった様々な段階における親魚の栄養状態に応じて、成熟の開始やその進行に影響が生じることが明らかとなった。しかし、このような成熟に及ぼす親魚の栄養状態の影響は、現状では成熟期あるいは産卵期に生殖腺の観察や成熟誘導因子の定量を行うことでしか評価することができない。このため、大型海産魚類から低コストかつ確実に良質卵を得る技術を開発するためには、親魚の栄養状態が成熟の進行や産卵に及ぼす影響を事前に予測可能なバイオマーカーの開発が望まれる。本研究の結果から、成熟内分泌機構に及ぼす成長誘導因子の内分泌的役割の一端が明らかとなり、成長誘導因子 IGF が親魚の栄養状態を成熟内分泌機構へ伝える伝達物質として機能している可能性が示唆された。このことから、IGF 等をバイオマーカーとして利用すれば、制限給餌による成熟・産卵への影響を事前に予測することが可能になるかもしれない。しかし、上述したように、親魚の栄養状態が成熟や産卵を左右する内分泌メカニズムについて不明な部分が多く残されている。今後、バイオマーカーを開発するために、成熟内分泌機構に及ぼす IGF を中心とした成長誘導因子の生理作用の解明に向けたさらなる研究が必要であろう。

本研究の結果から、成熟開始前の給餌量を 50%削減することで、成熟や産卵に影響を及ぼすことなく、ブリの親魚養成における給餌コストを年間で約 3 分の 1 削減することが可能になった。我が国における多くの養殖対象種は非同期発達型の成熟・産卵様式を有しているため、本研究で開発した給餌の低コスト化技術は他魚種に広く応用可能であると考えられる。例えば、クロマグロの場合、産卵期間中に複数回産卵し、しばしば数

日にわたって連続産卵すること (Masuma et al., 2011 ; Okochi et al., 2016), 成熟した卵巢内にはほとんどすべての発達段階の卵母細胞が同時に出現することが明らかとなっており (Gen, 2015), ブリと同様に, 卵形成が進行する成熟期に摂取したエネルギーに依存して卵を生産する *income breeder* の性質が強いと考えられる。このため, 本研究で開発した技術をクロマグロに応用すれば, これまで体重 100 kg 以上の巨大な親魚から卵を得るために必要であった年間 1,000 万円以上にも及ぶ給餌コストのうち少なくとも 3 分の 1 程度を削減可能になることが期待される。クロマグロは大型海産魚類の中で最も高値で取引されるため, 近年養殖産業が活発に展開されている。しかし, ほとんどの養殖種苗を天然の幼魚に依存しているため, 天然資源への影響が懸念されている。実際に, 太平洋に分布するクロマグロの資源量は低位とされており, その親魚資源量は歴史的最低水準まで低下している (水産庁, 2016)。将来, 当該技術によって養殖種苗のもととなる卵を効率的に確保可能になれば, 天然資源に依存することないクロマグロの完全養殖技術の普及にも貢献できるものと考えられる。

また, 副次的成果として, 制限給餌によって親魚の成長が抑制されることが明らかになった。したがって, これまで満腹になるまでたくさんの餌を与え, 過剰に大きくしていた親魚のサイズを小型化することが可能であると考えられ, さらなる給餌の低コスト化や飼育施設の小規模化が期待される。また, ブリ類を初め多くの養殖現場では, DNA マーカー等を利用した選抜・継代によって有用形質を持つ個体を作成する遺伝子マーカー育種が活発に行われている (Whatmore et al., 2013; Ozaki et al., 2013)。しかし, 複数の親魚群を長年にわたって継代し, 飼育保存するためには, 非常に大型の飼育施設が不可欠となる。成熟開始前の制限給餌によって親魚のサイズを小型化できれば, 限られたスペースでより多くの親魚を効率よく継代・飼育保存することが可能となり, 育種研究を効率よく進めることが可能になると期待される。

以上の一連の研究から, 大型海産魚類の親魚養成において, 成熟開始前に給餌量を削減することで, 成熟の進行や産卵に影響を及ぼすことなく, 給餌の低コストならびに省

力化が可能であることが明らかとなった。また、親魚の栄養状態によって成熟の進行や産卵に影響が生じる内分泌メカニズムの一端が明らかとなった。これまで魚類養殖の現場では、満腹になるまで親魚にたくさんの餌を与え、大きく太らせることで卵の確保が図られてきた。本研究で開発した新たな親魚養成法は、親魚養成における給餌コストを大幅に削減し、養殖種苗のもととなる卵の安定的確保に向けたブレイクスルーになると期待される。これまでクロマグロやブリ、カンパチといった大型海産魚類の養殖現場では、主に天然海域で捕獲した幼魚を養殖用種苗として利用してきた (Higuchi et al., 2014; Mushiake et al., 1998 ; Nuji et al., 2016)。しかし、天然種苗の確保は資源状況に大きく左右され、不安定であり、かつ資源への影響も懸念されるため、卵から人工的に育てた種苗を用いる完全養殖技術の開発およびその普及が強く求められている。本研究で開発した親魚養成の低コスト化技術によって、卵の安定的確保が可能となれば、完全養殖技術の確立に大きく寄与するものと考えられる。したがって、本研究の成果は、将来完全養殖技術の確立を通して、天然資源に依存することなく、水産物を安定的に供給できる持続可能な養殖技術の確立に大きく貢献できると考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、研究計画、その遂行および論文の作成に終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜り、また本稿の御校閲を頂いた長崎大学環東シナ海海洋環境資源研究センターの征矢野 清教授に謹んで深謝の意を表します。また、本論文の御校閲に労を取られ、有益かつ貴重な御助言を賜った長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科の萩原篤志教授、阪倉良孝教授、国立研究開発法人水産研究・教育機構西海区水産研究所まぐろ増養殖研究センターの玄 浩一郎博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり多大な御協力、御支援をいただきました国立研究開発法人水産研究・教育機構西海区水産研究所資源生産部の藤浪祐一郎氏、中川雅弘博士、堀田卓朗氏、吉田一範氏、野田 勉氏、水落裕貴氏および中条太郎氏、国立研究開発法人水産研究・教育機構増養殖研究所ウナギ種苗量産研究センターの島 康洋氏、元西海区水産研究所資源生産部の津崎龍雄氏、長崎大学環東シナ海海洋環境資源研究センターの盛田祐加助教、泉田大介氏（現所属、国立研究開発法人水産研究・教育機構北海道区水産研究所生産環境部）をはじめ同センターの職員諸氏、大学院ならびに学部生諸氏に心から感謝の意を表します。また、本研究に係わる供試魚の飼育について多大な御支援、御協力をいただいた西海区水産研究所五島庁舎の永尾美代氏、宿輪 仁氏、田中幸二氏をはじめ職員各位に心より御礼申し上げます。さらに、アンドロステンジオン量の測定に御協力いただいた国立研究開発法人水産研究・教育機構増養殖研究所育種研究センターの風藤行紀博士、卵の脂肪酸分析およびアミノ酸分析に御協力いただいた国立研究開発法人水産研究・教育機構増養殖研究所養殖システム研究センターの松成宏之博士、血中の生殖腺刺激ホルモン量の測定に御協力いただいた国立研究開発法人水産研究・教育機構中央水産研究所資源管理研究センターの入路光雄博士に心より御礼申し上げます。

西海区水産研究所業務推進部の虫明敬一博士には本研究を遂行する契機を頂くとともに、御指導と御鞭撻を賜り謹んで感謝の意を表します。

また、東京海洋大学海洋科学技術研究科の吉崎悟朗教授，先端科学技術研究センターの竹内 裕准教授には東京海洋大学大学院修士課程在学中に研究者としての基礎および取り組みについて御指導と御鞭撻を賜るとともに，卒業後も叱咤激励を頂きました。ここに謹んで感謝申し上げます。

さらに，本研究の遂行にあたり，御配慮と御鞭撻を頂いた西海区水産研究所まぐろ増殖研究センターの岡 雅一博士，高志利宣博士，澤口小有美博士，相馬智史氏，辻田明子氏，伊奈佳晃博士，鈴木絢子氏，小西淳平氏，深山喜好氏，長田知子氏，井手渕友美氏をはじめセンター職員各位に心より御礼申し上げます。

最後に，本研究の一部は，農林水産技術会議委託プロジェクト研究「養殖ブリ類の輸出促進のための低コスト・安定生産技術の開発」における研究開発の一環で実施しました。ここに記して感謝の意を表します。

引用文献

Acharjee, A., Chaube, R., Joy, K.P., 2015. Molecular cloning and characterization of the gonadotropin subunits GP α , FSH β , and LH β , genes in the stinging catfish *Heteropneustes fossilis*: Phylogeny, seasonal expression, and pituitary localization. J. Exp. Zool. 323, 567-585.

Adashi, E.Y., Resnik, C.E., Rosenfeld, R.G., 1990. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II hormonal action in cultured rat granulosa cells: mediation via type I but not type II IGF receptors. Endocrinology 126, 216-222.

Almansa, E., Perez, M.J., Cejas, J.R., Badia, P., Villamandos, J.R., Lorenzo, A., 1999. Influence of broodstock gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) dietary fatty acid on egg quality and egg fatty acid composition throughout the spawning season. Aquaculture 170, 323-336.

Amer, M.A., Miura, T., Miura, C., Yamauchi, K., 2001. Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). Biol. Reprod. 65, 1057-1066.

青海忠久・北島 力, 1980. マアジの種苗生産. 栽培技研 9, 53-59.

Asahina, K., Kambegawa, A., Higashi, T., 1995. Development of a microtiter plate enzyme-linked immunosorbent assay for 17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-on, a teleost gonadal steroid. Fish. Sci. 61, 491-494.

Baker, D.M., Davies, B., Dickhoff, W.W., Swanson, P., 2000. Insulin-like growth factor I

increases follicle-stimulating hormone (FSH) content and gonadotropin-releasing hormone-stimulated FSH release from coho salmon pituitary cell in vitro. *Biol. Reprod.* 63, 865-871.

Begtashi, I., Rodriguez, L., Moles, G., Zanuy, S., Carrillo, M., 2004. Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in juvenile male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). I. morphological aspects. *Aquaculture* 241, 539-559.

Bell, J.G., Sargent, J.R., 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture* 218, 491-499.

Berishvili, G., D'Cotta, H., Baroiller, J.F., Segner, H., Reinecke, M., 2006. Differential expression of IGF-I mRNA and peptide in the male and female gonad during early development of a bony fish, the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 146, 204-210.

Berishvili, G., Baroiller, J.F., Eppler, E., Reinecke, M., 2010. Insulin-like growth factor-3 (IGF-3) in male and female gonads of the tilapia: development and regulation of gene expression by growth hormone (GH) and 17alpha-ethinylestradiol (EE2). *Gen. Comp. Endocrinol.* 167, 128-34.

Bhatta, S., Iwai, T., Miura, C., Higuchi, M., Shimizu-Yamaguchi, S., Fukada, H., Miura, T., 2012. Gonads directly regulate growth in teleosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 11408-11412.

Biga, P.R., Schelling, G.T., Hardy, R.W., Cain, K.D., Overturf, K., Ott, T.L., 2004. The effects of recombinant bovine somatotropin (rbST) on tissue IGF-I, IGF-I receptor, and GH mRNA

levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocrinol. 135, 324-333.

Bogerd, J., Blomenrohr, M., Andersson, E., van der Putten, H.H., Tensen, C.P., Vischer, H.F., Granneman, J.C., Janssen-Dommerholt, C., Goos, H.J., Schulz, R.W., 2001. Discrepancy between molecular structure and ligand selectivity of a testicular follicle-stimulating hormone receptor of the African catfish (*Clarias gariepinus*). Biol. Reprod. 64, 1633-1643.

Bondy, C.A., Zhou, J., Arraztoa, J.A., 2006. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the ovary. In: Neill, J.D. (eds.), Physiology of Reproduction. Academic Press, San Diego, pp. 527-546.

Caelers, A., Berishvili, G., Meli, M.L., Eppler, E., Reinecke, M., 2004. Establishment of a real-time RT-PCR for the determination of absolute amounts of IGF-I and IGF-II gene expression in liver and extrahepatic sites of the tilapia. Gen. Comp. Endocrinol. 137, 196-204.

Campbell, B., Dickey, J., Beckman, B., Young, G., Pierce, A., Fukada, H., Swanson, P., 2006. Previtellogenic oocyte growth in salmon: relationships among body growth, plasma insulin-like growth factor-1, estradiol-17beta, follicle-stimulating hormone and expression of ovarian genes for insulin-like growth factors, steroidogenic-acute regulatory protein and receptors for gonadotropins, growth hormone and somatolactin. Biol. Reprod. 75, 34-44.

Chambers, R.C., Waiwood, K.G., 1996. Maternal and seasonal differences in egg sizes and spawning characteristics of captive Atlantic cod, *Gadus morhua*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53, 1986-2003.

Chandrashekar, V., Zaczek, D., Bartke, A., 2004. The consequences of altered somatotropic system on reproduction. *Biol. Reprod.* 71, 17-27.

Chauvigne, F., Verdura, S., Mazon, M.J., Duncan, N., Zanuy, S., Gomez, A., Cerda, J., 2012. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone mediate the androgenic pathway in Leydig cells of an evolutionary advanced teleost. *Biol. Reprod.* 87, 1-11.

Chourasia, T.K., Joy, K.P., 2008. Estrogen-2/4-hydroxylase activity is stimulated during germinal vesicle breakdown induced by hCG, IGF-1, GH and insulin in the catfish *Heteropneustes fossilis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155, 413-421.

中田 久・今吉隆志・荒川敏久・松山倫也, 2001. ブリ養成親魚の排卵誘導におけるホルモン投与法の検討. 九州大学大学院農学研究院学芸雑誌, 55, 169-177.

土津井憲彰, 福見敏房, 長谷川好男, 1979. 養成カンパチの成熟状態と人工採取卵・孵化仔魚の飼育について. 栽培技研 8, 95-103.

Dubois, W., Callard, G.V., 1993. Culture of intact Sertoli/germ cell units and isolated Sertoli cells from *Squalus testis*. II. Stimulatory effects of insulin and IGF-I on DNA synthesis in premeiotic stages. *J. Exp. Zool.* 26, 233-244.

Duston, J., Bromage, N., 1986. Photoperiodic mechanisms and rhythms of reproduction in the female rainbow trout. *Fish Physiol. Biochem.* 2, 35-51.

Elisio, M., Chalde, T., Miranda, L.A., 2014. Seasonal changes and endocrine regulation of

pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) oogenesis in the wild. *Comp. Biochem. Physiol. A* 175, 102-109.

Eppler, E., Berishvili, G., Mazel, P., Caelers, A., Hwang, G., Maclean, N., Reinecke, M., 2009. Distinct organ-specific up- and down-regulation of IGF-I and IGF-II mRNA in various organs of a GH-overexpressing transgenic Nile tilapia. *Transgenic Res.* 19, 231-240.

Escobar, S., Felip, A., Salah, M., Zanuy, S., Carrillo, M., 2014. Long-term feeding restriction in prepubertal male sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) increases the number of apoptotic cells in the reproductive parameters. *Aquaculture* 433, 504-512.

FAO, 2014. World review of fisheries and aquaculture. The state of world fisheries and aquaculture, FAO, Rome, pp. 3-98.

Felip, A., Zanuy, S., Muriach, B., Cerda-Reverter, J.M., Carrillo, M., 2008. Reproduction of sexual maturation in male *Dicentrarchus labrax* by continuous light both before and during gametogenesis. *Aquaculture* 275, 347-355.

Filby, A.L., Tyler, C.R., 2007. Cloning and characterization of cDNA for hormones and/or receptors of growth hormone, insulin-like growth factor-I, thyroid hormone, and corticosteroid and the gender-, tissue-, and developmental-specific expression of their mRNA transcripts in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 150, 151-163.

Folch, J., Lees, M., Sloane-stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.

Fontaine, P., Pereira, C., Wang, N., Marie, M., 2006. Influence of pre-inductive photoperiod variations on Eurasian perch *Perca fluviatilis* broodstock response to an inductive photothermal program. *Aquaculture* 255, 410-416.

Fukada, H., Dickey, J.T., Pierce, A.L., Hodges, N., Hara, A., Swanson, P., Dickhoff, W.W., 2003. Gene expression levels of growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I in gonads of maturing coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Fish Physiol. Biochem.* 28, 335-336.

Fukada, H., Murashita, K., Furutani, T., Masumoto, T., 2012. Yellowtail insulin-like growth factor I: molecular cloning and response to various nutritional conditions. *Domest. Anim. Endocrinol.* 42, 220-229.

Furuita, H., Murashita, K., Matsunari, H., Yamamoto, T., Nagao, J., Nomura, K., Tanaka, H., 2014. Decreasing dietary lipids improves larval survival and growth of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.* 80, 581-587.

Gen, K., Okuzawa, K., Kumakura, N., Yamaguchi, S., Kagawa, H., 2001. Correlation between messenger RNA expression of cytochrome P450 aromatase and its enzyme activity during oocyte development in the red seabream (*Pagrus major*). *Biol. Reprod.* 65, 1186-1194.

Gen, K., 2015. Physiology of bluefin tuna reproduction: New insights into reproduction in wild and captive bluefin tuna species. In: Kitagawa, T., Kimura, S. (eds.), *Biology and Ecology of Bluefin Tuna*, CRC press, Florida, pp. 325-354.

Gioacchini, G., Cardinali, M., Maradonna, F., Funkenstein, B., Mosconi, G., Carnevali, O., 2005. Hormonal control of the IGF system in the sea bream ovary. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1040, 320-322.

Gomez, J.M., Weil, C., Ollitrault, M., Le Bail P.Y., Breton, B., Le Gac, F., 1999. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 113, 413-428.

Halm, S., Kwon, J.K., Rand-Weaver, M., Sumpter, J.P., Pound, N., Hutchinson, T.H., Tylera, C.R., 2003. Cloning and gene expression of P450 17 α -hydroxylase, 17, 20-lyase cDNA in the gonads and brain of the fathead minnow *Pimephales promelas*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 130, 256-266.

Hassin, S., Holland, M.C.H., Zohar, Y., 2000. Early maturity in the male striped bass, *Morone saxatilis*: follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone gene expression and their regulation by gonadotropin-releasing hormone analogue and testosterone. *Biol. Reprod.* 63, 1691-1697.

Hellqvist, A., Schmitz, M., Mayer, I., Borg, B., 2006. Seasonal changes in expression of LH- β and FSH- β in male and female three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 145, 263-269.

浜田和久・虫明敬一, 2006. 日長および水温条件の制御によるブリの12月採卵. *日水誌*, 72, 186-192.

Higuchi, K., Tanaka, Y., Eba, T., Nishi, A., Kumon, K., Nikaido, H., Shiozawa, S., 2014. Causes of heavy mortality of hatchery-reared Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* juveniles in sea cages. *Aquaculture* 424-425, 140-145.

Higuchi, K., Gen, K., Izumida, D., Kazeto, Y., Hotta, T., Takashi, T., Aono, H., Soyano, K., 2016. Changes in gene expression and cellular localization of insulin-like growth factors 1 and 2 in the ovaries during ovarian development of the yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 232, 86-95.

Jin, G.X., Wen, H.S., He, F., Li, J.F., Chen, C.F., Zhang, J.R., Chen, X.Y., Shi, B., Shi, D., Yang, Y.P., Qi, B.X., Li, N., 2012. Molecular cloning, characterization expression of P450c17-I and P450c17-II and their functions analysis during the reproductive cycle in males of barfin flounder (*Verasper moseri*). *Fish Physiol. Biochem.* 38, 807-817.

Jorgensen, C., Ernande, B., Fiksen, O., Dieckmann, U., 2006. The logic of skipped spawning in fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 63, 200-211.

Kagawa, H., Kobayashi, M., Hasegawa, Y., Aida, K., 1994. Insulin and insulin-like growth factors I and II induce final maturation of oocytes of red seabream, *Pagrus major*, *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95, 293-300.

Kagawa, H., Moriyama, S., Kawauchi, H., 1995. Immunocytochemical localization of IGF-I in the ovary of red seabream, *Pagrus major*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 99, 307-315.

Kagawa, H., Gen, K., Okuzawa, K., 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 follicles of red seabream, *Pagrus major*. Biol. Reprod. 68, 1562-1568.

Kajimura, S., Kawaguchi, N., Kaneko, T., Kawazoe, I., Hirano, T., Visitacion, N., Grau, E.G., Aida, K., 2004. Identification of the growth hormone receptor in an advanced teleost, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*), with special reference to its distinct expression pattern in the ovary. J. Endocrinol. 181, 65-76.

Kazeto, Y., Kohara, M., Miura, T., Miura, C., Yamaguchi, S., Trant, J.M., Adachi, S., Yamauchi, K., 2008. Japanese eel follicle-stimulating hormone (Fsh) and luteinizing hormone (Lh): production of biologically active recombinant Fsh and Lh by *Drosophila* S2 cells and their differential actions on the reproductive biology. Biol. Reprod. 79, 938-946.

Ko, H., Park, W., Kim, D.J., Kobayashi, M., Sohn, Y.C., 2007. Biological activities of recombinant Manchurian trout FSH and LH: their receptor specificity, steroidogenic and vitellogenic potencies. J. Mol. Endocrinol. 38, 99-111.

Kobayashi, M., Aida, K., Stacey, N.E., 1991. Induction of testis development by implantation of 11-ketotestosterone in female goldfish. Zool. Sci. 8, 389-393.

小林牧人・足立伸次, 2002. 生殖. 魚類生理学の基礎 (会田勝美編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 155-184.

Kusakabe, M., Nakamura, I., Evans, J., Swanson, P., Young, G., 2006. Changes in mRNAs encoding steroidogenic acute regulatory protein, steroidogenic enzymes and receptors for gonadotropins during spermatogenesis in rainbow trout testes. *J. Endocrinol.* 189, 541-554.

栗田 豊, 2010. 産卵親魚個体群の繁殖能力の時空間的変化が加入量に及ぼす影響. *水産海洋研究* 74, 4-18.

Lankford, S.E., Weber, G.M., 2010. Temporal mRNA expression of transforming growth factor-beta superfamily members and inhibitors in the developing rainbow trout ovary. *Gen. Comp. Endocrinol.* 166, 250-258.

Le Gac, F., Loir, M., Le Bail, P.Y., Ollitrault, M., 1996. Insulin-like growth factor I (IGF-I) mRNA and IGF-I receptor in trout testis and in isolated spermatogenic and Sertoli cells. *Mol. Reprod. Dev.* 44, 23-35.

Loir, M., Le Gac, F., 1994. Insulin-like growth factor-I and -II binding and action on DNA synthesis in rainbow trout spermatogenesis and spermatocytes. *Biol. Reprod.* 51, 1154-1163.

Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerda, J., 2010. Oogenesis in teleost: How fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 367-389.

Luckenbach, J.A., Dickey, J.T., Swanson, P., 2010. Regulation of pituitary GnRH receptor and gonadotropin subunits by IGF1 and GnRH in prepubertal male coho salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 167, 387-396.

Maestro, M.A., Planas, J.V., Moriyama, S., Gutierrez, J., Planas, J., Swanson, P., 1997. Ovarian receptors for insulin and insulin-like growth factor I (IGF-I) and effects of IGF-1 on steroid production by isolated follicular layers of the preovulatory coho salmon ovarian follicle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106, 189-201.

Masuma, S., Takebe, T., Sakakura, Y., 2011. A review of the broodstock management and larviculture of the Pacific northern bluefin tuna in Japan. *Aquaculture* 315, 2-8.

Mateos, J., Mananos, E., Martinez-Rodriguez, G., Carrillo, M., Querat, B., Zanuy, S., 2003. Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (α , FSH β and LH β) and their expression during the reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133, 216-232.

Matsunari, H., Hashimoto, H., Iwasaki, T., Oda, Kentaro, Masuda, Y., Imaizumi, H., Teruya, K., Furuita, H., Yamamoto, T., Hamada, K., Mushiake, K., 2013. Effect of feeding rotifers enriched with taurine on the growth and survival of larval amberjack *Seriola dumerili*. *Fish. Sci.* 79, 815-821.

松山倫也・香川浩彦・有元 操・丸山敬悟・広辻日出夫・柏木正章・劉 鋭, 1996. 胎盤性生殖腺刺激ホルモン投与により有機されたブリ卵巣卵の成熟過程. *水産増殖* 44, 189-195.

Miura, C., Yoshihara, Y., Shimizu-Yamaguchi, S., Hayashi, D., Hamada, K., Takeda, Y., Miura, M., Miura, T., 2014. Controlled feeding alleviates the reduced growth associated with spawning in farmed yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture* 424-425, 10-17.

Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagahama, Y., 1991. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 5774-5778.

Moles, G., Zanuy, S., Munoz, I., Crespo, B., Martinez, I., Mananos, E., Gomez, A., 2011. Receptor specificity and functional comparison of recombinant sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gonadotropins (Fsh and Lh) produced in different host systems. Biol. Reprod. 84, 1171-1181.

Mukherjee, D., Mukherjee, D., Sen, U., Paul, S., Bhattacharyya, S.P., 2006. In vitro effects of insulin-like growth factors and insulin on oocyte maturation and maturational-inducing steroid production in ovarian follicles of common carp, *Cyprinus carpio*. Comp. Biochem. Physiol. A 144, 63-77.

Mushiake, K., Kawano, K., Kobayashi, T., Yamasaki, T., 1998. Advanced spawning in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, by manipulations of the photoperiod and water temperature. Fish. Sci. 64, 727-731.

Nagahama, Y., 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. Int. J. Dev. Biol. 38, 217-229.

Negatu, Z., Hsiao, S.M., Wallace, R.A., 1998. Effects of insulin-like growth factor-I on final oocyte maturation and steroid production in *Fundulus heteroclitus*. Fish Physiol. Biochem. 19, 13-21.

Nelson, S.N., Van Der Kraak, G., 2010a. The role of the insulin-like growth factor (IGF) system

in zebrafish (*Danio rerio*) ovarian development. Gen. Comp. Endocrinol. 168, 103-110.

Nelson, S.N., Van Der Kraak, G., 2010b. Characterization and regulation of the insulin-like growth factor (IGF) system in the zebrafish (*Danio rerio*) ovary. Gen. Comp. Endocrinol. 168, 111-120.

Nee Pathak, N.D., Kumar, P., Lal, B., 2015. Endocrine regulation of testosterone production by Leydig cells in the catfish, *Clarias batrachus*: Probable mediators of growth hormone. Anim. Reprod. Sci. 154, 158-165.

Nobrega, R.H., Morais, R.D., Crespo, D., de Waal, P.P., de Franca, L.R., Schulz, R.W., Bogerd, J., 2015. Fsh stimulates spermatogonial proliferation and differentiation in zebrafish via Igf3. Endocrinology 156, 3804-3817.

Nyuji, M., Shiraishi, T., Selvaraj, S., In, V.V., Kitano, H., Yamaguchi, A., Okamoto, K., Onoue, S., Shimizu, A., Matsuyama, M., 2012. Immunoreactive changes in pituitary FSH and LH cells during seasonal reproductive and spawning cycles of female chub mackerel *Scomber japonicus*. Fish. Sci. 77, 731-739.

Nyuji, M., Kazeto, Y., Izumida, D., Tani, K., Suzuki, H., Hamada, K., Mekuchi, M., Gen, K., Soyano, K., Okuzawa, K., 2016. Greater amberjack Fsh, Lh, and their receptors: plasma and mRNA profiles during ovarian development. Gen. Comp. Endocrinol. 225, 224-234.

Oba, Y., Hirai, T., Yoshiura, Y., Yoshikuni, M., Kawauchi, H., Nagahama, Y., 1999. The duality of fish gonadotropin receptors: cloning and functional characterization of a second gonadotropin

receptor cDNA expressed in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*).

Biochem. Biophys. Res. Commun. 265, 366-371.

Ohta, T., Miyake, H., Miura, C., Kamei, H., Aida, K., Miura, T., 2007. Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. Biol. Reprod. 77, 970-977.

Okochi, Y., Abe, O., Tanaka, S., Ishihara, Y., Shimizu, A., 2016. Reproductive biology of female Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, in the Sea of Japan. Fish. Res. 174, 30-39.

Ouchi, K., Adachi, S., Nagahama, Y., Matsumoto, A., 1985. Ovarian maturity and plasma steroid hormone levels in the cultured and wild yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) during spawning season. Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult. 7, 13-20.

Ozaki, A., Yoshida, K., Fuji, K., Kubota, S., Kai, W., Aoki, J., Kawabata, Y., Suzuki, J., Akita, K., Koyama, T., Nakagawa, M., Hotta, T., Tsuzaki, T., Okamoto, N., Araki, K., Sakamoto, T., 2013. Quantitative trait loci (QTL) associated with resistance to a monogenean parasite (*Benedenia seriolae*) in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) through genome wide analysis. PLOS one 8, doi:10.1371/journal.pone.0064987.

Patino, R., Kagawa, H., 1999. Regulation of gap junctions and oocyte maturational competence by gonadotropin and insulin-like growth factor-I in ovarian follicles of red seabream. Gen. Comp. Endocrinol. 115, 454-462.

Patrino, M., Maccatrozzo, L., Funkenstein, B., Radaelli, G., 2006. Cloning and expression of

insulin-like growth factors I and II in the shi drum (*Umbrina cirrosa*). Comp. Biochem. Physiol. B 144, 137-151.

Paul, S., Pramanick, K., Kundu, S., Kumar, D., Mukherjee, D., 2010. Regulation of ovarian steroidogenesis *in vitro* by IGF-I and insulin in common carp, *Cyprinus carpio*: stimulation of aromatase activity and P450arom gene expression. Mol. Cell. Endocrinol. 315, 95-103.

Perrot, V., Moiseeva, E.B., Gozes, Y., Chan, S.J., Funkenstein, B., 2000. Insulin-like growth factor receptors and their ligands in gonads of a hermaphroditic species, the gilthead seabream (*Sparus aurata*): expression and cellular localization. Biol. Reprod. 63, 229-241.

Picha, M.S., Shi, B., Thomas, P., 2012. Dual role of IGF-II in oocyte maturation in southern flounder *Paralichthys lethostigma*: Up-regulation of mPR α and resumption of meiosis. Gen. Comp. Endocrinol. 177, 220-230.

Prat, F., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 1996. Validation of radioimmunoassays for two salmon gonadotropins (GTH I and GTH II) and their plasma concentrations throughout the reproductive cycle in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biol. Reprod. 54, 1375-1382.

Radaelli, G., Patruno, M., Maccatrozzo, L., Funkenstein, B., 2003. Expression and cellular localization of insulin-like growth factor-II protein and mRNA in *Sparus aurata* during development. J. Endocrinol. 178, 285-299.

Rahman, M.A., Ohta, K., Chuda, H., Nakano, S., Maruyama, K., Matsuyama, M., 2001. Gonadotropin-induced steroidogenic shift towards maturation-inducing hormone in a marine

carangid, *Seriola quinqueradiata* (Japanese yellowtail) during final oocyte maturation. J. Fish Biol. 58, 462-474.

Rahman, M.A., Ohta, K., Yoshikuni, M., Nagahama, Y., Chuda, H., Matsuyama, M., 2002. Characterization of ovarian membrane receptor for 17,20-dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Gen. Comp. Endocrinol. 127, 71-79.

Rahman, M.A., Ohta, K., Yamaguchi, A., Chuda, H., Hirai, T., Matsuyama, M., 2003. Gonadotropins, gonadotropin receptors and their expressions during sexual maturation in yellowtail, a carangid fish. Fish Physiol. Biochem. 28, 81-83.

Reindl, K.M., Sheridan, M.A., 2012. Peripheral regulation of the growth hormone- insulin-like growth factor system in fish and other vertebrates. Comp. Biochem. Physiol. A 163, 231-245.

Reinecke, M., 2010. Insulin-like growth factors and fish reproduction. Biol. Reprod. 82, 656-661.

Rideout, R.M., Rose, G.A., Burton, M.P.M., 2005. Skipped spawning in female iteroparous fishes. Fish Fish. 6, 50-72.

Rocha, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Gomez, A., 2009. Seasonal changes in gonadal expression of gonadotropin receptors, steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenic enzymes in the European sea bass. Gen. Comp. Endocrinol. 162, 265-275.

Rønnestad, I., Fyhn, H.J., 1993. Metabolic aspects of free amino acids in developing marine fish eggs and larvae. *Rev. Fish. Sci.* 1, 239-259.

Sadovy de Mitcheson, Y., Liu, M., 2008. Environmental and biodiversity impacts of capture-based aquaculture. FAO fisheries technical paper No. 508 Capture-based aquaculture, FAO, Rome, pp. 5-40.

Salze, G., Tocher, D.R., Roy, W.J., Robertson, D.A., 2005. Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.): egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock. *Aquacult. Res.* 36, 1488-1499.

Sambroni, E., Le Gac, F., Breton, B., Lareyre, J.J., 2007. Functional specificity of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gonadotropin receptors as assayed in a mammalian cell line. *J. Endocrinol.* 195, 213-228.

Schmid, A.C., Naf, E., Kloas, W., Reinecke, M., 1999. Insulin-like growth factor-I and -II in the ovary of a bony fish, *Oreochromis mossambicus*, the tilapia: in situ hybridisation, immunohistochemical localization, Northern blot and cDNA sequences. *Mol. Cell. Endocrinol.* 156, 141-149.

Schulz, R.W., de Franca, L.R., Lareyre, J.J., Le Gac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 390-411.

清野通康, 1974. 海産魚. 魚類の成熟と産卵 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 113-119.

Shearer, K., Parkins, P., Gadberry, B., Beckman, B., Swanson, P., 2006. Effects of growth rate/body size and a low lipid diet on the incidence of early sexual maturation in juvenile male spring Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 252, 545-556.

Shimizu, A., Ohkubo, M., Hamaguchi, M., 2012. Development of non-competitive enzyme-linked immunosorbent assays for mummichog *Fundulus heteroclitus* gonadotropins – examining seasonal variations in plasma FSH and LH levels in both sexes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 178, 463-469.

So, W.K., Kwok, H.F., Ge, W., 2005. Zebrafish gonadotropins and their receptors: II. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits: their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity. *Biol. Reprod.* 72, 1382-1396.

水産庁, 2014. 第 I 章 特集 養殖業の持続的発展. 水産白書 平成 26 年版, 水産庁, 東京, pp. 4-63.

水産庁, 2016. 平成 27 年度国際漁業資源の現況.

http://kokushi.fra.go.jp/H27/H27_04.html. (accessed 16.03.16)

Swanson, P., Suzuki, K., Kawauchi, H., Dickhoff, W.W., 1991. Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GtH I and GtH II. *Biol. Reprod.* 44, 29-38.

高野和則, 1989. 卵巣の構造と配偶子形成. 水族繁殖学 (隆島忠夫・羽生 功編), 緑

書房, 東京, pp. 3-34.

Taranger, G.L., Carrillo, M., Schulz, R.W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., Weltzien, F.A., Dufour, S., Karlsen, O., Norberg, B., Andersson, E., Hansen, T., 2010. Control of puberty in farmed fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 483-515.

Thorpe, J.E., Talbot, C., Miles, M.S., Keay, D.S., 1990. Control of maturation in cultured Atlantic salmon, *Salmo salar*, in pumped seawater tanks, by restricting food intake. *Aquaculture* 86, 315-326.

Thorpe, J.E., Mangel, M., Metcalfe, N.B., Huntingford, F.A., 1998. Modeling the proximate basis of salmonid life-history variation with application to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Evol. Ecol.* 12, 581-599.

Tse, M.C., Vong, Q.P., Cheng, C.H., Chan, K.M., 2002. PCR-cloning and gene expression studies in common carp (*Cyprinus carpio*) insulin-like growth factor-II. *Biochim. Biophys. Acta* 1575, 63-74.

Trant, J.M., 1995. Isolation and characterization of the cDNA encoding the spiny dogfish shark (*Squalus acanthias*) form of cytochrome P450c17. *J. Exp. Zool.* 272, 25-33.

Tveiten, H., Jobling, M., Andreassen, Y.I., 2004. Influence of egg lipid and fatty acids on egg viability and their utilization during embryonic development of spotted wolffish *Anahichas minor* Olafsen. *Aquacult. Res.* 35, 152-161.

Vinas, J., Piferrer, F., 2008. Stage-specific gene expression during fish spermatogenesis as determined by laser-capture microdissection and quantitative-PCR in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gonads. Biol. Reprod. 79, 738-747.

Vong, Q.P., Chan, K.M., Cheng, C.H.K., 2003. Quantification of common carp (*Cyprinus carpio*) IGF-I and IGF-II mRNA by real-time PCR: differential regulation of expression by GH. J. Endocrinol. 178, 513-521.

Wang, D.S., Jiao, B., Hu, C., Huang, X., Liu, Z., Cheng, C.H., 2008. Discovery of a gonad-specific IGF subtype in teleost. Biochem. Biophys. Res. Commun. 367, 336-341.

Weber, G.M., Sullivan, C.V., 2000. Effects of insulin-like growth factor-I on in vitro final oocyte maturation and ovarian steroidogenesis in striped bass, *Morone saxatilis*. Biol. Reprod. 63, 1049-1057.

Weber, G.M., Moore, A.B., Sullivan, C.V., 2007. In vitro actions of insulin-like growth factor-I on ovarian follicle maturation in white perch (*Morone americana*). Gen. Comp. Endocrinol. 151, 180-187.

Weil, C., Carre, F., Blaise, O., Breton, B., Le Bail, P.Y., 1999. Differential effect of insulin-like growth factor I on in vitro gonadotropin (I and II) and growth hormone secretions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different stages of the reproductive cycle. Endocrinology 140, 2054-2062.

Whatmore, P., Nguyen, N.H., Miller, A., Lamont, R., Powell, D., D'Antignana, T., Bubner, E.,

Elizur, A., Knibb, W., 2013. Genetic parameters for economically important traits in yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *Aquaculture* 400-401, 77-84.

Willis, D.S., Mason, H.D., Watson, H., Franks, S., 1998. Developmentally regulated responses of human granulosa cells to insulin-like growth factors (IGFs): IGF-I and IGF-II action mediated via the type-I IGF receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 1256-1259.

Wood, A.W., Duan, C., Bern, H.A., 2005. Insulin-like growth factor signaling in fish. *Int. Rev. Cytol.* 243, 215-285.

Wuertz, S., Gessner, J., Kirschbaum, F., Kloas, W., 2007. Expression of IGF-I and IGF-I receptor in male and female starlet, *Acipenser ruthenus* - evidence for an important role in gonad maturation. *Comp. Biochem. Physiol. A* 147, 223-230.

Yamamoto, Y., Luckenbach, J.A., Goetz, F.W., Young, G., Swanson, P., 2011. Disruption of the salmon reproductive endocrine axis through prolonged nutritional stress: changes in circulating hormone levels and transcripts for ovarian gene involved in steroidogenesis and apoptosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 172, 331-343.

Yanase, T., 1995. 17α -hydroxylase/17, 20-lyase defects. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53, 153-157.

Yoneda, M., Kitano, H., Tanaka, H., Kawamura, K., Selvaraj, S., Ohshimo, S., Matsuyama, M., Shimizu, A., 2014. Temperature- and income resource availability-mediated variation in reproductive investment in a multiple-batch-spawning Japanese anchovy. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*

516, 251-262.

Young, J.M., McNeilly, A.S., 2010. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction* 140, 489-504.

Zhou, J., Kumar, T.R., Matzuk, M.M., Bondy, C., 1997. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol. Endocrinol.* 11, 1924-1933.

Zhou, L.Y., Wang, D.S., Kobayashi, T., Yano, A., Paul-Prasanth, B., Suzuki, A., Sakai, F., 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, 4282-4291.

Zhou, R., Yu, S.M.Y., Ge, W., 2016. Expression and functional characterization of intrafollicular GH-IGF system in the zebrafish ovary. *Gen. Comp. Endocrinol.* 232, 32-42.