

論 文 要 旨

論 文 題 目

Physiological studies on gonadal sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*:
Description of sexual plasticity at the cellular level in the gonad

雌性先熟魚ミツボシキウセン*Halichoeres trimaculatus*の生殖腺転換に関する生理学的研究：
生殖腺における細胞レベルの性的可塑性に関する報告

It is well known that teleost fish exhibit a marked sexual plasticity, and differ from those of other higher vertebrates. Individuals of some fish change sex from female to male (protogyny), others change from male to female (protandry), and a few can change sex both way and multiple times (serial sex change). During sex change, regardless of direction, the gonads are dynamically transformed from one sex to the other. However, the fate and origin of the cells that construct the gonadal tissue have not been identified. In this thesis, I attempted to understand the mechanism of gonadal restructuring at the cellular level by using one of the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*, as a model of sex change.

First, I revealed the histological change of gonad and hormonal shift during sex change (Chapter II). Based on the endocrinological aspect of sex change, which is information obtained from chapter II, I established the experimental system of induction of sex change by treatment with aromatase inhibitor (AI) to analyze the physiological mechanism of sex change particularly (Chapter III). To clarify the cellular properties organizing gonad, I focused on cellular behavior, especially cell proliferation and apoptosis, during sex change (Chapter IV). Accordingly, I showed that oocytes disappear by apoptosis, gonial germ cells in the ovary differentiate into sperm and some types of ovarian somatic cells remain in the gonad during sex change. However, I could not specify the somatic cell types remaining in the sex-changing gonad at this time. Then, to identify the cell types remaining in the sex-changing gonad, it is essential to develop cell-specific biomarkers. Therefore, I checked expression profile of sex-related genes and steroidogenic enzyme gene to develop biomarkers (Chapter V–VIII). I showed that Foxl2 expresses in granulosa cells specifically in ovary, Dmrt1 can be used as biomarker for Sertoli cells. Also, I provided the possibility that fate and origin of SPCs during sex change by using steroidogenic enzymes and ultrastructures as biomarkers (Chapter VIII). Then, by these using biomarkers, I presented fate of proliferative ovarian somatic cells and origin of testicular somatic cells in the sex-changing gonad (Chapter IX).

In conclusion, pre-differentiated germ cells, which are gonial germ cells, have bipotentiality, suggesting that allow the switching of gametogenesis during sex change. Additionally, functional somatic cells of the ovary might be used as some testicular somatic cells during sex change. These cellular properties are responsible for gonadal sex change in the three-spot wrasse. Thus, gonadal sex change is artfully and highly controlled by germ and somatic cells at the cellular level in the gonad.

氏 名 野 津 了

平成24年2月13日

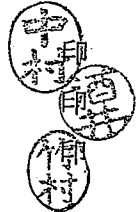
琉球大学大学院
理工学研究科長 殿

論文審査委員

主査 氏名 中村 將

副査 氏名 酒井一彦

副査 氏名 竹村明洋



学位（博士）論文審査及び最終試験の終了報告書

学位（博士）の申請に対し、学位論文の審査及び最終試験を終了したので、下記のとおり報告します。

記

申請者	専攻名 海洋環境学 氏名 野津 了 学籍番号 098607B	
指導教員名	中村 將	
成績評価	学位論文 <input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格	最終試験 <input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格
論文題目	Physiological studies on gonadal sex change in the protogynous wrasse, <i>Halichoeres trimaculatus</i> : Description of sexual plasticity at the cellular level in the gonad (雌性先熟魚ミツボシキュウセンの生殖腺転換に関する生理学的研究：生殖腺における細胞レベルの性的可塑性に関する報告)	
審査要旨（2000字以内） 魚類の生殖腺は高等な脊椎動物と比べて著しい性的可塑性を示す。特に、珊瑚礁域に生息する魚類では雌から雄へ、ある種では雄から雌へ、または両方向に性転換することが知られている。どのタイプの性転換も生殖腺は著しい形態的变化が伴う。野津了氏は特にミツボシキュウセンの雌から雄への性転換に伴う卵巣から精巣への変化過程に		

審査要旨

おける生殖腺を構成する生殖細胞と体細胞の運命を調べることで魚類の生殖腺に見られる性的可塑性機構を明らかにした。

はじめに、実験魚として用いたミツボシキュウセン雌2尾の同時飼育実験より、大きい方の個体が雄へと性転換する社会的性転換であることを明らかにした。同時に、性転換に伴い血中の雌性ホルモン量が有意に減少すること、卵巢組織が完全に消失し、代わって精巣組織が出現して成熟した精巣へと転換することを明らかにした。

次に、性転換研究には容易に性転換させる方法を確立する必要性から、雌性ホルモンの合成を低下させるアロマターゼインヒビター(AI)を成熟雌に3、5、10日間投与することで性転換誘導について調べた。その結果、5日以上AIを投与するとすべての卵巢は精巣へと転換することを明らかにした。投与5日処理直後の生殖腺はまだ精巣組織はみられないが、既に性転換の引き金がひかれており、性転換はかなり早い段階より開始していることを明らかにした。

AIの性転換誘導系を確立して以降の研究を行った。卵巢から精巣へと転換する過程で消失または分化する細胞系の追跡を行うために、細胞死および細胞増殖についてアポトーシスの指標となるカスパーゼ3の発現とBrdUの取り込み実験を特異抗体を用いて免疫組織化学的に調べた。その結果、性転換に伴い発達した卵母細胞にカスパーゼ3陽性反応が見られるものの、生殖原細胞を含む若い生殖細胞や体細胞に反応は極く少数しか見られなかった。このことから、卵巢を構成する多く細胞は精巣へ転換後にも残ることを明らかにした。またBrdUの陽性反応は性転換開始の極く初期の生殖腺の生殖原細胞の一部と、退行した卵を取り囲んでいた多数の顆粒膜細胞に見られた。その後、免疫陽性細胞群は卵巢薄板の中央部分に見られ、転換後も精巣中に散在した。この結果からも、卵巢を構成していた顆粒膜細胞は精巣へ転換後も残るとことを証明した。

次に、卵巢分化に関係するForkhead transcriptional factor -2(Foxl2)と精巣分化に関連すると考えられているdoubulesex/male abnormal -3related transcriptional factor-1(Dmrt1)およびgonadal soma derived factor (gsdf) 遺伝子をクローニンし、In situ hybridization 法またはポリクロナール抗体を作製して、性転換に伴う発現変化を調べ、体細胞の挙動を解析した。その結果、Foxl2遺伝子は、卵巢の体細胞のみならず性転換中および精巣でも強く発現することが明らかとなった。また、Dmrt1は性転換途中の生殖腺のセルトリ細胞で特異的に発現することが明らかになった。更に、性転換の後期に発現がセルトリ細胞で見られるようになった。Gsdfは卵巢にある生殖原細胞を取り囲む体細胞に既に弱い発現が見られる。性転換開始に伴い精原細胞を取り巻く体細胞で強く発現し、精巣のセルトリ細胞で強く発現した。このことからgsdfは精巣分化と密接な関係を持つ重要な因子であることを明らかにした。

ステロイド代謝酵素群の発現変化を調べ、ステロイド産生細胞の性転換における挙動を追跡した。その結果、卵母細胞を取り囲んでいた顆粒膜細胞が雄性ホルモン産生細胞へと分化する可能性が示唆された。以上のように卵巢から精巣へと転換する際に卵巢を構成した体細胞は、精巣へ転換後も残り精巣の機能を担う細胞へと分化することを明らかとした。このような細胞の可塑性が性転換を可能にしていると結論づけた。

したがって、本研究成果は海洋環境学において有用であり、提出された学位論文は博士の学位論文に相当するものと判断し、学位論文の審査を合格とする。また、平成24年2月13日に行われた論文発表会における発表ならびに質疑応答において、申請者は専門分野および関連分野の十分な知識ならびに琉球大学大学院理工学研究科博士後期課程修了者として十分な研究能力を有していることが確認できたので最終論文審査委員会は全会一致で最終試験を「合格」とした。