

## 論文題目

Title Endocrine mechanism of protogynous sex change in tropical grouper *Epinephelus merra*  
(熱帯性ハタ *Epinephelus merra* の雌性先熟型性転換の内分泌調節機構)

Groupers change sex from female-to-male when they attain a certain body size, but it is poorly understood how a fully functional female becomes an active male within a limited timeframe. I used endocrinological, histological, immunohistochemical, and molecular approaches to assess the role of the male-specific androgen (11-ketotestosterone, 11-KT) and the sex-dimorphic marker genes in sex change. Here, the *Epinephelus merra* grouper is used as a model animal. During the investigation of natural sex change, I first time reported that clusters of special cells in tunica near BV is a site of 11-KT biosynthesis in *E. merra* gonads. During sex change, this site possibly produces 11-KT in female that may cause oocyte degeneration and launch sex change. In this study, we also evidenced that in transitional gonads, Leydig cells are derived from estrogenic theca cells. The raises of 11-KT level with the increases of nucleus diameter of steroid producing cell (SPC) during mid to late phases of sex change suggest that efferent duct (ED) differentiation, proliferation of spermatogonial germ cells and subsequent spermatogenesis could be depend on the 11-KT biosynthesis in new site. Natural sex change mechanism clearly evidence that when estrogen (E2) decreases at early phase of sex change, that time 11-KT takes over the gonads and initiates spermatogenesis which restructures an ovary into a testis. Therefore, the restructuring of the gonads during female-to-male sex change is largely depends on 11-KT.

In order to verify the results of natural sex change, we conducted time-course study and induced sex change by aromatase inhibitor (AI). Here, I have demonstrated how and when androgen producing cells appear first time in the restructuring gonads and how correlates with the plasma level of 11-KT during female-to-male sex change in *E. merra*. First appearance of androgen observed in the restructuring gonads at early transitional (ET) phase when for the first time, plasma level of 11-KT goes up, oocytes degenerate and, gonial germ cells proliferate into spermatogonia. These results suggested that the appearance of androgen producing cells closely communicate with the plasma levels of 11-KT and initiation of spermatogenesis during sex change. The differentiation of ED and its relation with sharp increases of 11-KT evidenced that androgen may has important function for ED differentiation during sex change. These results further suggested that the initiation of spermatogenesis, ED differentiation and initiation of sex change largely depend on the elevated levels of 11-KT as described in natural process of sex change. Furthermore, here I again verified that the androgenic cells are derived from estrogenic theca cells during sex change.

By considering the critical role of 11-KT in female-to-male sex change, I examined how 11-KT biosynthesis occurs in *E. merra* gonads. It's generally known that the gonadotropin-releasing hormone (GnRH), gonadotropic hormones (Follicle stimulating hormone, FSH; Luteinizing hormone, LH), and their receptors (FSH receptor, FSHR; LH receptor, LHR) coordinately control steroid biosynthesis in vertebrates. In order to understand the process of 11-KT biosynthesis in *E. merra* gonads, here I cloned and quantified the FSHR and LHR during sex change. Quantitative analyses evidence that FSHR transcripts rise around the time of onset of sex change and significantly elevated levels were detected in late transitional (LT) and in sex changed male. However, LHR transcripts remained constant throughout the all phases of sex change. The differential expression pattern of FSHR transcripts during the process of sex change is well corresponded to the previously studied FSH transcripts, 11-KT level, P45011 $\beta$  activity and histological differentiation of sex change. Together with all findings, here I have proposed a model for 11-KT biosynthesis in *E. merra* gonads. On the basis of the model, during the initiation of sex change at ET phase, brain gives signal to the pituitary to release FSH that travels through blood and binds to FSHR in the gonads and activates intracellular signaling pathways which in turn induce 11-KT synthesis via direct transcriptional activation of 11-KT producing enzymes.

To understand the role of sex specific marker genes in sex change, here I cloned and quantified an ovarian specific marker gene called, Forkhead box 12 (Foxl2) and a testis specific marker gene called Doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (Dmrt1) during sex change. Quantitative expression analyses suggested that Foxl2 mRNA expression down regulates from the LT phase to the completion of natural sex change. Conversely, during natural sex change, Dmrt1 expression increases with the progression of spermatogenesis and continued until the formation of the testis. The expression profiles of these two genes corresponded closely with the plasma level of 11-KT and progress of sex change. Therefore, the data suggest that the elevated level of 11-KT during the early phase of sex change turns off or inactivates the Foxl2 gene, which facilitates oocytes degeneration, and at the same time turns on Dmrt1, which promotes the differentiation of gonial germ cells into spermatogonia and initiates sex change. This result is further clarified by androgen (17 alpha-methyltestosterone, MT) induced sex change. When I treated matured females with MT, females changed into males with the sharp increases of Dmrt1 transcripts. But the Foxl2 transcript levels remain constant during the progress of sex change. These data, suggested that androgen treatment possibly directly upregulates the Dmrt1 which lead to induce sex change. The high and constant transcript levels of Foxl2 during the process of sex change indicates that when Dmrt1 upregulates by androgen treatment, even high levels of Foxl2 transcripts can not keep the ovary into function. It is most likely that Dmrt1 upregulation is critical for testis formation during sex change.

If I account all findings together, we can see how 11-KT pushing the female into the male direction rather than remain in female sex without caring the female specific gene. Therefore, present results reveal that 11-KT is one of the important endocrine element which induces the sex change by turning off or inactivates the female specific gene while turn on the male specific gene during sex change.

By applying present understanding of protogynous sex change, I first time performed artificial sex change by short-term treatment of AI during breeding season. I also conducted successful mating of sex-changed male with natural normal female and obtained healthy larvae. Therefore, short-term sex change in *E. merra* induced by AI implantation is considered to be the key step to the success of artificial sex change and captive reproduction of grouper during breeding season.

Name Mohammad Ashraf Alam

平成20年 8月 11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 中村 宗一

副査 氏名 池田 讓



### 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 海洋環境学専攻 氏名 Mohammad Ashraful Alam 学籍番号 [REDACTED]	
指導教員名	中村 將	
成績評価	学位論文 (合格) 不合格	最終試験 (合格) 不合格
論文題目	Endocrine mechanism of protogynous sex change in tropical grouper <i>Epinephelus merra</i> (熱帯性ハタ <i>Epinephelus merra</i> の雌性先熟型性転換の内分泌調節機構)	
審査要旨 (2000字以内) 1. 研究の背景と目的 ハタは熱帯・亜熱帯域の養殖対象魚として大いに期待されている。ハタの多くの種では、はじめ雌として産卵を繰り返し、大きく成長した後に性転換して雄として成熟する生殖特性を持つことが知られている。このため大型雄の入手が困難で稚魚の生産に影響を及ぼし、養殖の大きな障害となっている。Alam M A は、形態学的、免疫組織化学的、生理学的及び分子生物学的手法を修得し、小型のカンモンハタを用いて性転換の内分泌調節機構の解明と人為的性転換の誘導法の確立を目指して研究を行った。		

(次頁へ続く)

## 2. 研究内容

卵巣から精巣への性転換過程の生殖腺の組織学的観察と雌性ホルモンのエストラジオール-17 $\beta$ (E2)と雄性ホルモンの11-ケトテストステロン(11-KT)の性転換に伴う血中の変化を調べた。その結果、E2量は性転換に伴い低下する。一方、11-KT量は性転換に伴い上昇することを明らかにした。次に、11-KTの性転換に果たす役割について研究を進めた。11-KTの産生に必要な酵素である11 $\beta$ -水酸化酵素の抗体に強い免疫陽性を示す特殊な細胞群が卵巣の血管周辺部に分布していることを明らかにした。更に、卵を取り囲む雌性ホルモンの産生に関与する莖膜細胞が性転換途上で11 $\beta$ -水酸化酵素の抗体に陽性反応を示す様になり最終的に雄性ホルモンを産生するライデッヒ細胞へと分化する過程が観察された。血管周辺に分布する細胞群と莖膜細胞より由来するステロイドホルモン細胞の核径は性転換に伴い増加し、血中11-KT量も増加することから、最終的に性転換に関与していることを明らかにした。

非成熟期の雌を用いて、雌性ホルモン合成を阻害するアロマターゼインヒビター(AI)の性転換に果たす役割を調べた。その結果、5、6週間の処理により卵巣から精巣へと完全に性転換することを明らかにした。AIによる人為的な性転換の開始には雌性ホルモンの低下と、雄性ホルモンの上昇が重要であることを明らかにした。

次に、2種の生殖腺刺激ホルモン受容体(FSHR, LHR)の性転換に果たす役割を明らかにするためにFSHR, LHRをクローニングし、性転換に伴う発現変化を調べた。その結果、FSHRは性転換に伴い上昇するが、LHRは性転換に伴う変化は認められなかった。FSHRが性転換に関与している可能性を示唆した。精巣及び卵巣に特異的に発現するDmrt1とFoxl2の性転換に果たす役割を明らかにするために両遺伝子のクローニングを行い、性転換に伴う発現変化について調べた。その結果、Foxl2は性転換に伴い徐々に低下し精巣で有意に低い値を示した。一方、Dmrt1は、卵巣では低い値であったが性転換に伴い徐々に増加し、精巣では有意に高くなった。雄性ホルモンによる人為的な性転換においてもDmrt1は急激に上昇した。一方、Foxl2は変化せずに一定の発現を示した。このことから、雄性ホルモンの上昇はDmrt1の発現を上昇させ、その結果性転換を誘導させると考えられた。

## 3. 研究成果の意義と学術的水準

ハタの卵巣には雄性ホルモンを分泌する特殊な細胞群が存在することをはじめて明らかにした。この細胞群および莖膜細胞に由来するステロイドホルモン産生細胞より分泌される雄性ホルモンが性転換の開始に決定的役割を果たしていることを明らかにした。更に、脳下垂体からの生殖腺刺激ホルモンを受け取る受容体のうちFSH受容体の遺伝子発現量が性転換に伴い上昇することを明らかにした。また、精巣分化に関連する遺伝子の一つであるDmrt1遺伝子が性転換に伴い上昇することを突きとめた。以上の様に、今まで不明であった性転換に果たす種々の遺伝子の役割解明はハタの性転換機構の解明に大きく貢献する。得られた基礎的知見を基に産卵期におけるAIの約3週間の短期間処理で卵巣から精巣への転換を誘導することに成功した。性転換雄は正常雌と自然交配し受精卵と孵化仔魚を得ることに成功した。この人為的性転換誘導技術の確立は熱帯性魚類養殖に大いに貢献する。本研究の一部はすでに6編の査読付きの国際誌に公表され、本研究の学術的水準が極めて高いことを証明している。

## 4. 審査会の審査経過及び結論

平成20年8月11日、学位論文の内容に関する学力確認を口頭発表と質疑応答により行った。論文審査委員会は、博士課程修了者としての十分な学力を有していると判断し、「合」に値するという結論に至った。以上のことから、本論文は海洋環境学専攻における博士の学位論文として十分価値のあるものであると判断された。8月11日に行われた最終論文審査委員会は全会一致で「合格」とした。