

海洋アライアンス イニシャティブ報告書

採択課題名：魚類の産卵行動を制御する因子を同定し、養殖魚の自然産卵を目指す

主提案者名・所属：大久保範聡・農学生命科学研究科水圏生物科学専攻

共同提案者名・所属：神田真司・理学系研究科生物科学専攻（計1名）

報告書の提出日：2017年3月13日

1) 研究の目的

世界的な人口増加や魚食普及の影響を受け、現在、様々な魚種で天然資源の減少が危惧されている。この問題を解決するための有効な手段の一つは、天然資源への依存が少ない持続可能な魚類養殖の技術を確立させることである。しかし、魚類の中には、養殖環境下での繁殖が難しい種が少なくない。適切な環境でなければ、成熟した卵や精子を作らなかつたり、仮に作ったとしても産卵行動を起こさないためである。

成熟した卵や精子を作らないという問題に対しては、性成熟を促進するホルモンの投与によって、多くの魚種で克服の目途が立っている。一方、産卵行動を起こさないという問題に対しては、有効な対応策がないのが現状である。この問題を解決するための従来の方法論は、飼育環境を改善することで自然産卵を誘起するというものであった。しかし、スペースやコストが限られている実際の状況では、この方法論にはどうしても限界がある。そこで期待がかかるのが、魚類の産卵を誘起する技術や、産卵しやすい魚類系統を開発することである。

魚類でも他の脊椎動物と同様に、性ホルモンによって産卵行動が促進される。しかし、一般に飼育条件下で繁殖が難しいとされる魚種では、性ホルモンを投与しても、自然産卵を誘起できない。また、性ホルモンは卵や精子の質に大きな影響を与える（過熟を引き起こす）ため、性ホルモンで産卵行動を誘起しても、質の良い卵や精子を得ることは難しい。したがって、産卵行動を起こしやすくする技術や系統の開発には、別の観点からのアプローチが必要となる。

卵や精子が成熟すると、性ホルモンが卵巣や精巣から脳へと伝えられ、脳内で何らかのイベントが起こった結果、産卵行動が引き起こされる。具体的に脳内でどのようなイベントが起こっているのかは明らかとなっていないが、そこをピンポイントで人為的に制御できれば、卵や精子の質には一切悪影響を与えることなく、産卵行動を誘起できるはずである。そこで本研究では、メダカ (*Oryzias latipes*) をモデル魚として用いて、性ホルモンが産卵行動を引き起こす際に脳内で起こるイベントを明らかにすることを目的とした。

なお、本研究で得られた成果はまだ投稿論文として公表していないため、以下の記述は概要のみに留めたことをご了承いただきたい。

2) 手法

まず、脳内での性ホルモンの作用や代謝に直接関わる 4 種類の遺伝子をノックアウトした変異体メダカ系統を作出し、それらの産卵行動を解析した。変異体の作製には、targeting induced local lesions in genomes (TILLING) 法、および clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) /Cas9 法を用いた。変異体の作製後、交配と継代を繰り返して、系統化を行った。産卵行動の解析では、産卵の有無、産卵までに要した時間、求愛ダンスの頻度、求愛ダンスまでに要した時間、求愛の失敗回数などのパラメーターを解析した。

また、それらの変異体系統の卵形成・精子形成もあわせて解析することとした。産卵行動に異常がみられた場合、それがノックアウトした遺伝子の脳内ではたらきが阻害された結果なのか、あるいは、卵形成や精子形成にも異常が生じており、産卵行動の異常はそれらの異常を介した間接的な結果なのかを判断するためである。その目的のもと、各変異体系統の卵巢・精巢の形態観察、組織学的解析を行った。産卵行動に顕著な異常がみられた一部の変異体系統については、卵巢・精巢の重量測定や、受精率・孵化率の解析も行った。

続いて、上記のノックアウト解析によって産卵行動に顕著な異常がみられた遺伝子とともに脳内ではたらき、産卵行動に深く関わる遺伝子の同定を目指すこととした。性ホルモンの有無、あるいは上記のノックアウト解析で産卵行動に顕著な異常がみられた遺伝子の有無に応じて、脳内で発現が亢進あるいは抑制されている遺伝子を、RNA-seq 解析によって網羅的に探索した。RNA-seq 解析に供するサンプルの調製は、Quartz-seq 法、および KAPA Standard mRNA-seq Kit を用いて行った。その後、real-time PCR や in situ hybridization を用いて、得られた個々の遺伝子の発現の変化を確認し、発現の変化が確認された遺伝子については、ノックアウト系統を作出することとした。

3) 成果

解析した 4 種類の変異体系統のうち、2 種類の遺伝子（性ホルモン関連遺伝子 A (sex hormone-related gene A (SRGA)、および性ホルモン関連遺伝子 B (SRGB) とよぶことにする) をノックアウトした系統で、産卵行動に顕著な異常がみられた。SRGA と SRGB のいずれのノックアウト系統でも、メスがオスの求愛を受け入れず、産卵に至らなかった。そこでそれらのノックアウト系統の卵形成・精子形成を解析したところ、SRGA のノックアウト系統については、いずれの観点からも卵形成の異常を示唆するようなデータは得られず、ノックアウト個体の卵形成は野生型個体と変わらないことが明らかとなった (図 1)。また、ノックアウト個体の受精率・孵化率も野生型個体と変わらないことが明らかとなった (図 2)。これらの結

果から、SRGA ノックアウト系統にみられた産卵行動の異常は、卵形成の機能不全を介した間接的なものではなく、脳内の SRGA が消失したことに直接起因すると考えられた。一方、SRGB ノックアウト系統については、排卵異常が認められた。野生型個体やヘテロ変異体個体では、濾胞組織が剥がれた排卵後の卵が確認されたのに対し、ノックアウト個体では、観察した全ての卵母細胞が濾胞組織に覆われており、排卵が確認されなかった（図 3）。排卵がうまく行われないうまく行わないために（つまり不妊になるために）、産卵行動に異常が生じたと考えられる。

そこで、性ホルモンが SRGA および SRGB を介して産卵行動を引き起こす際に、脳内ではたらく鍵遺伝子の探索を行ったところ、いくつかの候補遺伝子を得ることができた。

4) 今後の展開

現在も引き続き、得られた候補遺伝子の発現解析とノックアウト系統の作出を進めているところである。ノックアウト系統の作出が終わり次第、それらの産卵行動の表現型解析を行う予定であり、それにより魚類の産卵行動に深く関わる遺伝子を同定する。

その中から産卵行動を直接制御するような脳内遺伝子が同定できれば、例えば、ゲノム編集技術を用いて、その遺伝子に変異を導入することで、産卵行動を行いやすい魚類系統を作出することが可能となる。あるいは、その遺伝子産物を化学合成したものやその阻害剤を投与することで、自然産卵を誘発することも可能となる。それにより、魚類養殖の効率や生産性が大きく向上することが期待される。

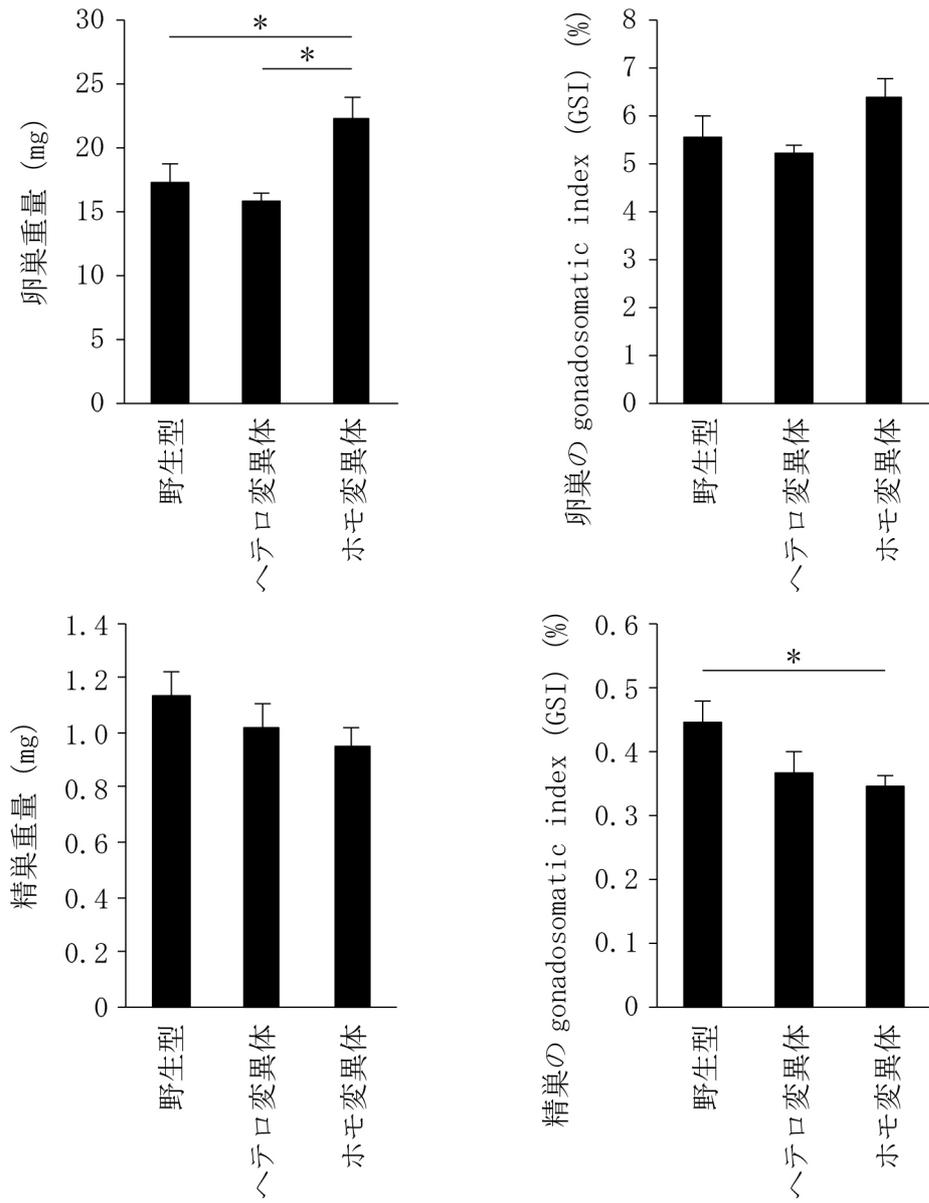


図 1 SRGA ノックアウト系統の野生型、ヘテロ変異体、ホモ変異体（つまりノックアウト個体）の卵巣重量、精巣重量、および、それらを体重で補正した gonadosomatic index (GSI) を解析し、結果を遺伝子型間で比較した。

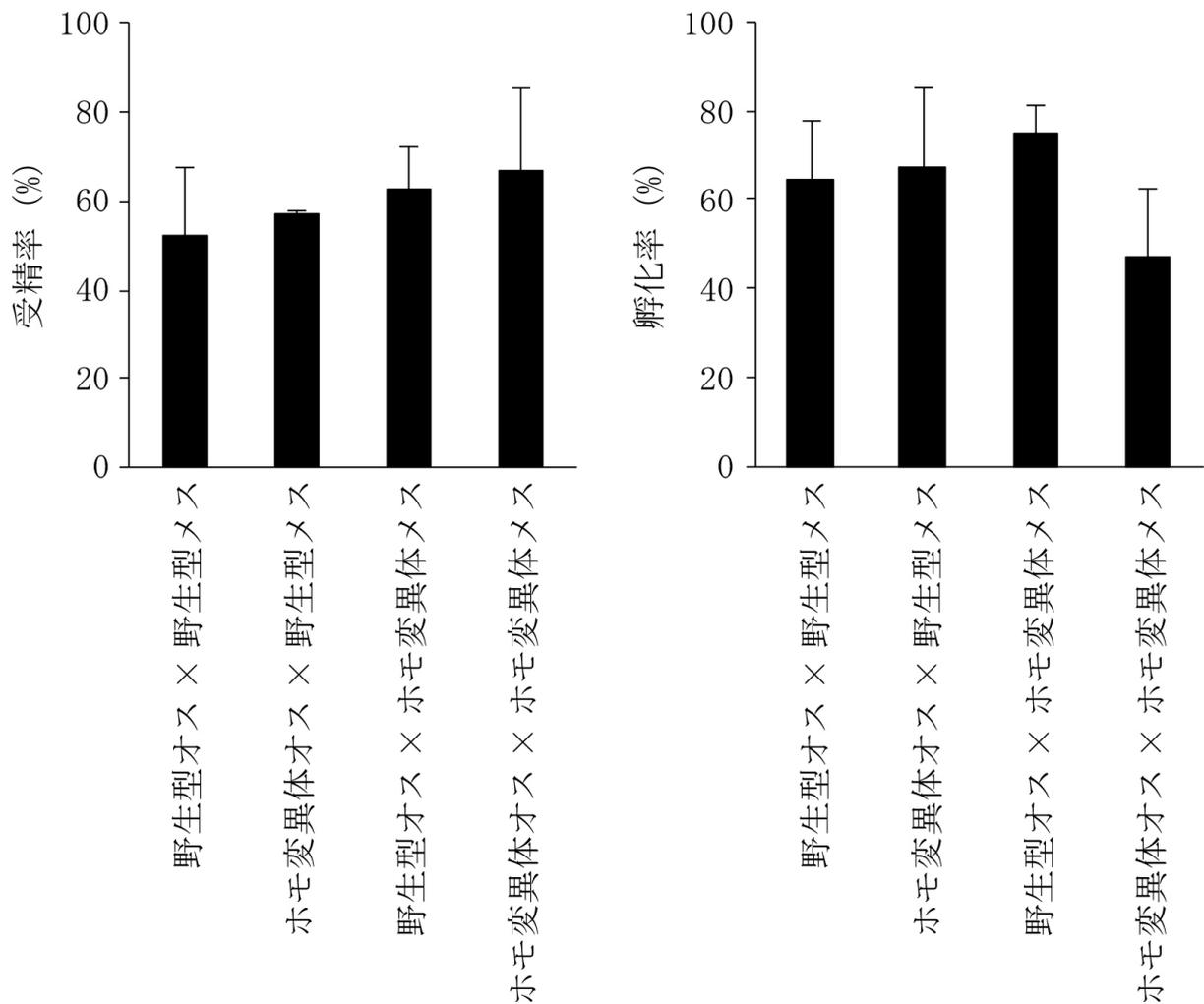


図2 SRGA ノックアウト系統の (1) 野生型オス×野生型メス、(2) ホモ変異体 (つまりノックアウト個体) オス×野生型メス、(3) 野生型オス×ホモ変異体メス、(4) ホモ変異体オス×ホモ変異体メスの組み合わせで人工授精を行い、受精率と孵化率を算出した。

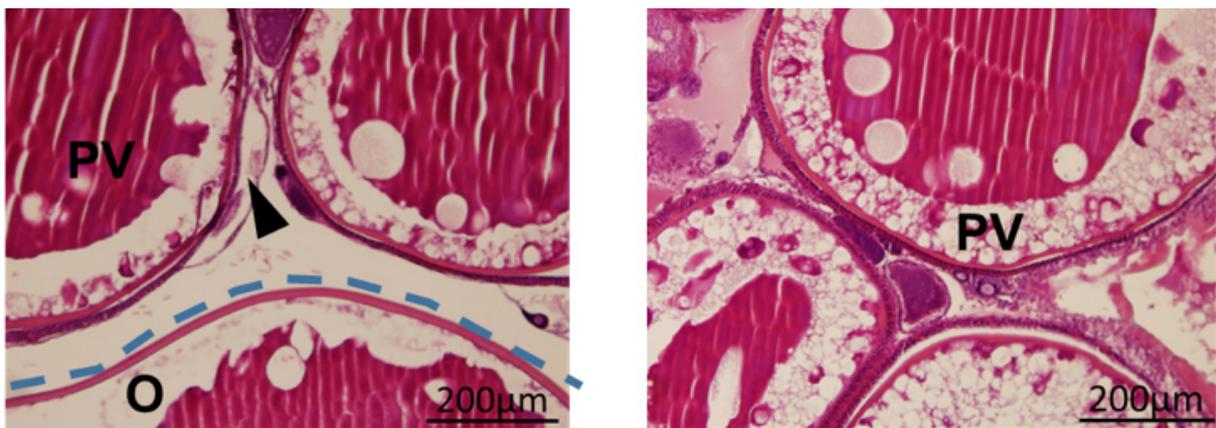


図3 SRGA ノックアウト系統のヘテロ変異体 (左のパネル)、およびホモ変異体 (つまりノックアウト個体) (右のパネル) の卵巣切片を観察した。点線で示すような排卵後の卵は、ホモ変異体では全くみられなかった。