

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（継続）

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：2018年2月28日

1) 研究の目的

本研究課題は昨年度からの継続課題である。以下に、昨年度に本研究課題に取り組み始めた背景と、昨年度に得られた成果を受けての本年度の目的を記す。

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。

このようなアイデアのもとで我々は昨年度、メダカ (*Oryzias latipes*) をモデル魚として本研究課題を開始した。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。その結果、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。その後の解析によって、SRGA ノックアウト系統にみられた産卵行動の異常は、脳内の SRGA 発現が消失したことに直接起因すること、SRGB ノックアウト系統にみられた産卵行動の異常は、放卵がうまく行われないうちに起因することが示唆された。

そこで本年度は、脳内で SRGA の下流ではたらき、産卵行動を直接的に制御する遺伝子の探索を行うとともに、SRGB ノックアウト系統にみられた放卵不全の詳細を解析することとした。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、また、複数の変異体を解析した成果の一部であることをご了承ください。

2) 手法

脳内で SRGA の下流ではたらき、産卵行動を直接的に制御する遺伝子の探索については、以下の解析を行った。ここでは、得られた候補遺伝子の中で、最も解析が進んだ遺伝子（便宜的に、SRGA 依存的遺伝子1（SRGA-dependent gene 1（SDG1））とよぶことにする）についての解析手法を記す。

まずは、産卵行動に関わるとされる神経細胞で SDG1 が発現していることを、同ニューロンのマーカー遺伝子と SDGA との二重 *in situ* hybridization 法によって確認した。また、卵巣から放出され、メスの産卵行動を促進する性ホルモンであるエストロゲンの受容体に依存して SDG1 が発現していることを確かめるために、卵巣をもつ通常のメスと卵巣を除去したメスを用意し、それらの個体の脳内での SDG1 の発現を解析した。この解析には、リアルタイム PCR 法と *in situ* hybridization 法を用いた。次に、ゲノム編集技術の一種である clustered regularly interspaced short palindromic repeats（CRISPR）/Cas9 法を用いて、SDG1 のノックアウトメダカを作出することとした。交配と継代を繰り返して系統化を行った後、このノックアウトメダカ系統のメスの産卵行動を解析した。産卵行動の解析では、産卵の有無、産卵までに要した時間、交接（哺乳類でいう交尾）までに要した時間、受けた求愛の回数、求愛までに要した時間、求愛の失敗回数などのパラメーターを解析した。

一方、SRGB ノックアウト系統にみられた放卵不全の解析については、以下の解析を行った。まずは、SRGB ノックアウト系統の卵巣組織を、肉眼解剖レベル、および薄切切片のヘマトキシリン・エオシン染色標本として解析した。また、卵巣組織に加え、卵巣腔の発生にも性ホルモンの経路は関与しているため、全身の組織切片を作成、観察した。さらに放卵不全の原因の詳細を明らかにするため、メダカの卵巣培養系を利用し、排卵に至るまでの経路に関わ

る遺伝子を、リアルタイム PCR 法によって解析した。

3) 成果

SDG1 の発現解析の結果、確かに同遺伝子は、産卵行動を制御すると推察される神経細胞でエストロゲン受容体依存的に発現していることが明らかとなった。そこで SDG1 のノックアウトメダカを作出して系統化を行った後、メスの産卵行動を解析したところ、残念ながら、産卵行動に関わるいずれのパラメーターにおいても、野生型メス、ヘテロ変異体メス、ノックアウトメス（ホモ変異体メス）の間に有意な差は認められなかった（図 1）。

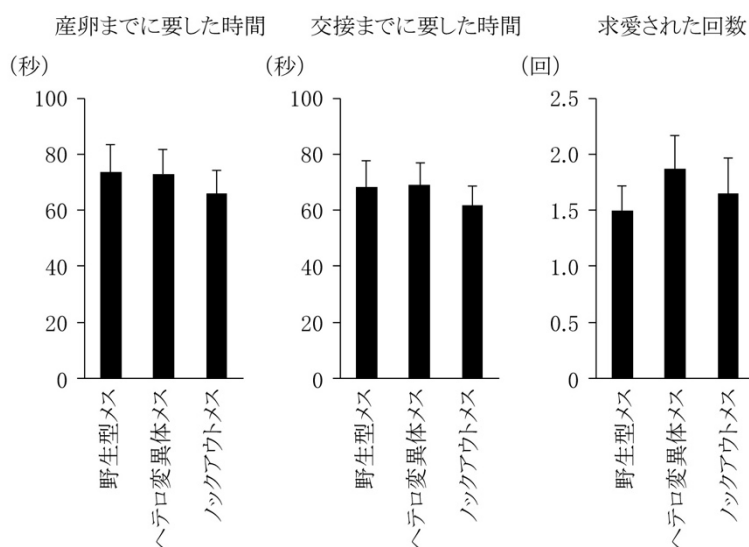


図 1 SDG1 ノックアウト系統の野生型メス、ヘテロ変異体メス、ノックアウトメス（ホモ変異体メス）の産卵行動の比較。ここでは、野生型オスとペアにしてから産卵に至るまでに要した時間（左のグラフ）、交尾（哺乳類という交尾）に至るまでに要した時間（中央のグラフ）、オスから受けた求愛の回数（右のグラフ）を示したが、いずれのパラメーターにおいても、各メスの間に有意な差は認められなかった。データは全て平均値±標準誤差で示した。

一方、SRGB ノックアウト系統の放卵不全の原因を検証するため、卵巢組織を解析したところ、卵巢はしっかりと発達しており、稀ではあるが排卵した卵もみられた。さらに詳しく解析するために、メダカの卵巢培養系を利用し、排卵に至るまでの経路を詳細に解析した。その結果、メダカにおける排卵を誘発する黄体形成ホルモンの受容体アゴニストである PMSG を投与することにより、この変異体も ep4b などの、排卵を司るカスケードの発現は正常に起こることが分かった。また、メダカの卵巢でリアルタイム PCR 法によって黄体形成ホルモン受容体が発現していることも分かったため、この SRGB ノックアウト個体は、卵巢を成熟させ、さらに排卵させる能力はあることが分かった。それでは、あとは卵を放卵することが重要である。抱卵する際に卵が通る経路について、組織切片を作成して詳細に観察してみたところ、ノックアウト個体は輸卵管が完全に形成されていない、すなわち、排卵した卵を抱卵しよう

とした際に物理的に遮られてしまうことが分かった (図2)。

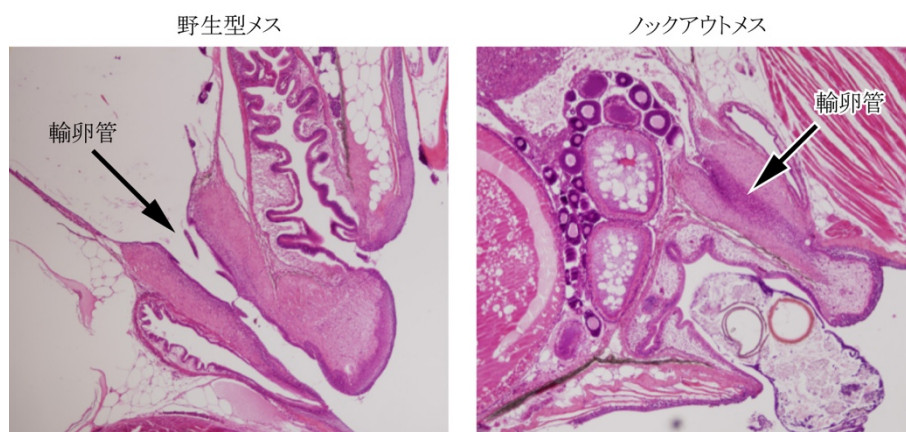


図2 SRGB ノックアウト系統における輸卵管の閉鎖。野生型メス (左の写真) で形成される輸卵管が、ノックアウトメス (右の写真) では形成されない。すなわち、SRGB が輸卵管の形成に必須であることを示している。

4) 今後の展開

現在、SRGA の下流ではたらき、産卵行動を直接的に制御する脳内遺伝子の候補として、SDG1 以外の遺伝子についても解析を進めている。さらに解析を進め、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だろう。

また、SRGB ノックアウト系統の放卵不全の原因については、輸卵管が形成されないこと自体が問題なのか、あるいは一度は形成された輸卵管が閉鎖してしまったのか、未だ不明である。いずれにしても、性行動を行うべきタイミングで開いていなかったため、産卵できない障害に繋がったことは明白であり、放卵を引き起こす性行動と性成熟のタイミングの一致が重要であることが改めて明らかになった上、そのタイミングの同期に対する性ホルモンの重要性が再認識された。現在、本因子に加え、メスの性行動必須な性ステロイド関連因子についても、研究を進めている。脳内に複数存在するニューロン群のうち、ランダムな一部の細胞の性ステロイド関連因子をノックアウトしたり、賦活したりする実験系を並行して確立中であり、これらの技術を用いて同定した体内の重要な細胞に特異的な薬剤を探索することにより、あらゆる魚類に強制的に産卵行動を引き起こさせることも可能となると期待される。