

令和元年6月13日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18738

研究課題名(和文) 親魚の年齢を卵に伝える母性遺伝因子の探索

研究課題名(英文) Studies on maternal genetic factors in fish eggs and its relation to the adult age

研究代表者

入路 光雄 (NYUJI, Mitsuo)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・中央水産研究所・研究員

研究者番号：50732426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マサバを材料に、雌親魚より卵に引き継がれる母性遺伝因子と、親魚年齢との関係について調べた。高齢と若齢の雌マサバに対して排卵を誘導し、卵を得た。1) 次世代シーケンサーを用いて、マサバ卵に発現する遺伝子の塩基配列情報を網羅的に解読した。2) RNA-seqにより、高齢魚と若齢魚の卵において、統計的に発現量に差のある4遺伝子を特定した。3) ミトコンドリアDNAコピー数の解析により、産卵が活発な親魚群において、高齢魚の卵ほどコピー数が多かったが、活発でない群のコピー数は年齢に関係なく低かった。研究成果は、親魚年齢が卵質に及ぼす影響のメカニズム解明に貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色は、これまで研究されてこなかった、親魚年齢と母性遺伝因子(mRNA、mtDNA)の関係を解析した点にある。本研究により、雌親魚の年齢によって発現の異なる遺伝子が示された。さらに、産卵群によっては、高齢魚と若齢魚の卵の間でmtDNAコピー数が顕著に異なることが示された。これらの成果は、親魚年齢が卵質に及ぼす影響のメカニズム解明に貢献するとともに、卵から親魚年齢を推定する指標として利用されることが期待される。また、マサバ遺伝子の塩基配列情報を網羅的に解析する本研究の成果は、国際的な小型浮魚類の資源研究分野にとって有益な情報になるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Maternally-inherited mRNA expressions and mitochondrial DNA (mtDNA) copy number, and its relation to the adult age were studied in the egg of chub mackerel *Scomber japonicus*. Female fish were ovulated using hormonal manipulation and eggs were obtained. Transcriptome analysis of chub mackerel eggs was conducted using next-generation sequencing. Four genes that were differently expressed between old adult fish and young adult fish were identified. During active spawning, the number of mtDNA copies in eggs was higher in old adult fish than in young adult fish. During non-active spawning, the number of mtDNA copies in eggs was low in both old and young adult fish.

研究分野：繁殖生理学・水産資源学

キーワード：水産資源 小型浮魚類 マサバ 母性遺伝因子 母性年齢 ミトコンドリアDNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水産資源は再生産する資源であり、親が子を産み出し、子が成長して新たな親として加入することで資源が持続的に生産される。サバ、イワシ類などの多獲性小型浮魚類は、我が国の漁獲量の 30%以上を占める重要な水産資源である。近年、乱獲による資源の減少により、親魚全体に占める高齢魚の割合が減り、若い親の割合が増加している。産卵魚の年齢構成における若齢化は、個体群としての繁殖能力の低下を引き起こし、再生産効率を低下させるものと考えられている(図1; 文献)。その要因の一つとして、若齢魚ほど産卵量が少なく、産卵期間が短いため、産み出される卵量が相対的に減少することが挙げられる。一方、高齢魚の産んだ卵では、若齢魚の卵と比べて受精率や孵化率が高く、孵化後の仔魚の成長が速いことが知られている。すなわち、高齢魚ほど良質な卵を産出する。雌親魚の年齢が卵質に及ぼす影響やメカニズムの解明は、小型浮魚類の再生産過程を理解し、適切な資源評価を実施する上で不可欠である。

親魚の栄養状態や年齢などの母性特性は、タンパク質や核酸などの母性因子を介して、配偶子である卵へと移行する(図2)。親魚年齢と卵質の関係については大西洋タラでよく調べられており、高齢魚から産出された卵の方が脂質や卵黄タンパク質が多く、孵化後の仔魚の成長も速いことがわかっている(文献)。すなわち、高齢な親魚ほど、より高い栄養成分を卵に移行させて、良質な卵を産出できる。一方、脊椎動物の卵においては、母性由来の mRNA も蓄積されており、「母性 mRNA」と呼ばれる。発生の初期は核からの mRNA 転写は行われず、母性 mRNA がタンパク質合成に中心的役割を果たす。しかし、卵質に作用する母性因子として、転写因子に着目して解析した研究例はこれまでになかった。

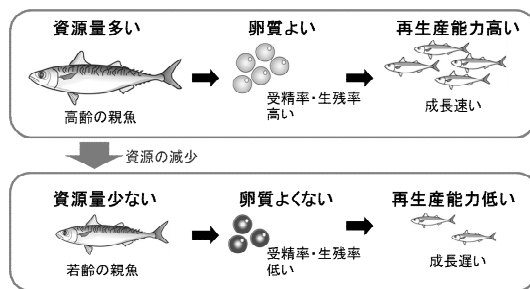


図1. 資源の減少と再生産効率の関係



図2. 母性特性の卵への伝達

このような背景の中、研究代表者は、「雌親魚の年齢は、栄養成分だけでなく、母性 mRNA も介して卵質に影響しているのではないか」という着想を得た。魚類における母性 mRNA については、これまで、ゼブラフィッシュなどの実験モデル魚を中心とした報告が多く、海産魚ではほとんど研究されてこなかった。その理由として、1) 海産魚の飼育は困難で、その多くは人工飼育下では自発的に産卵しないこと。また、2) ゼブラフィッシュなどに比べて海産魚の卵は小さいため、発生初期の卵からの mRNA 抽出など、解析が困難であることが挙げられた。

研究代表者は、代表的な小型浮魚類であるマサバを材料とした生殖内分泌学の研究に長年携わってきた。その中で、飼育下でマサバの産卵を確実に誘導できる実験系の確立に貢献し、マサバの卵形成に係る生理機構を明らかにした(文献)。一方、大量の塩基配列データを解析できる次世代シーケンサー(NGS)を用いることで、特定の組織で発現している遺伝子を網羅的に解読し、発現量を比較することが容易になってきている。

そこで、本研究では、小型浮魚類の中で最も飼育実験系が確立されたマサバを材料に、近年解析技術が飛躍的に進歩した NGS を用いた遺伝子解析手法を組み合わせることで、高齢魚で良質卵が産出されるメカニズム解明における第一歩として、親魚年齢と相関のある母性 mRNA の発見を目指した。さらに、最近、哺乳類において、母性遺伝のミトコンドリア DNA (mtDNA) の低コピー数が受精能の低下と関係のあることや、母年齢と卵母細胞中の mtDNA に負の相関があることが報告されている(文献)。魚類においても、mtDNA コピー数が親魚の年齢を反映して卵に移行し、卵質に影響する可能性が考えられたため、親魚年齢と mtDNA コピー数の関係についても解析した。

2. 研究の目的

(1) 母性 mRNA の解析

NGS を用いて、マサバ排卵卵(以下、マサバ卵)に発現している mRNA 配列に由来する cDNA の塩基配列を網羅的に解読した。解析は、若齢と高齢の雌マサバ親魚群ごとに、各群の卵から得た cDNA を混合して行った。次に、得られたデータから、親魚年齢によって発現量に差がある遺伝子を選定した。

(2) mtDNA コピー数の解析

マサバ卵における mtDNA コピー数定量法を確立するため、リファレンス遺伝子や検量線について検討した。開発した定量法を用いて、mtDNA コピー数と親魚年齢との相関の有無について明らかにした。

3. 研究の方法

(1) マサバ卵のサンプリング

産卵期に、人工孵化から養成された年齢が明らかなマサバ親魚を陸上水槽に搬送し、パイオプシーにより雌雄および成熟度合を判定した。卵黄形成を完了した雌個体にホルモンを投与して、人工的に排卵を誘導した。排卵の確認できた個体を取り上げて排卵卵を回収し、卵の一部を凍結保存した。

排卵誘導は、1年目と3年目の2回実施した。1年目は近畿大学水産研究所の白浜実験場で養成された5~6歳と2歳の雌マサバ(以下、近大養成マサバとする)から、3年目は国立研究開発法人水産研究・教育機構、瀬戸内海区水産研究所の伯方島庁舎で養成された4歳と1歳の雌マサバ(以下、水研養成マサバとする)から、それぞれ卵を得た。RNA-seq解析では近大養成マサバから得た卵を、mtDNAコピー数の定量では近大養成マサバと水研養成マサバから得た卵の両方を解析した。

また、「高齢魚ほど良質な卵を産出する」という母性効果を検証するため、得られた排卵卵の一部は人工授精に供して、若齢群の卵に比べて受精率および孵化率が高いことを確認している。

(2) RNA-seq

マサバ卵より total RNA を抽出して、mRNA を精製した。5~6歳のマサバ2個体、2歳のマサバ2個体の卵各30粒より、それぞれ7~16 ng の mRNA を得た。cDNA ライブラリを作製し、Ion Proton システムを用いてシーケンスした。トランスクリプトームのアセンブリには、Trinity を用いた。さらに、親魚の年齢間で異なる発現量の遺伝子を探索した。

(3) mtDNA コピー数の定量

マサバ卵中の mtDNA コピー数を比較するため、定量に適する領域として ND1 を選定し、real-time PCR 用のプライマーを設計した。高齢と若齢の雌マサバの卵より total DNA を抽出し、マサバの ND1 配列に基づいて作製した特異プライマーとプローブを用いて、real-time PCR による mtDNA コピー数を定量した。個体ごとに、数十粒の卵中のコピー数を1卵ごとに定量し、卵1個当たりの平均として算出した。

4. 研究成果

(1) 母性 mRNA の解析

IonProton システムにより、若齢と高齢の雌マサバ各2尾ずつ計4尾の卵より、シーケンスデータを得た。リード数は、各個体とも約1,500,000であった。アセンブリにより、68,103の contig を得た。若齢魚と高齢魚の間でクラスターデンドグラムを作成したところ、若齢と高齢の個体間ではグループは形成されなかった。

高齢魚(Old)と若齢魚(Young)の間で、発現量比較に基づいて MA プロットを作成した(図3)。発現量に差のある遺伝子は少なかった。

発現量の比較解析により、若齢と高齢で発現量の異なる遺伝子が4個選定された。Blast 検索により、それぞれ“GTPase IMAP family member 7”“Ependymin”“Collagen alpha 6”“FH1/FH2”と相同性の高い遺伝子であった。

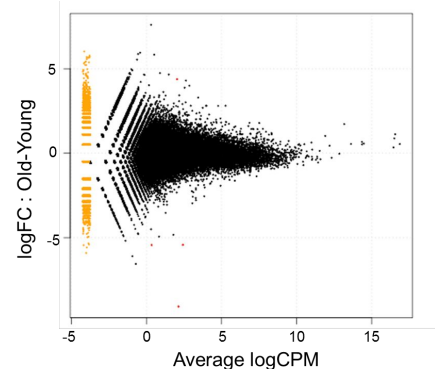


図3. MA プロット

(2) mtDNA コピー数の解析

近大養成マサバでは、5~6歳と2歳の雌マサバを2個体ずつ解析した。mtDNA コピー数の平均は、5~6歳魚の卵では171.0と210.4 copies/卵、2歳の卵では139.1と130.3 copies/卵であった(図4)。高齢魚の卵の方がコピー数の多い傾向にあり、6歳のNo. 2と2歳魚2個体の間には有意差が見られた。

一方、水研養成マサバでは、4歳2個体と1歳5個体を解析した。mtDNA コピー数の平均は、4歳魚の卵では32.4と75.7 copies/卵、1歳の卵では40.5~104.4 copies/卵となり、親魚の年齢による明確な違いは見られなかった(図4)。また、近大養成マサバに比べて、水研養成マサバの卵の方が、コピー数は一様に顕著に少なかった。

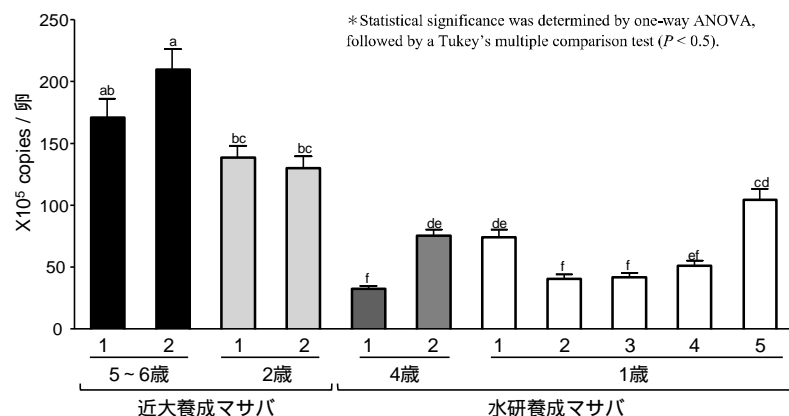


図4. 異なる年齢のマサバ親魚から得た卵中の mtDNA コピー数

以上まとめると、本研究課題において、NGS によりマサバ卵に発現する遺伝子の塩基配列情報を網羅的に解読した。サバ類は水産資源として世界的に利用価値が高いため、マサバ遺伝子の塩基配列情報は、国際的な小型浮魚類の資源研究分野にとって有益な情報になるものと期待される。

RNA-seq により、高齢と若齢のマサバ親魚から得た卵において、統計的に発現量に差のある遺伝子を特定した。選定された 4 遺伝子のうち、哺乳類においては、GTPase I MAP family member 7 と Ependymin は、それぞれ GTP 活性と神経再生に関与するとされる。対して、Collagen alpha 6 と FH1/FH2 は基底膜の構築や細胞の伸長といった細胞構造に関与する。これらの遺伝子の発現量と卵質の関係については、さらに詳細な解析が必要である。

mtDNA コピー数の解析により、近大養成マサバにおいて、高齢魚の方が若齢魚よりコピー数が多いことが明らかになり、高齢魚の卵ほどコピー数が多い可能性が示唆された。しかし、水研養成マサバでは年齢による差は出なかった。両飼育群の間で異なる結果となった要因は不明であるが、産卵有無や採集時期の違いによる可能性が考えられる。近大養成マサバは産卵盛期に取り上げ、生け簀内で飼育されていたため繰り返し産卵を行っていた。そのため、産卵が活発な状態であったと考えられる。対して、水槽内で飼育した水研養成マサバは、自発的な産卵を行わず、取り上げた時期も産卵初期であった。このような、産卵期における卵巣の活発化が不十分であったことが、mtDNA コピー数の相対的な低さにつながっているかもしれない。いずれにしても、異なる飼育群における mtDNA コピー数の明確な差が現れた今回の結果は、卵中の mtDNA コピー数により個体の産卵状態や時期を推察できる新たな可能性を示唆している。

< 引用文献 >

- 渡邊千夏子 (2014) 親魚の量的・質的変動. 「水産海洋学入門」 pp144-151.
米田道夫 (2010) 繁殖特性の変異が加入量に及ぼす影響. 水産海洋研究 74(特集号):19-26.
Nyuji, M. et al. (2012) Changes in the expression of pituitary gonadotropin subunits during reproductive cycle of multiple spawning female chub mackerel *Scomber japonicus*. Fish Physiology and Biochemistry 38:883-629.
Nyuji, M. et al. (2013) Characterization, localization, and stage-dependent gene expression of gonadotropin receptors in chub mackerel (*Scomber japonicus*) ovarian follicles. Biology of Reproduction 88:148, pp.1-14.
Chiaratti, M.R., et al. (2010) Mitochondrial DNA copy number, a marker of viability for oocytes. Biology of Reproduction 83:1-2.
Wai, T., et al (2010) The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. Biology of Reproduction 83: 52-62.

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計1件)

入路 光雄、小型浮魚類の生殖内分泌制御機構と繁殖特性に関する研究、平成 30 年度日本水産学会春季大会、28 March、2018、東京

6 . 研究組織

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。