

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22587

研究課題名（和文）体長の性差を生み出すメカニズムから解き明かす養殖魚の商品価値の向上に向けた研究

研究課題名（英文）Study on improving the commodity value of farmed fish by analyzing the regulatory mechanism of sexual dimorphism in body size in fish

研究代表者

加用 大地 (Kayo, Daichi)

東北大学・生命科学研究科・特任研究員

研究者番号：40880373

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：養殖魚の体長や体重、脂の乗りは商品価値に直結する極めて重要な形質である。本研究では、多くの魚種に体サイズの性差が観察されることを切り口として、これらの形質を制御する生理機構を明らかにすることを目標とした。メス優位の体成長パターンが消失するcyp19a1b遺伝子ノックアウトメダカをモデルとして、表現型の詳細とそれが引き起こされるメカニズムについて生理学的解析を行った。加えて、これらの解析の条件検討の過程で偶然にもメダカ精巣片を部分的に去勢した他個体オスの腹腔に埋め込むだけで移植精巣由来の仔が自然交配によって得られることを発見した。この発見は、簡易的な代理父親作製技術の確立に有用な可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、体サイズが通常より大きくなりかつ脂の乗りが優れた個体の生理状態、肝臓及び筋肉におけるメタボロームや代謝関連遺伝子の動態が網羅的に明らかになった。加えて、エストロゲンによる脂質合成の抑制作用を抑えることが上述の優れた形質をもつ養殖魚を作製する上で重要である可能性が示唆された。また、本研究により開発された簡易的な代理父親作製技術は、他個体の精巣を受け入れる免疫寛容の分子メカニズムを解明する糸口となり得る。これは優れた形質をもつ系統の選抜育種へ応用可能性を示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：The body size and fat content are directly linked to their commodity value in farmed fish. This study aimed to elucidate the physiological mechanisms that control these traits by focusing on the fact that sexual dimorphism in body growth is observed among various fish species. Using a gene knockout medaka model with the disappearance of the female-biased growth pattern due to the cyp19a1b gene knockout, we performed physiological analyses to understand the detailed phenotype and the underlying mechanisms. Additionally, we also discovered that allogeneic testes transplanted into partially castrated adult medaka can produce donor derived offspring through natural mating. This method may be helpful for establishing a simplified technique for surrogate father production.

研究分野：魚類生殖生理

キーワード：魚類生殖生理

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

養殖魚の体長や体重、脂質含有量(脂の乗り)は商品価値に直結する極めて重要な形質である。そのため、これらの形質を支配する生理機構を明らかにし、その成果を水産増養殖に応用することは、水圏生命科学にとって重要な課題の一つである。興味深いことに、多くの魚種において、これらの形質には雌雄差が認められる。例えばヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) では、メスの方がオスよりも成長が早く、体サイズも大きくなる。一方でティラピア (*Oreochromis mossambicus*) では逆に、オスの方が大きくなる。体サイズを制御する生理機構について、それらに多くの魚種において性差が存在することを切り口として解き明かそうとするアプローチは今まで存在しなかった。

また、本研究に必要な実験条件の検討の過程で、偶然ではあるもののメダカの精巣組織片を部分的に去勢した同種他個体の腹腔へ埋め込むだけで代理父親を作製することに成功した。魚類を対象とした代理親作製技術は、水産的な視点から重要な意味を持ち、本発見はその簡便性から新しい技術としての確立が期待できた。

### 2. 研究の目的

本研究では、上述の体サイズを決める形質を制御する分子機構の解明を目的とした(1)。また、精巣組織片の移植による代理父親作製法に関して、成功率の改善や移植後の精巣組織の様態に関する基礎的知見を得ることを目的とした(2)。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究開始時までに、モデル生物メダカ (*O. latipes*) において体サイズの性差が消失する遺伝子(*cyp19a1b*) ノックアウト (KO) 系統が作出されていた。一般的に日本に生息するメダカでは、メス優位の体成長パターンが認められ、成体ではメスの方が体長・体重ともにオスよりも大きくなることが知られている。これらの性的二型が消失する KO メダカでは逆にオスが野生型より体サイズが大きくなる一方で、メスでは体サイズが小さくなった結果、体サイズの性差が消失していることがわかっていた。そこで、本研究ではまず、この KO 系統の肝臓および筋肉におけるメタボローム解析を実施し、代謝に関連する遺伝子発現の定量 PCR 法による定量を行った。性ステロイドホルモンによる遺伝子発現の制御機構を明らかにする一端で、性ステロイドホルモンあるいはその阻害剤の投与および各種代謝遺伝子の発現変動を解析した。

(2) 続いて、精巣移植による代理父親作製法の開発に対して、体細胞組織に強く蛍光を発するトランスジェニックメダカ (*actb-GFP*) 系統をドナー系統として用い、宿主 (d-rR) 系統への腹腔への埋め込んだ後の GFP 蛍光の有無を経時的に観察した。また、ドナー精巣が宿主体内へと生着する様態を詳細に解析するため、組織切片の作製および免疫組織化学と *in situ* hybridization 法によるドナー精巣遺伝子の可視化を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) *cyp19a1b*KO メダカの表現型が生じるメカニズムの解析

*cyp19a1b* は脳型アロマターゼであり、男性ホルモンのアンドロゲンと女性ホルモンのエストロゲンへと代謝する酵素である。この KO により、KO メダカの性ステロイドレベルは、特に脳内においてアンドロゲンが増加、エストロゲンが減少していた。また、肝臓および筋肉のメタボローム解析を行い、野生型と比較した結果、KO メダカの肝臓における脂質含有量が増加していた。この増加は特に KO オスにおいて顕著で、腹腔に貯蔵されている内臓脂肪量も野生型と比較して有意に増加していた。加えて、肝臓における代謝関連遺伝子の定量 PCR 法による発現量の定量を行ったところ、脂質合成に関連する一連の遺伝子が増加していた。この一連の変動が増加したアンドロゲンレベルに起因するものか、減少したエストロゲンレベルに起因するものかを調べるため、KO オスメダカに対し、代表的なエストロゲンであるエストラジオールおよびアンドロゲン受容体のアンタゴニストである酢酸シプロテロン投与を行い、肝臓における代謝関連遺伝子の定量を行った。この結果、脂質合成に関わる遺伝子はエストロゲン投与によって有意に減少した他、脂肪酸分解に関わる遺伝子の発現はエストロゲン投与によって増加していた。一連の解析により、KO オスで観察されていた脂肪含有量の増加は、減少したエストロゲンによって引き起こされていることが示唆された。一方で、*cyp19a1b*KO メダカでは、GH/IGF-1 の発現量に目立った変化は認められなかった。本研究により、性ステロイドが体成長と脂の乗りを制御するメカニズムの一部が明らかになった。

#### (2) メダカ精巣組織片を移植する、新しい代理父親作製技術の確立

モデル生物であるメダカにおいて、成体宿主への精巣小片の移植および生着が、免疫不全処理を行うことなく成功することを明らかにした。成体宿主の精巣を 3 分の 2 程度除去し、その近

傍にドナーから切除した精巣組織を埋め込む移植手術を行ったところ、2-3割ほどの宿主個体の体内にドナー精巣が生着していることがわかった。また、これらの宿主個体をメスと交配させたところ、ドナー由来の子孫を得ることができた。また、宿主系統とは大きく異なる遺伝的バックグラウンドをもつ野生メダカ系統の精巣を移植しても同様の結果が得られることも明らかとなった。このドナー由来の子孫が得られる現象は、移植後13週間を経過しても観察され、期間にして3週間の間交配させ続けても同様にドナー由来の子孫が得られ続けた。次に、ドナーと宿主との間に免疫的な反応が起きることを確認するため、鱗の移植実験を行ったところ、ドナー由来の鱗は宿主から約2週間で抜け落ちた。この結果は、実験に用いた宿主系統のメダカがドナー由来の体細胞組織に対して免疫応答性を有することを示している。続く解析として、移植したドナー精巣が宿主体内でどのように保持されているのかについて、組織切片を作製し、ドナー由来の細胞を免疫組織化学により解析した。その結果、興味深いことに、ドナー精巣は宿主精巣と融合し、生殖細胞以外の体細胞由来の精巣組織も拒絶されずに生着していることが明らかになった。以上の解析により、メダカにおいて、成体宿主に精巣を移植するだけの比較的簡易な代理父親作製法が適用可能であることが明らかとなった。今後は、移植後の精巣が他個体へと生着する際の免疫寛容の分子メカニズムについての解析が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kayo Daichi, Kanda Shinji, Okubo Kataaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Allogeneic testes transplanted into partially castrated adult medaka ( <i>Oryzias latipes</i> ) can produce donor-derived offspring by natural mating over a prolonged period	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40851-022-00195-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加用大地
2. 発表標題 真骨魚類における脳型アロマターゼが体成長の性差を制御するメカニズムの解析
3. 学会等名 新学術領域研究「性スペクトラム」第5回領域会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加用大地、成瀬清
2. 発表標題 メダカの成体を用いた精巣の同種他個体への移植方法の確立
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------