

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05740

研究課題名(和文) ヒラメにおける完全な全雌生産技術の開発

研究課題名(英文) Technological development for producing all-female populations in Japanese flounder.

研究代表者

山口 寿哉 (Toshiya, Yamaguchi)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(南勢)・主任研究員

研究者番号：70604312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：養殖魚ヒラメはXX/XY型の性決定様式をもち、性決定遺伝子amhyが同定されている。また、ヒラメの成長は雄より雌の方が優れていることから全雌生産が望まれている。しかしながら、水温等の環境要因により遺伝的な雌が容易に高い割合で雄化することから、完全な全雌生産は難しかった。本研究では、高効率なCRISPR/Cas9システムを用いて、性決定遺伝子の受容体(amhr2)のノックアウト(K0)ヒラメを早期に作出した。解析の結果、amhr2 K0ヒラメは遺伝的な雄が雌になる全雌であり、高水温による雄化も引き起こされなかった。このように、遺伝的な雌が雄化しない完全な全雌生産を可能にするヒラメの作出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で実施したamhr2 K0ヒラメの作出と解析により、amhr2を介した雄化のシグナルは生殖腺の雌化において重要なエストロゲン合成を抑制する役割があることが確認された。このことは、未だ不明な部分が多い魚類の性分化や温度依存性性決定の解明に繋がる学術的な成果と言える。また、作出したamhr2 K0系統は高水温で雄化しない完全なヒラメ全雌生産が可能であり、ヒラメ養殖において成長の良い雌だけを生産することは生産量の増加が期待できることから、社会的に意義のある成果と言える。

研究成果の概要(英文)：The Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) is a marine fish with an XX/XY sex determination system. In aquaculture, female flounders are more productive due to their faster growth compared to males. However, producing all-female populations has been challenging because genetically female flounders can turn into phenotypic males when larvae are raised at high water temperatures. In this study, to produce a flounder strain that is all-female and resistant to masculinization at high temperatures, we created a mutant of amhr2, the receptor for amh (the sex-determining gene in flounders), using the CRISPR/Cas9 system. Consequently, the loss of function of the amhr2 gene caused sex reversal from male to female in genetically male, preventing masculinization rearing at high water temperatures. This study successfully developed a flounder strain capable of consistent all-female production, avoiding masculinization due to high water temperatures.

研究分野：魚類繁殖生理

キーワード：ヒラメ 全雌生産技術 性分化 環境依存的性決定 ゲノム編集 amhr2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒラメ等の水産養殖においては、雄よりも雌の成長が速い等の理由により、雌だけを作る全雌生産の技術開発が要望されているが、ヒラメの遺伝的雌(XX)は高温や低温飼育により簡単に雄化するため(遺伝的雄(XY)は雄のまま)、完全な全雌生産が難しいのが現状である。実際、ヒラメを含む多くの水産魚種は、遺伝的な要因により性が決定するシステム(遺伝的性決定システム)だけでなく、環境に依存して性が決定するシステム(環境依存的性決定システム)を保持している。この環境依存的性決定システムにおいては、温度(温度依存的性決定)、pH、社会環境など、様々な環境要因で性が決定(転換)することが知られているが、この分子機構の全貌は未だに解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、ヒラメにおける完全な全雌生産技術の開発を目的とした。ヒラメは雄よりも雌の成長が早いことから、雌だけを作る全雌生産技術が要望されているが、ヒラメの遺伝的雌(XX)は高水温等の環境要因により簡単に雄化する為、完全な全雌生産が難しいのが現状である。そこで、F0世代で高効率にノックアウト(KO)変異体を作成可能なゲノム編集手法を用いてヒラメの雄化誘導因子のKO変異体を作成し、環境要因により雄化しない全雌化ヒラメシステムを作成した。

3. 研究の方法

本研究では、実施者らのこれまでのヒラメ性分化研究を背景としてヒラメの雄化誘導因子に着目し、F0世代でのKO技術を利用したKO系統ヒラメの開発を実施した。作出したKO系統ヒラメの表現型の解析を実施すると共に、高水温により雄化しないことを確認する為の高水温飼育試験を実施した。

4. 研究成果

(1) *amhr2* KO変異体ヒラメの作製とAmh/Amhr2シグナルの機能解析

amhr2 KO変異体ヒラメの作製

本研究においては、ヒラメの雄化誘導因子としてヒラメの性決定遺伝子 *amh* (Hattori et al., 2022)の受容体遺伝子である *amhr2* に着目した。ヒラメにおいて *amh* は性分化時期に雄特異的に発現する(Kitano et al., 2007)ことから、雄化において重要な役割を持つと推測されていたが、Amh/Amhr2シグナルの役割については明らかとされていなかった。そこで、Amh/Amhr2シグナルの機能を調べるために、CRISPR/Cas9システムを用いて *amhr2* 欠損変異体を作製した。このシステムは、標的遺伝子に対する2つのcrRNAを使用して広範囲の欠失を誘導することにより、F0世代における両対立遺伝子KO変異体の高効率な生産が可能になる(Sawamura et al., 2017)。本研究においてcrRNAは、保存されたセリン/スレオニンキナーゼドメインを含む *amhr2* 遺伝子のエクソン7および9内に設計した(図1)。これにより、*amhr2* 遺伝子に約710bpの欠失が生じ、それがコードするAmhr2タンパク質の機能欠損が誘導されると予想された(図1)。2つのcrRNAをtracrRNAおよびCas9タンパク質とともに受精卵に同時注入し、変異体の遺伝子型を調査するために変異体を200dah(days after hatching)まで飼育した。詳細な変異体の遺伝子型を決定するために、生殖腺から抽出したDNAを使用して *amhr2* KO変異体のシーケンス解析を実施した結果、代表的なアンプリコン断片配列は、2つのcrRNA標的配列間の714、715、または706bpの広域の欠失を示した(図1)。シーケンス解析におけるこの広域欠失の割合は、遺伝的雄では15/16、13/16、および15/16クローン、遺伝的雌では8/8および6/8クローンだった。また、解析した全てのクローンにおいてこれらの広域欠失を含む変異が確認された。したがって、CRISPR/Cas9システムを使用することにより、ヒラメの *amhr2* 遺伝子に広域欠失が高効率に誘導された。

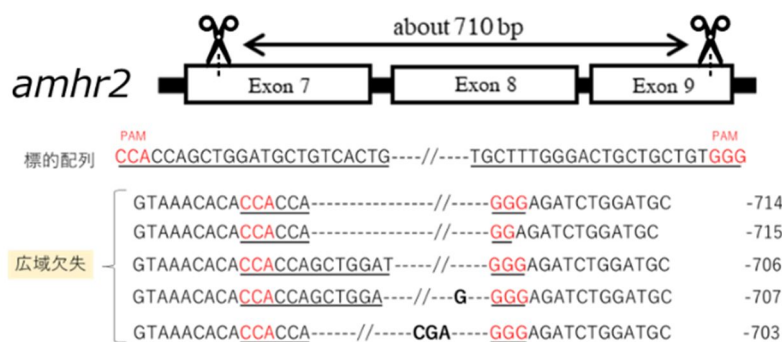


図1. CRISPR/Cas9システムにより作出した *amhr2* KO変異体ヒラメの変異導入状況

PAM(Protospacer Adjacent Motif):Cas9タンパク質が特定のDNA配列を認識する際に必要な配列

amhr2 KO 変異体ヒラメの表現型解析とファドロゾール処理

amhr2 KO 変異体ヒラメの生殖腺における性を調べる為に、精巣または卵巣へと完全に分化した時期になる 200dah まで amhr2 KO 変異体ヒラメを飼育し、ヘマトキシリン・エオシン染色による組織学的な解析により、amhr2 KO 変異体の生殖腺における表現型を XY および XX ヒラメの表現型と比較して観察した。その結果(図 2)、野生型の生殖腺(Control)では、XY 生殖腺は細胞の形態的特徴から精原細胞が充満した精巣であり、XX 生殖腺は初期の卵母細胞と卵巣腔(OC: ovarian cavity)が確認されたことから卵巣であると判断された。このように、野生型ヒラメの生殖腺は、200dah で典型的な卵巣または精巣に分化していた。次に、amhr2 KO 変異体の表現型を観察し、野生型の生殖腺と比較した。その結果、XY および XX amhr2 KO 変異体は両方ともに、野生型と同様の初期の卵母細胞および卵巣腔が確認され、それらの間に組織学的な差異は見あたらなかった。また、解析した全ての XY amhr2 KO 変異体(n=6)は、XY であるにもかかわらず、正常な卵巣を持つ雌の表現型を示していた。このように、ヒラメにおいて amhr2 を KO すると、XY の雄化が阻止され、雌へと性分化する結果が得られた。次に、amhr2 KO 変異体ヒラメの生殖腺における性分化関連遺伝子の発現パターンを調べるために、定量的リアルタイム PCR 解析を使用して、XY および XX の野生型および amhr2 KO 変異体ヒラメにおける amh (Amhr2 のリガンドであり、雄特異的に発現する)、cyp19a1 (エストロゲン合成酵素)、foxl2 (cyp19a1 を上方制御する転写因子) および fshr (生殖腺の発達に関わる遺伝子) の発現を 200 dah において確認した(図 3)。雄特異的に発現する amh は、野生型において XY で高い発現を示し、XX では非常に低い発現レベルを示すが、amhr2 KO 変異体ヒラメでは XY と XX では共に野生型の XX と同様に低い発現レベルを示した。一方、雌で高く発現する cyp19a1 の発現は、野生型 XY では非常に低い発現レベルを示すが、amhr2 KO 変異体ヒラメの XY では野生型 XX と同様に高い発現レベルを示した。転写因子 foxl2 も、cyp19a1 と同様に amhr2 KO 変異体ヒラメの XY において高い発現レベルを示した。すべての実験グループ間で fshr の発現レベルに有意な差は認められなかった。XX の amhr2 KO 変異体ヒラメにおける amh、cyp19a1、foxl2 および fshr の発現パターンは XX 野生型の発現パターンと同様だった。このように、amhr2 KO 変異体ヒラメの XY の雌化において、性分化関連遺伝子の発現パターンも雌化していることが確認された。

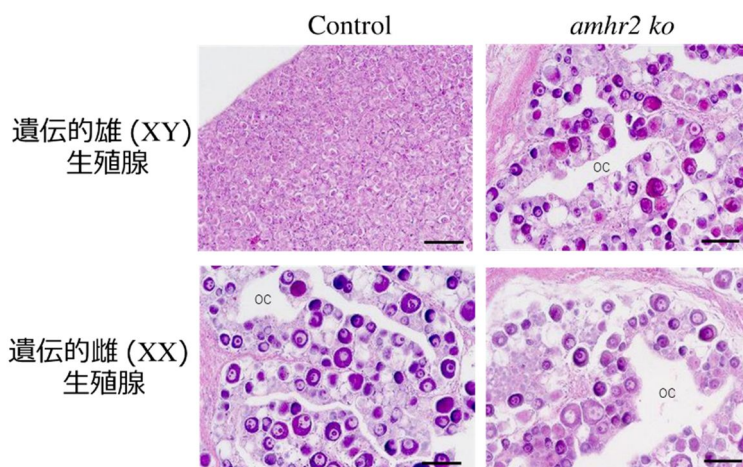


図 2、200dah における amhr2 KO 変異体ヒラメの生殖腺組織像

Scalebar: 100μm

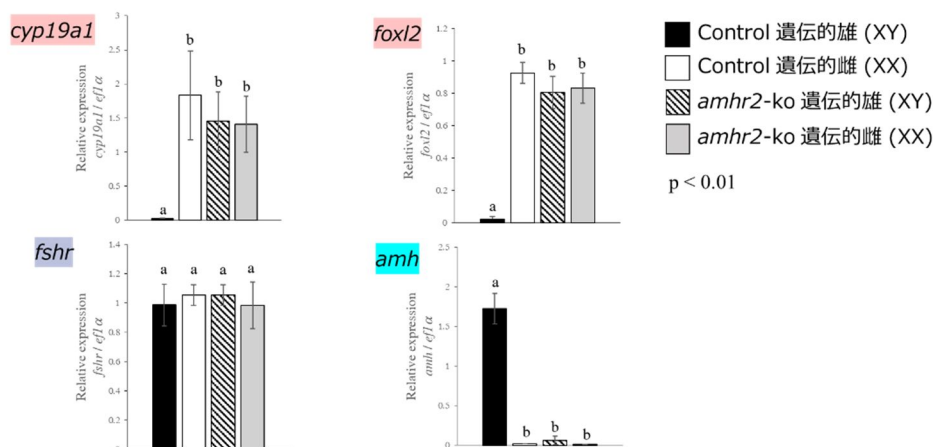


図 3、200dah における amhr2 KO 変異体ヒラメの性分化関連遺伝子の発現状況

組織学的な解析により、*amhr2* KO 変異体ヒラメの XY は雄から雌への性転換を起こすことが明らかとなった。そこで、*amhr2* KO 変異体ヒラメの生殖腺の雌化において、雌への性分化に重要な役割を持つエストロゲンが関与するかどうかを調べるために、エストロゲン合成を阻害するファドロゾールを *amhr2* KO 変異体ヒラメに投与する試験を行った。性分化時期を含む 30~100 dah にファドロゾール投与処理(100 µg/g diet)試験を行い、200dah まで飼育した後に組織学的解析を行った。その結果(図 4)、無処理の XY *amhr2* KO 変異体ヒラメの生殖腺は XX 野生型の生殖腺と同様の通常の卵巣を示したのに対して、ファドロゾール処理した XY *amhr2* KO 変異体ヒラメの生殖腺は XY 野生型と同様の精巣を示した (n=5)。また、ファドロゾール処理した全ての XX *amhr2* KO 変異体ヒラメ (n=5) は典型的な精巣を持っていた。このファドロゾール投与試験の結果から、*amhr2* KO 変異体ヒラメにおける XY の雌への性転換はエストロゲンの雌化作用が関与することが確認された。

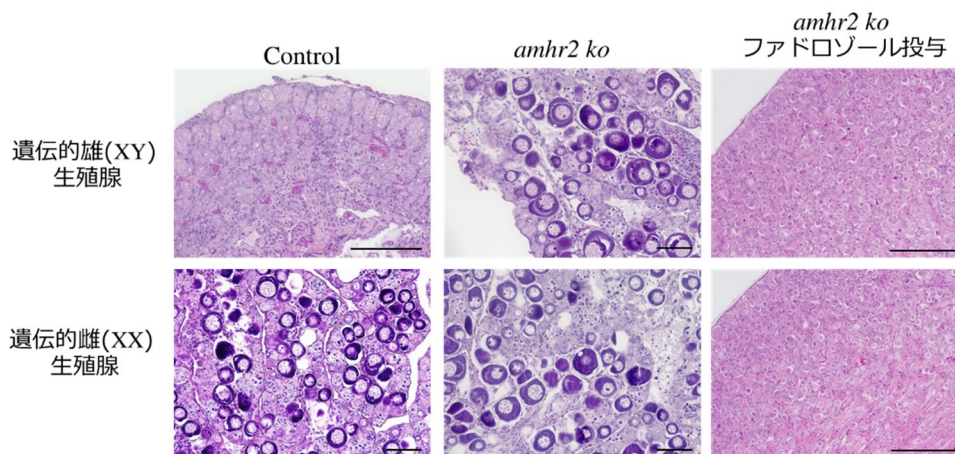


図 4、200dah におけるファドロゾール投与した *amhr2* KO 変異体の生殖腺組織像

Scalebar: 100µm

以上のように、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により *amhr2* KO 変異体ヒラメの XY が雌化することが明らかとなり、その雌化にはエストロゲンが関与することが明らかとなった。

他魚種における *amhr2* 遺伝子の研究報告においても、ヒラメと同様に XX/XY の性決定様式を持つメダカ (*Oryzias latipes*) では *amhr2* 遺伝子の機能欠損により XY が 50%以上の割合で性転換することが報告されている (Morinaga et al., 2007)。また、ニルティラピア (*Oreochromis niloticus*) では、*amhy* および *amh* -y と呼ばれる 2 つの雄特異的な *amh* の重複が存在し、*amhy*、*amh* -y、および *amhr2* の KO 変異体は、雄から雌への性転換を引き起こすことが報告されている (Li et al., 2015)。さらに、哺乳類においても、Amh を KO した XY マウスでは Amh シグナル伝達が阻害され、卵巣の形成を伴う部分的な雌雄同体症を引き起すとされている (Josso et al., 2001)。このように、Amhr2 機能の喪失が雄から雌への性転換を引き起こすことから、Amh/Amhr2 シグナルは脊椎動物に共通して雄の性決定と精巣の発達に関与している可能性が考えられる。また、Amh/Amhr2 シグナルの喪失によるエストロゲン合成への影響についても報告されており、メダカでは *amhr2* 機能欠損した XY では *cyp19a1* の発現が上昇するとされ (Morinaga et al., 2007)、ペヘレイ (*Odontesthes hatcheri*) における *amhy* をノックダウンした報告では、*foxl2* および *cyp19a1* の発現が上昇するというヒラメと同様の結果が報告されている (Hattori et al., 2010)。本研究においては、ファドロゾール処理試験により XY *amhr2* KO 変異体ヒラメの雌化にエストロゲンが関与することを示した。これらの結果をまとめると、ヒラメを含む魚類においては、*amhr2* を機能欠損することでエストロゲン合成量が上昇し、雄から雌への表現型の性転換が引き起こされると考えられる。したがって、ヒラメにおける Amh/Amhr2 シグナルは遺伝的な雄においてエストロゲン合成を抑制する役割を持ち、結果的に雄への性分化と精巣形成を誘導する雄化シグナルであることが示された。

(2) *amhr2* KO ヒラメに対する高水温による雄化誘導試験

amhr2 KO 変異体ヒラメは、雄化シグナルである Amh/Amhr2 シグナルを喪失していることから全雌になることが明らかとなった。そこで、作出した *amhr2* KO 変異体ヒラメが高水温による XX の雄化が引き起こされないことを確認するために、高水温飼育による雄化誘導試験を実施した。性分化時期を含む 30~100dah に、XX ヒラメがほぼ 100%雄へと性転換する 27 の高水温で飼育する試験を実施した結果(表 1) 野生型では通常の飼育水温である 18 飼育では XY は雄であり、XX は雌だったが、27 飼育では全ての XX が精巣を持つ雄へと性転換していた。しかしながら、*amhr2* KO 変異体ヒラメにおいては、27 飼育では全て雌であり、XX の雄化は確認されな

った。この高水温による雄化誘導試験により、*amhr2* KO 変異体ヒラメは高水温による雄化が誘導されない可能性が高いことが示された。

	水温	個体数	遺伝的雄(XY)		遺伝的雌(XX)	
			♂(精巣)	♀(卵巣)	♂(精巣)	♀(卵巣)
野生型	18°C	18	10			8
	18°C	20	9			11
	18°C	20	10			10
	27°C	19	11		8	
	27°C	17	8		9	
	27°C	18	7		11	
<i>amhr2</i> KO	18°C	18		9		9
	18°C	20		9		11
	18°C	17		5		12
	27°C	20		11		9
	27°C	18		10		8
	27°C	18		9		9

表1、高水温飼育による *amhr2* KO 変異体ヒラメの雄化誘導試験

以上のように、本研究で作出した *amhr2* KO 変異体ヒラメは雄化シグナルの喪失による全雌であり、高水温による雄化が引き起こされないことが確認された。また、系統化についても、フィードゾール投与により *amhr2* KO 変異体ヒラメの雄化が確認できたことから次世代の作出も可能と考えられる。残念ながら、本研究の実施期間中に *amhr2* KO 変異体ヒラメの系統化や成長への影響の調査には至らなかったが、本研究で実施した *amhr2* KO 変異体ヒラメの作出と解析は、ヒラメ養殖における完全な全雌生産を可能にする成果であると考えられる。

(引用文献)

- Hattori RS, Kumazawa K, Nakamoto M, Nakano Y, Yamaguchi T, Kitano T, Yamamoto E, Fuji K, Sakamoto T. Y-specific amh allele, amhy, is the master sex-determining gene in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Front Genet.* 2022;13:1007548. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1007548>
- Kitano T, Yoshinaga N, Shiraishi E, Koyanagi T, Abe S. Tamoxifen induces masculinization of genetic females and regulates P450 aromatase and Müllerian inhibiting substance mRNA expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol Reprod Dev.* 2007;74(9):1171-1177. <https://doi.org/10.1002/mrd.20603>
- Sawamura R, Osafune N, Murakami T, Furukawa F, Kitano T. Generation of biallelic FO mutants in medaka using the CRISPR/Cas9 system. *Genes Cells.* 2017;22(8):756-763. <https://doi.org/10.1111/gtc.12511>
- Morinaga C, Saito D, Nakamura S, Sasaki T, Asakawa S, Shimizu N, Mitani H, Furutani-Seiki M, Tanaka M, Kondoh H. The hotei mutation of medaka in the anti-Müllerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(23):9691-9696. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611379104>
- Li M, Sun Y, Zhao J, Shi H, Zeng S, Ye K, Jiang D, Zhou L, Sun L, Tao W, Nagahama Y, Kocher TD, Wang D. A Tandem Duplicate of Anti-Müllerian Hormone with a Missense SNP on the Y Chromosome Is Essential for Male Sex Determination in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *PLoS Genet.* 2015;11(11):e1005678. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005678>
- Josso N, di Clemente N, Gouédard L. Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;179(1-2):25-32. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(98\)00186-5](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(98)00186-5)
- Hattori RS, Oura M, Sakamoto T, Yokota M, Watanabe S, Strüssmann CA. Establishment of a strain inheriting a sex-linked SNP marker in Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*), a species with both genetic and temperature-dependent sex determination. *Anim Genet.* 2010;41(1):81-84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01948>

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 Yamaguchi Toshiya, Kitano Takeshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Amh/Amhr2 Signaling Causes Masculinization by Inhibiting Estrogen Synthesis during Gonadal Sex Differentiation in Japanese Flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2480 ~ 2480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24032480	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口寿哉
2. 発表標題 amhr2ノックアウトヒラメを用いた雄化の分子機構の解析
3. 学会等名 令和6年度 日本水産学会大会春季大会
4. 発表年 2024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
研究 分 担 者	北野 健 (Kitano Takeshi) (40336219)	熊本大学・大学院先端科学研究部(理)・教授 (17401)	

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
---------	---------