

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：85202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07567

研究課題名(和文) 哺乳動物由来生化学マーカーを応用したチョウザメの雌雄判定技術開発

研究課題名(英文) Sex determination technology development of the sturgeon which applied biochemical marker derived from mammal

研究代表者

永瀬 光俊 (NAGASE, Mitsutoshi)

島根県産業技術センター・生物応用科・科長

研究者番号：00538465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ベストル種およびアムール種について、当歳魚の時点から、1カ月ごとに体重、体長、生残率を測定すると同時に、血液採取を行った。生化学マーカーの定量を行ったところ、ビテロジェニン濃度に個体差が見られる傾向が認められた。しかしながら、血液採取をした個体は、飼育途中の死亡あるいは生育不良が続出し、サンプリング方法の改良が必要と考えられた。

ベストル種の1歳魚、2歳魚、雌雄判明した3歳魚についても、同様に、血液、尿を採取して、生化学マーカーの定量を行ったが、雌雄に有意な差はなく、エサ由来の環境ホルモンが影響していると考えられた。魚体が大きくなると、環境ホルモン量を考慮する必要があることが分かった。

研究成果の概要(英文)：In this investigation, we measured the weight, body length, and survival rate of and collected blood samples from Bester and Amur sturgeons on a monthly basis from the time of yearling. Using a quantitative analysis of biochemical markers, we observed a tendency for variability in vitellogenin concentration among different individuals. However, death or poor growth during breeding was more likely observed in individuals in which we performed prior blood sampling. Thus, it is necessary to improve our sampling method.

Further, blood and urine samples were collected from Bester sturgeons, particularly 1-, 2-, and 3-year-old fish. Sex was morphologically confirmed of the 3-year-old fish. However, quantitative analysis of biochemical markers did not show significant differences among individuals. It appears that environmental hormones derived from their feed affect biochemical marker levels. As the fish become bigger, it is necessary to consider the amount of environmental hormone they eat.

研究分野：水産化学、食品科学

キーワード：チョウザメ ホルモン 雌雄判別

1. 研究開始当初の背景

チョウザメは、その魚卵が世界三大珍味のひとつであるキャビアとして世界的にも需要の高い食材であるが、その反面、絶滅の恐れがあり、天然キャビアの国際取引は規制されている。そのため、世界各地でチョウザメの養殖が盛んに行われている。日本におけるチョウザメ養殖は、1983年に日ソ漁業科学技術協力の一環により、旧ソ連からベステル (Bester) 種が導入されたことから始まった。ベステルとは、旧ソ連で養殖種として開発されたもので、降海型で大型のオオチョウザメ (*Huso huso*) の雌と、小型で河川型のコチョウザメ (*Acipenser ruthenus*) の雄との交配で作出されたものである。現在では、本研究の共同研究者である島根県邑南町の小林建設 (株) を含む、全国の十数カ所でベステル種を中心とした養殖が行われている。チョウザメ養殖は、異業種参入、町おこしなど生産量は年々増え、中山間地域の有力産業として期待されている。研究協力者は2005年に異業種から参入し、島根県産業技術センターと共に、キャビアの加工、保存技術の開発、魚肉薫製品の製品化などの研究を共同で行ってきた。その中で、本研究を始めた2015年には、チョウザメ養殖参入から10年目になり、キャビア生産が本格化しており、早期の雌雄判別によるコスト削減および利用価値のないオスの削減が深刻な課題となっていた。

チョウザメの性比は、約1対1であることが経験的に知られている。つまり、導入稚魚の半分はキャビアの採れないオスということになる。また、メスからキャビアが採れるのには8年以上かかる。そうなるとチョウザメ養殖の合理化のためには、キャビアのためにメスだけを養殖する必要がある。魚の雌雄は、ヒレの位置や形、大きさ、体色などで区別される場合が多いが、チョウザメは雌雄の特徴がほとんど無い。成魚であれば、体形や生殖口の形状で判断できるが、養殖コストの面から現実的でない。そのため、稚魚から3年目まで待って、その外科的手術を行い開腹して生殖腺を目で見確認するという非常に熟練を要する煩雑な方法が一般的に使われる。この方法は、生殖腺が成熟するまで3年間は判別ができないこと (0から3年目までのオスについては飼料代が無駄になる)、開腹手術の失敗により魚が死亡する危険性があること、そのため鑑定作業者に熟練が要求されること、手術後の管理 (感染症の予防等) に手間とコストがかかること、など多くの問題点がある。もし仮に稚魚の段階で迅速、簡便に雌雄判別ができれば、必要量以上の雄魚は不要になり飼育コストが半減でき、判別にかかる手間も不要になることから、養殖経営の効率が劇的に高まる。

チョウザメ科 Acipenseridae は、2亜科4属の約30種からなり、2億年以上前から地球上に姿を現した古代魚であるが、いずれの

種においてもその性決定メカニズムは、完全にはわかっていない。チョウザメの雌雄判別を考える場合、まず、ゲノム情報からアプローチして、性差を遺伝子レベルで解明する方法が考えられるが、染色体の数は250本程度で他の脊椎動物に比べ著しく多いことが知られ、性染色体も同定されておらず、遺伝的な性が存在するかについても確定していない。また、仮に次世代シーケンサー等の利用により、チョウザメのゲノム情報を得ることは、できたとしても、近年、全ゲノムシーケンシングが解読されたトラフグの様に、雌雄の差が1塩基しかない例も存在し、I) ゲノム情報の不足や、II) 染色体数が著しく多いこと、さらには、III) チョウザメの機能的な性が、遺伝的な性と一致しない場合もあり得ること、などを考慮すると、分子遺伝学的手法で雌雄判別を行うことは、莫大な時間とコストがかかることが予想され、得策ではない。そこで、本研究では、チョウザメの雌雄を早期に判別する技術を開発するため、生殖細胞の生化学的マーカーに着目することにした。近年、環境ホルモンによる魚介類のメス化が数多く報告されている。現在のところ、そのメス化に大きく寄与する物質には諸説あるが、近年では、特に環境中へ放出される尿中に存在する女性ホルモンの影響が疑われるようになってきた。以上のことは、ヒトをはじめとする脊椎動物の特に女性ホルモンとしての生理活性や化学構造には、かなり共通性があることを示しており、ヒトなどの哺乳動物の生殖細胞の生化学的マーカーを活用した、新しい魚介類の雌雄判別技術開発の可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、チョウザメについて、あくまで機能的な性の違いを出来るだけ早い段階で、誰でも、簡単、迅速に、安価に鑑定できる技術開発を行うことを目的とした。そこで、メスに特異的な生化学マーカーを明らかにしてメスを確実に判別することに重点を置く。従来、ヒトをはじめとする哺乳動物の雌雄の判定や親子鑑定などにおいては、分子生物学的手法すなわちDNA配列の違いを検出することが主流であり、确实ではあるが、DNA解析は、数時間から数十時間を要す点、また、数百から数千匹の魚を処理するには、不向きであり、抗原抗体反応を利用した方法、例えるなら市販の妊娠判定薬や血液型判別のような要領で瞬時に鑑定できることが望ましい。また、チョウザメの雌雄判別については、ふ化後1年半で生殖腺を採取してその顕微鏡観察により雌雄を鑑定した報告が、今までで、最も若い魚で鑑定した例である。よって、少なくとも1年半で生殖腺の分化は終わっており、ふ化後1年半以前のどの時期に、生化学マーカーの雌雄による違いがみられるのかを調べる。

3. 研究の方法

1) チョウザメ成魚個体における血液および

尿中のホルモン測定

本研究では、ホルモン等の生化学マーカーを雌雄判別に応用することで、判別の早期化、作業の軽減化を目指している。そこで、実際に雌雄判別が終了したチョウザメから血液および尿を採取して、17 β -エストラジオールとビトロジェニンの濃度を調べた。分析には、環境ホルモン用に作られ、測定範囲の広い酵素免疫法を用いる汎用キット、コスモバイオ YK170 17 β -Estradiol EIA Kit および CUSABIO Grouper Vitellogenin、VTG ELISA Kit を用いた。対象魚は、チョウザメ養殖場[小林建設(株)]にいた生後3年から6年のアムール種およびコチョウザメ種を用い、157尾の尿(オス74尾、メス83尾)および83尾の血液(オス37尾、メス46尾)について調査した。

2) チョウザメの性分化時期の解明

2015年5月に、ふ化して60日経ったベステル種の当歳魚100尾を、種苗供給メーカーから入手して、ビニールハウス内にある専用の水槽で飼育した。飼育は、島根県邑南町にある共同研究者であるチョウザメ養殖場[小林建設(株)]にて行った。個体をランダムにサンプリングして、1カ月ごとに生後20カ月まで体重、体長を測定した。さらに、11カ月以降は、10個体についてナンバーリングを行い、血液の採取を行った。採取した試料について、エストロゲン類(エストラジオール、エストリオール、エストロン)等の生化学的マーカーの定量を行った。分析には、環境ホルモン用に作られ、測定範囲の広い酵素免疫法を用いる汎用キット、CUSABIO Grouper Vitellogenin、VTG ELISA Kit を用いた。

3) チョウザメにおける検査部位の検討

魚類における性決定遺伝子マーカーの探索研究において、発現に性差のある mRNA の発現パターンを確認する方法が知られている。簡易的に検査できる部位の探索として、チョウザメの体表粘液に注目し、RNA 抽出の確認を行った。比較にはチョウザメ尾ヒレもしくは、背ヒレいずれかの部位を使用した。

4. 研究成果

1) チョウザメ成魚個体における血液および尿中のホルモン測定

17 β -エストラジオール(E2)、ビトロジェニン(Vg)の両方ともに、血液についても尿についても検出されたが、雌雄間で差が見られなかった。E2は、女性ホルモンであるエストロゲン的一种である。Vgは卵黄タンパク質の前駆タンパクである。正常な状態では、発達を開始した卵巣で合成される雌性ホルモンが肝臓にあるエストロゲン受容体を仲介して、Vg合成を誘導するとされる。E2、Vgともメス特有の物質であるが、オスからも検出された理由としては、エサに含まれる植物性エストロゲン(イソフラボン、リグナン、クメスタン等)の影響が考えられる。実際に、チョウザメ飼料をキットで測定すると、E2、Vgとも検出された。今回の測定キットは、測

定範囲の広い汎用キットを用いており、エサの摂取量が多い成魚の場合、その影響が大きくなり、雌雄の差が見えなくなったと推察される。この問題を解決するためには、チョウザメ分子に感度良く反応する測定キットを設計、開発する必要がある。

2) チョウザメの性分化時期の解明

2015年5月に、ふ化したベステル種について、体長および体重を測定したところ、最初の8カ月間は急激に成長して、平均体長で約42cm、平均体重が250gとなった。その後20カ月目までの成長は緩やかであった。体重は、体長と比較して個体間のばらつきが大きかった。チョウザメの成長様式は、若齢時には速く、その後は緩やかな成長をすることが知られており、今回の実験に供した魚も同様であったことを示している。

10個体について生後11カ月目から採血を行い、血中のVg濃度を調べた。Vgは卵黄タンパク質の前駆タンパクで、本来はメスの血液に見られる物質である。この物質が、成長のどの時点で血中で検出されるかで、雌雄判別の有効な情報になりうると考えた。10個体の全てについて、13カ月目までVgは検出されなかった。このことにより、13カ月目までは、ベステル種では魚体の成熟がないことがわかった。そして14カ月目では、2個体に初めて検出され、15カ月目で5個体、16カ月目からは全個体に検出された。各個体の濃度経過は様々で、4個体については、時間経過とともに増加しており、メスであることが示唆されたが、それ以外については不明であった。16カ月目からは、おそらくエサに含まれる植物性エストロゲン(イソフラボン、リグナン、クメスタン等)の影響が出ていると考えられ、Vgを指標にする場合は、生後15カ月目までが適していることが分かった。

なお、本研究が終了した2018年3月31日現在で、実験に供した10個体のうち、生き残っている個体は2個体のみであり、今後と同様の実験を行う場合は、方法を改善する必要がある。

3) チョウザメにおける検査部位の検討

チョウザメの体表粘液は水中でも分泌はされているが、水中から取り出した際に多く分泌されることが経験上わかっている。そこで、水中から取り出して、大量に分泌されたものを採取しRNA抽出に使用した。体表粘液の採取時に体表をしっかりと擦り取ると表皮も採取できる。これによりRNA抽出が可能な結果が得られた。しかしながら、その確率は極めて低く、粘液を検査部位として使用するのは難しかった。一方、ヒレを用いたRNA抽出は問題なく確認できた。

チョウザメの体表粘液は水中でも分泌はされているが、水中から取り出した際に多く分泌されることが経験上わかっている。そこで、水中から取り出して、大量に分泌されたものを採取しRNA抽出に使用した。体表粘液の採取時に体表をしっかりと擦り取ると表皮

も採取できる。これにより RNA 抽出が可能な結果が得られた。しかしながら、その確率は極めて低く、粘液を検査部位として使用するのには難しかった。一方、ヒレを用いた RNA 抽出は問題なく確認できた。

上記により抽出した RNA を使用して、実際に目的配列の増幅確認を行った。既知配列である p450 アロマトラーゼを用いて確認を行ったが、個体ごとの差は明らかにできなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計件)

小林 憲治、緑書房、養殖ビジネス、2017、9、49

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永瀬 光俊 (NAGASE Mitsutoshi)

島根県産業技術センター・技術部生物応用科・科長

研究者番号：00538465

(2) 研究分担者

會見 忠則 (AIMI Tadanori)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：90264928

(3) 連携研究者

秋吉 渚月 (AKIYOSHI natsuki)

島根県産業技術センター・技術部生物応用科・研究員

研究者番号：00748668

(4) 研究協力者

小林 憲治 (KOBAYASHI kenji)

小林建設代表取締役