

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18746

研究課題名(和文) エビ類の高効率な卵巣成熟技術の開発を目指した基盤分子情報の集積

研究課題名(英文) Integration of transcriptomic information during ovarian maturation process in Penaeid shrimps

研究代表者

奥津 智之 (Okutsu, Tomoyuki)

国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・その他部局等・研究員(移行)

研究者番号：40456322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：データベースからバナメイエビの72,348個のunigeneについて、ORF finderによりタンパク質をコードした66,166遺伝子を抽出し、そのアミノ酸配列を明らかにした。上記72,348個のunigeneについてマイクロアレイプローブをeArrayで設計し、このアレイを用いた解析の結果、バナメイエビの成熟卵巣に特徴的な遺伝子としてGILTなど、未成熟卵巣に特徴的な遺伝子としてNP1などを同定した。本研究により開発されたマイクロアレイはクルマエビ科に属する種の卵巣成熟過程に関する有用な分子情報を得るために有用なツールとして利用できる。

研究成果の概要(英文)：We found 66,166 genes encoding a certain protein among 72,348 unigene sequences in whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, obtained from NCBI database, and revealed their amino acid sequences. The microarray probes were designed from the above-mentioned 72,348 unigene sequences using eArray software. A comparative transcriptomic analysis using the array revealed GILT and NP1 gene showed specific expression in mature and undeveloped ovary in *L. vannamei*. The microarray developed in this study can be a useful tools to uncover the molecular mechanisms in ovarian development in Penaeid shrimp species.

研究分野：水生生物繁殖生理

キーワード：バナメイエビ 卵巣成熟 分子マーカー マイクロアレイクルマエビ科

### 1. 研究開始当初の背景

世界のエビ類養殖生産量 445 万トン (2013 年) に達しており、その 70%以上をクルマエビ類に属するバナメイ (*Litopenaeus vannamei*) が占めており、その生産地は東南アジアが中心となっている (FAO, 2015)。しかし、中南米原産のバナメイは東南アジア地域にとっては外来種であるため、本来であればウシエビに代表される東南アジア在来種の養殖生産が望まれるが、それらの種については完全養殖技術が確立されておらず実現には至っていない。クルマエビ類の完全養殖技術の確立を困難にさせている最大の原因は、卵巣の成熟を人為的に制御・促進する技術が確立されていないことにある。このような技術を確立するためには、未だ不明な点が多い卵巣の成熟機構を明らかにすることが必要となる。そこで本研究では、卵巣成熟の分子機構解明を目的とした。

### 2. 研究の目的

クルマエビ類は重要養殖対象種であるが、その多くの種では成熟卵巣を持った親エビを天然から採捕し、種苗生産に供している。しかしこれらの資源量は近年減少しているため、持続的なエビ養殖を実現するためには卵巣成熟技術の開発が必要である。そこで本研究では、実験材料の入手が容易なバナメイをモデルに用い、卵巣成熟に関わる分子情報、すなわち、成熟卵巣のマーカー分子の同定、卵巣成熟過程の分子カスケードの解明、卵巣成熟に重要な役割を果たす分子の同定、を目的とした網羅的遺伝子発現解析を実施し、高効率な卵巣成熟技術の開発を目指した基盤分子情報の集積を目的とした。

### 3. 研究の方法

エビ類は、他の動物種に比較して遺伝子に関する情報が不足しており、本研究の対象種であるバナメイにおいても例外ではない。申請者はこれまでに、次世代シーケンスを用いてバナメイエビの発現遺伝子に関する情報を網羅的に収集し、これをデータベースに存在する既存の分子情報に加えることで独自のマイクロアレイ (バナメイアレイ) を設計した。このバナメイアレイは、特異性の高い 29,917 個のプローブを搭載しており、これを用いることで、再現性・網羅性の高いデータを得られることが予備実験で確認されていた。このバナメイアレイを用いて以下の研究を実施することとした。

(1) バナメイの様々な成熟段階にある卵巣のサンプルについて、バナメイアレイを用いた網羅的な発現遺伝子の解析を行う。

(2) 各成熟段階で特徴的な発現を示す遺伝子を抽出し、その分子について qPCR によって各成熟段階にある卵巣および各組織 (眼柄、脳、神経節、肝臓、鰓、筋肉、消化管、精巣) における遺伝子発現量を測定する。

### 4. 研究成果

約 4 ヶ月齢の若齢個体の未成熟卵巣 (若・未, n=4)、約 11 ヶ月齢の成体より摘出した未成熟卵巣 (成・未, n=6) および同じく約 11 ヶ月齢の成体より摘出した成熟卵巣 (成・成, n=6) の 3 区 (表 1) について、我々の開発したバナメイアレイを用いた発現遺伝子の網羅的な比較解析を実施した。

表 1. 実験に用いたバナメイ個体

	若齢・ 未成熟卵巣 (n=4)	成体・ 未成熟卵巣 (n=6)	成体・ 成熟卵巣 (n=6)
月齢	4-6	12-14	12-14
体重 (g)	16.3±1.70	71.40±3.57	79.45±7.66
GSI (%)	0.38±0.11	1.92±0.28	7.58±0.42

その結果、発現量に有意な差のある遺伝子が、若・未と成・未の間で 1,008 個、若・未と成・成の間で 3,021 個、成・未と成・成の間で 184 個が見つかった。組織学的解析では、成・未と成・成の間に最も顕著な違いが認められていたが、発現遺伝子の差異は他の比較に比べて小さいという結果が得られた。また、上記の結果に基づき、主成分分析および PCA 解析を行った。その結果、主成分分析では比較した 3 群は異なるグループに分かれ (図 1)、PC1 スコアの最も高い遺伝子が、既知の卵巣成熟マーカーである卵黄タンパク質遺伝子 (Vg) であったことから (図 2)、本実験で得られた結果は十分な妥当性があることが示された。

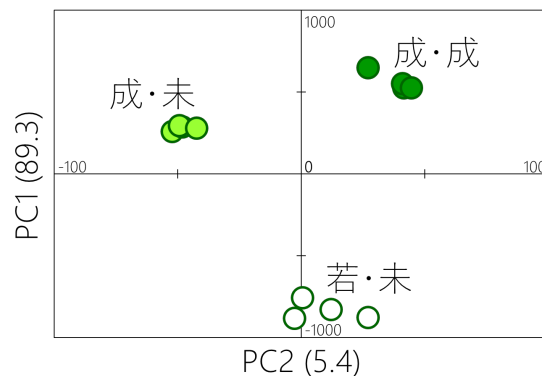


図 1. 主成分分析の結果

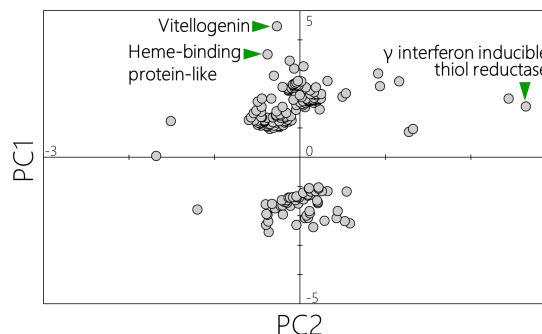


図 2. PCA loading の結果

また、PC1 スコアの高い遺伝子として、

Heme-binding protein (HBP) 様遺伝子が同定され(図2)、この遺伝子は、ほぼ卵巣特異的な発現かつ卵巣成熟の進行とともに発現量が上昇するという、Vg とほぼ同様の発現パターンを示すことが明らかとなった(図3)。

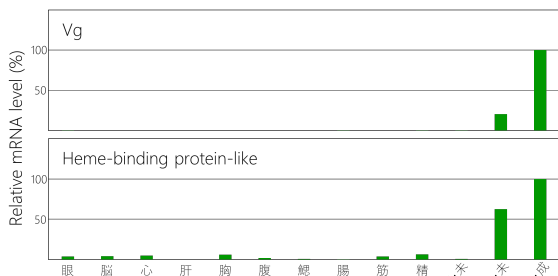


図 3. Vg と HBP 様遺伝子の発現

PC2 スコアの最も高い遺伝子として、Gamma interferon inducible lysosomal thiol reductase (GILT) 遺伝子(図2)が同定された。GILT 遺伝子は、多くの体組織でその発現が認められ、卵巣においては成・成で特に強い発現が認められた(図4)。また、バッタで卵巣成熟制御に関わる分子として知られる Neuroparsin 1 (NP1) 遺伝子は、成・未で特に強い発現が認められた(図4)。

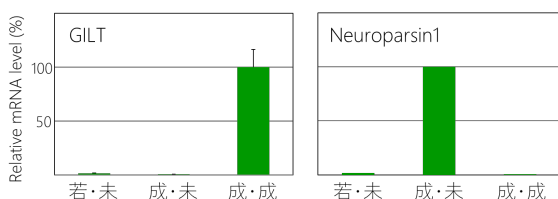


図 4. GILT と NP1 遺伝子の発現

成・未および成・成の cDNA を鋳型とした RT-PCR を行った結果、GILT は成・成で、Neuroparsin 1 は成・未で、それぞれ特異的な増幅バンドが確認された(図5)。これは、GILT と NP1 の各遺伝子がそれぞれ成熟卵巣および未成熟卵巣の分子マーカーとして利用可能であることを示している。

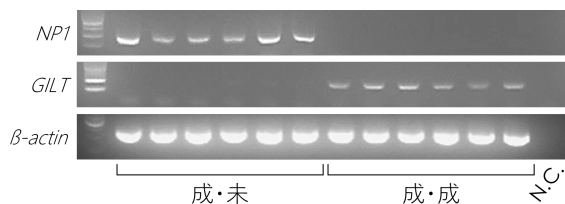


図 5. GILT および NP1 の RT-PCR の結果

また、表2に示した実験群を用いてクルマエビの卵巣 RNA を用いて、マイクロアレイ解析を行った結果、成・未と成・成で特徴的に発現する遺伝子として、Prefoldin subunit 5-like、Tubulin alpha-like、Myosin heavy chain-like 遺伝子が得られた(図6)。

表 2. 実験に用いたクルマエビ個体

	成体・未成熟卵巣 (n=4)	成体・成熟卵巣 (n=4)
体重 (g)	47.84±7.87	58.14±8.57
GSI (%)	0.65±0.06	8.51±0.05

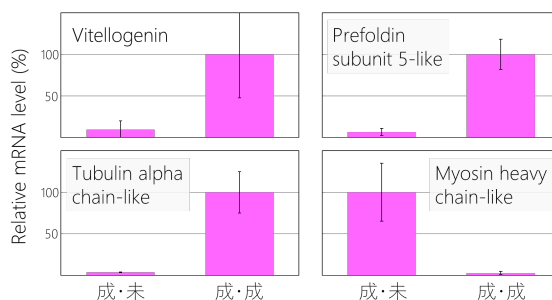


図 6. クルマエビ卵巣で特徴的に発現する遺伝子

さらに、バナメイエビに関する遺伝子情報がアップデートされたことから、最終年度は改めて NCBI のデータベースからバナメイエビの 72,348 個の unigene をダウンロードして、ORF finder によりタンパク質をコードした 66,166 遺伝子を抽出し、そのアミノ酸配列を明らかにした。Unigene の最も長い遺伝子は、2,587 アミノ酸残基であり、平均は 100 アミノ酸残基であった。上記 66,166 遺伝子のアミノ酸配列を pfam で解析して、11,272 個の遺伝子に特徴的なタンパク質のモチーフがあることがわかった。上記情報に基づき、72,348 個の unigene のマイクロアレイプローブを eArray で設計し、新たなマイクロアレイを設計・作製した。今後、この新たなマイクロアレイによってより網羅性が高い解析が可能になることが期待される。本研究によりマイクロアレイはクルマエビ科に属する種の卵巣成熟過程に関する有用な分子情報を得るために有用なツールであることが示された。

## 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 1 件)

マイクロアレイによるクルマエビ類卵巣の網羅的発現遺伝子解析

奥津 智之(国際農研)・櫻井 哲也(高知大)・大平剛(神奈川大)・山根史裕(三重県栽培セ)・最上今日子・岸本美帆・圓山恭之進(国際農研)

平成 31 年度日本水産学会春季大会(2018 年

3月27日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

奥津 智之 (OKUTSU, Tomoyuki)

国際農林水産業研究センター・水産領域・

主任研究員

研究者番号: 40456322

##### (2) 研究協力者

圓山 恭之進 (MARUYAMA, Kyonoshin)

国際農林水産業研究センター・水産領域・

主任研究員