

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22414

研究課題名（和文）軟骨魚類研究への逆遺伝学的解析の導入

研究課題名（英文）Introduction of reverse genetic analysis into cartilaginous fish research

研究代表者

兵藤 晋（HYODO, SUSUMU）

東京大学・大気海洋研究所・教授

研究者番号：40222244

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：脊椎動物の進化において重要な位置を占め、形態・発生・適応・生殖など様々な特徴を持つ軟骨魚類の研究に、逆遺伝学的解析を導入することを目指した。まず、個体発生における栄養消化吸収機能を含む機能獲得の過程を明らかにし、排卵から受精・卵殻形成・産卵に至る生殖周期の把握と内分泌調節のメカニズムを明らかにした。これらの基盤情報に基づき、トラザメ胚からの初代培養細胞を樹立し、さまざまな手法を用いて遺伝子導入の最適化をはかった。さらにはトラザメの胚体ならびに成魚の精巣にも遺伝子導入を行い、将来の逆遺伝学的解析を目指した萌芽研究を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、軟骨魚類に特有の様々な特徴や難しさゆえに、軟骨魚類での遺伝子改変、ゲノム編集などは不可能だと考えられてきた。本研究の成果は、今後培養細胞における導入遺伝子の機能解析、細胞機能の遺伝学的解析、生体における特定器官・組織・細胞の遺伝学的機能解析、そして将来的には遺伝子改変動物作出による逆遺伝学的解析を可能にするための第一歩となった。軟骨魚類は海洋生態系の高次捕食者として、海洋生態系の保全・維持・管理という観点からも重要であり、基礎科学だけでなく社会的にも意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to introduce reverse genetic analysis into the study of cartilaginous fish, which occupy an important position in the evolution of vertebrates and have various characteristics such as morphology, development, adaptation, and reproduction. First, we clarified the process of embryonic development including nutrient digestion and absorption function during the ontogeny of cloudy catshark, and also investigated endocrine regulation of the reproductive cycle of catshark from ovulation to fertilization, egg-case formation and spawning by ultrasound investigation and concomitant plasma hormone measurement. Based on these basic information, we established primary cultured cells from cloudy catshark embryos and optimized gene transfer using various methods. Furthermore, we conducted introduction of genes into the embryos of cloudy catsharks and the testes of adult fish, an exploratory research aiming at future reverse genetic study.

研究分野：比較内分泌学、魚類生理学

キーワード：軟骨魚類 遺伝子導入 プレハッチ 生殖周期

1. 研究開始当初の背景

サメ・エイを含む軟骨魚類は、現生の脊椎動物顎口類の中で最も早くに分岐し、脊椎動物の進化を理解する上で鍵となる生物群である。尿素を利用する環境適応や、卵生から胎生までの多様な繁殖・発生様式など、ユニークな特徴を多く持ち、その基礎研究の重要性は広く認識されている。基礎生物学的な重要性に加え、海洋生態系の調節機能を担う高次捕食者として、海洋生態系の保全・維持・管理という観点からも極めて重要だが、最近の50年間で主要なサメ・エイ類は70%近くも減少したことが報告され、絶滅が危惧される種も30%を超えることが国際自然保護連合の調査により示され、軟骨魚類の理解は喫緊の課題となっている。

このような生物学的・社会的重要性のもと、我々は国内外の研究拠点として軟骨魚類研究を推進してきた。海洋環境への適応のしくみ(Hyodo et al., 2014)、淡水環境にも生息域を拡大する広塩性のメカニズム(Imaseki et al., 2019)などを明らかにし、我々が研究モデルとするトラザメを含めたサメゲノムの解析結果も報告された(Hara et al., 2018)。しかしながら、サメ研究には未だ大きな手法的制約がある。それが、遺伝子操作・逆遺伝学的解析ができないことである。この最大の原因は、軟骨魚類の繁殖の特徴にある。全ての種が交尾による体内受精であり、胎生の場合には受精後体内で1年近く発生・成長してから出産にいたる。約40%を占める卵生種であっても、受精卵は硬い卵殻に包まれ、一定期間輸卵管内に留まった後に産卵される。それゆえ、産卵されたときには発生がすでに進んでしまっている。さらには、交尾後はメスが体内に精子を保存し、再び交尾することなくメス単独で排卵から交尾、産卵までを繰り返すため、「いつ受精したのか」を外見的に知ることができなかった。以上のような特徴から、軟骨魚類において遺伝子操作・逆遺伝学的解析は全く考えられなかったと言える。

我々は、卵生種トラザメをモデルに生殖生理学研究を開始するにあたって、エコー検査の活用を考えた。水族館などでは大型板鰐類(ジンベエザメやマンタなど)や海棲哺乳類などの健康観察や妊娠判断にエコー検査が用いられている。保全を目的とした研究においても、生殖状態の把握にエコー検査が用いられはじめてきている。しかしこれまでの研究では、研究用の飼育動物を用いて、純粋に研究を目的とした頻繁なエコー検査は行われていなかった。我々はトラザメに対してエコー検査をすることで、輸卵管内に存在する受精卵の有無を把握できることを明らかにした。このことにより、将来的に受精後1日以内の受精卵を入手することも可能となり、これまで全く考えることのできなかつた遺伝子操作・逆遺伝学的解析の基盤をつくることができると考えた。

2. 研究の目的

これまで不可能と思われてきた、軟骨魚類における逆遺伝学的アプローチを可能にする遺伝子改変技術一般を、世界で初めて開発することが目的である。本研究の成果は、生理・形態・発生・遺伝などの分野において、器官形成や恒常性、適応、繁殖などさまざまな現象の解明を飛躍的に進めることが期待できる。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するため、大きく3つの項目を進めてきた。まずひとつは、トラザメ胚の発生過程、特に栄養吸収過程を調べることである。消化吸收機能をターゲットとして、Vivo-Morpholino (VM) を用いたノックダウンを試みるという意味がある。ふたつめは、トラザメの生殖周期の詳細、とくに受精前後の内分分泌現象を明らかにすることである。将来的な初期胚での遺伝子導入には、排卵のメカニズムや貯精された精子の活性化、受精のメカニズムや、これらの内分分泌機構の理解が必要不可欠である。そして最後に、これまで様々な動物種で確立されてきた複数の遺伝子導入方法を応用し、軟骨魚類への遺伝子導入を検討することである。

4. 研究成果

(1) トラザメ胚の発生過程における栄養吸収機構の獲得

トラザメ胚は、産卵された後、硬い卵殻内で約半年間発生・成長した後に孵化に至る。しかしその間、最初の2ヶ月間は卵殻が固く閉じられている一方で、プレハッチとよばれる卵殻の一部が開放する現象の後には、卵殻内に海水を循環させながら発生・成長が進むことがわかってきた。このような半年間において、トラザメの発生・成長がどのように進むのか、特に消化管の機能に注目して研究を進めることで、消化吸收機能をターゲットとしたノックダウンが可能になるのではないかと考えた。消化管内にVMを直接投与できることに加え、消化吸収に関わるタンパク質の発現をターゲットにすることで、体内の栄養素を指標に、VMの効果を検証した。

まず、発生段階を追って消化管の形態を調べたところ、受精後約1ヶ月のステージ23では腸管は直管であり、その中に卵黄は存在しなかった。その後ステージ24から消化管が回旋していく様子が観察された。発生の進行とともに回旋数は増え、プレハッチ直前のステージ31Eでは成魚と同様の7回の回旋が認められた。しかし回旋数の増加とは関係なく、プレハッチ前に消化管内に卵黄が認められることはなく、消化吸收機能を獲得していないことが明らかとなった。一方で、プレハッチ後のステージ32の個体では、全てで消化管内に卵黄が存在したため、卵黄が

消化管内に入るタイミングを詳細に観察したところ、プレハッチから 48 時間以内に卵黄が消化管内に入ること、プレハッチまでは外部卵黄嚢と胚体をつなぐ卵黄柄内に卵黄の侵入をおさえるための膜状構造が存在すること、プレハッチ後すぐにこの膜状構造が消失して卵黄が胚体の消化管内に進入することがわかった。さらに、ステージごとの発現解析により、プレハッチ以降、消化管上皮細胞表面の微絨毛が発達し、ペプチド輸送体 (PepT1) やアミノ酸輸送体 (Slc6a19) の発現が発生の進行とともに上昇することもわかった。PepT1 の発現は孵化前のステージ 34 では前方に偏った発現を示し、このことは孵化後の幼魚とも一致していた。以上のことから、これまでは呼吸促進などのために卵殻の一部が開放するのだと考えられてきた「プレハッチ」という現象であったが、このプレハッチを境に胚体の消化吸収機能が働き始めるなど、プレハッチこそが軟骨魚にとっての「孵化」であり、その後は安全な卵殻内においてさらに発生と成長を進め、ほぼ卵黄を吸収し終わった段階でからから出てくるという説を提唱した (Honda et al., 2020)。

では、プレハッチ前はどのように栄養を吸収しているのだろうか？真骨魚類などでは、卵黄を包む卵黄嚢上皮が消化吸収に関わる。上記のプレハッチという現象を考えると、プレハッチ前は卵黄嚢上皮が消化吸収機能を担い、プレハッチ後は胚体の消化管がその役割を担うようになるかと予想した。胚体の消化管ならびに卵黄嚢上皮の RNAseq 解析から消化吸収機能を担う分子群を網羅的に調べたところ、予想と反し、卵黄嚢上皮においても多くの分子群はプレハッチ後に発現が上昇することがわかった。すなわち、プレハッチ前は卵黄嚢上皮が消化吸収機能を担うことはたしかだが、その活動は活発ではない。プレハッチ後は胚体の消化管を機能させて効率的な消化吸収を進める一方で、卵黄嚢上皮の消化吸収機能も向上させ、胚体を大きく成長させると考えられた。実際、プレハッチ前の成長率と比べ、プレハッチ後の成長は著しく、このことが胚体を大きく成長させるメカニズムであることが示唆された (Honda et al., 2022)。以上の成果は、とくに研究所の「リサーチトピックス」として紹介されている。

プレハッチ後には胚体の消化管が機能的になることがわかったため、発現が大きく上昇する PepT1 遺伝子をターゲットに VM を作製し、ステージ 32 のトラザメ胚の消化管内に投与した。VM の配列をエキソンとイントロンの境目に設計することでスプライシング異常を起こさせ、PepT1 遺伝子をノックダウンさせることを目指した。VM を投与した個体の腸で RT-PCR を行い、スプライシング異常によるバンドパターンの変化を検出することで VM が機能しているかどうかを調べたものの、バンドパターンの変化は見られなかった。投与方法、濃度、個体のステージ等複数検討したものの、いずれの条件でも VM が機能した証拠は得られなかった。軟骨魚類の体液には高濃度の尿素が含まれるなど、その組成は VM がこれまで用いられてきた哺乳類や真骨魚類のものとは異なるため、今後は溶液組成なども検討して実験を行う必要がある。

(2) エコー検査による産卵周期の非侵襲的把握と性ステロイドホルモン変動

研究の背景でも記述したとおり、軟骨魚類にとって逆遺伝学的解析が困難な最大の理由は、受精直後の卵を採取することが極めて難しいことにある。現時点では、生殖周期自体を外見的に同定することも不可能であり、受精のタイミングを知ることもできない。ましてや、その時に、さまざまな生殖関連現象がホルモンによってどのように調節されているのかもわかっていない。そこで、訪問診療などで使用されているポータブル超音波画像診断装置(ポケットエコーMiruco)を導入したところ、輸卵管内に存在する、殻に包まれた受精卵が明確に観察できた。このことを、多数のトラザメに対して毎日継続したところ、繰り返し起こる産卵周期を非侵襲的に同定することに世界で初めて成功した(図1)。トラザメは他の軟骨魚類と同様、夜間に活動が活発となるため、日中は水槽の底部でじっとしていることが多い。また、エコー検査においては、トラザメに密着させるのではなく、数センチ離れた状態の方が明瞭に観察できることがわかり、麻酔をかけたりサメを保持したりすることなくエコー検査ができる。すなわち、対象生物に対してほぼ完全にストレスを与えることなく産卵周期を把握できる。さらに、複数のトラザメを半年以上という長期間にわたって継続検査した結果、その生殖周期は個体間、さらには同一個体内でも周期間で変動が激しいことがわかり、エコー検査の有用性をよく表していた。

生殖周期を制御する内分泌メカニズムを明らかにするため、エコー検査と並行して 3 日に一度の採血を行い、血中の性ステロイドホルモンである Estradiol-17 β (E2)、Testosterone (T)、Progesterone (P4) を測定した。その結果、E2 には明確な周期的変動は見られなかったものの、卵殻が輸卵管内に見出される直前に血中 P4 レベルの一過的なサージならびに T レベルの低下が見られた(図1)。この現象は調べた全ての個体、全ての産卵周期で認められた。さらに、採血間隔を短縮して毎日行ったところ、卵殻に包まれた受精卵を検出する 2 日前に P4 が上昇すること、その直前に T レベルの低下が起こることがわかった。卵殻の形成開始ならびに排卵・受精は、輸卵管内に受精卵を発見する 1 日前には起こると考えられることから、P4 のサージは排卵・受精・卵殻形成の直前に起こること、P4 がこれらの現象に関わる可能性を示唆している。まだ予備的な段階ではあるが、P4 を人為的に投与することにより、卵殻腺に作用して卵殻形成の第一段階であるツル形成を引き起こすこと、卵殻内液の分泌など卵殻腺の複数の機能に関わることも見出している。精子の保存・放出・活性化も卵殻腺の機能の一部であり、P4 等のホルモンによる作用があるのかどうかを検討している。これまでのところ、排卵を引き起こすことはできていないが、これについては脳下垂体の生殖腺刺激ホルモンが必要だと考えており、すでに受容体の発現と受容体に対する脳下垂体抽出物の検討も進めている。

以上の結果から、人為的な排卵ならびに受精を引き起こすための重要な情報を得ることがで

きた。今後この研究を進めていくことで、受精直後の卵を人為的に得るといった、遺伝子改変動物を得るための基盤技術開発への第一歩を踏み出せたと考えている。

(3) トラザメ培養細胞ならびに生体への遺伝子導入方法の検討

遺伝子導入方法の検討においては、まず初代培養細胞を用いて様々な手法を検討し、その後初代培養細胞において効果的だった方法を生体に試みるという、二段階で行った。

トラザメ胚初代培養細胞における遺伝子導入

初代培養細胞は、ステージ 29-31E までの胚を用いて樹立した。このステージはプレハッチより前であり（研究成果 1 を参照）、外界の海水にさらされていない状態であるため、海洋微生物などの混入リスクを最小限に押さえられると考えた。実際、プレハッチ前の胚を卵殻から出して海水環境に暴露すると生存できない、とされている。コラゲナーゼを含むサメリンガー液で処理し、細胞懸濁液を洗浄後、ゼラチンコートした培養プレートにサメ体液に合わせた L15 培養液で 3-4 日間培養することで、遺伝子導入に適した初代培養細胞を樹立することに成功した。プレートに播種してすぐは多数の細胞塊として存在していたが、培養開始から 24 時間以内に単層の状態に広がった。培養細胞には異種の細胞が混在しており、最も多かったものは細長い線維芽細胞様のもの、ならびに多角形の上皮細胞様の細胞であった。培養細胞は少なくとも 28 日間維持することができたが、培養開始から 19 日ほど経過すると、細胞質や核が肥大化し、核の周囲に液胞が見られるようになるなど、老化細胞に類似した特徴が現れ始めた。そこで、実験は播種後 3-4 日目の細胞を用いることとした。

遺伝子導入には、GFP 遺伝子をコピキタスなプロモーターである CMV プロモーターにつなげたコンストラクトである pEGFP-N1 vector (Takara Bio USA) を用いた。GFP の蛍光を細胞自体が示す自家蛍光と区別することは難しいが、無処理の細胞においては 0.018% という極めて少数の細胞のみが自家蛍光を示した一方で、後述するように遺伝子導入した細胞では 0.5% 以上の細胞が蛍光を示したことから、トラザメ初代培養細胞においては自家蛍光は問題にならないことがわかった。遺伝子導入方法として試みたのは、リポフェクション（リポフェクタミン）、ポリエチレンイミン、アデノウィルス、バキュロウィルス、エレクトロポレーションの 5 つの方法である。これらの方法の中ではリポフェクションが最も導入効率が高く、2 日目から蛍光が観察されるようになり、7 日後には 4.7% の細胞で蛍光が観察された。バキュロウィルスに感染させた細胞では、4 日後に最初の蛍光が観察され、7 日後には 2.0% の細胞で GFP の蛍光が観察された。エレクトロポレーションでは 9 日目に最も多くの細胞で蛍光が観察され、0.7% の細胞が蛍光を示した。一方で、ポリエチレンイミンならびにアデノウィルス処理では GFP の蛍光を観察することはできなかった。

トラザメ初代培養細胞において遺伝子導入に成功した 3 つの手法のうち、バキュロウィルス感染とエレクトロポレーションは哺乳類や真骨魚類において生体への遺伝子導入に用いられている。そこで、これら 2 つの手法について、さらに条件検討を行った。用いるバキュロウィルス量に依存して導入効率は高くなり、最も高い条件では 3.6% の細胞が蛍光を発した。エレクトロポレーションにおいては、パルスの強度、持続時間、回数を変化させたところ、0.2 kV の強度、50 マイクロ秒の持続時間で 2 回 (0.38%) あるいは 3 回 (0.38%) パルスを与えた条件が最もよかった。ただし、3 回パルスを与えた場合には、多くの細胞がプレートから剥がれてしまい、細胞にとってのダメージが大きいことがわかった。

トラザメ胚および成体組織における *in vivo* 遺伝子導入

以上のように確立した手法を用い、トラザメ胚の生体への遺伝子導入を試みた。この目的には、ステージ 31L-32 の胚を用いた。これらはプレハッチ後の個体であり、消化管による栄養吸収、鰓による呼吸、基本的な免疫系の確立など、個体として生存するための様々な生理機構を獲得している一方で（研究成果 1 参照）、その表皮は遺伝子導入に対して肥厚しすぎていない（発生後期では、いわゆる「サメ肌」になる）ことから、遺伝子導入に最適だと考えた。しかし、初代培養細胞での結果とは異なり、バキュロウィルスによる感染では、生体への遺伝子導入は確認できなかった。一方で、エレクトロポレーションによって、骨格筋細胞に蛍光が観察された（図 2）。このシグナルは GFP に対する免疫組織化学によっても確認され、インジェクションを行った側のみで確認されたことから、遺伝子導入が成功したことを示している。皮膚の表面にも斑点状の蛍光が観察されたが、これについては未処理の胚体でも観察されたこと、GFP に対する免疫組織化学では観察されないことから自家蛍光であることを確認した。脳に対してエレクトロポレーションを行った個体では、外套下部のニューロンに導入による GFP シグナルが認められた。エレクトロポレーションの強度と頻度を検討したところ、30 V を 8 回ならびに 50V の強度ではほとんどの個体が死亡してしまったのに対して、30V を 5 回あるいは 15V の条件では全ての個体が生存し、GFP のシグナルも検出された。投与するベクター量を 0.5-2 μg の間で変えた時には、全ての条件で GFP シグナルが検出され、導入効率にも違いはなかった。

さらに、トラザメ成熟オスの精巣に対してもエレクトロポレーションによる遺伝子導入を試みた。導入後 7 日目に確認したところ、精巣内に GFP シグナルが検出された。ただし、全てのシグナルは精巣の外部のみに検出された。これは、精巣の周囲には基底膜が存在し、間質へのインジェクションおよびエレクトロポレーションでは精巣内部にまで届かない可能性がある。軟骨魚類の場合、研究成果 2 に示したとおり受精直後の卵に遺伝子導入することには多くのハ-

ドルが存在する。もし精子に対して遺伝子改変を行うことができれば、遺伝子改変した精子をメスの輸卵管に人為的に注入し、卵殻腺内に保持させることができれば、自然状態での排卵あるいは研究成果 2 に示した人為的な排卵と精子の活性化により、遺伝子改変動物を作成できるのではないかと考えている。今後、精嚢内に遺伝子導入する手法の開発、あるいはアブラツノザメやシュモクザメなどで報告されているようにシストに包まれていない初期の精原細胞がトラザメにも存在すれば、精子への遺伝子導入も可能になる可能性がある (Fujimori et al., 2022)。今回は、検出しやすいように GFP 遺伝子を用いたが、将来的には Cas9-gRNA integrated vector を導入することで、CRISPR/Cas9 システムによる特定の遺伝子のノックアウトにもつながる重要な第一歩となったと考えている。

以上の通り、これまで全く行われてこなかった軟骨魚類における遺伝子改変を目的とし、本研究によりそのための基盤となる排卵から受精、その後の発生にいたる現象と内分泌制御機構を明らかにした。そして初期胚から初代培養細胞を樹立し、エレクトロポレーションやウイルス感染など複数の手法による培養細胞への遺伝子導入を検討し、発生中期の胚体への遺伝子導入に成功した。さらには、成魚の精巢への遺伝子導入も試み、生殖細胞への導入は確認されなかったものの、将来的な逆遺伝学的アプローチに向けて第一歩を踏み出すことができた。まだ乗り越えなければならないハードルは多数あるものの、軟骨魚類の生理・形態・発生・遺伝など様々な分野において、器官形成や恒常性、適応、生殖などさまざまな現象の解明のための萌芽研究を進めることができた。今後は、本研究で確立した手法を用い、器官培養などを通して遺伝子発現制御、生殖系列への遺伝子導入・改変につなげていく。

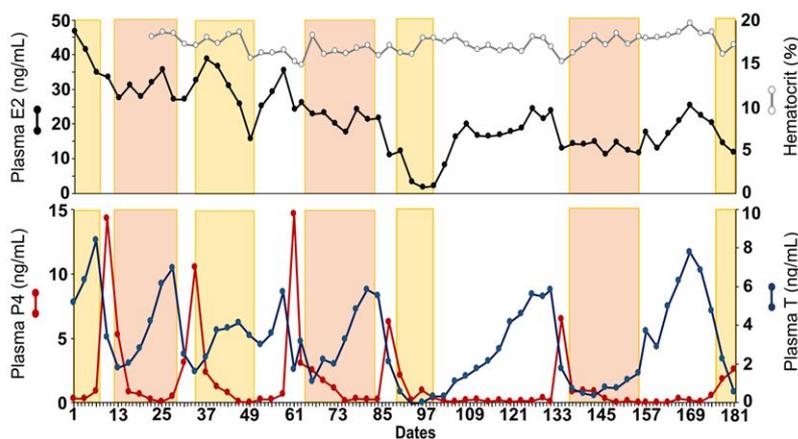


図 1：トラザメの生殖周期における性ステロイドホルモンの変動。黄色とピンクの四角は、輸卵管内に卵殻に包まれた受精卵を持つことを示す。

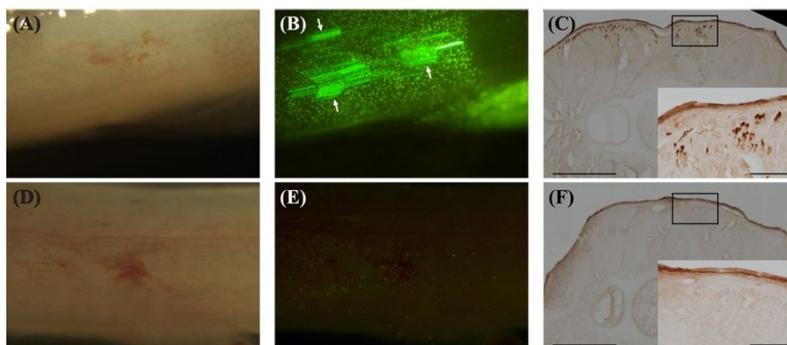


図 2：トラザメ胚への遺伝子導入。エレクトロポレーションによる。骨格筋に GFP 遺伝子が導入されたことを示している。

< 引用文献 >

- Fujimori C et al. bioRxiv, doi:10.1101/2022.05.16.491766, 2022.
 Hara Y et al. Nature Ecol Evol, 2, 1761-1771, 2018.
 Honda Y et al. J Exp Biol, 220, jeb225557, 2020.
 Honda Y et al. PLOS ONE, 17, e0265428, 2022.
 Hyodo S et al. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 307, R1381-R1395, 2014.
 Imaseki I et al. J Exp Biol, 222, jeb201780, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Honda Yuki, Ogawa Nobuhiro, Wong Marty Kwok-Shing, Tokunaga Kotaro, Kuraku Shigehiro, Hyodo Susumu, Takagi Wataru	4. 巻 17
2. 論文標題 Molecular mechanism of nutrient uptake in developing embryos of oviparous cloudy catshark (<i>Scyliorhinus torazame</i>)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0265428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0265428	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 -
1. 著者名 Takagi Wataru, Sugahara Fumiaki, Higuchi Shinnosuke, Kusakabe Rie, Pascual-Anaya Juan, Sato Iori, Oisi Yasuhiro, Ogawa Nobuhiro, Miyanishi Hiroshi, Adachi Noritaka, Hyodo Susumu, Kuratani Shigeru	4. 巻 20
2. 論文標題 Thyroid and endostyle development in cyclostomes provides new insights into the evolutionary history of vertebrates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-022-01282-7	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 該当する
1. 著者名 Nobata Shigenori, Sato Katsufumi, Houki Shouji, Ito Motohiro, Aoki Yoshinori, Kitagawa Takashi, Hyodo Susumu	4. 巻 100
2. 論文標題 Straightforward upriver migration to spawning sites by chum salmon <i>Oncorhynchus keta</i> homing to coastal short rivers in the Sanriku region	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Fish Biology	6. 最初と最後の頁 748 ~ 757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jfb.14990	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wong Marty Kwok Shing, Nobata Shigenori, Ito Shin ichi, Hyodo Susumu	4. 巻 4
2. 論文標題 Development of species specific multiplex real time PCR assays for tracing the small pelagic fishes of North Pacific with environmental DNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Environmental DNA	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) 10.1002/edn3.275	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 -

1. 著者名 Lin Xiaozhi, Takagi Wataru, Hyodo Susumu, Ijiri Shigeo, Katsu Yoshinao, Baker Michael E.	4. 巻 5
2. 論文標題 Regulation by Progestins, Corticosteroids, and RU486 of Transcriptional Activation of Elephant Shark and Human Progesterone Receptors: An Evolutionary Perspective	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Pharmacology & Translational Science	6. 最初と最後の頁 52 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acptscli.1c00191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nobata Shigenori, Houki Shouji, Kitagawa Takashi, Hyodo Susumu	4. 巻 69
2. 論文標題 Condition factor dependency of burst swimming ability between wild and hatchery-reared chum salmon fry (<i>Oncorhynchus keta</i>)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ichthyological Research	6. 最初と最後の頁 280 ~ 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10228-021-00838-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nobata Shigenori, Kitagawa Takashi, Houki Shouji, Ito Motohiro, Aoki Yoshinori, Sato Katsufumi, Hyodo Susumu	4. 巻 313
2. 論文標題 Relationships between maturational status and migration behavior of homing chum salmon <i>Oncorhynchus keta</i> in inner bays of the Sanriku coast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 113896 ~ 113896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2021.113896	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katsu Yoshinao, Shariful Islam M.D., Lin Xiaozhi, Takagi Wataru, Urushitani Hiroshi, Kohno Satomi, Hyodo Susumu, Baker Michael E.	4. 巻 210
2. 論文標題 N-terminal domain regulates steroid activation of elephant shark glucocorticoid and mineralocorticoid receptors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 105845 ~ 105845
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsbmb.2021.105845	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Iki Ayuko, Anderson W. Gary, Deck Courtney A., Ogiwara Mari H., Ikeba Kiriko, Kataoka Hiroshi, Hyodo Susumu	4. 巻 292
2. 論文標題 Measurement of 1 hydroxycorticosterone in the Japanese banded houndshark, <i>Triakis scyllium</i> , following exposure to a series of stressors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 113440 ~ 113440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2020.113440	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Aburatani Naotaka, Takagi Wataru, Wong Marty Kwok-Sing, Kadota Mitsutaka, Kuraku Shigehiro, Tokunaga Kotaro, Kofuji Kazuya, Saito Kazuhiro, Godo Waichiro, Sakamoto Tatsuya, Hyodo Susumu	4. 巻 37
2. 論文標題 Facilitated NaCl Uptake in the Highly Developed Bundle of the Nephron in Japanese Red Stingray <i>Hemirhamphysa akajei</i> Revealed by Comparative Anatomy and Molecular Mapping	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 458 ~ 466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs200038	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 -

1. 著者名 Honda Yuki, Takagi Wataru, Wong Marty K. S., Ogawa Nobuhiro, Tokunaga Kotaro, Kofuji Kazuya, Hyodo Susumu	4. 巻 223
2. 論文標題 Morphological and functional development of the spiral intestine in cloudy catshark (<i>Scyliorhinus torazame</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Biology	6. 最初と最後の頁 jeb225557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jeb.225557	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wong Marty Kwok-Shing, Nakao Mako, Hyodo Susumu	4. 巻 10
2. 論文標題 Field application of an improved protocol for environmental DNA extraction, purification, and measurement using Sterivex filter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-77304-7	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 -

1. 著者名 Park Chanhyun, Sakurai Yuki, Sato Hirofumi, Kanda Shinji, Iino Yuichi, Kunitomo Hirofumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Roles of the CIC chloride channel CLH-1 in food-associated salt chemotaxis behavior of <i>C. elegans</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e55701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.55701	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 -

1. 著者名 Royan Muhammad Rahmad, Kanda Shinji, Kayo Daichi, Song Weiyi, Ge Wei, Weltzien Finn-Arne, Fontaine Romain	4. 巻 166
2. 論文標題 Gonadectomy and Blood Sampling Procedures in the Small Size Teleost Model Japanese Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e62006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/62006	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 該当する

1. 著者名 Imaseki Itaru, Wakabayashi Midori, Hara Yuichiro, Watanabe Taro, Takabe Souichirou, Kakumura Keigo, Honda Yuki, Ueda Keiichi, Murakumo Kiyomi, Matsumoto Rui, Matsumoto Yosuke, Nakamura Masaru, Takagi Wataru, Kuraku Shigehiro, Hyodo Susumu	4. 巻 222
2. 論文標題 Comprehensive analysis of genes contributing to euryhalinity in the bull shark, <i>Carcharhinus leucas</i> ; Na ⁺ -Cl ⁻ co-transporter is one of the key renal factors upregulated in acclimation to low-salinity environment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Experimental Biology	6. 最初と最後の頁 jeb201780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jeb.201780	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katsu Yoshinao, Kohno Satomi, Oka Kaori, Lin Xiaozhi, Otake Sumika, Pillai Nisha E., Takagi Wataru, Hyodo Susumu, Venkatesh Byrappa, Baker Michael E.	4. 巻 12
2. 論文標題 Transcriptional activation of elephant shark mineralocorticoid receptor by corticosteroids, progesterone, and spironolactone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaar2668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aar2668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 兵藤晋、今関到、柏原知実、若林翠、尾崎聡、高木互、松本瑠偉、佐藤圭一、原雄一郎、工樂樹洋、櫻井もも子、立原一憲
2. 発表標題 サメの繁殖制御研究:見えないものをどうみるか
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下山紘也、井上拓人、齋藤萌々子、有村省吾、小林牧人、徳永幸太郎、高木互、兵藤晋
2. 発表標題 トラザメにおいてプロゲステロンは卵殻の一部であるツルの形成を誘導する
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川野真依、齋藤萌々子、有村省吾、下山紘也、徳永幸太郎、高木互、黄國成、兵藤晋
2. 発表標題 トラザメの卵胞における性ステロイドホルモン合成の変動
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有村省吾、齋藤萌々子、下山紘也、徳永幸太郎、高木互、兵藤晋
2. 発表標題 トラザメの卵胞発育に伴う生殖腺刺激ホルモン受容体の発現動態と機能解析
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本田祐基、高木互、小川展弘、徳永幸太郎、小藤一弥、工樂樹洋、兵藤晋
2. 発表標題 トラザメ胚における消化吸収機構の発達
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会(招待講演)(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 油谷直孝、高木互、工樂樹洋、齋藤和裕、牛堂和一郎、坂本竜哉、兵藤晋
2. 発表標題 アカエイ腎臓における淡水適応の分子メカニズム
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下山紘也、井上拓人、齋藤萌々子、有村省吾、小林牧人、徳永幸太郎、高木互、兵藤晋
2. 発表標題 トラザメ産卵周期におけるプロゲステロンの役割
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 兵藤晋、井上拓人、下山紘也、川野真依、齋藤萌々子、徳永幸太郎、野津了、村雲清美、松本瑠偉、佐藤圭一
2. 発表標題 エコー検査を活用したトラザメ産卵周期の非侵襲的同定と性ステロイドホルモンの変動
3. 学会等名 板鰐類シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 油谷直孝、兵藤晋、高木互
2. 発表標題 軟骨魚類の中でもユニークなエイ類の腎ネフロン：尿の組成と形態的特徴から考察する機能
3. 学会等名 第30回バソプレシン研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下山紘也、井上拓人、齋藤萌々子、有村省吾、小林牧人、徳永幸太郎、高木互、兵藤晋
2. 発表標題 エコー検査を用いたトラザメ(Scyliorhinus torazame)の産卵周期における性ステロイドホルモンの役割の研究
3. 学会等名 日本動物学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 有村省吾、下山紘也、齋藤萌々子、徳永幸太郎、高木互、兵藤晋
2. 発表標題 トラザメにおける生殖腺刺激ホルモン受容体の解析
3. 学会等名 日本動物学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本田祐基、高木互、徳永幸太郎、小藤一弥、工樂樹洋、兵藤晋
2. 発表標題 トラザメ胚発生における卵黄囊上皮ならびに消化管での栄養吸収輸送体の発現解析
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上拓人、齊藤萌々子、高木互、村雲清美、佐藤圭一、徳永幸太郎、小藤一弥、兵藤晋
2. 発表標題 トラザメの産卵サイクルの制御メカニズム：エコー検査と血中ステロイドホルモンの測定
3. 学会等名 第4回軟骨魚類研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上拓人、池羽希理子、徳永幸太郎、小藤一弥、高木互、兵藤晋
2. 発表標題 エコー検査を活用したトラザメの産卵周期と性ステロイドホルモン変動
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上拓人、齊藤萌々子、池羽希理子、高木互、村雲清美、佐藤圭一、徳永幸太郎、小藤一弥、兵藤晋
2. 発表標題 エコー検査を活用したトラザメの産卵周期同定と血中性ステロイドホルモンの変動
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学大気海洋研究所生理学分野 http://physiol.aori.u-tokyo.ac.jp/seiri/index.html 東京大学大気海洋研究所生理学分野 http://physiol.aori.u-tokyo.ac.jp/seiri/</p>

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	神田 真司 (KANDA SHINJI) (50634284)	東京大学・大気海洋研究所・准教授 (12601)	
研究分担者	高木 互 (TAKAGI WATARU) (90755307)	東京大学・大気海洋研究所・助教 (12601)	
研究分担者	藤森 千加 (FUJIMORI CHIKA) (50750775)	東京大学・大気海洋研究所・特任研究員 (12601)	

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