

自己評価報告書

平成23年4月12日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：20～23

課題番号：20380122

研究課題名 (和文) 雌性生殖細胞標識魚を用いた性分化影響因子の探索

研究課題名 (英文) Screening of sex differentiation factors
using female-gamete labeled fish

研究代表者

木下 政人 (KINOSHITA MASATO)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：60263125

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：遺伝子導入、生殖細胞、性決定、*vasa*、*42Sp50*、GFP

1. 研究計画の概要

本研究では、「迅速（発生の初期段階）に性を判断できる」遺伝子導入魚を作出し、遺伝的要因で性が決定されない（環境要因により性が決定される）魚種の性決定メカニズムを解明することを目的とする。具体的には、雌型生殖細胞が蛍光タンパク質で標識された遺伝子導入ホンモロコを作出し、卵発生／仔魚期に於ける、環境要因の性分化への影響を検討する。本方法では、雌への分化を雌型生殖細胞の出現としてとらえ、それらを分化初期の大変早期（メダカでは孵化後5日目ごろ）に、簡便（蛍光の観察）に検出する。

2. 研究の進捗状況

現在、メス型の生殖細胞を緑色蛍光タンパク質で標識化するために、ペプチド鎖伸長因子ファイミリーの一員である *42Sp50 promoter* に制御された緑色蛍光タンパク質遺伝子(GFP) (*42Sp50-GFP*) を受精卵にマイクロインジェクション法により導入したホンモロコが性成熟に至るまでに成長した。それらを野生型ホンモロコと交配し、F1世代を得、上記導入遺伝子を受け継いでいるかどうかをPCR法により検討した結果、複数のF1個体に、陽性のシグナルが確認された。現在、このF1世代の生殖細胞に緑色蛍光が観察されるか否かを蛍光顕微鏡を用いて検討している。加えて、このF1世代から得られたF2世代においてもPCR法により、挿入遺伝子の伝達を確認されたため、その発現を確認中である。

また、性分化の指標となる遺伝子のクローニングと発現様式を孵化後50日までの仔魚／幼魚あるいは成体の各組織を用いて検討した。その結果、これまでに、メダカ、ゼ

ブラフィッシュ、ティラピアなどで性分化の指標に有効であると報告されている多くの遺伝子 (*cyp19a*, *dmrt1*, *foxl2*) は、ホンモロコでは、仔魚期には、ほとんど全ての個体で発現しており、また、成体の精巣、卵巣のいずれに於いても発現が観察される等のことから、性分化の判別の指標としては有効でないことが明らかとなった。唯一 *42Sp50* のみが、メスへの分化が顕在化した、つまり、ある程度卵形成が進行した卵巣でのみ発現することが観察され、同遺伝子がメス分化を示すマーカー遺伝子として有用であることが示された。

3. 現在までの達成度

性分化を判別する遺伝子の解析では、予定通りに達成できている。また、ホンモロコに導入する人工遺伝子の構築も予定通りに完了している。

遺伝子導入ホンモロコの作出については、F1個体が得られていると考えられるが、F2世代がまだ、得られていないので達成率は、50%程度である。

(理由) ホンモロコでは、予想以上に顕微注入した遺伝子が生殖細胞に導入される効率が低く、予定通りに進行しなかった。

4. 今後の研究の推進方策

ホンモロコへの遺伝子導入操作を継続するとともに、F1世代の交配を行いF2世代の取得を試みる。また、これまでに雌への分化指標として *42Sp50* を確立したが、雄への分化指標となる分子の決定が出来ていない。そこで、MSP等の遺伝子クローニングと発現様式の検討を発生／発育段階に沿って行う。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計2件)

上山直城・芦田裕史・小林徹・村井直正・木下政人：ホンモロコ *vasa*, *42Sp50*, *CYP19a* 遺伝子クローニングと発現解析。平成21年度 日本水産学会 秋季大会

芦田裕史, 上山直城, 木下政人, 小林 徹: ホンモロコの性分化に関与する遺伝子, *Foxl 2*, *Dmrt 1* の単離と発現解析。平成23年度日本水産学会春季大会