

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 9日現在

機関番号：80122

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22780184

研究課題名（和文） 甲状腺ホルモン受容体遺伝子の発現量を健苗性評価に用いたワカサギ増殖技術の向上研究

研究課題名（英文） Evaluation of seed quality using transcript level of thyroid hormone receptors in aquaculture of Japanese smelt

研究代表者

水野 伸也（MIZUNO SHINYA）地方独立行政法人北海道立総合研究機構・さけます内水面水産試験場・研究主任

研究者番号：70442655

研究成果の概要（和文）：ワカサギ甲状腺ホルモン受容体(TR)3種のcDNAクローニングを行い、各々のmRNA発現量測定系を開発した。ワカサギ卵のTR mRNA発現量とその卵の孵化率の間には相関がみられ、TR遺伝子発現量がワカサギ卵の健苗性評価に有効であることがわかった。また、雌成熟魚への甲状腺ホルモン投与が孵化率向上に効果的だった。

研究成果の概要（英文）：In this study, 3 types of thyroid hormone receptor (TR) cDNA were isolated and quantitative system of each of the 3 types mRNA was developed in Japanese smelt. Positive relationship was found between embryo's TR transcript level and hatching rate. These results suggest that egg TR transcript level is a useful indicator to evaluate quality of embryos in Japanese smelt. In addition, it was considered that administration of thyroid hormone to ovulated female affected improvement of hatching rate of eggs in Japanese smelt.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：ワカサギ、甲状腺ホルモン受容体、健苗性

1. 研究開始当初の背景

ワカサギ孵化放流事業では、仔魚の大量斃死が起こる事例がみられていた。事業効率化のためには、放流前に胚の健苗性評価を行い、大量斃死を抑止する技術を開発しなければならない。過去の研究から、卵中の甲状腺ホルモンが魚類の初期発生に重要な役割を果たしており、同ホルモンは、TRと結合して、その作用を発現することが知られていた。これまでの研究から胚のTR mRNAの発現量と孵化後斃死率の間に相関

がある傍証を得ていた。

2. 研究の目的

TR遺伝子発現量を指標としたワカサギ胚の健苗性評価技術及び仔魚の生残率向上技術の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) TRcDNAのクローニング

孵化直前のワカサギ胚から抽出したmRNAを逆転写しcDNAを合成する。これ

を鋳型として既知の数種の魚類で明らかになっている TR α 及び β の塩基配列を基に設計したプライマーを用いて PCR を行い、 α 及び β の特異的 cDNA 断片を得る。この断片と RACE 法を活用し完全長の TR cDNA のクローニングを行う。

(2) TR mRNA測定系の開発

リアルタイムPCR法を用いたTR mRNA測定系を開発する。1.でクローニングされたTRの塩基配列を比較し、 α 及び β のサブタイプ及びそれらサブタイプにみられるアイソフォームを区別してmRNAを測定できるようにする。

(3) 胚の健苗性評価技術の開発

飼育実験を通して、水温変化及び発生段階の影響を受けにくいTR mRNAのサブタイプ及びアイソフォームを特定し、このTRを健苗性指標とする。孵化場で飼育されている胚の評価も合わせて行う。

(4) 仔魚の生残率向上技術の開発

親魚に甲状腺ホルモンを投与して、仔魚の生残率向上を図る。適正投与量、投与期間を明らかにする。

4. 研究成果

(1) TR α A、TR α B、TR β の合計3つのTR cDNAをクローニングした。

(2) TR α A、TR α B、TR β それぞれのmRNA発現量測定系を開発した

(3) 3種のTRのうちTR α BのmRNA発現量が最も孵化率と相関が強かった(図1)。TR α B mRNA発現量については、8°C~16°Cの間では影響がみられず、胚発生に伴い

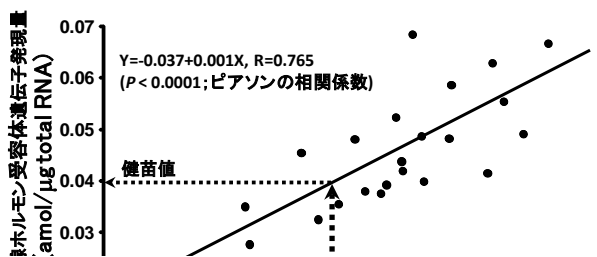


図1. ワカサギ卵の孵化率と甲状腺ホルモン受容体遺伝子発現量の関係

有意に増加した(図2)。健苗性評価を積算水温170°Cの発眼卵で、推定孵化率70%を下限として行うと、TR α B mRNA発現量の健苗値は約0.04 amol/ μ g total RNAとなった(図1)。この健苗値を用いて9群の孵化場産発眼卵の評価を行ったところ、9群のうち6群で健苗性が良好と推察された(表1)。

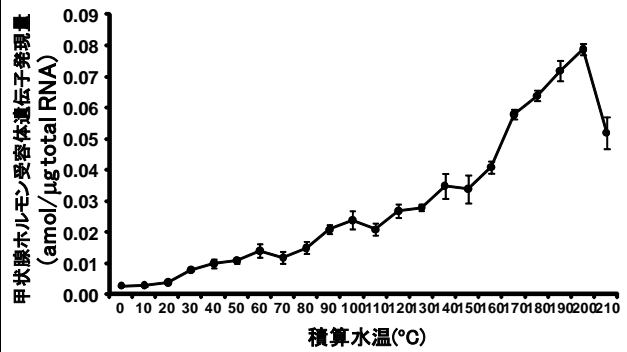


図2. 胚発生に伴う甲状腺ホルモン受容体遺伝子の発現変化

(4) 雌成熟魚に1 μ g/g体重のトリヨード

表1. 北海道各地の孵化場で飼育されている卵の孵化率と甲状腺ホルモン受容体遺伝子の発現量

受精日	採卵場所	収容場所	採集日	孵化率(%)	平均甲状腺ホルモン受容体遺伝子発現量 (amol/ μ g total RNA)
4/13	A	D	4/30	87.6	0.076 \pm 0.009
4/14	B	B	5/1	75.6	0.063 \pm 0.008
4/15	B	B	5/2	78.4	0.045 \pm 0.009
4/18	C	E	5/7	45.1	0.014 \pm 0.001
4/18	A	A	5/7	72.2	0.076 \pm 0.009
4/18	A	F	5/8	57.9	0.039 \pm 0.006
4/19	A	G	5/10	57.4	0.034 \pm 0.002
4/19	A	A	5/9	97.3	0.069 \pm 0.007
4/24	A	H	5/13	69.7	0.037 \pm 0.004

サイロニン(1回投与すると、約10%孵化率が向上した)。

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)

[学会発表] (計6件)

1) 水野伸也・川上優・畑山誠・小出展久・上田宏「ワカサギ甲状腺ホルモン受容体cDNAのクローニング」平成23年度日本水産学会春季大会講演要旨集、p214.

2) 水野伸也・川上優・畑山誠・小出展久・上田宏「ワカサギ胚発生に伴う甲状腺ホルモン受容体遺伝子の発現変化」平成23年度日本水産学会春季大会講演要旨集、p214.

3) 水野伸也・川上優・寺西哲夫・小出展久・上田宏「卵の粘性除去、孵化率、胚及び孵化仔魚の健苗性に与えるワカサギ卵への緑茶抽出物溶液処理の効果」平成23年度日本水産学会秋季大会講演要旨集、p126.

4) 水野伸也「サケ科及びキュウリウオ科魚類の種苗生産技術向上に関する研究」第10回日本農学進歩賞受賞者講演要旨集、p43-46.

5) 水野伸也・畑山誠・真野修一・隼野寛史・小出展久・川尻敏文・佐々木昇・川上優・上田宏「生理学的手法を用いたワカサギ発眼卵の健苗性評価」第16回ワカサギに学ぶ会講演要旨集、p15.

6) 水野伸也・畑山誠・真野修一・隼野寛史・小出展久・川尻敏文・佐々木昇・川上優・上田宏「甲状腺ホルモン受容体遺伝子の発現量を指標としたワカサギ胚の健苗性評価」平成24年度日本水産学会春季大会講演要旨集、p181.

6. 研究組織

(1)研究代表者

水野 伸也 (MIZUNO SHINYA)

地方独立行政法人北海道立総合研究機構・さけます内水面水産試験場・研究主任

研究者番号：70442655