

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450294

研究課題名(和文) クロマグロの初回成熟過程における卵巣の分子ダイナミクス

研究課題名(英文) Age-related changes in ovarian gene expression in Pacific bluefin tuna

研究代表者

玄 浩一郎 (GEN, KOICHIRO)

国立研究開発法人水産総合研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：80372051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：クロマグロ初回産卵魚の成熟特性を明らかにする端緒として、卵巣における成熟誘導遺伝子群の体系的な収集、ならびに初回産卵魚と経産卵魚による比較解析を行った。その結果、卵巣から単離した成熟誘導遺伝子のうち特定の成熟誘導遺伝子の発現が、初回産卵魚と経産卵魚間で異なることが明らかとなった。これらは、本種初回産卵魚を用いた低コスト・省スペースによる採卵技術を開発する上で重要な知見になるもの考えられる。

研究成果の概要(英文)：An understanding of the mechanism underlying puberty is important for establishment of tuna farming. In this study, we aim to characterize reproductive-related genes in Pacific bluefin tuna and to examine changes in their expression levels during the pubertal to adulthood period in ovary. Using standard cloning technique, we have obtained 50 candidate genes for reproductive traits in bluefin tuna ovary. Comparative analysis of gene expression revealed that transcripts encoding steroid hormone synthase and receptors (PR, AR) of pubertal female were significantly higher than that of adult female. In contrast, adult fish showed significantly higher levels of ovary ARID and CREB mRNA and circulating estrogens. These results suggested that age-related changes in reproductive-related genes expression may result from alterations in ovarian development characteristics and serum estrogens in pubertal female.

研究分野：魚類繁殖生理学

キーワード：クロマグロ 初回成熟 成熟誘導遺伝子 卵巣 繁殖生理 水産増養殖

## 1. 研究開始当初の背景

クロマグロ養殖では、養殖種苗のほとんどを天然資源に依存しているため、種苗の確保が不安定であり、かつ資源への影響が懸念されている。このためクロマグロの完全養殖技術の確立と普及が喫緊の課題となっている。しかし、現状では種苗のもととなる卵の生産がボトルネックとなっており、本技術の確立には至っていない。すなわち、クロマグロは養殖飼育下では平均で5歳(体重150kg以上)から成熟・産卵するため(Masuma et al. *Rev Fish Sci.* 2008)、卵を得るまでに膨大な時間・コストならびに親魚養成のための大規模な施設を必要とする。そこで種苗生産現場では、少なくとも天然魚と同じ3歳まで親魚の成熟開始年齢を短縮し、受精卵を効率的に生産する技術の開発が強く望まれている。この技術開発には本種の成熟機構を明らかにし、それを利用することが有効であると考えられる。しかし、クロマグロでは成熟誘導に関わる因子のみならず初回産卵魚における成熟特性についても不明な部分が多い。申請者らは、これまでに養殖クロマグロの初回産卵年齢を明らかにするためにフィールド調査を行ってきた。その結果、①本種は好適条件下で飼育することで、天然同様3歳魚から成熟・産卵すること、②成熟の進行には水温等の外部環境要因が密接に関連していることが明らかとなった。また、経産卵魚(4歳ならびに5歳魚)との比較から、初回産卵魚である3歳魚では卵巣の発達度合いが悪いうえ、得られた卵の質も劣ることがわかってきた。このような初回産卵魚における卵質の低下は、古くから多くの魚種で観察されているが、その詳細なメカニズムについては不明な部分が多い。一般に魚類の成熟は、視床下部-脳下垂体-生殖腺系の内分泌機構によって調節されており、申請者らのこれまでの研究等から成熟の開始ならびに進行には複数の成熟誘導因子が密接に関与していることが明らかになっている(Gen et al. *Biol Reprod.* 2000; Gen et al. *Fish Physiol Biochem.* 2003)。特に、卵巣で生成される性ステロイドは、卵のもととなる卵母細胞に直接作用することから性ステロイドとその合成酵素は、卵巣の発達や卵形成に必要な不可欠な成熟誘導因子として考えられている(Kazeto et al. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011)。しかし、クロマグロでは成熟誘導に関わる因子のみならず初回産卵魚における成熟誘導遺伝子の発現特性についてはほとんどわかっていない。

## 2. 研究の目的

クロマグロ養殖では、初回産卵魚を用いた低コスト・省スペースによる採卵技術の開発が強く望まれている。しかし、経産卵魚と比較して、初回産卵魚では卵巣の発達度合いが低くかつ卵の質も劣ることがこれまでの申請者らのフィールド調査から明らかとなっている。そこで本研究では、クロマグロの卵巣で

発現する成熟誘導因子群に着目し、初回産卵魚と経産卵魚の卵巣における遺伝子発現等を比較解析することで、「経産卵魚と比較して、初回産卵魚ではどのような成熟誘導遺伝子に発現等の違いがあり、結果として卵巣の発達度合いや得られた卵の質が悪いのか?」といった初回産卵魚における成熟特性を明らかにすることを目的としている。

具体的には以下の項目に焦点を絞って研究を進める。(1)クロマグロ卵巣における成熟誘導遺伝子群の体系的な収集、(2)初回産卵魚ならびに経産卵魚の性成熟における繁殖特性の解明、(3)初回産卵魚ならびに経産卵魚における成熟誘導遺伝子の発現と上位ホルモンに対する応答性の解明

## 3. 研究の方法

### (1) クロマグロ卵巣における成熟誘導遺伝子群の体系的な収集

これまで魚類を含む脊椎動物全般で卵形成に関与する成熟誘導因子群(ステロイド合成酵素、ステロイド受容体、生殖腺ホルモン受容体等)が明らかとなっている。そこで、既知の遺伝子情報を利用することで、クロマグロ卵巣から成熟誘導因子群をコードする遺伝子を体系的に収集する。併せて、現在、水産総合研究センター中央水産研究所水産遺伝子解析センターでは、クロマグロの全ゲノム解析を行っており、得られた情報を適宜利用することで魚類ではまだ未同定な成熟誘導遺伝子の単離も試みる。また、単離・同定した当該遺伝子群は、リアルタイムPCR等による定量系を開発することで、以下の実験に供する。

### (2) 初回産卵魚ならびに経産卵魚の性成熟における繁殖特性の解明

奄美大島で飼育された3歳魚(初回産卵魚)ならびに4歳魚(経産卵魚)を経時的にサンプリングし、卵巣の組織学的観察を行うことで、両者の群成熟率を調査する。併せて、成熟に伴う雌性ホルモンの血中動態を解析することで、初回産卵魚の繁殖特性を明らかにする。

### (3) 初回産卵魚ならびに経産卵魚における成熟誘導遺伝子の発現と上位ホルモンに対する応答性の解明

奄美大島で飼育された3歳魚(初回産卵魚)ならびに4歳魚(経産卵魚)の卵巣を用いて、成熟誘導遺伝子群の発現動態を明らかにする。また、一般に成熟誘導遺伝子群は、脳下垂体で合成される上位ホルモン(生殖腺刺激ホルモン:GTH)によって制御されていることから、クロマグロの卵巣の生体外培養系を用いて成熟誘導遺伝子のGTHに対する応答性についても解析を行う。さらに得られた知見、すなわち初回成熟魚ならびに成魚卵巣における遺伝子発現等を多角的に比較解析することで、養殖クロマグロの初回産卵魚における成熟特性を明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) クロマグロ卵巣における成熟誘導遺伝子群の体系的な収集

既知の遺伝子情報を用いることで、クロマグロ卵巣から成熟誘導因子をコードする以下の遺伝子、約 50 種類の構造を明らかにした。

- ① ホルモン産生に関わる遺伝子 (StAR、CYP11a1、CYP17a1 3βHSD、17βHSD1 等)
- ② ホルモンの受容に関わる遺伝子 (濾胞刺激ホルモン受容体、黄体形成ホルモン受容体、アクチビン受容体 II 型、雄性ホルモン受容体、IGF-1 受容体等)
- ③ 生殖腺の分化・発達に関わる遺伝子 (SF1、Sox9、DAZ1、Foxl2、GSDFI 等)

また、クロマグロの全ゲノム情報を利用することで、魚類で不明な部分が多かった成熟誘導因子 (Wilms tumor suppressor 1a 等) の遺伝子構造が明らかとなった (図 1)。

```

MGSDVRDLNLSLLPPLPAGFSGPCALPVSTAPQWAPVLDFTHTAASPYSSLLTAPHTSLGPH 60
SFIKQEPFSGWSTGDPHHHTDTPHCGLSAFTVHFSGQFTGTGACRYGAFGAPPPPPAPPSQ 120
PFSVTXPHHHQPTSRMFSNPTYLTCNMDTQQAARNQGYSTVAFDGAGNYGHTPTHSSQ 180
FSNHSFKHEDALTQQSTMAEQYVFPVFPVYCHTSPDCTCTGSAQLLRNPNYNSHTAGYDS 240
DPSTFMLYSCSTQYRIHTHGFRGIQDVRVPSIAPAIVRSESEKRPFMCAYPGCKRY 300
FKLSHLQMHRSRKHTEKPYQCEFADCGRRFSXXXQLKRHRQRHTGVKPFCECTCQRKFSR 360
SDHLKTHTRHTGTSEKPFNCRWPCQKFKFARSDELVRHNMHQRLNLTQLQLA 415
  
```

図 1. クロマグロの Wilms tumor suppressor 1a の推定アミノ酸配列

(2) 初回産卵魚ならびに経産卵魚の性成熟における繁殖特性の解明

奄美大島で養殖された初回産卵魚 (3 歳魚) ならびに経産卵魚 (4 歳魚) を用いて、卵巣の発達過程を組織学的手法によって解析した。いずれの年齢群においても、卵巣発達の指標となる生殖腺体指数 (GSI) は 4 月上旬から増加傾向を示し、産卵盛期には高値を示す個体が出現し、産卵終了後には低い値になった。さらに、卵巣内の最も発達した卵群のステージをみると、経産卵魚で 4 月上旬ならびに産卵盛期月上旬では全ての個体が卵黄球期の卵母細胞をもつ個体、すなわち成熟個体であった (図 2)。他方、初回産卵魚では、産卵最盛

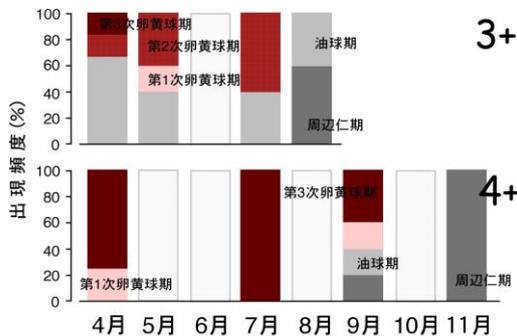


図 2. クロマグロの初回産卵魚 (3 歳魚) ならびに経産卵魚 (4 歳魚) における成熟に伴う各種卵母細胞の出現頻度  
3+ は 3 歳魚、4+ は 4 歳魚を示す。

期の 7 月上旬においても約 60% の雌個体しか成熟が観察されなかった。

主要な雌性ホルモンである estradiol-17β の血中量は、初回産卵魚ならびに経産卵魚 いずれにおいても 4 月から高値を示し、産卵終了後に低値に推移した。大変興味深いことに、初回産卵魚と経産卵魚の間では、産卵期の GSI に有意な差は見られなかったものの、雌性ホルモン estradiol-17β (E2)、estrone (E1) ならびに estriol (E3) のいずれの血中量も経産卵魚が初回産卵魚と比べて有意に高いことが明らかとなった (図 3)。

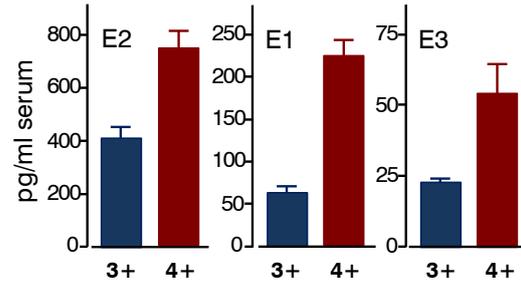


図 3. クロマグロの初回産卵魚 (3 歳魚) ならびに経産卵魚 (4 歳魚) における各種卵母細胞の出現頻度  
3+ は 3 歳魚、4+ は 4 歳魚を示す。

(3) 初回産卵魚ならびに経産卵魚における成熟誘導遺伝子の発現と上位ホルモンに対する応答性の解明

本研究で単離した成熟誘導遺伝子を用いて、初回産卵魚と経産卵魚で発現量の比較解析を行った。その結果、初回産卵魚では経産卵魚と比べて、ステロイドホルモンの受容に関わるプロゲステロン受容体 (PR) や雄性ホルモン受容体 (AR)、上位ホルモン (GTH) の合成・分泌に関わるフォリスタチン関連タンパク質ならびに特定のステロイドホルモン合成に関わる酵素等を遺伝子の発現が有意に高いことが明らかとなった (図 4)。

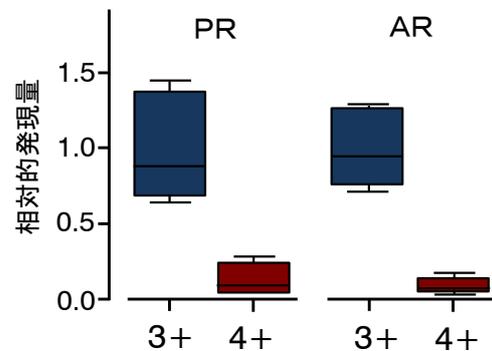


図 4. 経産卵魚と比較して、初回産卵魚で発現量が高い成熟誘導遺伝子  
3+ は初回産卵魚 (3 歳魚)、4+ は経産卵魚 (4 歳魚)、PR はプロゲステロン受容体 AR は雄性ホルモン受容体を示す。

また、初回産卵魚の産卵期の卵巢を用いた初代培養実験の結果、有意な変化が見られなかったものの、それらの一部の遺伝子が上位ホルモン(GTH)によって減少する傾向にあることがわかった。他方、初回産卵魚と比較して経産卵魚では、特定の転写調節因子(ARID、CREB)や低比重リポタンパク質受容体等をコードする遺伝子の発現量が高いことが明らかとなった(図5)。

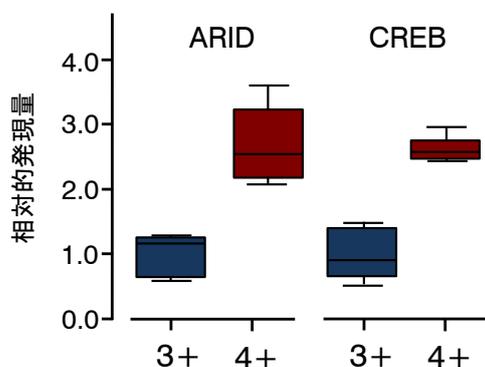


図5. 経産卵魚と比較して、初回産卵魚で発現量が低い成熟誘導遺伝子  
3+は初回産卵魚(3歳魚)、4+は経産卵魚(4歳魚)、ARID、CREBは転写調節因を示す。

以上より、経産卵魚との比較解析によって、クロマグロの初回産卵魚では卵巢における特定の成熟誘導遺伝子の発現が大きく異なることが明らかとなった。また、それら遺伝子の多くがステロイドホルモンの産生や受容に密接に関連していることを考え併せると、初回産卵魚では当該遺伝子の差異によって雌性ホルモンの合成・受容不全、ひいては卵巢の発達度合いが悪い等の成熟不全が起こっている可能性が示唆された。これらは、クロマグロの初回産卵魚を用いた低コスト・省スペースによる採卵技術を開発する上で重要な基礎的知見になるものと考えられる。

## 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 2 件)

- ① Mekuchi, M., Yasuike, M., Ojima, N., Gen, K., Sugaya, T., Nikaido, H., Shimizu, S. Evaluation of seasonal variation in reproduction-related gene expression in the pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* using next-generation sequencing. International Plants and Animal Genomics Conference XXII, San Diego, USA, Jan. 13, 2014.
- ② 玄 浩一郎、馬久地 みゆき、風藤 行紀、二階堂 英城。平成 27 年度日本水産学会春季大会，東京，2015 年 3 月 30 日

[図書] (計 2 件)

- ① 松原 孝博、玄 浩一郎、澤口 小有美、持田 和彦、二階堂 英城、成山堂、成熟、クロマグロの資源と生物学、2014、p37-53.
- ② Gen, K. Physiology of Bluefin tuna reproduction: New insights into reproduction in wild and captive Bluefin tuna species, *Biology and Ecology of Bluefin Tuna*, 2015, p325-354.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

玄 浩一郎 (GEN Koichiro)

水産総合研究センター・西海区水産研究所・グループ長

研究者番号：80372051

### (2) 研究分担者

風藤 行紀 (KAZETO Yukinori)

水産総合研究センター・増養殖研究所・主任研究員

研究者番号：60399996

### (3) 研究分担者

馬久地 みゆき (MEKUCHI Miyuki)

水産総合研究センター・中央水産研究所・研究員

研究者番号：60399996