

平成29年度大学コンソーシアムとちぎ「大学を超えた共同研究支援事業」報告書

所属機関名	帝京大学
団体・グループ等名	
研究代表者名 (所属部署)	平澤孝枝 (帝京大学理工学部バイオサイエンス学科)
研究連携担当者名及び連絡先	有限会社 林屋川魚店
研究連携校名	栃木県立馬頭高等学校
関連自治体・経済団体等名	

1. 研究事業名	ニホンウナギ (<i>Anguilla japonica</i>) の新奇養殖技術を目指した遺伝子制御機構の解明
2. 実施年度	平成29年度
3. 研究成果等	<p>【目的】 新奇養殖技術の開発を目指すために本年度は、ニホンウナギ (<i>Anguilla japonica</i>) の発生メカニズムを雌雄差、成長速度の関連性、メカニズムを明らかにするために脳機能関連分子を中心にmRNA, タンパクレベルでの解析を行なうことを目的とする。</p> <p>【成果】 申請者は、ウナギの脳と生殖腺を用いて <i>cyp19a</i> (Cytochrome P450 Family19) という酵素の発現解析と <i>dmrt1</i> (doublesex and mab-3 related transcription factor 1) 遺伝子の発現を確認している。<i>cyp19a1</i>はアンドロゲンをエストロゲンに転換する雌性ホルモンの合成を行う酵素であるアロマターゼである。この遺伝子が活性化されると女性ホルモンが多く生成され雌化のきっかけになっている。一方で、<i>dmrt1</i>は転写因子であり、欠損すると精巣細胞が卵巣細胞に分化する遺伝子である。ウナギRNAより作製したcDNAをRT-PCR法にて発現を確認した。さらに、出荷サイズにまだ満たない18gの小さいウナギは<i>cyp19a1</i>の発現は認められなかった(図2)。<i>dmrt1</i>は精巣形成に重要な働きを持つ遺伝子であるが、この遺伝子の発現は脳では認められず、生殖腺では発現が確認されたが、小さいウナギからは発現は確認されなかった。更に、全てのDNAサンプルからこれら遺伝子の発現が確認されたことから養殖場のウナギのほとんどが雄であることは間違いないことが分かった。養殖場が出荷するサイズ(180g)では生殖腺が確認され、10匹中1匹の卵巣様の形態を有したウナギがある事を確認した(図2)。</p>

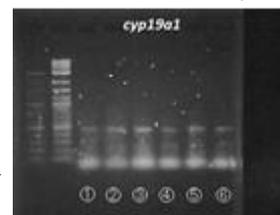


図1 ウナギの脳と生殖腺における*cyp19a*の発現(1~6:養殖ウナギ)

	<p>今後、この雌様のウナギが遺伝子的にも雌に分化しているかを確認している。また、PCR産物が本当にプライマーを認識した産物であるかを確認するためにTAクローニングを行い、ライブラリー、シーケンス解析を行って目的遺伝子の増幅を確認した。一方で、生殖腺をPFA固定し、ヘマトキシリン-エオジン染色にて染めたところ精巣、卵巣の発達は確認できてない。<i>cyp19a</i>は魚類において性転換する際の重要な遺伝子の一つであり、ウナギの雌雄化の決定に重要であることが推測されるので今後の標的遺伝子の一つとして検討する。</p>
<p>4. 今後の課題及び発展性</p>	<p>これまでの研究結果から、ウナギ脳および生殖腺サンプルからのDNA、mRNAの調整法の確立がおこなわれ、<i>cyp19a1</i>, <i>dmrt1</i>の発現を確認した。魚類において性分化や性転換は頻繁に起こる現象である。環境による影響を被りやすい変温動物の進化過程において性決定遺伝子は、性決定システムの最上位遺伝子として、雌雄2つの方向に分岐させる役割を担えばよいので、卵巣あるいは精巣形成の鍵遺伝子、あるいはその遺伝子を制御する遺伝子の上位の遺伝子であれば進化的保存性を保つ必要はなく、種によって多様化すると考える事ができる。これらの動物で鍵となるのは、性ホルモン合成酵素の遺伝子と推測され、今回ターゲットにしている<i>cyp19a1</i>は鍵となる遺伝子の一つと考えられた。</p> <div data-bbox="1034 611 1453 815" data-label="Image"> </div> <p style="text-align: center;">図2 ウナギの精巣（左）と卵巣</p> <p>今後これら性分化に関わる遺伝子の発達による発現量の比較、雌雄による発現の違い、発現調節のメカニズムの解明を目指す。<u>遺伝子の発現レベルの解析（リアルタイムPCR法を用いて解析）</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 大きさ（重量）、雌雄差による標的遺伝子の発現量の比較 2) 水温による標的遺伝子の発現量の解析 <p><u>遺伝子の発現調節となる環境因子の同定とエピジェネティック調節による発現調節の解明</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 3) 環境要因の違いによる標的遺伝子のメチル化解析（bisulfite シークエンス、MSP法） 4) ChIP解析によるクロマチン修飾とターゲット遺伝子のタンパク質発現調節 <p>この四つのテーマに沿って行っていく予定である。</p> <p>標的遺伝子であるアロマターゼはスズキの仲間であるヨーロッパシーバスにおき、<i>cyp19a</i>のメチル化に関して報告がある（Laia-NM et al., Plos Genetics, 2011）。この報告では発生の初期の段階で水温がメチル化、脱メチル化を制御しており、水温が高いとメチレーションが高く、雄化する事が示されている。これは、水温による<i>cyp19a</i>のメチル化は雌雄の性比が環境に依存することを示唆している。この事はこうした性決定ではない性分化、すなわち性比の決定は遺伝的決定だけではない事が種によって起こる可能性を示唆している。</p> <p>今後、これらの転写因子を始めとした雌雄決定のメカニズムのタイミングを調べることでその調節を人工的に調節することが可能となる。具体的には、水温や栄養などの変化で現在の雄化が進んでいれば、それら環境の変化で雌雄化の調節が可能になり、採卵、採精が可能となり人工授精が行いやすくなることで完全養殖の実現に一歩進むこととなる。</p>