

明 細 書

発明の名称：有用エビ類の卵成熟抑制を解除する方法

技術分野

[0001] 本発明は、分子生物学手法を用いてエビ類の生体内において本来の生物学的機能を制御する方法に関し、具体的にはRNA干渉の手法を用いてエビ類の卵成熟を抑制する遺伝子の発現を抑制し、卵成熟抑制を解除する方法に関する。

背景技術

[0002] 現在、年間350万トンにのぼるバナメイエビ養殖生産を支えるために世界で年間約2,000億尾の稚エビが生産されており、その親エビとして米国ハワイ州だけで80万尾が生産・輸出されている。バナメイエビを含むクルマエビ類は人為的に成熟させることが困難であり、現状では眼柄切除を行い、成熟を促している。しかし、眼柄切除は成熟成功率が低いだけでなく、エビの片方の眼柄を焼き切ることから、動物虐待との非難も浴びている。眼柄切除に代わる成熟促進技術を開発し、計画的、効率的な稚エビ生産を可能にすることは喫緊の課題である。

[0003] RNA干渉(RNAi)は、二本鎖RNA(dsRNA)によって、その配列特異的にmRNAが切断され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象であり、生物共通の核酸レベルの防御システムであることが報告されている(非特許文献1を参照)。RNAiにおいては、dsRNAがダイサー(Dicer)の作用によりプロセッシングされsiRNA(short interfering RNA)が形成され、siRNAがガイドRNAとしてターゲット配列を認識し、ターゲットmRNAを切断することにより、遺伝子の発現が抑制される。

[0004] 現在、ふ化場等において人為的にエビ類を成熟・産卵させるためには、眼柄切除に代わる技術は存在しない。しかしながら、最近ではRNA干渉法を用いるウシエビ(*Penaeus monodon*)などのエビ類でVIHの発現を抑制することを目的とした研究事例が報告されている(非特許文献1、非特許文献2及び非特

許文献3を参照)。また、同方法で成熟を促すことが可能であると訴える特許出願の事例もある(特許文献1を参照)。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1: 米国特許出願公開第US2015/0099702号明細書

非特許文献

[0006] 非特許文献1: Tiu and Chan, 2007, FEBS Journal, 274: 4385-4395.

非特許文献2: Treerattrakool et al., 2008, FEBS Journal, 275: 970-980.

非特許文献3: Treerattrakool et al., 2013, Aquaculture, 404-405: 116-121.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] RNA干渉の手法を用いてエビ類の卵成熟を抑制する遺伝子の発現を抑制し、卵成熟抑制を解除する方法の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、エビ類の卵成熟を制御する方法として、RNA干渉の原理を利用し、エビ類の卵成熟を抑制する遺伝子のmRNAに結合するdsRNAを用いエビ類の卵成熟を抑制する遺伝子の発現を抑制することについて鋭意検討を行った。この検討は、生化学的研究に基づいた効率的な成熟制御を可能にするための第一歩であり、生体内で成熟を抑制するホルモンの遺伝子発現を解除するものである。その結果、前記dsRNAにより効率的にエビ類の卵成熟を抑制する遺伝子の発現を抑制し、卵成熟の抑制を解除し得ることを見出した。

[0009] さらに、本発明者らは、複数の遺伝子が卵成熟の抑制に関与しており、それぞれの遺伝子の発現を抑制し得る複数のdsRNAを混ぜて使用することにより、より効果的に卵成熟を抑制する遺伝子の発現を抑制することができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0010] すなわち、本発明は以下のとおりである。

- [1] 養殖エビ類の卵黄形成抑制ホルモン (VIH) 遺伝子の mRNA を標的とする二本鎖 RNA (dsRNA) を用いて、RNA 干渉法により、エビ類の卵黄形成抑制ホルモン遺伝子の発現を抑制し、養殖エビ類の卵成熟抑制を解除する方法。
- [2] 養殖エビ類がクルマエビ科に属するエビ類である、[1] の方法。
- [3] 養殖エビ類がバナメイエビ又はクルマエビの成エビ又は亜成エビである、[2] の方法。
- [4] 卵黄形成抑制ホルモン (VIH) 遺伝子の mRNA を標的とする二本鎖 RNA (dsRNA) が、卵黄形成抑制ホルモン (VIH) 遺伝子の塩基配列の一部に対して同一な塩基配列を有し、該遺伝子にハイブリダイズし得るセンス鎖と該センス鎖の塩基配列に相補的な塩基配列を含むアンチセンス鎖が相補的に結合した二本鎖 RNA (dsRNA) である、[1]～[3] のいずれかの方法。
- [5] 卵黄形成抑制ホルモン遺伝子がバナメイエビの眼柄由来ペプチドである、SGP-A、SGP-B、SGP-C、SGP-F 及び SGP-G からなる群から選択される 1 種又は複数種の遺伝子である、[1]～[4] のいずれかの方法。
- [6] センス鎖が配列番号 28 で表される塩基配列からなる、SGP-A 遺伝子を標的とする二本鎖 RNA (dsRNA)；センス鎖が配列番号 30 で表される塩基配列からなる、SGP-B 遺伝子を標的とする二本鎖 RNA (dsRNA)；センス鎖が配列番号 33 で表される塩基配列からなる、SGP-C 遺伝子を標的とする二本鎖 RNA (dsRNA)；センス鎖が配列番号 36 で表される塩基配列からなる、SGP-F 遺伝子を標的とする二本鎖 RNA (dsRNA)；及びセンス鎖が配列番号 39 で表される塩基配列からなる、SGP-G 遺伝子を標的とする二本鎖 RNA (dsRNA) からなる群から選択される二本鎖 RNA (dsRNA) の 1 種又は複数種を用いる、[1]～[5] のいずれかの方法。
- [7] 卵黄形成抑制ホルモン (VIH) 遺伝子の mRNA を標的とする二本鎖 RNA (dsRNA) であって、卵黄形成抑制ホルモン (VIH) 遺伝子の塩基配列の一部に対して同一な塩基配列を有し、該遺伝子にハイブリダイズし得るセンス鎖と該センス鎖の塩基配列に相補的な塩基配列を含むアンチセンス鎖が相補的に結合した二本鎖 RNA を含む、エビ類の卵黄形成抑制ホルモン遺伝子の発現を抑制し

、養殖エビ類の卵成熟抑制を解除する組成物。

[8] 養殖エビ類がクルマエビ科に属するエビ類である、[7]の組成物。

[9] 養殖エビ類がバナメイエビ又はクルマエビの成エビ又は亜成エビである、[8]の組成物。

[1 0] 卵黄形成抑制ホルモン遺伝子がバナメイエビの眼柄由来ペプチドである、SGP-A、SGP-B、SGP-C、SGP-F及びSGP-Gからなる群から選択される1種又は複数種の遺伝子である、[7]～[9]のいずれかの組成物。

[1 1] センス鎖が配列番号28で表される塩基配列からなる、SGP-A遺伝子を標的とする二本鎖RNA (dsRNA) ; センス鎖が配列番号30で表される塩基配列からなる、SGP-B遺伝子を標的とする二本鎖RNA (dsRNA) ; センス鎖が配列番号33で表される塩基配列からなる、SGP-C遺伝子を標的とする二本鎖RNA (dsRNA) ; センス鎖が配列番号36で表される塩基配列からなる、SGP-F遺伝子を標的とする二本鎖RNA (dsRNA) ; 及びセンス鎖が配列番号39で表される塩基配列からなる、SGP-G遺伝子を標的とする二本鎖RNA (dsRNA)からなる群から選択される二本鎖RNA (dsRNA)の1種又は複数種を含む、[7]～[1 0]のいずれかの組成物。

[0011] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2016-214411号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0012] 本発明の二本鎖RNA (dsRNA) を用いることにより、RNA干渉の原理でエビ類の卵成熟を抑制する遺伝子の発現を抑制し、卵成熟抑制を解除することができる。このようにして卵成熟抑制が解除されたエビ類の卵成熟を促進することにより、計画的かつ効率的な稚エビの生産が可能になる。

[0013] 本発明の二本鎖RNA (dsRNA) を使用することにより、10日で全個体において、遺伝子発現レベルを皆無にすることができ、少なくともこの状態が30日間保たれる。また、本発明のdsRNAを用いた場合の遺伝子発現ノックダウン率は76.9～99.9%である。これに対してRNA干渉法を用いた他グループの結果では、例えばFeijo et al (2016), Mar Biotechnol. 18: 117-123において、遺伝

子発現のノックダウン率は投与後64～73%のみであった。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]本発明の方法の概念を示す図である。

[図2]バナメイエビのVIH (SGP-G) cDNAの塩基配列と推定アミノ酸配列を示す図である。推測された切断部位は矢印 (▼) で、二重下線部はdsRNA用のプライマー部位を示す。塩基配列数は右に表記してある。

[図3]半定量PCRによる眼柄内の VIH遺伝子発現の測定結果を示す図である。Initialは注射無し区を、TEはTE buffer注射区を、GFPはGFP-dsRNA注射区を、VIHはVIH-dsRNA注射区を示す。

[図4]定量PCRによる成エビ眼柄内のVIH遺伝子発現量の測定結果を示す図である。(N) は分析した個体数を示し、*はInitialに対して有意差あり ($P<0.05$) を示す。

[図5]バナメイエビのSGP-C cDNAの塩基配列と推定アミノ酸配列を示す図である。推測された切断部位は (↓) で、二重下線部はdsRNA用のプライマー部位を示す。塩基配列数は右、アミノ配列数は左に表記してある。

[図6]バナメイエビのSGP-A cDNAの塩基配列と推定アミノ酸配列を示す図である。推測された切断部位は (↓) で、二重下線部はdsRNA用プライマー部位を示し、太文字は合成されるdsRNA部位を示す。塩基配列数は右に表記してある。

[図7]バナメイエビのSGP-B cDNAの塩基配列と推定アミノ酸配列を示す図である。推測された切断部位は (↓) で、二重下線部はdsRNA用プライマー部位を示し、太文字は合成されるdsRNA部位を示す。塩基配列数は右に表記してある。報告されているペプチド配列とcDNAからの推定アミノ酸配列が異なる所は下線で示してある。

[図8]バナメイエビのSGP-F cDNAの塩基配列と推定アミノ酸配列を示す図である。推測された切断部位は (↓) で、二重下線部はdsRNA用プライマー部位を示し、太文字は合成されるdsRNA部位を示す。塩基配列数は右に表記してある。報告されているペプチド配列とcDNAからの推定アミノ酸配列が異なる所は

下線で示してある。

[図9]定量PCRによる亜成エビ眼柄内のVIH遺伝子発現量の測定結果を示す図である。(N)は分析した個体数、*はInitialに対して有意差あり($P < 0.05$)を示す。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0016] 本願発明は、RNA干渉法により、エビ類の卵成熟を抑制する遺伝子の発現を抑制し、卵成熟抑制を解除する方法である。

[0017] 養殖エビ類では、卵成熟が抑制されてしまい、従来は眼柄切除により、卵成熟を促進していた。本発明においては、養殖エビ類の卵成熟を抑制する遺伝子の発現を抑制することにより、卵成熟抑制を解除する。

[0018] 本願発明の方法により、卵成熟抑制を解除するエビ類は、クルマエビ科に属するエビ類であり、クルマエビ (*Penaeus japonicus*)、バナメイエビ (*Litopenaeus vannamei*)、大正エビ (*Penaeus chinensis*)、クマエビ (*Penaeus semisulcatus*)、ウシエビ (*Penaeus monodon*)、フトミゾエビ (*Melicertus latisulcatus*) 等が挙げられる。この中でも、食用エビとして大量に生産されているバナメイエビ又はクルマエビが好ましい。また、成エビを対象としても亜成エビを対象としてもよい。ここで、体重10g以上25g未満を亜成エビ、35g以上を成エビと称する。

[0019] 本願発明の方法により、発現を抑制するエビ類の卵成熟を抑制する遺伝子は、甲殻類血糖上昇ホルモン (CHH: crustacean hyperglycemic hormone) ファミリーに属する遺伝子である。CHHファミリーに属する遺伝子としては、甲殻類血糖上昇ホルモン (CHH: crustacean hyperglycemic hormone) 遺伝子、卵黄形成抑制ホルモン (VIH: vitellogenesis-inhibiting hormone) 遺伝子、脱皮抑制ホルモン (MIH: molt-inhibiting hormone) 遺伝子等が属する。なお、卵黄形成抑制ホルモン (VIH) を Gonad-inhibiting hormone ともいう。

[0020] 本発明では、甲殻類血糖上昇ホルモン (CHH: crustacean hyperglycemic hormone) ファミリーに属する卵黄形成抑制ホルモン (VIH) 遺伝子の発現を抑

制する。卵黄形成抑制ホルモン（VIH）遺伝子として、眼柄由来ペプチド（SGP：sinus gland peptide）遺伝子が挙げられる。眼柄由来ペプチドには、SGP-A～SGP-Gの7つが存在するが、本発明においては、SGP-A、AGP-B、SGP-C、SGP-F及びSGP-Gの5つの眼柄由来ペプチド遺伝子の1種又は複数種の遺伝子の発現を抑えることにより、卵黄形成抑制ホルモンの発現を抑制し、卵黄タンパク質を作りやすくし卵成熟させることにより、卵成熟を制御する。

[0021] 以下のように、配列番号1～10に遺伝子の塩基配列及び遺伝子がコードするペプチドのアミノ酸配列を示す。

配列番号1 SGP-A 塩基配列

配列番号2 SGP-A アミノ酸配列

配列番号3 SGP-B 塩基配列

配列番号4 SGP-B アミノ酸配列

配列番号5 SGP-C 塩基配列

配列番号6 SGP-C アミノ酸配列

配列番号7 SGP-F 塩基配列

配列番号8 SGP-F アミノ酸配列

配列番号9 SGP-G 塩基配列

配列番号10 SGP-G アミノ酸配列

また、SGP-Aの塩基配列及びアミノ酸配列を図6に、SGP-Bの塩基配列及びアミノ酸配列を図7に、SGP-Cの塩基配列及びアミノ酸配列を図5に、SGP-Fの塩基配列及びアミノ酸配列を図8に、SGP-Gの塩基配列及びアミノ酸配列を図2に示す。

[0022] 上記の遺伝子の発現を抑制するためには、それぞれの遺伝子のmRNAを標的とする二本鎖からなるdsRNA(double stranded RNA；二本鎖RNA)を用いればよい。dsRNAは、RNA干渉により標的遺伝子の発現を抑制（サイレンシング）する。該dsRNAの一方の鎖は各遺伝子の塩基配列の一部に対して同一な塩基配列を有し、該遺伝子にハイブリダイズし得るセンス鎖であり、他方の鎖は該センス鎖の塩基配列に相補的な塩基配列を含むアンチセンス鎖であり、該セン

ス鎖とアンチセンス鎖は相補的に結合し、dsRNAを形成する。ただし、センス鎖とアンチセンス鎖は完全に相補的である必要は必ずしもなく、相補的に結合する限り、1又は複数、すなわち、1～10個、好ましくは1～5個、さらに好ましくは、1～3個、特に好ましくは2個若しくは1個のミスマッチがあってもよい。上記の眼柄由来ペプチド遺伝子中の標的配列は、コーディング領域であっても、非コーディング領域であってもよい。また、コーディング領域と非コーディング領域の両方を含んでいてもよい。

[0023] 本発明において、dsRNAは、shRNA(small hairpin RNA)及びsiRNA (small interfering RNA)を含む。shRNAは2本鎖部分を含みセンス鎖とアンチセンス鎖がループ配列を介して連結しているステムループ構造を有する。shRNAにおいて、センス鎖の3'末端とアンチセンス鎖の5'末端がループ（ヘアピンループ配列）を介して連結されている。ヘアピンループ配列は限定されないが、5～12塩基からなるUUで始まる配列、例えばUUCAAGAGAが挙げられる。dsRNA及びshRNAは、生体内でダイサーによりプロセッシングされてsiRNAを生成する。また、dsRNAはmiRNAを形成し得る。本発明のdsRNAが、30塩基以上の長さで提供される場合、ダイサー（Dicer）と呼ばれるRNaseIII様酵素の作用によってプロセッシングされ、3'末端に2塩基のオーバーハングを有する21～27塩基のsiRNA (small interfering RNA) 分子を生じ得る。

[0024] dsRNAの塩基数は、限定されないが、50～800塩基、好ましくは100～500塩基、さらに好ましくは100～300塩基である。

[0025] dsRNAの眼柄由来ペプチド遺伝子の標的配列にハイブリダイズし、眼柄由来ペプチド遺伝子の発現を抑制し得るセンス鎖として、配列番号1で表されるSGP-A遺伝子の塩基配列、配列番号3で表されるSGP-B遺伝子の塩基配列、配列番号5で表されるSGP-C遺伝子の塩基配列、配列番号7で表されるSGP-F遺伝子の塩基配列及び配列番号9で表されるSGP-G遺伝子の塩基配列の部分配列であって、遺伝子配列中のチミンがウラシルに置換された塩基配列を有するRNA配列を有するものが挙げられる。

[0026] 具体的には、例えば、センス鎖が配列番号28で表される塩基配列からな

る、SGP-A遺伝子を標的とする二本鎖RNA (dsRNA) ; センス鎖が配列番号 3 0 で表される塩基配列からなる、SGP-B遺伝子を標的とする二本鎖RNA (dsRNA) ; センス鎖が配列番号 3 3 で表される塩基配列からなる、SGP-C遺伝子を標的とする二本鎖RNA (dsRNA) ; センス鎖が配列番号 3 6 で表される塩基配列からなる、SGP-F遺伝子を標的とする二本鎖RNA (dsRNA) ; 及びセンス鎖が配列番号 3 9 で表される塩基配列からなる、SGP-G遺伝子を標的とする二本鎖RNA (dsRNA) からなる群から選択される二本鎖RNA (dsRNA) の 1 種又は複数種を用いることができる。これらのセンス鎖に、相補的な配列からなるアンチセンス鎖がハイブリダイズしてdsRNAが形成される。上記センス鎖は、dsRNA用のプライマーを用いて作製することができる。配列番号 2 8 で表される塩基配列からなる、SGP-A遺伝子を標的とする二本鎖RNA (dsRNA) 用のプライマーとして、配列番号 2 7 で表される塩基配列からなるプライマーが挙げられ、配列番号 3 0 で表される塩基配列からなる、SGP-B遺伝子を標的とする二本鎖RNA (dsRNA) 用のプライマーとして、配列番号 2 9 で表される塩基配列からなるプライマーが挙げられ、配列番号 3 3 で表される塩基配列からなる、SGP-C遺伝子を標的とする二本鎖RNA (dsRNA) 用のプライマーとして、配列番号 3 1 で表される塩基配列からなるプライマー及び配列番号 3 2 で表される塩基配列からなるプライマーが挙げられ、配列番号 3 6 で表される塩基配列からなる、SGP-F遺伝子を標的とする二本鎖RNA (dsRNA) 用のプライマーとして、配列番号 3 4 で表される塩基配列からなるプライマー及び配列番号 3 5 で表される塩基配列からなるプライマーが挙げられ、配列番号 3 9 で表される塩基配列からなる、SGP-G遺伝子を標的とする二本鎖RNA (dsRNA) 用のプライマーとして、配列番号 3 7 で表される塩基配列からなるプライマー及び配列番号 3 8 で表される塩基配列からなるプライマーが挙げられる。

[0027] 本発明のdsRNAを構成するセンス鎖は、眼柄由来ペプチド遺伝子の塩基配列と同一であることが望ましいが、実質的に同一な配列であってもよい。すなわち、dsRNAのセンス鎖と実際に標的となる眼柄由来ペプチドのmRNA配列がハイブリダイズする限り 1 又は複数個の塩基、すなわち、1 ~ 1 0 個、好まし

くは1～5個、さらに好ましくは、1～3個、あるいは、2個若しくは1個の塩基が欠失、置換又は付加してミスマッチが生じていてもよい。

[0028] エビ類の卵成熟抑制を解除するために、上記の眼柄由来ペプチド遺伝子の少なくとも1種、好ましくは2種、3種、4種又は5種の複数の遺伝子の発現を抑制する。複数種の遺伝子の発現を抑制した場合、より効率的に卵成熟抑制を解除することができる。複数種の遺伝子の発現を抑制するためには、各遺伝子の発現を抑制し得る複数のdsRNAを用いればよい。

[0029] dsRNA分子を構成するセンス鎖又はアンチセンス鎖は、3'末端にオーバーハングを有していてもよい。オーバーハングの塩基の種類、数は限定されない。例えば、1～5塩基、好ましくは1～3塩基、さらに好ましくは1若しくは2塩基からなる配列が挙げられる。具体的には、例えば、TTT、UUやTTが挙げられる。ここで、オーバーハングとは、dsRNA分子の一方の鎖の末端に付加された塩基であって、もう一方の鎖の対応する位置に相補的に結合し得る塩基が存在しない塩基をいう。

[0030] 本発明のdsRNAは、化学合成や、プロモーター及びRNAポリメラーゼを用いた転写系によりin vitroで合成することができる。例えば、化学合成により合成する場合、互いに相補的な配列を逆方向配列として有しており自己相補性を有するRNA一本鎖を合成し、自己相補性部分で結合させればよい。合成されたセンス鎖及びアンチセンス鎖のアニーリングは、当業者に公知である一般的な方法によって行うことができる。

[0031] また、プロモーター及びRNAポリメラーゼを用いて合成する場合、1つのプロモーターの下流にセンス鎖とアンチセンス鎖をループで連結した構造を有する鋳型DNAを合成しRNAポリメラーゼによりRNAを転写すればよい。プロモーターとしては、in vitroで製造する場合、T7プロモーター、T3プロモーター等が用いられる。また、ベクターに本発明のdsRNAの鋳型DNAを導入し、該ベクターをエビ類の生体内に投与して生体内でdsRNAを合成する場合、H1プロモーター、U6プロモーター等のPol III系プロモーター等が用いられる。ベクターを用いる場合、ベクターとしては、プラスミドベクター、ウイルスベクター

一等を用いることができる。プラスミドベクターとしては、pSUPERベクター、pBAsiベクター等を用いることができ、ウイルスベクターとしては、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター等を用いることができる。

[0032] 本発明は、上記dsRNA分子を発現するベクターをも包含する。

[0033] 本発明のdsRNAは、配列特異的に眼柄由来ペプチド遺伝子のmRNAを切断し、その結果、眼柄由来ペプチド遺伝子の発現を抑制するRNA干渉（RNAi）を引き起こし、眼柄由来ペプチド遺伝子の発現を抑制し得る。

[0034] 本発明のdsRNAを用いてエビ類の卵成熟を抑制する遺伝子の発現を抑制し、卵成熟を解除するためには、本発明のdsRNAをエビ類の生体内に投与すればよい。投与は、経口ルート、並びに静脈内、筋肉内、皮下及び腹腔内の注射又は非経腸的ルートで行うことができる。例えば、dsRNAを注射により腹内に投与すればよい。この際、30G～33G程度の細い針を有するインスリン注射用注射針を用いることが好ましい。また、本発明のdsRNAを餌に混合し、摂食させることにより投与することもできる。

[0035] 本発明のdsRNAは、薬理学的に許容され得る担体、希釈剤若しくは賦形剤と配合して使用される。担体としては、生理的食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコース液及び緩衝生理食塩水が挙げられる。担体と配合される場合、本発明のdsRNAの含有量は、製剤により適宜選択されればよく、製剤により種々異なるが、0.001～1重量%であることが好ましい。本発明のdsRNAのエビ類への投与量は、0.0001～1mgを1日1回～数回に分けて投与すればよい。また、1投与単位あたり、dsRNA分子量で1nM～100 μ M、好ましくは10nM～50 μ M、より好ましくは100nM～20 μ M投与するのが好ましい。

[0036] 本発明において、RNA干渉により標的遺伝子の発現を抑制（サイレンシング）するとは、遺伝子の発現をその遺伝子のmRNA又はタンパク質の発現量を指標に判定した場合に、本発明のsiRNAを導入しない場合に対して、100%抑制される場合のみならず、75%以上、50%以上あるいは20%以上抑制される場

合も含まれる。発現抑制の程度は、遺伝子のmRNA又はタンパク質の産生量をsiRNA導入前後で比較すればよい。mRNAの場合は、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR、in situ hybridization等により測定することができ、タンパク質の場合は、ウエスタンブロッティング、ELISA等の公知の方法により測定することができる。

[0037] 本発明のdsRNAを用いてエビ類の卵成熟を抑制する遺伝子の発現を抑制することにより、エビ類の卵成熟抑制を解除することができる。すなわち、本発明は、本発明のdsRNAをエビ類に投与して、エビ類の卵成熟を抑制する遺伝子の発現を抑制することにより、エビ類の卵成熟抑制を解除する方法を包含する。該方法は、本発明のdsRNAをエビ類に投与して、エビ類の卵成熟を抑制する遺伝子の発現を抑制することにより、卵成熟抑制を解除したエビ類を製造する方法でもある。

[0038] エビ類に本発明のdsRNAを投与した場合、数日から十数日程度で、卵成熟を抑制する遺伝子の発現を完全に抑制することができる。また、遺伝子発現が抑制された状態は10～50日、好ましくは少なくとも30日保たれる。また、本発明のdsRNAを用いた場合の、遺伝子発現の抑制率は、76.6～99.9%である。

[0039] このように、卵成熟抑制を解除したエビ類に対して、卵成熟を促進することにより、人為的に成熟させたエビ類を製造することができる。該エビ類から、計画的かつ効率的に稚エビを生産することができる。

実施例

[0040] 本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

実施例1 バナメイ雌成エビにおける卵黄形成抑制ホルモン (VIH ; SGP-G) の遺伝子発現の抑制

1. VIH(vitellogenesis-inhibiting hormone)遺伝子の二本鎖RNA(ds-RNA)の作製

VIH遺伝子はTsutsui et al. (2013) Fish. Sci., 79: 357-365で報告されている配列 (SGP-G遺伝子配列) を基に、VIH遺伝子をクローニングしてプラ

スミドを作製した。作製したプラスミドを鋳型にT7プロモーターと結合した遺伝子特異的なプライマー（T7-VIH-L、T7-VIH-R、表1を参照）を用い mature VIH部位を増幅し、それを鋳型にMEGAscript RNAi Kitを用いてVIH-dsRNAを作製した（図2）。表1に示す配列中、TAATACGACTCACTATAGGG（配列番号20）で表される部分はt7プロモーターの配列である。

2. VIH-dsRNAの投与

バナメイ雌成エビ（体重39g～70g）の脱皮間期（ステージC0-C1）の個体を選び実験に用いた。作製したVIH-dsRNAはTE buffer（10mM Tris-HCl pH 7, 1mM EDTA）に溶解して（1 μ g/ μ L）、体重（g）あたり3 μ gを注射した（VIH-dsRNA区）。また、bufferの影響を調べるため、TE bufferを同量の体重（g）あたり3 μ Lを注射した（TE buffer区）。ネガティブコントロールとして、エビの生体に存在しない緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子に対するdsRNA（1 μ g/ μ L）を作製し、体重（g）あたり3 μ gを注射した（GFP-dsRNA区）。各実験区は注射後10日、20日にサンプリングを行い、眼柄でのVIH発現を調べた。また、本来の生体内でのVIH発現量を基準とするため、何も注射していない雌成エビ（Initial区）もサンプリングして眼柄でのVIH遺伝子の発現を調べた。なお、各実験区でサンプリングされた個体は、実験区・サンプリング日・番号順にラベルした。つまり、TE bufferを注射し（TE buffer区）10日後にサンプリングした個体はTE10-1～TE10-5に、注射20日後にサンプリングした個体はTE20-1～TE20-5に略称した。

3. 遺伝子発現量の分析（全RNA抽出、半定量PCR法、定量PCR法）

サンプリングした眼柄からRNeasy mini kit（Qiagen）とClean-up kit（Qiagen）を用いて全RNA（total RNA）を精製した。精製した一部のtotal RNAサンプルでは（TE10-3、TE10-4、VIH10-2）、色相が残り色がついていた。精製したtotal RNAはHigh capacity RNA to cDNA kit（Applied Biosystems）で逆転写することでcDNAを合成し、これを4倍希釈したものを鋳型として、半定量PCR法及び定量PCR法によりVIH遺伝子の発現量を調べた。

[0041] 半定量PCR法では、目的遺伝子の発現量を調べるため、VIH遺伝子に対する

特異的なプライマー (Liv-SGP-G-F : CGGAGTGCAGGAGCAACTG (配列番号 2 1) 、 Liv-R3 : CCTCTCTGTGCTTCTGGCCGTTGG (配列番号 2 2)) と TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x NoAmpErase UNG, Applied Biosystems) を用いて PCR (94°C 2 分間変性後、94°C 30 秒、62°C 30 秒、72°C 30 秒で 30 サイクル) を行い、発現量を分析した。また、内部標準遺伝子として beta-actin 遺伝子 (ACTB) を増幅するプライマー (Liv-act-Fw1 : CGACCTCACAGACTACCTGATGAAGAT (配列番号 2 3) 、 Liv-act-Rv2 : GTGGTCATCTCCTGCTCGAAG (配列番号 2 4)) を用いて同様に PCR を行い、相対的に比較した。

[0042] 定量 PCR 法では、上記の遺伝子特異的なプライマーとキットにプローブ (VIH には Liv-SGP-G-Prb : TCTACAACCCCGTGTTCGTCCAGTGC (配列番号 2 5) を、ACTB には Liv-act-Prb : CGACCACCGCCGAGCGAGAAATCGTTCGT (配列番号 2 6)) を加え、以下の条件でリアルタイム PCR (7500Fast Real-Time PCR system, Applied Biosystems) を行った : 95°C 2 分の変性後、95°C 10 秒、62°C 30 秒で 40 サイクル。VIH 遺伝子の発現量は内部標準遺伝子 (ACTB) に対する目的遺伝子 (VIH; SGP-G) の発現量を計算した相対定量で示した。

4. 結果

眼柄から精製した total RNA サンプルのうち、TE10-3、TE10-4、VIH10-2 の RNA サンプルでは色相が残り色がついていた。半定量 PCR 後、DNA 電気泳動で確認した結果、TE10-3、TE10-4 では内部標準遺伝子が増幅されていなかったの (図 3) 、遺伝子発現量の分析から外した。VIH10-2 サンプルでは内部標準遺伝子が増えていたが、残っていた色相が VIH の増幅を妨害する恐れがあるため、同様に発現量の分析から外した。30 サイクルの半定量 PCR では、Initial-2、GFP10-2、5、TE20-1、GFP20-5 の個体では VIH の発現が見られなかったが、Initial 区、TE buffer 区、GFP-dsRNA 区の全般的に VIH の発現が確認された。一方、VIH-dsRNA を注射した実験区では 10 日及び 20 日のすべての個体で VIH の発現が見られなかった。

[0043] また、図 4 で示したように、定量 PCR の結果では、Initial 区に対し、TE buffer 区と GFP-dsRNA 区では 10 日、20 日ともに VIH 発現量の有意的な変動が見ら

れなかったが、VIH-dsRNA区では10日、20日ともにVIH発現量が有意に減少した。以上のように、成エビにおいて、VIH-dsRNAの投与によりVIH遺伝子発現を抑制することができると立証された。

[0044] [表1]

RNA 干渉に使用した遺伝子特異的なプライマーリスト

target gene	Oligo Name	Sequence (5' to 3')
GFP	T7-EGFP-2L	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCATCGACTTCAAGGAGGAC(配列番号11)
GFP	T7-EGFP-2R	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGGGTGCTCAGGTAGTGGIT(配列番号12)
SGP-G	T7-VIH-L	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAAGCGAGCAAACTTCGAC(配列番号13)
SGP-G	T7-VIH-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTACTTGCCCAACCGTCTG(配列番号14)
SGP-C/SGP-A	T7_sgpC-L	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTCGCTCTTCGACCCTTCC(配列番号15)
SGP-C	T7_sgpC-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTATTTCCCGACCATCTGG(配列番号16)
SGP-B	T7-sgpB-L2	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGACGATATCCTTCGACTCGT(配列番号17)
SGP-F	T7-sgpF-L	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAAGCGCTCCCTCTTCGACC(配列番号18)
SGP-F	T7-sgpF-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTTTATTGCGGACGGTCTGCAGG(配列番号19)
	T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG(配列番号20)

[0045] 実施例2 バナメイ雌垂成エビにおけるVIH遺伝子の発現制御

1. 眼柄由来ペプチドのクローニング

バナメイエビにおいては7つの眼柄由来ペプチド (sinus gland peptides : SGP- A~G) が同定されており、そのうち6つの眼柄由来ペプチド (A、B、C、E、F、G) が卵黄タンパク質の発現を抑制することが報告されている (Tsutsui et al., 2007, Mar. Biotechnol., 9:360-369)。そのうちSGP-Gが最も多く存在していることから、SGP-Gは主なVIHとして研究のさらなる対象となっていた。しかしながら、SGP-Cの塩基配列は構造的に甲殻類血糖上昇ホルモン (crustacean hyperglycemic hormone: CHH) に類似しており、またCHHと同様な作用を有すること突き止めたので、両方のホルモンの性質を有すると判断された (Lago-Leston et al., 2007, Aquaculture, 270: 343-357; Liu et al., 2014, Peptides, 53: 115-124)。本発明では、SGP-G (VIH) のみならず、上記のSGP-C及びその他の類似したSGP遺伝子に対するdsRNAをエビの生体内に注入することでVIHの発現量を抑制することができる。そのため、眼柄のcDNAライブラリーからSGP-Cの全cDNA配列を得て、SGP-A、SGP-B、SGP-FのcDNAを新たにクローニングした。

2. 眼柄由来ペプチドのdsRNA作成

成エビと同様にVIH遺伝子のプラスミドを基に、mature VIH部位の遺伝子断

片をPCRにより増幅し、それを鋳型にMEGAscript RNAi Kitを用いてVIH-dsRNAを、ネガティブコントロールとしてGFP-dsRNAを作成した。また、VIH-dsRNAと同様に、SGP-A、SGP-B、SGP-C、SGP-F遺伝子のmature部位を標的としたdsRNAを合成するため、T7プロモーターと結合した遺伝子特異的なプライマーとT7プロモータープライマー（表1を参照）を用いて、クローニングした各プラスミドを鋳型にPCRにより遺伝子断片を増幅し、それを鋳型にVIH-dsRNAと同じ方法で各遺伝子のdsRNAを合成した。得られたGFP-dsRNA、VIH-dsRNA、SGP-C-dsRNAは $3\mu\text{g}/4\mu\text{L}$ 濃度でTE bufferに溶解して使用した。SGP-A-dsRNA、SGP-B-dsRNA、SGP-F-dsRNAの3つは、各dsRNAが $1\mu\text{g}/4\mu\text{L}$ 濃度になるように混ぜて総dsRNA濃度が $3\mu\text{g}/4\mu\text{L}$ になるようTE bufferで溶解して使用した。

3. dsRNAの投与

無作為に選んだ雌亜成エビ（体重15g～25g）個体に、VIH-dsRNAは体重（g）あたり $3\mu\text{g}$ の濃度で1回のみ注射（VIH-1区）と、7日間隔で3回注射した（VIH-2区）。SGP-C-dsRNAは体重（g）あたり $3\mu\text{g}$ の濃度で1回のみ注射した（SGP-C区）。SGP-A-dsRNA、SGP-B-dsRNA、SGP-F-dsRNAは同濃度に混ぜて、体重（g）あたり $3\mu\text{g}$ の濃度で1回のみ注射した（Mix区）。ネガティブコントロールとして、GFP-dsRNAを体重（g）あたり $3\mu\text{g}$ の濃度で1回のみ注射した（GFP区）。サンプリングは最初注射後、10日、20日、30日で行い、眼柄でのVIH発現量を調べた。

4. 遺伝子発現量の分析（全RNA抽出、半定量PCR法、定量PCR法）

実施例1の3と同様の方法で遺伝子発現量の分析を行った。

5. 結果

眼柄のcDNAライブラリーからクローニングしたSGP-C遺伝子は、115残基のアミノ酸配列をコードしており、その一次構造は、Signal peptide（24残基）、CPRP（CHH precursor-related peptide；16残基）、mature SGP-C（75残基）で構成されていた（図5）。また、SGP-A、SGP-B、SGP-Fの遺伝子と思われるcDNAもクローニングすることができた。それぞれのcDNAを以前眼柄から抽出されたペプチド配列と比較したところ、SGP-Aではmature部位の推定アミ

ノ酸配列と一致したが（図6）、SGP-B（図7）とSGP-F（図8）ではアミノ酸の2残基が異なっていた。これらのcDNAはそれぞれのdsRNAの合成で鋳型として使用した。図2及び5～8には、dsRNAの作製に用いたdsRNA用のプライマーの配列を二重下線部に示す。該プライマーを用いて各眼柄由来ペプチド遺伝子の発現を抑制するためのdsRNAを作製した。図2のSGP-G用のdsRNA配列を配列番号39に示し、SGP-G用のdsRNAを作製するためのdsRNA用プライマーの配列を配列番号37及び38に示す。図5のSGP-C用のdsRNA配列を配列番号33に示し、SGP-C用のdsRNAを作製するためのdsRNA用プライマーの配列を配列番号31及び32に示す。図6のSGP-A用のdsRNA配列を配列番号28に示し、SGP-A用のdsRNAを作製するためのdsRNA用プライマーの配列を配列番号27に示す。図7のSGP-B用のdsRNA配列を配列番号30に示し、SGP-B用のdsRNAを作製するためのdsRNA用プライマーの配列を配列番号29に示す。図8のSGP-F用のdsRNA配列を配列番号36に示し、SGP-F用のdsRNAを作製するためのdsRNA用プライマーの配列を配列番号34及び35に示す。

[0046] dsRNAの注射による眼柄でのVIH遺伝子発現を定量PCR法で分析した結果、Initial区（注射無し）に対し、GFP-dsRNAを注射したGFP区では10日、20日、30日ともにVIH発現量に有意な減少は見られなかったが、VIH-dsRNAを注射したVIH-1区（1回）とVIH-2区（3回）では、注射後10日、20日、30日にVIHの発現量が有意に減少した（図9）。類似したSGP-C遺伝子のdsRNAを注射したSGP-C区では、注射後10日ではVIH発現量が有意に減少したが、20日、30日にはInitial区のVIH発現量に対し有意差は認められなかった。また、SGP-A、SGP-B、SGP-F遺伝子のdsRNAを混ぜて注射したMix区では、注射後10日、30日ではVIH発現量が有意に減少したが、20日ではInitial区のVIH発現量に対し有意差は認められなかった。

[0047] 以上、垂成体エビにおいてもVIH（SGP-G）に対するdsRNAを使用することでVIH遺伝子の発現量を大幅に抑制することができる。また、VIHに類似したその他の遺伝子を用いても同様な効果を得ることができる。

産業上の利用可能性

[0048] 本発明のdsRNAを用いてエビ類を計画的かつ効率的に生産することができる。

配列表フリーテキスト

[0049] 配列番号 11～19、21～27、29、31、32、34、35、37、
38 プライマー

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 養殖エビ類の卵黄形成抑制ホルモン（VIH）遺伝子のmRNAを標的とする二本鎖RNA（dsRNA）を用いて、RNA干渉法により、エビ類の卵黄形成抑制ホルモン遺伝子の発現を抑制し、養殖エビ類の卵成熟抑制を解除する方法。
- [請求項2] 養殖エビ類がクルマエビ科に属するエビ類である、請求項1記載の方法。
- [請求項3] 養殖エビ類がバナメイエビ又はクルマエビの成エビ又は亜成エビである、請求項2記載の方法。
- [請求項4] 卵黄形成抑制ホルモン（VIH）遺伝子のmRNAを標的とする二本鎖RNA（dsRNA）が、卵黄形成抑制ホルモン（VIH）遺伝子の塩基配列の一部に対して同一な塩基配列を有し、該遺伝子にハイブリダイズし得るセンス鎖と該センス鎖の塩基配列に相補的な塩基配列を含むアンチセンス鎖が相補的に結合した二本鎖RNA(dsRNA)である、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項5] 卵黄形成抑制ホルモン遺伝子がバナメイエビの眼柄由来ペプチドである、SGP-A、SGP-B、SGP-C、SGP-F及びSGP-Gからなる群から選択される1種又は複数種の遺伝子である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6] センス鎖が配列番号28で表される塩基配列からなる、SGP-A遺伝子を標的とする二本鎖RNA（dsRNA）；センス鎖が配列番号30で表される塩基配列からなる、SGP-B遺伝子を標的とする二本鎖RNA（dsRNA）；センス鎖が配列番号33で表される塩基配列からなる、SGP-C遺伝子を標的とする二本鎖RNA（dsRNA）；センス鎖が配列番号36で表される塩基配列からなる、SGP-F遺伝子を標的とする二本鎖RNA（dsRNA）；及びセンス鎖が配列番号39で表される塩基配列からなる、SGP-G遺伝子を標的とする二本鎖RNA（dsRNA）からなる群から選択される二本鎖RNA（dsRNA）の1種又は複数種を用いる、請求項1～5のいずれ

か 1 項に記載の方法。

- [請求項7] 卵黄形成抑制ホルモン (VIH) 遺伝子の mRNA を標的とする二本鎖 RNA (dsRNA) であって、卵黄形成抑制ホルモン (VIH) 遺伝子の塩基配列の一部に対して同一な塩基配列を有し、該遺伝子にハイブリダイズし得るセンス鎖と該センス鎖の塩基配列に相補的な塩基配列を含むアンチセンス鎖が相補的に結合した二本鎖 RNA (dsRNA) を含む、エビ類の卵黄形成抑制ホルモン遺伝子の発現を抑制し、養殖エビ類の卵成熟抑制を解除する組成物。
- [請求項8] 養殖エビ類がクルマエビ科に属するエビ類である、請求項 7 記載の組成物。
- [請求項9] 養殖エビ類がバナメイエビ又はクルマエビの成エビ又は亜成エビである、請求項 8 記載の組成物。
- [請求項10] 卵黄形成抑制ホルモン遺伝子がバナメイエビの眼柄由来ペプチドである、SGP-A、SGP-B、SGP-C、SGP-F 及び SGP-G からなる群から選択される 1 種又は複数種の遺伝子である、請求項 7 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。
- [請求項11] センス鎖が配列番号 28 で表される塩基配列からなる、SGP-A 遺伝子を標的とする二本鎖 RNA (dsRNA) ; センス鎖が配列番号 30 で表される塩基配列からなる、SGP-B 遺伝子を標的とする二本鎖 RNA (dsRNA) ; センス鎖が配列番号 33 で表される塩基配列からなる、SGP-C 遺伝子を標的とする二本鎖 RNA (dsRNA) ; センス鎖が配列番号 36 で表される塩基配列からなる、SGP-F 遺伝子を標的とする二本鎖 RNA (dsRNA) ; 及びセンス鎖が配列番号 39 で表される塩基配列からなる、SGP-G 遺伝子を標的とする二本鎖 RNA (dsRNA) からなる群から選択される二本鎖 RNA (dsRNA) の 1 種又は複数種を含む、請求項 7 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の組成物。