

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B1)

(11)特許番号

特許第7350385号

(P7350385)

(45)発行日 令和5年9月26日(2023.9.26)

(24)登録日 令和5年9月15日(2023.9.15)

(51)国際特許分類

F I

A 0 1 K 67/027 (2006.01)

A 0 1 K 67/027

Z N A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 1 0 0

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/113 1 3 0 Z

C 1 2 N 15/113 1 4 0 Z

請求項の数 2 (全24頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-98322(P2022-98322)

(22)出願日 令和4年6月17日(2022.6.17)

審査請求日 令和5年2月9日(2023.2.9)

早期審査対象出願

(73)特許権者 520254417

リージョナルフィッシュ株式会社

京都府京都市左京区吉田本町3 6 番地 1

京都大学国際科学イノベーション棟

(74)代理人 110000796

弁理士法人三枝国際特許事務所

(72)発明者 岸本 謙太

京都府京都市左京区吉田本町3 6 番地 1

京都大学国際科学イノベーション棟

リージョナルフィッシュ株式会社内

審査官 西 賢二

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 魚類の性成熟を促進するための方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

魚類のレプチン受容体及びレプチンの少なくとも一方の機能発現を抑制する工程を含む、
魚類の性成熟を促進するための方法であって、前記魚類は、ヒラメ科、フグ科、ハコフグ科、タイ科、ハタ科、カワスズメ科、メダカ科、カワハギ科、サバ科、カレイ科、アジ科、スズキ科、モロネ科、アカメ科、スギ科、ウシノシタ科、サケ科、アユ亜科又はキュウリウオ亜科に属する魚類であり、

機能発現の抑制が、レプチン受容体及びレプチンの少なくとも一方の遺伝子の機能欠損変異の導入により行われるか、レプチン受容体及びレプチンの少なくとも一方の遺伝子の発現抑制により行われ、

前記機能欠損変異の導入が、Clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated protein 9 (CRISPR / Cas 9) システム、CompoZr Zinc Finger Nuclease (ZFN) システム、及びTALE effector nuclease (TALEN) システムから選択される少なくとも一種のゲノム編集システムにより行われ、

前記遺伝子の発現抑制が、レプチン受容体及びレプチンの少なくとも一方のmRNAを標的とするsiRNA、shRNA及びmiRNAよりなる群から選ばれる少なくとも一種のRNA分子を発現することができるベクターにより行われる、

方法。

【請求項 2】

前記魚類が雌個体である、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書には、魚類の性成熟を促進するための方法が開示される。

【背景技術】

【0002】

魚類は、天然水産資源として、或いは養殖により市場に供給されている。魚類の中でも、例えばヒラメは、性成熟した成魚となるまでに、一般的には雌個体で 2 年以上要することが報告されている（非特許文献 1、及び 2）。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【文献】小澤貴和他；Nippon Suisan Gakkaishi 62(5), 733-739 (1996)

山本雅之他；香水試研報 第11号、1-15 (2010)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

魚類を養殖下で、魚体の性成熟を早めることができれば、養殖下での魚類の生産を高めることができ、養殖コストの軽減にもつながる。また、育種の律速となる世代期間の短縮を行うことができ、良質な品種を作製するための期間と開発コストの軽減にもつながる。

20

【0005】

しかし、非特許文献 1 によれば、自然界において 1 歳齢で排卵が可能になったヒラメの雌魚は非常に少ない。また、非特許文献 2 においては、ヒラメの性成熟に、雌雄ともに 2 歳以上のほとんどの個体が成熟しているとみなされること、最小成熟年齢は 2 ～ 3 歳であるとされている。

【0006】

本発明は、自然界或いは通常の養殖条件下よりも高い確率で 1 歳齢で排卵、又は排精可能な魚類の個体を取得するため、魚類の性成熟を促進するための方法を提供することを課題とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、以下の実施形態を含む。

項 1 .

魚類のレプチン受容体及びレプチンの少なくとも一方の機能発現を抑制する工程を含む、魚類の性成熟を促進するための方法。

項 2 .

機能発現の抑制が、レプチン受容体及びレプチンの少なくとも一方の遺伝子の機能欠損変異の導入により行われる、項 1 に記載の方法。

40

項 3 .

機能欠損変異の導入が、Clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated protein 9 (CRISPR / Cas9) システム、CompoZr Zinc Finger Nuclease (ZFN) システム、及び TAL effector nuclease (TALEN) システムから選択される少なくとも一種のゲノム編集システムにより行われる、項 2 に記載の方法。

項 4 .

機能発現の抑制が、レプチン受容体及びレプチンの少なくとも一方の遺伝子の発現抑制により行われる、項 1 に記載の方法。

50

項 5 .

遺伝子の発現抑制が、レプチン受容体及びレプチンの少なくとも一方の mRNA を標的とする siRNA、shRNA 及び miRNA よりなる群から選ばれる少なくとも一種の RNA 分子又は該 RNA 分子を発現することができるベクターよりなる群から選ばれる少なくとも一種により行われる、項 4 に記載の方法。

項 6 .

機能発現の抑制が、レプチン受容体及びレプチンの少なくとも一方のタンパク質の機能の抑制により行われる、項 1 に記載の方法。

項 7 .

タンパク質の機能の抑制が、レプチン受容体及びレプチンの一方に特異的に結合し、その結合により結合対象の機能発現を抑制する抗体よりなる群から選ばれる少なくとも一種により行われる、項 6 に記載の方法。

10

項 8 .

前記魚類が雌個体である、項 1 に記載の方法。

【発明の効果】

【0008】

自然界或いは通常の養殖条件下よりも高い確率で1歳齢で排卵或いは産卵、又は排精可能な魚類の個体を取得することができる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

20

【図1】飼育中の温度条件を示す。

【図2】図2（A）に雌個体のレプチン受容体遺伝子欠損ヒラメの排卵の有無、月齢5.1、10.1、12.4、15.8、16.1、16.8における体重変化を示す。図2（B）に雄個体のレプチン受容体遺伝子欠損ヒラメの排精の有無、月齢5.1、10.1、12.4、15.8、16.1、16.8における体重変化を示す。

【図3】図3に雌個体のレプチン受容体遺伝子欠損ヒラメの体重変化を示す。図3（A）は排卵が認められた群であり、図3（B）は排卵が認められなかった群である。

【図4】図4に雄個体のレプチン受容体遺伝子欠損ヒラメの体重変化を示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

30

本発明のある実施形態は、魚類の性成熟を促進するための方法の関する。

本明細書において「魚類」は特に制限されない。本明細書において、前記魚類は、海水魚、淡水魚、汽水魚、通し回遊魚等を含み得る。

前記魚類は、例えば、ヒラメ科 (Paralichthys)、フグ科 (Tetraodontidae: puffer s)、ハコフグ科 (Ostraciidae: boxfishes)、タイ科 (Sparidae: sea breams and porgies)、サケ科 (Salmonidae)、コイ科 (Cyprinidae)、アメリカナマズ上科 (Ictaluroidea)、ナマズ上科 (Siluroidea)、ギギ上科 (Bagroidea)、ハタ科 (Serranidae: sea basses)、カワスズメ科 (Cichlidae)、メダカ科 (Oryziidae: medakas)、カワハギ科 (Monacanthidae)、キュウリウオ科 (Osmeridae)、サバ科 (Scombridae)、カレイ科 (Pleuronectidae)、アジ科 (Carangidae)、スズキ科 (Lateolabrax)、モロネ科 (Moronidae)、アカメ科 (Latidae)、スギ科 (Rachycentridae)、ウシノシタ科 (Cynoglossidae)、ウナギ科 (Anguillidae)、アナゴ科 (Congridae) 等の魚類があげられる。

40

【0011】

前記ヒラメ科の魚類は、例えば、Paralichthys olivaceus (TEMMINCK et SCHLEGEL)、ガンゾウヒラメ属に属するヒラメ (メガレイ、ナンヨウガレイ、クシガンゾウヒラメ、テンジクガレイ、タマガンゾウヒラメ、ガンゾウヒラメ、タイワンガンゾウ等)、アラメガレイ属に属するヒラメ (アラメガレイ等)、セイテンヒラメ属に属するヒラメ (セイテンヒラメ、ウスガレイ属に属するヒラメ (ウスガレイ)、イトヒキガンゾウ属に属するヒラメ (イトヒキガンゾウ) 等を含み得る。好ましくは、Paralichthys olivaceus (TE

50

MMINCK et SCHLEGEL)である。

【0012】

前記フグ科の魚類は、例えば、トラフグ (*Takifugu rubripes*)、マフグ (*Takifugu porphyreus*)、クサフグ (*Takifugu niphobles*) 等のトラフグ属 (*Takifugu*) ; シロサバフグ (*Lagocephalus wheeleri*) 等のサバフグ属 (*Lagocephalus*) ; 等の魚類があげられる。

【0013】

前記ハコフグ科の魚類は、例えば、ハコフグ (*Ostracion immaculatus*) 等のハコフグ属の魚類を含み得る。

【0014】

前記タイ科の魚類は、例えば、マダイ (*Pagrus major*)、ゴウシュウマダイ (*Pagrus auratus*) 等のマダイ属 (*Pagrus*) ; クロダイ (*Acanthopagrus schlegelii*)、キチヌ (*Acanthopagrus latus*) 等の *Acanthopagrus* 属 ; キダイ (連子鯛) (*Dentex tumifrons*) 等のキダイ属 (*Dentex*) ; ヨーロッパヘダイ (*Sparus aurata*) 等のヘダイ属 (*Sparus*) 等の魚類を含み得る。

【0015】

前記サケ科の魚類は、例えば、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*)、キングサーモン (*Oncorhynchus tshawytscha*)、サクラマス (*Oncorhynchus masou*)、サツキマス (*Oncorhynchus masou*)、クニマス (*Oncorhynchus kawamurae*)、カラフトマス (*Oncorhynchus gorbusha*)、サケ (*Oncorhynchus keta*) 等のタイヘイヨウサケ属の魚類 ; ブラウントラウト (*Salmo trutta*)、ベニザケ (*Oncorhynchus nerka*)、ギンザケ (*Oncorhynchus kisutch*)、タイセイヨウサケ (*Salmo salar*) 等のタイセイヨウサケ属の魚類 ; オシヨロコマ (*Salvelinus malma*)、ホッキョクイワナ (*Salvelinus alpinus*)、イワナ (*Salvelinus leucomaenis*)、カワマス (*Salvelinus fontinalis*)、レイクトラウト (*Salvelinus namaycush*) 等のイワナ属の魚類 ; イトウ (*Parahucho perryi*) 等のイトウ属の魚類等を含み得る。

【0016】

前記コイ科の魚類は、例えば、ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*)、ハクレン (*Hypophthalmichthys molitrix*)、コイ (*Cyprinus carpio*)、ソウギョ (*Ctenopharyngodon idellus*)、コクレン (*Hypophthalmichthys nobilis*)、ヨーロッパナ (*Carassius carassius*)、カトラ (*Cyprinus catla*)、アオウオ (*Mylopharyngodon piceus*)、ケンヒー (*Cirrhinus molitorella*)、ムリガルカーブ (*Cirrhinus cirrhosus*)、カトラ (*Catla catla*)、ローファー (*Labeo rohita*)、ダントウボウ (*Megalobrama amblycephala*) 等を含み得る。

【0017】

前記アメリカナマズ上科 (*Ictaluroidea*) の魚類は、例えば、アメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*)、ブルーキャットフィッシュ (*Ictalurus furcatus*) 等を含み得る。

【0018】

前記ナマズ上科 (*Siluroidea*) の魚類は、例えば、ナマズ (*Silurus asotus*)、ビワコオオナマズ (*Silurus biwaensis*)、イワトコナマズ (*Silurus lithophilus*)、ヨーロッパオオナマズ (*Silurus glanis*)、ヒレナマズ (*Clarias fuscus*)、ウォーキングキャットフィッシュ (*Clarias batrachus*) 等を含み得る。

【0019】

前記ギギ上科 (*Bagroidea*) の魚類は、例えば、コウライギギ (*Pseudobagrus fulvdraco*)、メコンオオナマズ (*Pangasianodon gigas*)、バサ (*Pangasius bocourti*)、カイヤン (*Pangasianodon hypophthalmus*) 等を含み得る。

【0020】

前記ハタ科の魚類は、例えば、マハタ (*Epinephelus septemfasciatus*)、クエ (*Epinephelus bruneus*)、キジハタ (*Epinephelus akaara*)、ヤイトハタ (*Epinephelus malabaricus*)、ホワイトグルーパー (*Epinephelus aeneus*)、コクテンアオハタ (*E*

10

20

30

40

50

pinephelus amblycephalus)、オオモンハタ (Epinephelus areolatus)、キテンハタ (Epinephelus bleekeri)、シラヌイハタ (Epinephelus bontoides)、(Epinephelus chlorostigma)、チャイロマルハタ (Epinephelus coiodes)、アカハタ (Epinephelus fasciatus)、アカマダラハタ (Epinephelus fuscoguttatus)、スターリーグループ (Epinephelus labriformis)、タマカイ (Epinephelus lanceolatus)、シロブチハタ (Epinephelus maculatus)、ヤイトハタ (Epinephelus malabricus)、ダスキグループ (Epinephelus marginatus)、ナミハタ (Epinephelus ongus)、マダラハタ (Epinephelus polyphekadion)、モヨウハタ (Epinephelus quoyanus)、コクテンヒレハタ (Epinephelus sexfasciatus)、ナツソーハタ (Epinephelus striatus)、ヒトミハタ (Epinephelus tauvina)、ジャガイモハタ (Epinephelus tukula) 等のマハタ属 (Epinephelus)、サラサハタ (Cromileptes altivelis) 等のサラサハタ属、スジアラ (Plectropomus leopardus) 等のスジアラ属 (Plectropomus) 等の魚類、およびハタ科魚類同士交雑種を含み得る。

10

【0021】

前記カワスズメ科 (Cichlidae) の魚類は、例えば、ナイルティラピア (Oreochromis niloticus)、カワスズメ (Oreochromis mossambicus)、ブルーティラピア (Oreochromis aureus) 等のオレオクロミス属 (Oreochromis) 等の魚類を含み得る。

【0022】

前記メダカ科の魚類は、例えば、メダカ (Oryzias latipes、Oryzias sakaizumii)、ジャワメダカ (Oryzias javanicus) 等のメダカ属 (Oryzias) 等の魚類を含み得る。

20

【0023】

前記カワハギ科の魚類は、例えば、カワハギ (Stephanolepis cirrhifer) 等のカワハギ属 (Stephanolepis)、ウマヅラハギ (Thamnaconus modestus) 等のウマヅラハギ属 (Thamnaconus) 等の魚類を含み得る。

【0024】

前記アユ科の魚類は、例えば、アユ (Plecoglossus altivelis) 等のアユ亜科 (Plecoglossinae)、ワカサギ (Hypomesus nipponensis)、チカ (Hypomesus japonicus) 等のワカサギ亜科 (Hypomesinae)、キュウリウオ (Osmerus mordax dentex) シシャモ (Spirinchus lanceolatus)、シラウオ (Spirinchus lanceolatus) 等のキュウリウオ亜科 (Osmerinae) 等の魚類を含み得る。

30

【0025】

前記サバ科の魚類は、例えば、マサバ (Scomber japonicus)、タイセイヨウサバ (Scomber scombrus)、ゴマサバ (Scomber australasicus) 等のサバ属 (Scombrini)、タイヘヨウクロマグロ (Thunnus orientalis)、タイセイヨウクロマグロ (タイセイヨウクロマグロ)、ミナミマグロ (Thunnus maccoyii)、メバチマグロ (Thunnus obesus)、キハダマグロ (Thunnus albacares)、ビンナガマグロ (Thunnus alalunga)、コシナガ (Thunnus tonggol) 等のマグロ属魚類 (Thunnini)、スマ (Euthynnus affinis)、タイセイヨウヤイト (Euthynnus alletteratus) 等のスマ属魚類 (Euthynnus)、カツオ (Katsuwonus pelamis) 等のカツオ属魚類 (Katsuwonus)、サワラ属魚類 (Scomberomorini)、ソウダガツオ属魚類 (Auxis)、ハガツオ属魚類 (Sardinini)、イソマグロ属魚類 (Gymnosarda) 等を含み得る。

40

【0026】

前記カレイ科の魚類は、例えば、マガレイ (Pseudopleuronectes herzensteini)、マコガレイ (Pleuronectes yokohamae)、イシガレイ (Kareius bicoloratus)、タイヘヨウオヒョウ (Hippoglossus stenolepis)、マツカワ (Verasper moseri) 等の魚類を含み得る。

【0027】

前記アジ科 (Carangidae) の魚類は、例えば、カンパチ (Seriola dumerili)、ヒラマサ (Seriola lalandi)、ヒレナガカンパチ (Seriola rivoliana)、ブリ (Seriola quinqueradiata) 等のブリ属 (Seriola)、マアジ (Trachurus japonicus)、シマアジ

50

(*Pseudocaranx dentex*) 等のシマアジ属 (*Pseudocaranx*)、マルコバン等のコバンアジ属 (*Trachinotus*) 等の魚類を含み得る。

【0028】

前記スズキ科 (*Lateolabrax*) の魚類は、例えば、ヒラスズキ (*Lateolabrax latus*)、タイリクスズキ (*Lateolabrax maculatus*)、前記モロネ科 (*Moronidae*) の魚類は、ヨーロピアンシーバス (*Dicentrarchus labrax*) 等の魚類を含み得る。

【0029】

前記アカメ科 (*Latidae*) の魚類は、例えば、バラマンディ (*Lates calcarifer*)、ナイルパーチ (*Lates niloticus*) 等のアカメ属 (*Lates*) 等の魚類を含み得る。

前記スギ科 (*Rachycentridae*) の魚類は、例えば、スギ (*Rachycentron canadum*) 等の魚類を含み得る。

10

【0030】

前記ウシノシタ科の魚類は、例えば、アカシタビラメ (*Cynoglossus joyneri*)、カラアカシタビラメ (*Cynoglossus semilaevis*) 等の魚類を含み得る。

【0031】

前記ウナギ科の魚類は、例えば、ニホンウナギ (*Anguilla japonica*)、ヨーロツパウナギ (*Anguilla anguilla*) 等の魚類を含み得る。

前記アナゴ科の魚類は、例えば、マアナゴ (*Conger myriaster*)、クロアナゴ (*Conger japonicus*) 等の魚類を含み得る。

本明細書において、前記魚類は、固定種でもよいし、交雑種でもよい。前記交雑種は、例えば、属間交雑に由来する雑種を含み得る。

20

【0032】

「魚類」として好ましくは養殖魚である。また、「養殖魚」は、例えば、食用、繁殖用、鑑賞用等の目的のために養殖される魚類を含み得る。

【0033】

本明細書において、「性成熟」とは、雌個体であれば排卵が認められることを意図し、雄個体であれば排精が認められることを意図する。

【0034】

「性成熟を促進」するとは、自然界或いは一般的な養殖下において成熟した平均的な同一種の個体の最短成熟月齢よりも早く産卵（或いは排卵）、又は排精可能になることを意図する。

30

【0035】

同一種の個体の最短成熟月齢を、例えば x ヶ月とすると、 x ヶ月より早い」とは、 $[x \text{ ヶ月} - 1 \text{ ヶ月}]$ 以下（「 $-$ 」は減算を意図する）を意図する。好ましくは、 $[x \text{ ヶ月} \times 0.2]$ ヶ月～ $[x \text{ ヶ月} \times 0.8]$ ヶ月、より好ましくは $[x \text{ ヶ月} \times 0.45]$ ヶ月～ $[x \text{ ヶ月} \times 0.75]$ ヶ月、さらに好ましくは $[x \text{ ヶ月} \times 0.45]$ ヶ月～ $[x \text{ ヶ月} \times 0.6]$ ヶ月を意図する。

【0036】

具体的には、非特許文献 1 によれば、ヒラメは雌個体であれば、ごくわずかな個体を除き、月齢 24 ヶ月以上で排卵が可能となる。また、非特許文献 1 において月齢 24 ヶ月未満で吸水卵（卵巣卵）を有する完熟期の卵巣を有する個体と、第 3 次卵黄球期の卵巣を有する個体がそれぞれ 1 個体ずつ確認されているが、いずれも 2 才直前であると記載されている。また、生産可能な受精卵を得たという報告もないため、個体の最短成熟月齢を示しているとは言えない。以上のことから、これらの個体が実際に産卵する際には、月齢 24 ヶ月を超えているものと考えられる。したがって、本明細書において、ヒラメの場合、「性成熟を促進」するとは、雌個体の場合、具体的には、受精した日を 0 日とし、受精した月を 0 ヶ月とした月齢において、24 ヶ月以下、好ましくは 10 ヶ月～18 ヶ月、より好ましくは 11 ヶ月～16 ヶ月さらに好ましくは 11 ヶ月～12 ヶ月で最初の排卵が可能になることを意図する。また、ヒラメは、非同期型多回産卵魚である。したがって、最初の排卵とは、その個体が第 1 回目の産卵期を迎えた際の第 1 日目の排卵を意図する。一方、

40

50

雄個体についても、「性成熟を促進」するとは、12ヶ月以下、好ましくは5ヶ月～12ヶ月、より好ましくは8ヶ月～12ヶ月で最初の排精が可能になることを意図する。ここで、月齢をカウントする際の「1ヶ月」とは、第0日目を起算日とし、第0日目から数えて第30日目を満了日とする。

【0037】

ここで、「排卵」は、卵巣から卵巣腔内に吸水卵が排出されることを意図し、腹部を圧迫すると卵を排出させることが可能である状態を意図する。「産卵」は、交尾行動に伴い雌個体が卵を排出することを意図する。

【0038】

また、魚類の月齢は、上述のとおり受精した月からカウント可能である。もし仮に、受精した月が明確でないとしても、年齢査定は1月1日を年齢基準日と仮定し、耳石の表面の不透明帯数に基づき行うことができる。すなわち、この基準で行けば、性成熟が促進された状態は、例えばヒラメの場合2歳未満である。

本明細書において、魚類の性成熟を促進するための方法は、レプチン受容体及びレプチンの少なくとも一方の機能発現を抑制する工程を含む。

【0039】

各魚類のレプチン受容体又はレプチンのmRNAは、各魚類のゲノムに存在するレプチン受容体又はレプチン遺伝子から転写されるものである限り制限されない。すなわち、各魚類のレプチン受容体又はレプチンのmRNAには、レプチン受容体又はレプチン遺伝子から転写されるバリエーション等を含み得る。

【0040】

例えば、*Paralichthys olivaceus* のレプチン受容体遺伝子は、Gene ID (NCBI): 109636534として登録されている。*Paralichthys olivaceus* のレプチン遺伝子は、Gene ID (NCBI): 109624291及び109632763として登録されている。

【0041】

Paralichthys olivaceus のレプチン受容体のmRNA配列は、NCBI Reference Sequence: XM_020098286.1として登録されている。また、*Paralichthys olivaceus* のレプチンのmRNA配列は、Reference Sequence: NW_017859644、及びNW_017859660として登録されている。各種魚類の具体例として、下記表1に示すレプチン受容体遺伝子、下記表2に示すレプチン遺伝子があげられる。

【0042】

10

20

30

40

50

【表 1】

種名	学名	GenBank ID (NCBI)	Gene ID (NCBI)
トラフグ	<i>Takifugu rubripes</i>	XM_029827573	100174783
ヨーロッパヘダイ	<i>Sparus aurata</i>	XM_030433806	115591642
ニジマス	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XM_021604608	110524724
キングサーモン	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	XM_042321277	112250617
ブラントラウト	<i>Salmo trutta</i>	XM_029707951	115158716
ホッキョクイワナ	<i>Salvelinus alpinus</i>	XM_024004689	111975995
タイセイヨウサケ	<i>Salmo salar</i>	NM_001164765	100303650
コイ	<i>Cyprinus carpio</i>	XM_019063286	109045413
ソウギョ	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	JQ080547	
ハクレン	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	KM068181	
アメリカナマズ	<i>Ictalurus punctatus</i>	XM_017480265	108272094
コウライギギ	<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	XM_027147262	113643163
コウライギギ	<i>Tachysurus fulvidraco</i>	XM_047814074	113643163
カイヤン	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	XM_034310139	113537103
アメリカナマズ	<i>Ictalurus punctatus</i>	XM_047158461	108272094
タマカイ	<i>Epinephelus lanceolatus</i>	XM_033622223	117254167
チャイロマルハタ	<i>Epinephelus coioides</i>	JX406149	
ナイルティラピア	<i>Oreochromis niloticus</i>	XM_005460448	100702842
ブルーティラピア	<i>Oreochromis aureus</i>	XM_005460448	100702842
カワスズメ	<i>Oreochromis mossambicus</i>	KC354703	
カラアカシタビラメ	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	XM_025065905	103395564
マサバ	<i>Scomber japonicus</i>	KP635451	
カンパチ	<i>Seriola dumerili</i>		111222157
ヒラマサ	<i>Seriola lalandi</i>		111645375
スズキ	<i>Lateolabrax japonicus</i>	KF850512	
ヨーロップスズキ	<i>Dicentrarchus labrax</i>	KF918755	
バラマンディ	<i>Lates calcarifer</i>	XM_018696399	108897025
ヨーロップウナギ	<i>Anguilla anguilla</i>	LN558791	

【 0 0 4 3 】

10

20

30

40

50

【表 2】

種名	学名	GenBank ID (NCBI)	Gene ID (NCBI)
トラフグ	<i>Takifugu rubripes</i>	NM_001032725	548631
ナイルティラピア	<i>Oreochromis niloticus</i>	NM_001301050 NM_001301049	100704227、100704338
ニジマス	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	XM_021564028	110490587
キングサーモン	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	XM_024379558	112218616
ブラントラウト	<i>Salmo trutta</i>	XM_029696522	115152051
ホッキョクイワナ	<i>Salvelinus alpinus</i>	XM_023972149	111953061
タイセイヨウサケ	<i>Salmo salar</i>	XM_014124944	106561227
アメリカナマズ	<i>Ictalurus punctatus</i>	XM_017465190	100304688
コウライギギ	<i>Tachysurus fulvidraco</i>	XM_027161401	11365239
マサバ	<i>Scomber japonicus</i>	KP635450 KP635449	
カンパチ	<i>Seriola dumerili</i>	XM_022749646	111224940
ヒラマサ	<i>Seriola lalandi</i>	XM_023408217	111656484

10

20

【0044】

レプチン受容体及びレプチンの少なくとも一方の機能発現を抑制する方法は、制限されない。例えば、機能発現の抑制は、レプチン受容体及びレプチンの少なくとも一方の機能欠損変異の導入、レプチン受容体及びレプチンの少なくとも一方の遺伝子の発現抑制、或いはレプチン受容体及びレプチンの少なくとも一方のタンパク質の機能の中和によって行われる。

【0045】

レプチン受容体及びレプチンの少なくとも一方に機能欠損変異を導入する方法は、対象の魚類のゲノムにおける対象遺伝子に対し機能欠損変異を導入できる限り制限されない。このような方法は公知である。例えば、機能欠損変異を導入する方法として、ゲノム編集法、相同組み換え法等の部位特異的突然変異誘発法；ランダム突然変異誘発法等を挙げることができる。

30

【0046】

ゲノム編集法は、ゲノム編集技術を構成するタンパク質及び核酸、またはこれらをコードするベクターを導入する方法を挙げることができる。前記タンパク質として、例えば、CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 酵素を挙げることができる。具体的には、前記CRISPR酵素として、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、CsF1、CsF2、CsF3、CsF4等を例示できる。前記核酸は、例えば、crRNAおよびtracrRNA、またはこれらがリンカーを介して連結された一本鎖核酸を挙げることができる。この場合、前記核酸は、例えば、crRNAにおける標的配列とアニールする塩基配列を、レプチン受容体及びレプチン遺伝子をコードする塩基配列と相補的な塩基配列に設計する。前記核酸は、1種類を単独で用いてもよいし、2種類以上を併用してもよい。CRISPR酵素を使用するゲノム編集システムとして、Clustered regularly

40

50

interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated protein 9 (CRISPR / Cas 9) システムを挙げることができる。また、他のゲノム編集システムとして、CompoZr Zinc Finger Nuclease (ZFN) システム、及び TAL effector nuclease (TALEN) システムから選択される少なくとも一種の方法を挙げることができる。好ましくは、Cas 9 を mRNA もしくはタンパク質で導入し、gRNA を sgRNA 或いは crRNA と tracrRNA の状態で導入する CRISPR / Cas 9 システムである。また、ベクターを用いた CRISPR / Cas 9 システムにおいて、CRISPR をコードする核酸と Cas 9 をコードする核酸は、異なるベクター上にあってもよく、また 1 つのベクター上にあってもよい。CRISPR を機能させるためのプロモーターは特に制限されないが、U6 プロモーターが好ましい。Cas 9 を機能させるためのプロモーターは特に制限されないが、サイトメガロウイルスプロモーター等の哺乳類細胞内で発現されるプロモーターが好ましい。CRISPR / Cas 9 システムとして好ましくは、pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 ベクター等の市販のベクターを使用することができる。

【0047】

CRISPR 配列に組み込まれる、レプチン受容体遺伝子、又はレプチン遺伝子を標的とする配列（以下、“標的配列”ともいう）は、CRISPR / Cas 9 システムによってガイド RNA (gRNA、sgRNA、crRNA ともいう) に組み込まれて転写されるか、標的配列に相補的な配列を含むガイド RNA として細胞に導入されレプチン受容体遺伝子、又はレプチン遺伝子を組換えることができる配列である限り制限されない。一般的には、標的配列としては、レプチン受容体遺伝子、又はレプチン遺伝子内に存在する塩基配列「NGG」（PAM 配列：N は部クレイオチド A、G、T、C のいずれか）の 5' 側上流域の 20 塩基前後の配列を選択することができるといわれている。標的配列は、Optimized CRISPR design tool (Massachusetts Institute of Technology, Zhang Lab のウェブページ (<http://crispr.mit.edu/>))、E-CRISP (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/> (ドイツがん研究センター))、ZiFiT Targeter (<http://zifit.partners.org/ZiFit/> (Zing Finger コンソーシアム))、Cas9 design (<http://cas9.cbi.pku.edu.cn> (北京大学))、CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp> (東京大学))、CRISPR-P (<http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/> (華中農業大学))、CRISPR RGEN Tools (<http://www.rgenome.net/> (ソウル大学)) 等において公開されている公知のデザインツールを使用してデザインすることができる。

【0048】

レプチン受容体遺伝子を標的とする配列としては、例えば 5'-CAGTGCCTCCTTCGGAGACTCGG-3' (配列番号 1) を挙げることができる。

また、好ましくは、PAM 配列に 1 塩基ポリモルフィズム (SNPs) が存在場合には、そのような配列を避けることが好ましい。標的配列に関し、個体の SNPs がわかる場合には、各 SNPs に合わせて配列を最適化することが好ましい。

標的配列の 5' 末端領域において、1、2、3、または 4 塩基、好ましくは、1、2、または 3 塩基短くてもよい。

【0049】

また、CRISPR / Cas 9 システムは、ベクターとして細胞に遺伝子導入してもよいが、人工合成、あるいは in vitro での転写により合成された gRNA、crRNA、trans-activating crRNA (tracrRNA)、および Cas 9 をコードする RNA を組み合わせて細胞に導入してもよい。或いは、Cas 9 タンパク質とガイド RNA を組み合わせて細胞に導入してもよい。

【0050】

さらに、上記ゲノム編集システムでは、一本鎖オリゴ（ssODNs）等のドナーオリゴDNAを共導入してもよい。ssODNsは、公知の方法にしたがってデザインすることができる。

【0051】

ゲノム編集システムは、受精卵、好ましくは1細胞期の受精卵の細胞質にマイクロインジェクションにより注入することができる。例えば、Cas9タンパク質を導入する場合、1受精卵あたり、5 pg～100 pg、好ましくは10 pg～80 pg、より好ましくは10 pg～50 pg程度の範囲で注入することができる。このときガイドRNAは、0.1 pg～50 pg、好ましくは0.5 pg～20 pg、より好ましくは1 pg～5 pg程度の範囲で注入することができる。

ゲノム編集技術を用いた変異の導入方法は、例えば、後述の実施例1を参照できる。

【0052】

ランダム突然変異誘発法として、例えば、 α 線、 β 線、 γ 線、X線等の放射線照射処理；メタンスルホン酸エチル（EMS）、エチルニトロソウレア（ENU）等の変異誘発剤による化学物質処理；重イオンビーム処理；等を挙げることができる。

【0053】

レプチン受容体及びレプチンの少なくとも一方の遺伝子の発現抑制を抑制する方法としては、レプチン受容体及びレプチンから選択される少なくとも一方のmRNAを標的とするRNA分子又は該RNA分子を発現することができるベクターよりなる群から選ばれる少なくとも一種を導入する方法を挙げることができる。「レプチン受容体及びレプチンから選択される少なくとも一方のmRNAを標的とするRNA分子」とは、レプチン受容体又はレプチンmRNAを標的とし、当該レプチン受容体又はレプチンタンパク質の発現を抑制できるものである限り、制限されない。例えば、siRNA、shRNA、dsRNA、miRNA等の標的mRNAを分解する作用を有するもの、および／または標的mRNAの翻訳を抑制するものを挙げることができる。これらのRNA分子の配列は、標的である上記遺伝子の塩基配列の情報に基づいて、当業者が公知の手法により適宜設計することができる。また、当該RNA分子は公知の手法に基づいて作製してもよく、市場に流通するものを入手して用いることもできる。上記RNA分子としては、siRNA、shRNAおよびmiRNAが好ましく、siRNAおよびshRNAが特に好ましい。上記レプチン受容体又はレプチンmRNAを標的とするRNA分子を発現できるベクターは、個体の体内、または細胞内で当該レプチン受容体又はレプチンタンパク質の発現を抑制するRNA分子を発現できる限り特に制限されない。例えば、ヘアピン型RNA発現ベクター等を挙げることができる。ヘアピン型RNA発現ベクターは、例えばU6プロモーター等の短鎖RNAの発現に適したプロモーター塩基配列の下流に、標的mRNAのセンス鎖と同じ配列（但しmRNAのウラシルはチミンに変わる）を有するセンス鎖DNA塩基配列と；転写後にループ構造を形成するループ塩基配列と；前記センス鎖DNA塩基配列と全体または一部が相補的に結合することができるアンチセンス鎖DNA塩基配列と；ターミネーター配列を少なくとも含む。ベクターは、プラスミドベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター等を例示することができる。

【0054】

siRNA、shRNAおよびmiRNAからなる群から選ばれる少なくとも1種のRNA分子は、マイクロインジェクションにより1受精卵あたり、5 pg～100 pg、好ましくは10 pg～80 pg、より好ましくは10 pg～50 pg程度の範囲で注入することができる。siRNA、shRNAおよびmiRNAからなる群から選ばれる少なくとも1種のRNA分子または該RNA分子を発現することができるベクターは、マイクロインジェクションにより1受精卵あたり、5 pg～100 pg、好ましくは10 pg～80 pg、より好ましくは10 pg～50 pg程度の範囲で注入することができる。ベクターは必要に応じて直鎖化することができる。

【0055】

タンパク質の機能の抑制は、レプチン受容体及びレプチンの一方に特異的に結合し、その結合により結合対象の機能発現を抑制する抗体よりなる群から選ばれる少なくとも一種を用いて行うことができる。当該抗体はポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体のいずれであってもよい。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は、いずれも当業者が公知の方法により適宜作成することができる。また、前記抗体は、F a b、F (a b) 2、ダイアボディ、s c F v、ミニボディ、ペプチボディ、ミメティボディ等の抗体フラグメントであってもよい。

抗体は、1 受精卵あたり、5 p g ~ 1 0 0 p g、好ましくは1 0 p g ~ 8 0 p g、より好ましくは1 0 p g ~ 5 0 p g 程度の範囲で注入することができる。

【0056】

受精卵から孵化した仔魚及び稚魚は、1 ~ 5 ヶ月間飼育し、レプチン受容体遺伝子に変異が誘導されている個体を変異解析方法、例えば、ヘテロ二本鎖移動度解析、Cel 1 アッセイ、T7 エンドヌクレアーゼアッセイ シーケンス解析等によって選抜する。月齢5 ~ 16 までの間、水温15.0 ~ 22.0℃程度で飼育する。日照時間は自然状態にて行うことができる。その他の飼育条件は、一般的な魚類の養殖条件で行うことができる。また、餌に関しても、一般的に養殖下において与えられるものを使用することができる。

【0057】

例えば、ヒラメの場合、受精卵から孵化した仔魚及び稚魚は、水温14.4 ~ 16.4℃程度で月齢2.6まで飼育した。レプチン受容体遺伝子に変異が誘導されている個体をヘテロ二本鎖移動度解析によって選抜する。月齢5.8まで水温16 ~ 19.3℃程度で飼育し、その後、月齢14.7まで水温14.3 ~ 20.6℃程度で飼育する。月齢14.7からは、水温15.6 ~ 22.2℃程度で飼育する。日照時間は自然状態にて行うことができる。その他の飼育条件は、一般的な魚類の養殖条件で行うことができる。また、餌に関しても、一般的に養殖下において与えられるものを使用することができる。

【実施例】

【0058】

以下に実施例を示して、本発明の態様についてより詳細に説明するが、本発明は実施例に限定して解釈されるものではない。

【0059】

1. レプチン受容体遺伝子欠損ヒラメの作製

レプチン受容体遺伝子の一部を欠損しているヒラメを作出し、野生型のヒラメと比較して、性成熟が促進されているか検討した。

【0060】

(1) 受精卵の作製

性成熟した雌雄のヒラメに対して、腹部を圧迫することにより、それぞれ、卵（未受精卵）および精子を採取した。得られた卵および精子について、人工授精させ、受精卵を取得した。

【0061】

(2) 変異の導入

変異の導入は、C a s 9 タンパク質およびガイドRNAを用いた。標的遺伝子の配列は、5' -CAGTGCCTCTTCGGAGACTCGG-3'（配列番号1）であり、RNAの合成は、F a s m a c 社が実施した。

【0062】

前記(1)で得られた1細胞期の受精卵の細胞質に、10 ~ 50 p g C a s 9 タンパク質、および1 ~ 5 p g ガイドRNAに調製した溶液を、マイクロインジェクション法より導入することにより、レプチン受容体遺伝子に変異を導入した。前記C a s 9 タンパク質と、ガイドRNAを導入した受精卵を通常の飼育条件で飼育し孵化させF 0 世代を得た。

【0063】

(3) F 1 世代の作製

前記(2)で得られたF 0 個体を性成熟させ、F 1 子世代のレプチン受容体遺伝子のホ

10

20

30

40

50

モ欠損個体及びヘテロ欠損個体を得た。標的遺伝子の改変配列は、前記（１）の８塩基（５'-TCGGAGAC-3'）の欠失であり、レプチン受容体遺伝子の機能欠損が生じた。

【００６４】

２．レプチン受容体遺伝子欠損ヒラメの生成熟期間の観察

（１）飼育条件

前記（２）のＦ０世代の孵化仔魚を０．５ｔ水槽にて水温１４．４～１６．４℃にて月齢２．６まで飼育した。月齢２．６に個体識別を行い、それぞれの個体に個体識別タグを標識し、レプチン受容体遺伝子に変異が誘導されている個体をヘテロ二本鎖移動度解析によって、３４個体選抜した。月齢５．８まで１ｔ水槽で、水温１６～１９．３℃にて飼育を行い、その後、月齢１４．７まで３ｔ水槽で、水温１４．３～２０．６℃にて飼育した。月齢１４．７からは、１０ｔ水槽で、水温１５．６～２２．２℃にて飼育した。日照時間は自然状態にて行った。

飼育中の温度条件を図１に示す。

【００６５】

（２）結果

図２（Ａ）にＦ０世代の雌個体のレプチン受容体遺伝子欠損ヒラメの排卵の有無、月齢５．１、１０．１、１２．４、１５．８、１６．１、１６．８における体重変化を示す。１６個体中半数の個体において月齢１５．８～１６．１において排卵が認められた。その卵が正常に受精及び発生、孵化することを確認した。

【００６６】

図２（Ｂ）にＦ０世代の雄個体のレプチン受容体遺伝子欠損ヒラメの排精の有無、月齢５．１、１０．１、１２．４、１５．８、１６．１、１６．８における体重変化を示す。１５個体中１３個体の個体において月齢１０．５において排精が認められた。その精子が正常に運動することを確認した。

【００６７】

図３にＦ０世代の雌個体のレプチン受容体遺伝子欠損ヒラメの体重変化を示す。図３（Ａ）は排卵が認められた群であり、図３（Ｂ）は排卵が認められなかった群である。

図４にＦ０世代の雄個体のレプチン受容体遺伝子欠損ヒラメの体重変化を示す。

【００６８】

一般的に雌個体のヒラメが性的に成熟し排卵できるようになるまで、２年かかると報告されている。また、雄個体の場合、性的に成熟し排精できるようになるまで、１年かかることが報告されている。

【００６９】

レプチン受容体遺伝子の欠損により、一般的に報告されている性成熟までの期間と比較して、雌個体であっても雄個体であっても短時間での性成熟が認められた。

【００７０】

このことから、ヒラメの体内においてレプチン受容体とそのリガンドであるレプチンの結合による情報伝達を阻害することにより、ヒラメにおいて性成熟の促進効果が得られることが示された。

【００７１】

３．Ｆ１世代のレプチン受容体ホモ欠損個体の雄個体の性成熟

Ｆ１世代のレプチン受容体ホモ欠損個体の雄（実施例の魚の子孫の個体）の性成熟を確認した。雄６個体のうち６個体で排精を確認した。その精子が正常に運動することを確認した。期間は月齢５であり、上記１．において作製したヒラメ月齢１０の排精と比較しても大幅に短縮していた。

【００７２】

４．Ｆ１世代のレプチン受容体ヘテロ欠損個体の雌個体の性成熟

Ｆ１世代のレプチン受容体ヘテロ欠損個体（実施例の魚の子孫の個体）の性成熟を確認した。雌２６個体のうち１個体で産卵を確認した。期間は３５８日齢であり、上記１．において作製したヒラメ１．４年齢の産卵と比較しても大幅に短縮していた。

【0073】

5. レプチン受容体遺伝子欠損トラフグの作製及び性成熟期間の観察

レプチン受容体遺伝子を欠損しているトラフグを作出し、野生型のトラフグと比較して、性成熟が促進されているか検討した。

【0074】

(1) 受精卵の作製

性成熟した雌雄のトラフグに対して、腹部を圧迫することにより、それぞれ、卵（未受精卵）および精子を採取した。得られた卵および精子について、人工授精させ、受精卵を取得した。

【0075】

(2) 変異の導入

変異の導入は、Cas9 mRNAおよびガイドRNAを用いた。標的遺伝子の配列は、5'-GTAGATGGAACAGCACACAGTGG-3'（配列番号2）である。1細胞期の受精卵の細胞質に、2～10 pg Cas9 RNA、および1～5 pg ガイドRNAに調製した溶液を、マイクロインジェクション法より導入することにより、レプチン受容体遺伝子に変異を導入した。前記Cas9 mRNAと、ガイドRNAを導入した受精卵を通常の飼育条件で飼育し孵化させF0世代を得た。

【0076】

(3) 系統の作製

前記(2)で得られた個体を性成熟させ、子世代のレプチン受容体遺伝子のホモ欠損個体を得た。標的遺伝子の改変配列は、前記(1)の4塩基の欠失であり、レプチン受容体遺伝子の機能欠損が生じた。欠失配列は5'-GTAGATGGAACAG----CAGTGG-3'（配列番号3）であった。

【0077】

(4) 性成熟期間の観察

前記(4)のF2世代のレプチン受容体遺伝子のホモ欠損個体を水温は自然水温で、日照時間は自然状態にて、2歳齢まで飼育した。催熟時のみ水温17℃、日照時間は14時間明期、10時間暗期にて飼育し、雌個体は2歳齢で産卵したことを確認した。

【0078】

6. レプチン受容体遺伝子欠損カワハギの性成熟期間の作製及び成熟期間の観察

レプチン受容体遺伝子（本遺伝子配列は公知でないためヌクレオチド配列は後述する）を欠損しているカワハギを作出し、野生型のカワハギと比較して、性成熟が促進されているか検討した。

【0079】

(1) 受精卵の作製

性成熟した雌雄のカワハギに対して、腹部を圧迫することにより、それぞれ、卵（未受精卵）および精子を採取した。得られた卵および精子について、人工授精させ、受精卵を取得した。

【0080】

(2) 変異の導入

変異の導入は、Cas9タンパク質およびガイドRNAを用いた。標的遺伝子の配列は、5'-CCCTCACGCAGTTCCTGAACGCG-3'（配列番号4）である。1細胞期の受精卵の細胞質に、10～50 pg Cas9タンパク質、および1～5 pg ガイドRNAに調製した溶液を、マイクロインジェクション法より導入することにより、レプチン受容体遺伝子に変異を導入した。前記Cas9タンパク質と、ガイドRNAを導入した受精卵を通常の飼育条件で飼育し孵化させF0世代を得た。

【0081】

(3) 変異導入のスクリーニング及び性成熟の促進の観察

前記(2)で得られた個体について、標的配列近傍をPCR法によって増幅し、変異導入がされた個体について、性成熟が促進されていることを観察した。

10

20

30

40

50

【0082】

7. レプチン受容体遺伝子欠損アユの性成熟期間の作製及び成熟期間の観察

レプチン受容体遺伝子（本遺伝子配列は公知でないためヌクレオチド配列は後述する）を欠損しているアユを作出し、野生型のトラフグと比較して、性成熟が促進されているか検討した。

【0083】

(1) 受精卵の作製

性成熟した雌雄のアユに対して、腹部を圧迫することにより、それぞれ、卵（未受精卵）および精子を採取した。得られた卵および精子について、人工授精させ、受精卵を取得した。

【0084】

(2) 変異の導入

変異の導入は、Cas9タンパク質およびガイドRNAを用いた。標的遺伝子の配列は、5'-AAAGTGTCCAATCAGGAAGGAGG-3'（配列番号5）である。1細胞期の受精卵の細胞質に、10～50 pg Cas9タンパク質、および1～5 pg ガイドRNAに調製した溶液を、マイクロインジェクション法より導入することにより、レプチン受容体遺伝子に変異を導入した。前記Cas9タンパク質と、ガイドRNAを導入した受精卵を通常の飼育条件で飼育し孵化させF0世代を得た。

【0085】

(3) 変異導入のスクリーニング及び性成熟の促進の観察

前記(2)で得られた個体について、標的配列近傍をPCR法によって増幅し、変異導入がされた個体について、性成熟が促進されていることを観察した。

【0086】

8. レプチン受容体遺伝子欠損マサバの性成熟期間の作製及び成熟期間の観察

レプチン受容体遺伝子（本遺伝子配列は公知でないためヌクレオチド配列は後述する）を欠損しているマサバを作出し、野生型のマサバと比較して、性成熟が促進されているか検討した。

【0087】

(1) 受精卵の作製

性成熟した雌雄のマサバに対して、腹部を圧迫することにより、それぞれ、卵（未受精卵）および精子を採取した。得られた卵および精子について、人工授精させ、受精卵を取得した。

【0088】

(2) 変異の導入

変異の導入は、Cas9タンパク質およびガイドRNAを用いた。標的遺伝子の配列は、5'-TTCTGGTCTGCTGAGATATGAGG-3'（配列番号6）である。1細胞期の受精卵の細胞質に、10～50 pg Cas9タンパク質、および1～5 pg ガイドRNAに調製した溶液を、マイクロインジェクション法より導入することにより、レプチン受容体遺伝子に変異を導入した。前記Cas9タンパク質と、ガイドRNAを導入した受精卵を通常の飼育条件で飼育し孵化させF0世代を得た。

【0089】

(3) 変異導入のスクリーニング及び性成熟の促進の観察

前記(2)で得られた個体について、標的配列近傍をPCR法によって増幅し、変異導入がされた個体について、性成熟が促進されていることを観察した。

【0090】

9. レプチン受容体遺伝子欠損ニジマスの性成熟期間の作製及び成熟期間の観察

レプチン受容体遺伝子を欠損しているニジマスを作成し、野生型のニジマスと比較して、性成熟が促進されているか検討した。

【0091】

(1) 受精卵の作製

10

20

30

40

50

性成熟した雌雄のニジマスに対して、腹部を圧迫することにより、それぞれ、卵（未受精卵）および精子を採取した。得られた卵および精子について、人工授精させ、受精卵を取得した。

【0092】

（2）変異の導入

変異の導入は、Cas9タンパク質およびガイドRNA#1又はガイドRNA#2を用いた。標的遺伝子の配列は、5'-CCCTGCTCTGCCTCACCTGTGGA-3'（配列番号7）、又は、5'-AGGGAGAGTTGATTCTGAGCTGG-3'（配列番号8）である。1細胞期の受精卵の細胞質に、10～50 pg Cas9タンパク質、および1～5 pg ガイドRNAに調製した溶液を、マイクロインジェクション法より導入することにより、レプチン受容体遺伝子に変異を導入した。前記Cas9タンパク質と、ガイドRNAを導入した受精卵を通常の飼育条件で飼育し孵化させF0世代を得た。

10

【0093】

（3）変異導入のスクリーニング及び性成熟の促進の観察

前記（2）で得られた個体について、標的配列近傍をPCR法によって増幅し、変異導入がされた個体について、性成熟が促進されていることを観察した。

【0094】

10．レプチン受容体遺伝子欠損ティラピアの性成熟期間の作製及び成熟期間の観察

レプチン受容体遺伝子を欠損しているティラピアを作出し、野生型のティラピアと比較して、性成熟が促進されているか検討した。

20

【0095】

（1）受精卵の作製

性成熟した雌雄のティラピアに対して、腹部を圧迫することにより、それぞれ、卵（未受精卵）および精子を採取した。得られた卵および精子について、人工授精させ、受精卵を取得した。

【0096】

（2）変異の導入

変異の導入は、Cas9タンパク質およびガイドRNA#1又はガイドRNA#2を用いた。標的遺伝子の配列は、5'-CTCTCTGCGTTCAGGTGCCGTGG-3'（配列番号9）、5'-CCTTCAGCCACCTTGGTGTGGA-3'（配列番号10）である。1細胞期の受精卵の細胞質に、10～50 pg Cas9タンパク質、および1～5 pg ガイドRNAに調製した溶液を、マイクロインジェクション法より導入することにより、レプチン受容体遺伝子に変異を導入した。前記Cas9タンパク質と、ガイドRNAを導入した受精卵を通常の飼育条件で飼育し孵化させF0世代を得た。

30

【0097】

（3）変異導入のスクリーニング及び性成熟の促進の観察

前記（2）で得られた個体について、標的配列近傍をPCR法によって増幅し、変異導入がされた個体について、性成熟が促進されていることを観察した。

【0098】

11．レプチン受容体遺伝子欠損キジハタの性成熟期間の作製及び成熟期間の観察

レプチン受容体遺伝子（本遺伝子配列は公知でないためヌクレオチド配列は後述する）を欠損しているキジハタを作出し、野生型のキジハタと比較して、性成熟が促進されているか検討した。

40

【0099】

（1）受精卵の作製

性成熟した雌雄のキジハタに対して、腹部を圧迫することにより、それぞれ、卵（未受精卵）および精子を採取した。得られた卵および精子について、人工授精させ、受精卵を取得した。

【0100】

（2）変異の導入

50

変異の導入は、C a s 9 タンパク質およびガイドRNAを用いた。標的遺伝子の配列は、5'-TCCACTCCTGAGTGCACTGCAGG-3'（配列番号11）である。1細胞期の受精卵の細胞質に、10～50 pg C a s 9 タンパク質、および1～5 pg ガイドRNAに調製した溶液を、マイクロインジェクション法より導入することにより、レプチン受容体遺伝子に変異を導入した。前記C a s 9 タンパク質と、ガイドRNAを導入した受精卵を通常の飼育条件で飼育し孵化させF0世代を得た。

【0101】

（3）変異導入のスクリーニング及び性成熟の促進の観察

前記（2）で得られた個体について、標的配列近傍をPCR法によって増幅し、変異導入がされた個体について、性成熟が促進されていることを観察した。

【0102】

11. レプチン受容体遺伝子欠損ホンモロコの性成熟期間の作製及び成熟期間の観察

レプチン受容体遺伝子（本遺伝子配列は公知でないためヌクレオチド配列は後述する）を欠損しているホンモロコを作成し、野生型のキジハタと比較して、性成熟が促進されているか検討した。

【0103】

（1）受精卵の作製

性成熟した雌雄のホンモロコに対して、腹部を圧迫することにより、それぞれ、卵（未受精卵）および精子を採取した。得られた卵および精子について、人工授精させ、受精卵を取得した。

【0104】

（2）変異の導入

変異の導入は、C a s 9 タンパク質およびガイドRNA # 1 又はガイドRNA # 2、ガイドRNA # 3を用いた。標的遺伝子の配列は、5'-GACTGAATGGCTCTGGATACTGG-3'（配列番号12）、5'-AAGATTAAGCACCAGGCCTCAGG-3'（配列番号13）、5'-ACTCGGCTTCACCTGAGGCCTGG-3'（配列番号14）である。1細胞期の受精卵の細胞質に、10～50 pg C a s 9 タンパク質、および1～5 pg ガイドRNAに調製した溶液を、マイクロインジェクション法より導入することにより、レプチン受容体遺伝子に変異を導入した。前記C a s 9 タンパク質と、ガイドRNAを導入した受精卵を通常の飼育条件で飼育し孵化させF0世代を得た。

【0105】

（3）変異導入のスクリーニング及び性成熟の促進の観察

前記（2）で得られた個体について、標的配列近傍をPCR法によって増幅し、変異導入がされた個体について、性成熟が促進されていることを観察した。

【0106】

<レプチン受容体遺伝子配列>

・カワハギ (*Stephanolepis cirrhifer*)

tacgcccgcgcgcatgcgtgtcaaaggtcaaagccgtcatgtgacgaggctgttggtccctcacgcagTTCCT
GAACGCGGCCCGGACTTCTGGAGGATTCTCCAAGACCATCCGAACAGACCTCAGACCAA
AGTCACCCTGTTGTTCAAGgaagtcgacacgtcaggtctctcgtactgtgtggatggttttctaaccag
caccggagctccagtggctctgtgacaaccgagcggatcgagccggccgcctccttcagcttcgactggaacc
agaggcccgagaatgtgactgtgatggcctacaacagtttggggaactccagcaacaacagcttcaggtgct
ggacagacagcccaaacgtcgtgcgtgcgCTCCTTCAGCGTGCAGGTGGTCAACCCATCCTGC
GTCTCCCTGACGTGGACGCTGTTTGAGAACTGCTCCACCCCGACTTCATGGTGGTCCA
GTGGTCTCTCGCGGAGGCACCAGGGCTCCGCCACCACCGCAGGCTGCAGGGCGGACACA
CCTGGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
TGATCGTCTTCTTCTCTCTGTCGTCCTGTTTGTACCCCTCATCATCTCGCAGCAAAAaa
tgaagaagtttgtgtggaaggaggtgcccgacccagcaagtgctcctgggccaaggagtggtgacTTCAG

10

20

30

40

50

tgctgactacatgttgctgattatcatcaccttcctagccatcgtcctcatcatcactctcatgttggtccagaacc
acatgaagaagctgatgtggagaaaggttcctaaccccaaccgctgctcctgggcgcaaggaagagacttcc
ggaaggcagagacatggaccagctgttcagacacccagacggtttccctgcctggcctctcctcctggtgtct
gagaccatctctgaggtggtgatcatggagaagagcagccttcctctcctgctctctctccagctccggaccc
cgtccctgggcaaggccctcccagaggcctccctggccctcgccctcctccacccccagcgaaggctctggc
tctgggttccccaggacatcagagacctcgggccagtcgtcggtcgctacgctactgttctcctctccaacaa
gccaagcctcctccgcaagcaagatggaggtagcagctccagcgacgaggggaacttctccgccaacaattc
ggacatttctggctccttcctgaggggtgtggtggggctggacacctgcggaccggaggggcctgacaccag
acattcacgctctttcaactccgtggaggagtctccgaaacatcgagcagaggaggacgagggcgttgggggg
ggaggggagagggggaggagagggggaggggggaggagaagagcctgtactatctagatatgggctgtccg
caaaggaggaggaggaggaggaagaggaggaggaggaggaggaggaggaggagggttggaagaaaggaa
aacactgcttctccaggaacgggaggcgttgtgggcggagcctaactctccgcttgggcggggcgacccag
gttcgagtgcagggaggcggagtcaggtgacatggttgaggcgtggctctttacctgcctcagtttaggact
ggccccggcagacctggtacagagggaaggccagacagcgccctccagctgtga (配列番号 16)

【0108】

・マサバ (*Scomber japonicus*)

ATGAACACAACAATGGTTTGGTCTGTAATGTTGTGTCAGTCCTGATGCATATTTTCCTGGT
GTCCCATGGTGCCCTGTGTTTGGAGCCCGAGGAGGTTGCCTCTCTTCAGGCAGGTGCTC
TGAACCTCCCATGGCAGGATGAGCTGTGCTGTGATTACCGTCAGCCACCTCACTGTG
AAGGTGGACGGTGTGCACGCACTGGAGACAAACCACTCTGAATCAAGCCTCCCACACTA
TGCTCACTGCAACTTCAGGAGCCTGACAGCCACATCACATCCTCACAAGCCCTCTGGTG
GCACCTGTTTGGACATGCTGTGCAGAATTGATGAAAAGTGGGAGAGTTTGACTTGTGAT
CTTCAGTCTCACGACCCGCCTTCAGACACAATGAATACTGCTCTTATGGCAATTAGCTT
ACAGCATCTGCTCTCCAAGAAAAAGGGCTCAGAGGTGAATTATGGGAATGACGCATCTT
ATAACCTGTGCTGTGTAAGCAGAGGATTCCTTCATGTGCTCACTCCCACTTGACACT
ACGACAAGCTTTGTTACCATGGTGACTGTCAGCATCGCTGAAGCTGTAGCTCCGCCAAT
TCTGCTCAGAGTTCCTGCCCCGACCTGTGAAACCCAGTCCTCCGGTCAACCTTTCACATA
TGCAGACTATTGAGGCAGAACTGATTTTACACTGGGACGACCCAGAAGACATTGATTCT
GGTCTGCTGAGATATGAGGTCCGATACTCTTCTAACACCAATCATCCAGCCTGGCAGGT
GGTTTCTGTACCCGCAGAGCCCAGGATGCTTCTGGATTTGAAGCCCAGACTGAACTACA
CTATCCAGGTTTCGCTCCGGCTTGATGAACCCCCACTGTGGAGTGACTGGAGTGAACCC
TACCACATTTACCTGGACACGGTGAGCTACATCCCTGAGAAAGTGGTGGCGCGCCCGGG
AGAGAACGTAACAGTTTATTGTGTATTCAACGACCACAGCATCAATGCCAGCACGGCCA
TGTGGATGCTCAACTTCCAACAGCCGCTTCATCGCAGCCAGTACCACCCAGTCAACCAG
TGGGTCAGCCAGATCACAGTGCGCCCTTCAGAGACTCGAATGTATGACCTGCTGCAGTG
CACGCAGGAGTGGAACATCCCCTACAGCCAGATCTATGTAGAAGGAGCATCCATTGATA
TAAAATGTGAAACCAACGGTGATATTGATGCTATGGACTGCAGCTGGAAGAACACACAG
TGGACTAAACCCAAATTCCTATCCAGGTGGGCTGATCTGCCATGTGATGTAATGGAGGA
AAGGGAGAGAGCAGGTGAGAGTGTGGGAGAGATGGGACCTGTTTGCCTCTCTCAGAAAT
CCTGCACCATCCAGCCCCTGAGGATGAACTGCTACAAGTTGTGGCTGGAGGTGCCATCC
CGTCTGGGCCCTATCTGGTCCAAACCTGTCTACCTGTCAACCATAGATCATGTGAAACC
ACACACACCGACTAATGTGAGGGCAGTGAGCCGGAGCAGCGGGGTCTGACGATCACAT
GGGAACCACCTTCTCTGCCAGTTGAGGGGCTCCAGTGTCAGTTTCGTCTCCACTCACTG
TCCACTGTCAGAGCTCAGCCAGAGTGGAAGGTTTATAATCCAGTGCGGGTGCAATGGGC
GGAGGTTGCGGTTCCAGATATGTGCCGTGTGTATGTGGTGCAAGTGCGCTGCATGCACA
CCAACGGCACCGGCTACTGGAGCGACTGGAGTGACTCCATTTACTCTACGCCACAAAAT
AGCAGAGCTCCTGATCGTGGCCCTGATTTCTGGAGAGTTCTACAGGATGATCCATACAG
AAACCAAATAATGTTACTCTGCTATTTTCAGCCTCTCCTGACATCAGGGCACTCCTACT
GTGTGGATGGATTTATAGTCCAGCACCAAGTCTCAAGTGGCACTGTGATAAGGGAGCGG
ATCGAGCTGGTGTCTCTACAGCTTTGAGTGGAACCAGGAGGTCCAAACTGTCACCGT

10

20

30

40

50

GGAAGCCTACAATAGTCTGGGGAGCTCGGCTAACAACATCAATATGACACTGGGGAGAC
AGCCCAAACGCCGCTCTGTGCGTGCGTTCCGTGCGCTGGTTATCAACAGCACCTGTGTG
TCTCTGTCCTGGAGCCTGCTAGACAACAGCTCTGTCCCTCTATTTCATGGTGGTCCAGTG
GTTGCCACAGAGGCAACAGGACCCTCATCATCAAAAGGCCTGAGTGGAGAACCATGGG
TCAGAGTGCCTTACACTGATCGTCCTGTCTATTTAAGAGGTGATTTCTTTGGCTCTGAG
GAGTATGGGTTCTATCTGTATCCTGTGTTTGTGTAAGGAGAAGGGGAGCCAGCATACAC
TACAGCCACCAGAGGAGACCCTGCAGCCTACATGATGCTGATGATCATCTCCTTCCTCT
CCATCGTCCTGTTTGTACCCCTGGTCCTCTCCCAAACCAGATGAAAAAGTTTATGTGG
AAGGATGTGCCCAACCCAAACAAATGCTCCTGGGCTAAAGGACTGGACTTCAAAAAGGC
TGACACGTTTCGACCACCTTTTCCAACCGCCAGAGGGCCTGCCAGCCCGGCCACTGCTGC
TCCCTCTGAGAACATTTCCAAGTCGTTATTATGGAAAAGACTGACCTCTCAGCGCTG
ACCCCGCTTGTGTCCCTAAATCCCGACACAGCAACTGCCTTAGCTATCTCCATTCTTTCA
GGGTTTAACTCTGAGGTTGACCAAACCCGATCCATGGACAGTGAAGCGCTTCTGGGTGG
AGCTCCCTCCTTAACCTTGATATGGATGCTTTAACCGCCTCAAGCCTGAGGACAGATG
AGTTACAGCTTGTGACCTCCCAAGAACAGATCAGCTGCCAGGCACCAATAACAACAGT
GCACAGTCCTCAGTCACTTATGCCACTGTGCTGCTCATTAATCCAAGCAGGAGCAGCA
GCCCATTTCATCTCCACTACAAGGATGGTAGTGGCAGCAGCTCCAGTGATGAGGGCAATT
TCTCTGCTAACAACTCAGACATTTCCAGGATCTTTCCCGGTGGCCTGTGGGAGCTGGAG
AGCTGCCGAGGTGGGGAGATGGATGACCCGCGACGCTCCTGCTCCTATAACTCCGTGGA
GGAGCTTTCTGAAACATCTGAGCAAGAAGATGAGGAGGAGGTGAGAGAAGGGAAACAC
CTGTATTATCTCGGTATGGACTATCCAGCGGAGGATGAGGAGAGTGACGAAGAAGAGGA
GCAGAGAGAGGAAGATACAAAACTGAGCTGCTCACAAGTGTTGTTTTGAACAGAGATG
CCTGCTCTGTGGAGTCACACCCATTGCTTGGCCCTGTGGACTCGAGTGATAACAGTGAG
ATGGATTTCAGCATCAACACGTGGCTTTTCCCTGCTGTACATGCCTCAGTTCAGAACTGC
ACCATGCACGAGGCAACTCACAGATTAA (配列番号 17)

【0109】

・キジハタ (*Epinephelus akaara*)

ATGGACTCGGACAAAAGAAGAGCCGGACACAAAGCCAGGGGAAACTTCCAGGAGCGTTT
GAGATTCACCCAGACAAAGCCAGCCAGGCCATGCTCACGCTATGACTACTACAATGG
TTCGGTCTGTTATACTGACAGCCCTGATGCACTTGTTCCTGGTACCCCATGGTGCTCAG
TGTTTGGAGCCTGAAAACGGAGCCTCTGACCATTTCAGGTGCCCTGGACCTCCCGTGGCA
GGATGAGCTGTGCTGTGACTCACCTTCAGCCCACCTCACTCTGGAGGGAGACGACATGC
ACGCACCGGAGACAAACCGCTCTGAATCAAACCTCCACAACATCCCTCTGCAGCTTC
AGGGGCTCGACAAGCGAATCACATCCACGTGAGCCCTCTGGCGTGAAACCAAGTCCTCC
AGTCAACCTGTTACATAATCAGACCATTGAGGCAGACCTGATTTTACAATGGGACGACC
CGTCAGACTCTGATACCAGTCCACTGAGATACGAAGTCCGATACTCTTCTAACACCACT
CATCCACAGTGGCAGGTGGTGTCTGCACCTGGAGAGCCCAGGTTGTCTCTGGAGCTGAA
GCCCAGACTGAACTACACCATCCAGGTTTCGCTGCTCCGGCCTGGAAAACCCGCCAGTGT
GGAGCGACTGGAGCGAACCTTATCACATCTACCTGGACACGGTGAGCTACATCCCTGAG
AAAGTGGTGGCACGGCCGGGGGACAACGTACGGTGTATTGTGTGTTCAATGACCACAG
CATCAACGCCAGCACGGCCATGTGGATGCGCAACTTCCAACAGCGGCTTCATAGCAGCC
AGTATCACCCAGTTAACCAGTGGGTGAGCCAGATCACAGTGCCTTCAGAGTCTCGG
ATGTACGACCTCCTGCAGTGCCTCAGGAGTGGACCATCCCGTACAGCCAGATCTATGT
ACAAGGAGCTTCCATAGATATTACATGCGAAACCAACGGTGACATCGACGCGATGACCT
GCAGCTGGAAGAGCACACAGTGGACAAGAATCAAATTCAGATCCAGGTGGGCTGACCTG
CAGTGCGACGCGATGGAGGAAAGGGAGCGAGCGGGGGAGAAAGTGGGGGAGTTGGGGC
CCTCGTGCTGCAAGTCCGATCCAAGCAGAAAACCTGCACCATCCAGCCTCTCAGGATG
AACTGCTACAAGCTGTGGCTGGAGGTCCCGTCCCGACTGGGCCCCATCAGGTCTAAACC
CATCTACCTGTCCCCCATCGATCATGTGAAACCCCACTACCCACTAATGTGAAGGCAG
TGAGCAGAAGCAGCGGGGTCTGATGATCTGTGGGAGCCTCCGCTCTGCCAGTCGAAGG

10

20

30

40

50

GCTCCAGTGT CAGTTTCGGTACCACTCACCTCCGCTGTGAGAGCCCAGCCGGAGTGGA
AGAGGATGTTCTGACATGGACTCAGCTGATCCAGAGTCCAGTGCGGGTGCCATGGGCGG
AGGTCTTAGTGCCGGACATGTGCCGGGTGTATGTTGTACAAGTACGCTGCATGCACACC
AACGGCACCGGCCATTGGAGCGAATGGAGCGATTCCGGTCTACTCCACACCTCAGAACAG
CAGAGCTCCTGAGCGAGGCCCGATTCTGGAGAGTCTTCAAGATGATCCGTACAGAA
ACCAGACGAATGTCACTTTGCTGTTGAGCAGCAGCATCTCCAATATCAGGACGGTCT
TACTGCATAGATGGATTTATAGTGCAGTACCAGGCGTTGAGTGGCTCTGTGACGAGGGA
GCAGATCGAGCTGGCGTCCTCCTTCAGCTTTGAGTGGAACCAGGTGCCCCAACTGTGA
CGGTGGAGGCCTACAATAATCTGGGGAGCTCCGCCAACAACTTCAACATGACGCTGGAG
AGACAGCCTAAACGCCGCGAGTGTGCGCTCGCTCAGCGTGTGTTGTTTATCAACAGCACCTG
TGTGACTCTGTCCTGGACTCTGCTGGACAACAACCTCTGTGCCTCTGTTTCATGGTGGTCC
AGTGGTCTCCACATAAGCAACAGGACTCAGATCATCAGAAAGGCCGGATTGGAGAAACA
TGGGCCAGACTGCCCTACACCGACCATCCCATCTACCTGAAAGGTGATTTCTTTGGCTC
TGAGGAGTGTGGCTTCTACTTGTACCCTGTGTTTGTGCTGATGGAGAAGGGGAGCCGGTGT
ATGCTATAGCTTCCAGAGGAGACCCTGCAGCCTACATGATGCTGATGATCATCTCTTTC
CTCTCCATCGTCCTGTTTGTACCCCTGATCCTACCCAAAACCAAATGAAAAGGTTTGT
GTGGAAGGATGTGCCCAACCCCAACAAGTGCTCCTGGGCCAAAGGACTAGACTTAAAAA
AGGCTGACAACTTTGACCACCTGTTTCAACCTGCAGAGAGCCTGTGAGCCTGGCCGCTG
CTCCTGCCAGCTGAGAACATTTCAAAAGTCGTCATAGTGGATGAAGCTGATCTCTCAGC
TCTGACTACGGCTTTAATCCAAGTCCCATTGTGTCCCTGACTCCTGACCCAGCCACTG
CTTTATCTATCTCCCTTCTCCAGGGTATGACTCGGAGGTGACCAAGCCCAGCCCATG
GAGAGTGAGGTGCTTGTGAGTGGAGCTCCATCCCAGCTCATGGAGCAGCCGCCAATTCA
TCTCCACTACAAAGATGGCAGTGGCAGCAGCTCCAGTGACGAGGGCAATTTCTCTGCCA
ACAACTCAGACATTTCTGGATCTTTCCCCGGCGGCCTGTGGGAGCTGGAGAGCTGCCGT
GGTGGAGAGATAGACGACCCTCGGCGCTCCTGCTCCTACAACTCTGTGGAGGAGCTTTC
TGAAACATCAGAGCAAGAGGATGAGGAAGAGGAGGCGAGAGAAGAGAAGGACTTATAT
TATCTAGGAATGGACTACCCAGCGGAGGATGAGGAGAGCGAGGAAGACAAGGAGCAGA
TAGAAGAAGAGACAGATATTGAGCTACTTAAAAATGTGGTTTTGAGCAGGGAGGACTGC
TCTGTGGAGTTGCACCCTTTGCTCAGCCCTGAGGACTCGAGCGAAGTTGCTGTTAGCGT
CAACACGTGGTTTTTCTCGCTGTACCTGCCTCAGTTCAGAACTGCTCCATGCACGAGG
AAACTCACAGCTCAACCGCATGA (配列番号 18)

【0110】

・ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*)

ATGATGTATTTGTTTATCTTGCTTTCGCTTCTTGCGAATTTTCATTACCGTTTCAACAAGGT
CTTGCTGCTCTGAATCCTTCGGATGGCAGGGGAGTTTATGAAGACCTGAAGTGGAAGTC
TCTGCTATGTTGTGAGCTGCCCTTTGCTCAGACAGTTGACAGTGGTCTTTCAGAACACC
GACCAGTAGAACCGTGTCAGCTGCTAAATGTTACAAAACCGGAATCCTCTAGTAAATCA
CTTGCCCTTTTCTGGAACTGTTTGGACATCCTGTGCTGGCTTGAAGGTGAACGGACAAA
TTTGATTTGTAATGCAAAGAGCCACGGAGAAGCAGCCACTGCCAGTCTGTTCACTGTTA
GTCCTCAACAATTAGTTCTACAGATGGATATACTTTCAGAAAAAAACCATAGTGCTCAG
TGTGCTGGGGAAGATACTACCACGTGCTCCGTTTTCTTTCATGGCAATGATGCAACTGT
CTCGTTGACCATCAGTATATCTGTGAATGGGACTACTGCACTGTCAACGGAGATGCAAA
TCAGCACATATCATCTAAGAAGACCAGACCCACCTGTCAATCTGCATTACAATGTGACG
ACAGAAGACGAAGTCATTTTCAGATGGAGTAGCACACAACCTGACAGTAATGACATAAA
CTATGAGATCCGATACTCTTCCAATTCTCGCTTCAGCAGTGGGAGGTGGTGAAGGTCA
GAGGTCATTCATGGGTACCTCTGAATGAGCTCAGTTTTGGGATCAGATACACAGTCCAA
GTGCGCTGCCAAAACCTACTTCCATTACTGGAGTGAATGGAGCCAACCTTTCTATACACT
AGACGTGAGTTACATCCCTGCTGAAGTCTCCACAACGCCTGGGTGAGGTAACGGTTT
ATGCCGTCTTCCACAACCGCAGCTGGAGTGCAGCAAGCTGTGTGGATGCTAAACGGG
CATGAGAAGATTCCGGAAAGCCAGTACAGGGTAATCAACGAGCAAGTTCGTGCTGTCAC

10

20

30

40

50

TATAAGGGTAGATGAACCCAGGTTTGATTCTCTGATGTGCTGCCACTTGGGAGGAGAGC
GGGTCAAATGCCCCATCGCCTATGGCAAATATACACCGAAGGGAGTTTTAATGCAGAT
ATTACCTGCGAGAGCAAGATTTAGAGGTGGACACCACTCTGGATTGTGAGTGGAATAA
AAGCGCTTGGGCACTGGTCAGACTCCTTTACAGACAATATATATCAATATGTGAAACCA
TATCAAAGATGCAGGGCATTGAAGAAGCTGAAGAAAACATGCCTTTGGTAAAGGAGTAC
CAAAGTGGAGCAGGAGACTACAGAAAATACTCTTTAAGCAACCTTAGCCTGTACTCTTG
TTACGAAATCTGGTTGGAAGTGGAAGGAGGGCGTGGCAAAGTGAGATCATTTCTGTCT
ATGTTTCACCCATTGACCATGTGAAACCATCTCCTCCCTCAGTCCTTGAAGCGATCACT
TTGCCGAACAAAACCTTAAGCGTAAAGTGGAATATCCCGATTACTTGTATACAAAAT
GCAGTATGAGCTGCGCTTTGTGGCTTTGCGTGGGATGGCAAATACGCAATGGAAGGTCA
TCGGTCCTCTATTGGAAGCACAGGCAGAGATTCCGCTTGAAGATTCTGTGTTCAAGTTT
AATGTAGACGTTTCGCTGTAAAAGACTGAATGGCTCTGGATACTGGAGCAAATGGAGCGG
GAGTCACACTTCCATTGTTTACAACAGGAAAGCTCCTGAAATTGGACCAGACTTCTGGC
GCATTATACAAGAGGATCCTGTTAGGAGCGTGACAAATGTCACACTGATCTTTAAGCAG
CCTATCCTAGCAGGAGATCCATATAGTTGTGTGGAGGGTCTCAAGATTAAGCACCAGGC
CTCAGGTGAAGCCGAGTGGTCAAAGAAACGGCCTTGATTCAAGTTTCACTCATTCCAGT
GGAAGAAGGAAGCACACACAGTCACCGTAATGTCTCGCAACGCTTTGGGCTTCTCTACA
CGGAATAGCAACATGACGCTGTTACATCAACCCAAACGACGATGTGTACGGTCATTAG
CGCAGTTGCAAATGCGAGCTGTGTGCATCTCTCCTGGAGCCTGTTACCTGATCAACTGG
TGCCTCAATCGTTTGTATCGAGTGGTTAGACCTGAACAAAGATCCTGAACAGGACGGG
TCTCTAACGGAGAGGCTACAGTGGGTGAGAGTTTATTCCGCATCCAGGGATATCTCTCT
TTGCCGTCGTTTTTATGGCTCGGAGGAGTTCACATTGTATCCAGTGTTTGTGGATGGTG
AGGGGGAGCCGGTTCGATACACAGTTACTAGGAGCGACTCTGCTGCCTACATACTGCTA
CTGATCATTGCGTTCCTGTCTGTGGTGCTGTTTGTACACTCATGATGTCACAAAACCA
GATGAAAAAACTTGTGTGGAAGGATGTTCCAAATCCCAACAACCTGCTCCTGGGCCAAAG
GAATGGACTTCAGGCAGATTGACACCATGGAGAACCTGTTCCCTCACTCAGAAGGTCTC
ACGGCCTGTCCACTGCTGCTGGTCTCCGAGAGCATCTGCGAGGTGGAAATCGAGAAATG
TCATCCTCTCAACCTTGAACATGGAAAAGACAATGAAGTACTCCTTTATAACTCGGAAG
ACAAGACAACCACCGACTCTGCCCCGTCTGGGAGACTCCTCTGAACCTTTATCACTGGAG
GCTTCCACTGCTGCTGCTACCCCAAGAACATCAGGCCAGTCTCGGTGACATACTCGAC
CGTCTCCTCGCCGATCAGCCCGCTCTCCTTCGAAAGCAGCAGGAGAGTCTGAGCAGCT
CCAGCGACGAAGGCAACTTCTCTGCTAACAACCTCAGACATTTCCGGCTCCTTCCCTGGA
GGAATCTGGGACCTGGAGAACCACGTGTGCTCTGACAGCACCAATCCTCGCCATTCCAG
CTCCTACAACCTCCGTGGAAGAGTTCTCGGAAACATCAGAACAAGATTACGAAGCATCGG
AAAGCACTGGTGTAGCCAAAGACCTCTACTACCTTGATATGAATGAAGAGGAGAAGCAG
GACAAAGAAGAGGATGAGGAAGCTCAGGATGGACAGGATAAGAATGAAATGGTTATGA
GGGTGGATGCCAGGCCTCTTCTGGAAGGCCAAAAATTCCACAGACGTCGATTCCAATAAT
GTATCTCACAGCGTTCCGCTTTATCTGCCTCAGTTTCGAACTGAATGCATCAATCCACC
ATGA（配列番号19）

【要約】

【課題】魚類のレプチン受容体及びレプチンの少なくとも一方の機能発現を抑制する工程を含む、魚類の性成熟を促進するための方法。

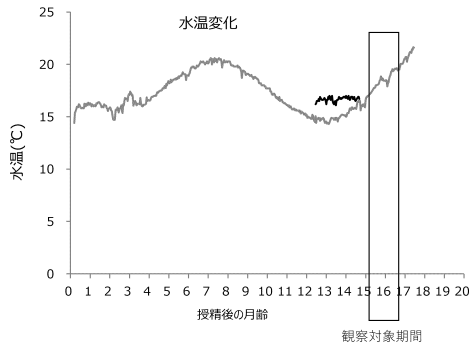
【解決手段】本発明は、自然界或いは通常の養殖条件下よりも高い確率で、1歳齢で排卵、又は排精可能な魚類の個体を取得するため、魚類の性成熟を促進するための方法を提供することを課題とする。

【選択図】なし

【図面】

【図 1】

〔図 1〕



【図 2】

〔図 2〕

(A)メス

測定日		2020/9/11	2021/2/15	2021/4/27	採卵試験① 2021/8/11	採卵試験② 2021/8/19	採卵試験③ 2021/9/10
タグ	排卵 (○有:×無)	体重 (g)					
		月齢5.1	月齢10.1	月齢12.4	月齢15.8	月齢16.1	月齢16.8
6904	○8	48.8	520	810	1080		1,050
6923	○7	52.2	580	850		1250	1,190
6941	○6	44	560	870			1,320
6884	○5	64.6	600	1020	1360	1320	1,450
6979	○4	71.8	720	1060	1460		1,480
6952	○3	41.3	600	930			1,510
6907	○2	54.7	640	940		1440	1,520
6874	○1	67.8	720	1090			1,570
6986	×1	44.5	640	970	1800		1,800
6921	×2	62.1	620	1010			1,620
6880	×3	57.7	660	1060			1,540
6933	×4	45.7	560	900			1,480
6872	×5	67.1	580	900			1,430
6894	×6	63.2	540	740			1,320
6871	×7	60.89	580	780			1,270
6978	×8	23.4	220	370			690

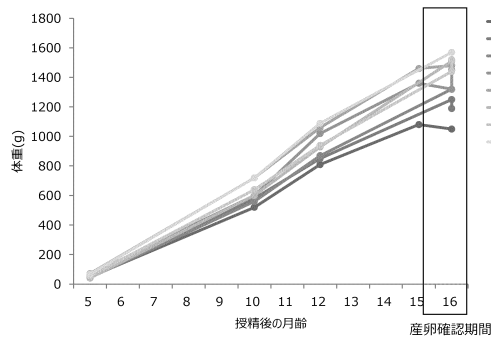
(B)オス

タグ	排卵 (○有)	体重 (g)					
		月齢5.1	月齢10.1	月齢12.4	月齢15.8	月齢16.1	月齢16.8
6893	○1	49.2	500	850			1,240
6919	○2	43.2	520	810			1,080
6883	○3	55.3	500	750			980
6950	○4	33.6	480	720			970
6967	○5	35.7	460	690			970
6878	○6	62.1	520	690			880
6924	○7	51.2	480	650			850
6939	○8	40.7	400	550			850
6947	○9	39.7	500	730			820
6970	○10	37.9	440	670			800
6912	○11	54.7	400	850			750
6988	○12	55.2	480	670			740
6934	○13	37.6	420	540			630
6928	排卵なし	60.2	420	600			970
6959	排卵なし	38.2	460	650			860

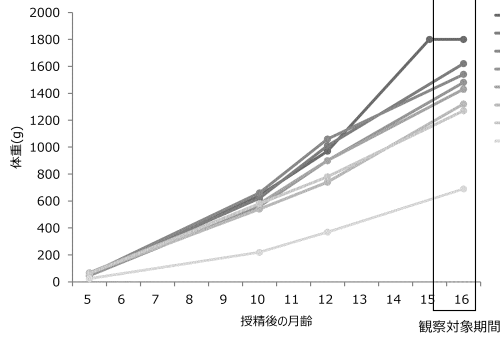
【図 3】

〔図 3〕

(A)産卵が観察された雌の体重変化

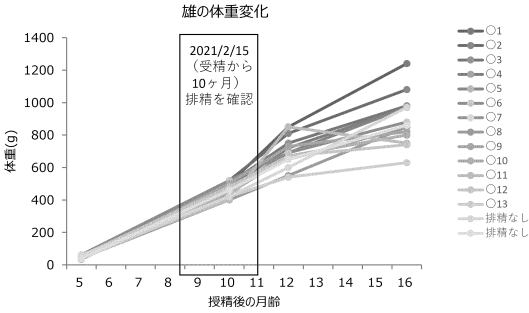


(B)産卵が観察されなかった雌の体重変化



【図 4】

〔図 4〕



【配列表】

0007350385000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I
C 1 2 N 15/63 Z

(56)参考文献

特開 2 0 1 4 - 1 4 7 3 7 8 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 9 / 0 2 7 3 2 6 (W O , A 2)

Tsakoumis, E. et al., "Impaired leptin signaling causes subfertility in female zebrafish", Mol. Cell. Endocrinol., 2022年, Vol. 546, 111595, pp. 1-13, Available online 6 February 2022

Hu, Z. et al., "Leptin and Its Signaling Are Not Involved in Zebrafish Puberty Onset", Biol. Reprod., 2022年, Vol. 106, pp. 928-942, Advance access publication date 17 January 2022

Blanco, A. M. et al., "Leptin signalling in teleost fish with emphasis in food intake regulation", Mol. Cell. Endocrinol., 2021年, Vol. 526; 111209, pp. 1-13

岸本謙太, "ナノジーン育種(欠失型ゲノム編集技術)による22世紀ふぐの開発", 第22回マリンバイオテクノロジー学会大会講演要旨集, 2022年05月28日, p. 16

吉浦康寿 ほか, "トラフグにおけるCRISPR/Casを用いた優良品種作出技術の開発", 平成27年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, 2015年, p. 27; 419

岸本謙太 ほか, "ゲノム編集技術を用いたマダイ品種開発の試み", 2014年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, 2014年, p. 65, 539

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 0 1 K 6 7 / 0 2 - 6 7 / 0 3 3

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)