

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7636756号
(P7636756)

(45)発行日 令和7年2月27日(2025.2.27)

(24)登録日 令和7年2月18日(2025.2.18)

(51)国際特許分類	F I			
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113		Z Z N A	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09		1 0 0	
A 0 1 K 67/60 (2025.01)	A 0 1 K 67/033		5 0 1	

請求項の数 14 (全28頁)

(21)出願番号	特願2022-559212(P2022-559212)	(73)特許権者	504137912 国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷七丁目3番1号
(86)(22)出願日	令和3年10月27日(2021.10.27)	(73)特許権者	000229519 日本八ム株式会社 大阪府大阪市北区梅田二丁目4番9号
(86)国際出願番号	PCT/JP2021/039717	(74)代理人	230104019 弁理士 大野 聖二
(87)国際公開番号	WO2022/092170	(74)代理人	100119183 弁理士 松任谷 優子
(87)国際公開日	令和4年5月5日(2022.5.5)	(74)代理人	100149076 弁理士 梅田 慎介
審査請求日	令和5年4月27日(2023.4.27)	(74)代理人	100173185 弁理士 森田 裕
(31)優先権主張番号	特願2020-179947(P2020-179947)	(74)代理人	100162503
(32)優先日	令和2年10月27日(2020.10.27)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 十脚目甲殻類の成長調節方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

AMPK、TBC1D7、TSC1、TSC2、Rheb、Akt、FOXO、PDK、PTEN、およびp27からなる群より選ばれる少なくとも1つの成長調節関連遺伝子と、

任意選択でさらに脱皮関連遺伝子としてのMIHを含む遺伝子の機能、または当該遺伝子の転写産物もしくは翻訳産物の機能を調節する工程を含む、十脚目に属する動物の成長を調節する方法。

【請求項2】

前記遺伝子が、成長調節関連遺伝子として、AMPK、TBC1D7、TSC1、TSC2およびPDKからなる群より選ばれる少なくとも1つを含み、前記工程が、当該成長調節関連遺伝子またはその転写産物もしくは翻訳産物の機能を阻害するよう調節することを含み、前記十脚目に属する動物の成長を促進するよう調節するものである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記成長調節関連遺伝子が、少なくともAMPKとTSC1またはTSC2を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記遺伝子が、成長調節関連遺伝子として少なくともRhebまたはAktを含み、前記工程が、当該成長調節関連遺伝子またはその転写産物もしくは翻訳産物の機能を増強す

るよう調節することを含み、前記十脚目に属する動物の成長を促進するよう調節するものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記遺伝子が、成長調節関連遺伝子として少なくとも R h e b または A k t を含み、前記工程が、当該成長調節関連遺伝子またはその転写産物もしくは翻訳産物の機能を阻害するよう調節することを含み、前記十脚目に属する動物の成長を抑制するよう調節するものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記遺伝子が、成長調節関連遺伝子として少なくとも P T E N を含み、かつ脱皮関連遺伝子として少なくとも M I H を含み、前記工程が、当該成長調節関連遺伝子および脱皮関連遺伝子またはそれらの転写産物もしくは翻訳産物の機能を阻害するよう調節することを含み、前記十脚目に属する動物の成長を促進するよう調節するものである、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 7】

前記遺伝子またはその転写産物もしくは翻訳産物の機能の調節が阻害であり、R N A 干渉法 (R N A i 法)、アンチセンス法またはゲノム編集による、前記遺伝子の発現の抑制により行われる、請求項 1 ~ 3、5 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

A M P K、T B C 1 D 7、T S C 1、T S C 2、R h e b、A k t、F O X O、P D K、P T E N、および p 2 7 からなる群より選ばれる少なくとも 1 つの成長調節関連遺伝子と、

20

任意選択でさらに脱皮関連遺伝子としての M I H とを含む遺伝子の機能、またはその転写産物もしくは翻訳産物の機能が調節されている、十脚目に属する動物。

【請求項 9】

前記遺伝子が、成長調節関連遺伝子として、A M P K、T B C 1 D 7、T S C 1、T S C 2 および P D K からなる群より選ばれる少なくとも 1 つを含み、当該成長調節関連遺伝子またはその転写産物もしくは翻訳産物の機能を阻害するよう調節され、前記十脚目に属する動物の成長を促進するよう調節されている、請求項 8 に記載の動物。

【請求項 10】

前記成長調節関連遺伝子が、少なくとも A M P K と T S C 1 または T S C 2 とを含む、請求項 9 に記載の動物。

30

【請求項 11】

前記遺伝子が、成長調節関連遺伝子として少なくとも R h e b または A k t を含み、当該成長調節関連遺伝子またはその転写産物もしくは翻訳産物の機能を増強するよう調節され、前記十脚目に属する動物の成長を促進するよう調節されている、請求項 8 に記載の動物。

【請求項 12】

前記遺伝子が、成長調節関連遺伝子として少なくとも R h e b または A k t を含み、当該成長調節関連遺伝子またはその転写産物もしくは翻訳産物の機能を阻害するよう調節され、前記十脚目に属する動物の成長を抑制するよう調節されている、請求項 8 に記載の動物。

40

【請求項 13】

前記遺伝子が、成長調節関連遺伝子として少なくとも P T E N を含み、かつ脱皮関連遺伝子として少なくとも M I H を含み、当該成長調節関連遺伝子および脱皮関連遺伝子またはそれらの転写産物もしくは翻訳産物の機能を阻害するよう調節され、前記十脚目に属する動物の成長を促進するよう調節されている、請求項 8 に記載の動物。

【請求項 14】

前記遺伝子またはその転写産物もしくは翻訳産物の機能の調節が阻害であり、体内に、R N A 干渉法 (R N A i 法) による前記遺伝子の発現抑制用の二本鎖 R N A またはベクター、前記遺伝子の機能が欠損した染色体、あるいは前記遺伝子の翻訳産物またはその受容体に対する阻害剤を含む、請求項 8 ~ 10、1 2 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の動物。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、十脚目甲殻類（エビ、カニ等）の成長調節方法、特に成長促進方法に関する。より詳しくは、本発明は、特定の遺伝子またはその転写産物もしくは翻訳産物の機能を阻害または増強することを含む、十脚目甲殻類の成長調節方法、特に成長促進方法に関する。

【背景技術】

【0002】

エビ、カニ等の十脚目甲殻類は、長らく日本における需要が世界で最も高く、エビの完全養殖技術は日本において世界で初めて確立された。近年では、エビ等の需要は国際的に急激に高まっており、エビ等の養殖は世界的な成長産業として注目を集めている。しかしながら、食用に特化した品種を数多くもつ畜産業と比較して、エビ養殖では確立された養殖品種が存在しない。とどまることなく高まりを続ける生産要求を満たすため、自然環境では存在しえない高密度条件の養殖生産を余儀なくされ、その結果、成長率の低下および大量斃死などエビ養殖の黎明期から続く問題が今なお継続している。エビ等の養殖には、強く早く大きく育つ品種を作る、またはそのように育つ方法を創出することで、高度に生産性を向上させる余地が残されている。一方で、例えば有害な十脚目甲殻類を小型化して外敵から食べられやすくする、性成熟を促進するために成長に使うエネルギーを減らす、といった目的のために成長を抑制する方法のニーズもある。

【0003】

これまで、エビ、カニ等の十脚目甲殻類の成長速度を向上させる方法としては、例えば、低分子リグニンおよび/または高分子リグニンを投与する方法（特許文献1）、所定のアミノ酸配列を有するペプチド（GHRP-6）を投与する方法（特許文献2）、所定の一般式で表されるコレステロールの脂肪酸エステルを投与する方法（特許文献3）などが提案されている。一方で、遺伝子の発現量を変動させる（抑制または亢進する）ことにより十脚目甲殻類の成長速度を向上させる方法は、例えばテナガエビのMIH（Molt-Inhibiting Hormone）遺伝子の発現をRNAiにより抑制することで、脱皮サイクルを加速できることが報告されているが（非特許文献1）、これまでほとんど知られていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【文献】WO2018/079641（特許第6344534号対応）

【文献】WO2003/080102（特許第4195865号対応）

【文献】特開平9-084527号公報

【非特許文献】

【0005】

【文献】Qial et al. PLoS One. 2018; 13(6): e0198861.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

特許文献1～3および非特許文献1に記載されているような従来の方法には、成長促進の効果（持続性、安定性など）において改善の余地があった。

【0007】

本発明は、エビ、カニ等の十脚目に属する動物（十脚目甲殻類）の成長を調節する手段、例えば成長を促進する手段であって、特に遺伝子の発現量を変動させることを含む手段を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、生物の成長に影響する環境情報の統括に関与しているmTORシグナル

10

20

30

40

50

伝達パスウェイ（本明細書において「mTORパスウェイ」と呼ぶこともある。）に含まれる遺伝子のうち、環境情報の伝達を仲介するTSC（Tuberous Sclerosis Complex）1/TSC2等の遺伝子に注目した。そして、後記実施例によって開示するように、十脚目甲殻類のモデル生物であるミステリークレイフィッシュを用いて、siRNAを用いたRNAi法によりTSC2等の機能を阻害したところ、優れた成長促進効果を確認することができた。また、本発明者らは、mTORシグナル伝達パスウェイに含まれる遺伝子のうち、細胞の利用できるエネルギー状態の悪化により活性化するAMPK（AMP-activated protein kinase）にも注目し、当該遺伝子の機能を阻害することによっても、優れた成長促進効果を確認することができた。本発明者らはさらに、mTORシグナル伝達パスウェイに加えて、PDK1-Aktシグナル伝達パスウェイ（本明細書において「Aktパスウェイ」と呼ぶこともある。）や、脱皮関連因子など、成長に関係するその他のシグナル伝達パスウェイも含めて、十脚目甲殻類（ミステリークレイフィッシュ）における、それらのパスウェイの上流および下流の遺伝子（因子）の発現量と個体の成長とを主成分分析により解析した。その結果、発現を抑制することにより成長が促進される、逆に言えば発現を増強することにより成長が抑制されると解釈可能な遺伝子群や、発現を増強することにより成長が促進される、逆に言えば発現を抑制することにより成長が抑制されると解釈可能な遺伝子群などを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づく総合的な技術的思想として、mTORパスウェイ、Aktパスウェイおよびそれらの上流因子、ならびに脱皮関連因子と、十脚目甲殻類の成長の促進および抑制の両方向への調節に係る本発明を完成させるに至った。

10

20

【0009】

すなわち、本発明は一側面において、下記の事項を提供する。

[項1]

mTORパスウェイ、Aktパスウェイならびにそれらの上流因子および下流因子からなる群より選ばれる少なくとも1つの成長調節関連遺伝子と、任意選択でさらに脱皮関連因子より選ばれる少なくとも1つの脱皮関連遺伝子とを含む遺伝子の機能、または当該遺伝子の転写産物もしくは翻訳産物の機能を調節する工程を含む、十脚目に属する動物の成長を調節する方法。

[項2]

前記遺伝子が、Akt、AMPK、FOXO、p27、PDK、PTEN、TBC1D7、TSC1およびTSC2からなる群より選ばれる少なくとも1つの成長調節関連遺伝子を含む、項1に記載の方法。

30

[項3]

前記遺伝子が、EcR、Kr-h1、MetおよびMIHからなる群より選ばれる少なくとも1つの脱皮関連遺伝子を含む、項1に記載の方法。

[項4]

前記遺伝子が、成長調節関連遺伝子として、AMPK、TSC1、TSC2およびPDKからなる群より選ばれる少なくとも1つを含み、前記工程が、当該成長調節関連遺伝子またはその転写産物もしくは翻訳産物の機能を阻害するよう調節することを含み、前記十脚目に属する動物の成長を促進するよう調節するものである、項1～3のいずれか一項に記載の方法。

40

[項5]

前記成長調節関連遺伝子が、少なくともAMPKとTSC1および/またはTSC2を含む、項4に記載の方法。

[項6]

前記遺伝子が、成長調節関連遺伝子として少なくともAktを含み、前記工程が、当該成長調節関連遺伝子またはその転写産物もしくは翻訳産物の機能を増強するよう調節することを含み、前記十脚目に属する動物の成長を促進するよう調節するものである、項1～3のいずれか一項に記載の方法。

[項7]

50

前記遺伝子が、成長調節関連遺伝子として少なくともAktを含み、前記工程が、当該成長調節関連遺伝子またはその転写産物もしくは翻訳産物の機能を阻害するよう調節することを含み、前記十脚目に属する動物の成長を抑制するよう調節するものである、項1～3のいずれか一項に記載の方法。

[項8]

前記遺伝子が、成長調節関連遺伝子として少なくともPTENを含み、かつ脱皮関連遺伝子として少なくともMIHを含み、前記工程が、当該成長調節関連遺伝子および脱皮関連遺伝子またはそれらの転写産物もしくは翻訳産物の機能を阻害するよう調節することを含み、前記十脚目に属する動物の成長を促進するよう調節するものである、項1～3のいずれか一項に記載の方法。

10

[項9]

前記遺伝子が、4EBP、Akt、FGF1、FOXO、ILP、PTEN、Rheb、S6K1、TSC1およびTSC2からなる群より選ばれる少なくとも1つの成長調節関連遺伝子と、任意選択でさらにEcR、Kr-h1、MetおよびMIHからなる群より選ばれる少なくとも1つの脱皮関連遺伝子とを含む、項1に記載の方法。

[項10]

前記遺伝子またはその転写産物もしくは翻訳産物の機能の調節が阻害であり、RNA干渉法(RNAi法)、アンチセンス法またはゲノム編集による、前記遺伝子の発現の抑制により行われる、項1～5、7～9のいずれか一項に記載の方法。

[項11]

20

mTORパスウェイ、Aktパスウェイならびにそれらの上流因子および下流因子からなる群より選ばれる少なくとも1つの成長調節関連遺伝子と、任意選択でさらに脱皮関連因子より選ばれる少なくとも1つの脱皮関連遺伝子とを含む遺伝子の機能、またはその転写産物もしくは翻訳産物の機能が調節されている、十脚目に属する動物。

[項12]

前記遺伝子が、Akt、AMPK、FOXO、p27、PDK、PTEN、TBC1D7、TSC1およびTSC2からなる群より選ばれる少なくとも1つの成長調節関連遺伝子を含む、項11に記載の動物。

[項13]

前記遺伝子が、EcR、Kr-h1、MetおよびMIHからなる群より選ばれる少なくとも1つの脱皮関連遺伝子を含む、項11に記載の動物。

30

[項14]

前記遺伝子が、4EBP、Akt、FGF1、FOXO、ILP、PTEN、Rheb、S6K1、TSC1およびTSC2からなる群より選ばれる少なくとも1つの成長調節関連遺伝子と、任意選択でさらにEcR、Kr-h1、MetおよびMIHからなる群より選ばれる少なくとも1つの脱皮関連遺伝子とを含む、項11に記載の動物。

[項15]

前記遺伝子またはその転写産物もしくは翻訳産物の機能の調節が阻害であり、体内に、RNA干渉法(RNAi法)による前記遺伝子の発現抑制用の二本鎖RNAまたはベクター、前記遺伝子の機能が欠損した染色体、あるいは前記遺伝子の翻訳産物またはその受容体に対する阻害剤を含む、請求項11～14のいずれか一項に記載の動物。

40

【発明の効果】

【0010】

本発明による十脚目甲殻類の成長調節方法を利用することで、養殖等の大規模な飼育環境下でも成長を促進したり、逆に用途によっては成長を抑制したりすることができるようになる。例えば、環境保全の観点から好ましい、遺伝子改変を伴わない特定遺伝子のノックダウンにより、高成長の十脚目甲殻類の個体を得ることもできるし、遺伝子改変により世代を超えて効果が受け継がれる十脚目甲殻類の高成長系統を得ることもできる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

50

【図1】図1は、実施例1における、TSC2機能阻害区(TSC2^{RNAi})と対照区としてのGFP機能阻害区(GFP^{RNAi})の成長の違いに関する結果を表す。[A]TSC2機能阻害個体(開始25日後)と対照区(開始31日後)の個体の体サイズの比較(開始時個体重はともに28mg)。[B]実験開始後の経過日数に対する個体重の推移。脱皮1日後に個体重の計測を行った結果に基づき、経過日数に対する個体重の関係を線形回帰分析により分析した。その結果、1日あたりの成長速度を示す回帰係数は、対照区に対してTSC2機能阻害区において約2倍の値を示した。[C]脱皮ごとの個体重増加率の推移。[D]脱皮ごとの脱皮間隔の推移。[E]脱皮ごとの個体重の推移。TSC2機能阻害区では、脱皮成長量が増加するとともに、実験期間内に脱皮が1回分早くなった。*: n = 7 ~ 9 ; Students' t-testまたはWelch's t-test ; P < 0 . 0 5。

10

【図2】図2は、実施例2における、TSC1およびAMPKの同時機能阻害区(TSC1^{RNAi}&K^{RNAi})(開始19日後)と対照区(GFP^{RNAi})(開始16日後)の体サイズを比較した写真である(開始時個体重はともに20mg)。

【図3】図3は、mTORシグナリングパスウェイの概略図である(Journal of Cell Science 122, 3589-3594. doi:10.1242/jcs.051011より引用)。

【図4】図4は、実施例4において作成した数理モデルを用いて脱皮前の個体の状態から予測された脱皮後の成長PC1の主成分得点と実際の脱皮後の成長PC1の主成分得点の関係を示す。

【図5】図5は、実施例4で得られた成長PC1との遺伝子発現量の相関を示す。[A]AktパスウェイおよびmTORパスウェイの上流リガンド候補因子との相関。破線で囲まれたFGF1およびILPの2因子のみにおいて有意な相関がみられた。[B]mTORおよびAktパスウェイを構成する因子のうち、成長PC1と特に高い相関がみられたもの一例としてRhebの遺伝子発現動態を示す。

20

【図6】図6は、実施例4の表6および表7の結果に基づき作成した、各遺伝子の発現動態と成長の関係を示したパス図モデルである。

【発明を実施するための形態】

【0012】

成長調節(促進または抑制)方法

本発明による、十脚目に属する動物(本明細書において「対象動物」と呼ぶことがある。)の成長を調節する方法(本明細書において「本発明の成長調節方法」と呼ぶことがある。)は、特定遺伝子またはその転写産物もしくは翻訳産物(本明細書において、これらの遺伝子、転写産物および翻訳産物を「特定遺伝子等」と総称することがある。)の機能を調節する工程(本明細書において「調節工程」と呼ぶことがある。)を含む。

30

【0013】

本発明の成長調節方法には、(I)対象動物の成長を促進する方法(本明細書において「本発明の成長促進方法」と呼ぶことがある。)と、(II)対象動物の成長を抑制する方法(本明細書において「本発明の成長抑制方法」と呼ぶことがある。)が含まれ、本発明の実施形態や用途により変動しうる。また、調節工程には、(i)特定遺伝子等の機能を阻害する工程(本明細書において「阻害工程」と呼ぶことがある。)、(ii)特定遺伝子等の機能を増強する工程(本明細書において「増強工程」と呼ぶことがある。)、および(iii)ある特定遺伝子等の機能を阻害し、他の特定遺伝子等の機能を増強する工程(本明細書において「抑制/増強工程」と呼ぶことがある。)が含まれ、本発明の実施形態により変動しうる。詳細は後述するが、特定遺伝子等には、(A)機能を阻害することにより対象動物の成長が促進され、逆に機能を増強することにより対象動物の成長が抑制される種類のものと、(B)機能を阻害することにより対象動物の成長が抑制され、逆に機能を増強することにより対象動物の成長が促進される種類のものとが含まれる。したがって、本発明の成長調節方法には、例えば、(I-i)特定遺伝子等の阻害工程を含む成長促進方法、(I-ii)特定遺伝子等の増強工程を含む成長促進方法、(I-iii)特定遺伝子の抑制/増強工程、つまりある特定遺伝子等の阻害工程と、他の特定遺伝子等の増強工程を含む、成長促進方法、(II-i)特定遺伝子等の阻害工程を含む成長抑制方法、(II-ii)特定遺伝子等の増

40

50

強工程を含む成長抑制方法、(II-iii) 特定遺伝子の抑制/増強工程、つまりある特定遺伝子等の阻害工程と、他の特定遺伝子等の増強工程を含む、成長抑制方法、などが含まれる。

【0014】

本発明における「対象動物」(十脚目に属する動物、十脚目甲殻類)の種類は特に限定されるものではなく、エビ、カニ、ヤドカリ、ザリガニなどと称されている各種の十脚目甲殻類を包含する。後記実施例で用いた、十脚目甲殻類としては飼育・繁殖が例外的に容易な淡水性エビ類、ミステリークレイフィッシュ(Procambarus virginalis)は、十脚目甲殻類のモデル生物として近年注目されており、本発明における対象動物の代表例といえる。対象動物としては、例えば、クルマエビ(Marsupenaeus japonicus)、ブラックタイガー(ウシエビ、Penaeus monodon)、パナメイエビ(Penaeus vannamei)など、養殖事業における重要性の高いものが好ましい。また、栽培漁業の対象となっているタラバエビ類、アカザエビ類、ガザミ類、タラバガニ類に加え、イセエビ類なども比較的重要な対象動物である。

10

【0015】

本発明における「特定遺伝子」は、「成長調節関連遺伝子」を含むことができる。本発明における「成長調節関連遺伝子」は、細胞分裂の制御機構または成長を指令する機構に関係する「mTORパスウェイ、Aktパスウェイならびにそれらの上流因子および下流因子」である遺伝子を指す。「mTORパスウェイ」の因子としては、例えば、4EBP、AMPK、mTOR、PRAS40、Raptor、Rheb、S6K1、TBC1D7、TSC1、TSC2などの遺伝子が挙げられる。「Aktパスウェイ」の因子としては、例えば、Akt、FOXO、PKD、PTENなどの遺伝子が挙げられる。「mTORパスウェイおよびAktパスウェイの下流因子」としては、例えば、細胞周期をコントロールしているp27などの遺伝子が挙げられる。「mTORパスウェイおよびAktパスウェイの上流因子」としては、例えば、FGF1、およびILP(Insulin-like peptide)などの遺伝子が挙げられる。なお、mTORパスウェイおよびその上流因子の遺伝子については、図3を参照することができる。成長調節関連遺伝子は、いずれか1種だけであってもよいし、2種以上の組み合わせであってもよい。また、成長調節関連遺伝子は、「mTORパスウェイの因子」、「Aktパスウェイの因子」、「mTORパスウェイおよび/またはAktパスウェイの上流因子」ならびに「mTORパスウェイおよび/またはAktパスウェイの下流因子」のいずれか1つの因子から選ばれる少なくとも1種の遺伝子であってもよいし、それらの複数の因子から選ばれる少なくとも2種の(各因子毎に少なくとも1種の)遺伝子であってもよい。

20

30

【0016】

本発明における「特定遺伝子」は、「脱皮関連遺伝子」を含むことができる。この実施形態において、特定遺伝子は、成長調節関連遺伝子を含まなくてもよい。本発明における「脱皮関連遺伝子」は、脱皮の制御機構に関係する「脱皮関連因子」である遺伝子を指す。脱皮関連遺伝子としては、例えば、E75、EcR、Kr-h1、Met、MIHなどが挙げられる。脱皮関連遺伝子は、いずれか1種だけであってもよいし、2種以上の組み合わせであってもよい。脱皮関連遺伝子は、例えば、E75、EcR、Kr-h1およびMetからなる群より選ばれる少なくとも1種、好ましくはKr-h1であってもよい。

40

【0017】

本発明の一実施形態において、「特定遺伝子」は「成長調節関連遺伝子」を含み、任意選択でさらに「脱皮関連遺伝子」を含むことができる。つまり、特定遺伝子は、少なくとも1種の成長調節関連遺伝子だけを含んでいてもよいし、少なくとも1種の成長調節関連遺伝子と、少なくとも1種の脱皮関連遺伝子の両方を含んでいてもよい。

【0018】

本発明の一実施形態において、「特定遺伝子」は「脱皮関連遺伝子」を含み、任意選択でさらに「成長調節関連遺伝子」を含むことができる。つまり、特定遺伝子は、少なくとも1種の脱皮関連遺伝子だけを含んでいてもよいし、少なくとも1種の脱皮関連遺伝子と、少なくとも1種の成長調節関連遺伝子の両方を含んでいてもよい。

50

【0019】

本発明の一実施形態における「特定遺伝子」（本明細書において「特定遺伝子0」と呼ぶことがある。）は、成長調節関連遺伝子として「4EBP、Akt、AMPK、FGF1、FOXO、ILP、p27、PDK、PTEN、Rheb、S6K1、TBC1D7、TSC1およびTSC2からなる群より選ばれる少なくとも1つの遺伝子」を含み、任意選択でさらに、脱皮関連遺伝子として「EcR、Kr-h1、MetおよびMIHからなる群より選ばれる少なくとも1つの遺伝子」を含むことができる。特定遺伝子0は、次に記載する「特定遺伝子1」および「特定遺伝子2」を統合したものである。

【0020】

本発明の一実施形態における「特定遺伝子」（本明細書において「特定遺伝子1」と呼ぶことがある。）は、成長調節関連遺伝子として「Akt、AMPK、FOXO、p27、PDK、PTEN、TBC1D7、TSC1およびTSC2からなる群より選ばれる少なくとも1つの遺伝子」を含み、任意選択でさらに脱皮関連遺伝子として「EcR、Kr-h1、MetおよびMIHからなる群より選ばれる少なくとも1つの遺伝子」を含むことができる。特定遺伝子1に含まれる成長調節関連遺伝子のうち、Akt、FOXO、PDKおよびPTENはAktパスウェイの因子であり、p27はmTORパスウェイおよびAktパスウェイの下流因子である。AMPK、TBC1D7、TSC1およびTSC2はmTORパスウェイの因子である。特定遺伝子1については、本明細書で後述する実施例1（表1）、実施例2（表2）および実施例3（表3）等を参照することができる。

【0021】

本発明の一実施形態における「特定遺伝子」（本明細書において「特定遺伝子2」と呼ぶことがある。）は、成長調節関連遺伝子として「4EBP、Akt、FGF1、FOXO、ILP、PTEN、Rheb、S6K1、TSC1およびTSC2からなる群より選ばれる少なくとも1つの遺伝子」を含み、任意選択でさらに脱皮関連遺伝子として「EcR、Kr-h1、MetおよびMIHからなる群より選ばれる少なくとも1つの遺伝子」を含むことができる。特定遺伝子2に含まれる成長調節関連遺伝子のうち、Akt、FOXOおよびPTENはAktパスウェイの因子であり、4EBP、Rheb、S6K1、TSC1およびTSC2はmTORパスウェイの因子であり、FGF1およびILPはAktパスウェイおよびmTORパスウェイの上流因子である。特定遺伝子2については、本明細書で後述する実施例4（表4、図5）等を参照することができる。なお、Akt、FOXO、PTENおよびTSC2は、特定遺伝子1および2のどちらにも該当し、本発明の技術的思想との関係によって、特定遺伝子1として扱うことも、特定遺伝子2として扱うこともできる。

【0022】

特定遺伝子（成長調節関連遺伝子および脱皮関連遺伝子）には、（A）機能を阻害することにより対象動物の成長が促進され、逆に機能を増強することにより対象動物の成長が抑制される種類のもの（本明細書において「特定遺伝子A」と総称することがある。）と、（B）機能を阻害することにより対象動物の成長が抑制され、逆に機能を増強することにより対象動物の成長が促進される種類のもの（本明細書において「特定遺伝子B」と総称することがある。）が含まれる。特定遺伝子Aとしては、（A1）特定遺伝子1のうちAMPK、FOXO、p27、PDK、PTEN、TBC1D7、TSC1、TSC2などの成長調節関連遺伝子、（A2）特定遺伝子2のうち、4EBP、FOXO、PTEN、S6K1、TSC2などの成長調節関連遺伝子や、Kr-h1、MIHなどの脱皮関連遺伝子（本明細書において「特定遺伝子2A」と総称することがある。）が挙げられる。特定遺伝子Bとしては、（B1）特定遺伝子1のうち、Akt、PTENなどの成長調節関連遺伝子、（B2）特定遺伝子2のうち、Akt、FGF1、ILP、Rheb、S6K1などの成長調節関連遺伝子や、EcR、Metなどの脱皮関連遺伝子が挙げられる。なお、PTENおよびS6K1は、特定遺伝子AおよびBのどちらにも該当するものであり、実施形態によって（例えば組み合わせる用いられる他の特定遺伝子の種類や、脱皮の回数によって）特定遺伝子Aとして扱うことも、特定遺伝子Bとして扱うこともできる。

10

20

30

40

50

【0023】

本発明の一実施形態において、特定遺伝子は、成長調節関連遺伝子としてAMPK、TSC1、TSC2およびPDKからなる群より選ばれる少なくとも1つを含むこと（つまり、特定遺伝子等として、少なくともAMPK遺伝子、TSC1遺伝子、TSC2遺伝子またはPDK遺伝子、あるいはこれらの転写産物または翻訳産物の機能を調節すること）が、対象動物の成長の調節に対する効果（例えば、機能を阻害したときの対象動物の成長を促進する効果）が向上するため好ましい。この実施形態では、特定遺伝子として、AMPK、TSC1、TSC2およびPDKからなる群より選ばれる少なくとも1つ（つまり、AMPK単独、TSC1単独、TSC2単独、PDK単独、またはそれらの任意の組み合わせ）のみを用いてもよいし、AMPK、TSC1、TSC2またはPDKとそれ以外の遺伝子（例えば、Akt、FOXO、p27、PTENおよびTBC1D7からなる群より選ばれる少なくとも1つの遺伝子（AMPK、TSC1、TSC2およびPDK以外の特定遺伝子1）、あるいは特定遺伝子2）とを組み合わせて用いてもよい。この実施形態については、本明細書で後述する実施例1（表1）および実施例2（表2）を参照することができる。

10

【0024】

本発明の一実施形態において、特定遺伝子は、成長調節関連遺伝子として少なくともAMPKとTSC1および/またはTSC2を含むこと（つまり、特定遺伝子等として、少なくともAMPK遺伝子とTSC1遺伝子および/またはTSC2遺伝子、あるいはそれらの転写産物もしくは翻訳産物の機能を調節すること）が、対象動物の成長の調節に対する効果（例えば、機能を阻害したときの対象動物の成長を促進する効果）が向上するため好ましい。AMPKは細胞の利用できるエネルギー状態の悪化を仲介する因子（遺伝子）であり、環境情報の伝達を仲介するTSC1/TSC2と組み合わせて用いる実施形態は、対象動物の成長速度を調節（例えば促進）する機能がより優れたものになることなどから、より好ましいものとなる。この実施形態については、本明細書で後述する実施例2（表2）を参照することができる。この実施形態では、特定遺伝子として、AMPKとTSC1および/またはTSC2のみを用いてもよいし、AMPKとTSC1および/またはTSC2とそれ以外の遺伝子（例えば、Akt、FOXO、p27、PDK、PTENおよびTBC1D7からなる群より選ばれる少なくとも1つの遺伝子（AMPK、TSC1およびTSC2以外の特定遺伝子1）、あるいは特定遺伝子2）とを組み合わせ用いてもよい。

20

30

【0025】

本発明の一実施形態において、特定遺伝子は、成長調節関連遺伝子として少なくともAktを含むこと（つまり、特定遺伝子等として、少なくともAkt遺伝子またはその転写産物または翻訳産物の機能を調節すること）が、対象動物の成長を調節するために（例えば、機能を増強したときの対象動物の成長を促進する効果の点、または機能を阻害した時に対象動物の成長を抑制する効果の点で）好ましい。この実施形態については、本明細書で後述する実施例1（表1）を参照することができる。

【0026】

本発明の一実施形態において、特定遺伝子は、少なくともPTENもしくはその他の（好ましくは特定遺伝子2に含まれる）成長調節関連遺伝子およびMIHを含むこと、またはPTENおよびMIHもしくはその他の脱皮関連遺伝子を含むことが、対象動物の成長を調節するために（例えば、機能を阻害したときの対象動物の成長を促進する効果の点で）好ましい。この実施形態については、本明細書で後述する実施例3を参照することができる。

40

【0027】

特定遺伝子等の機能を調節（阻害または増強）するための手段は特に限定されるものではなく、周知慣用の、または公知の、様々な手段を用いることができ、選択した手段に応じて適切な条件を設定することができる。

【0028】

50

特定遺伝子自体の機能を阻害するための手段としては、例えば、ゲノム編集技術（CRISPR-Casシステム、TALEN、ZFN）、またはその他の遺伝子組換え技術（古典的な相同組み換え法等）が挙げられる。例えば、CRISPR-Casシステムを採用する場合は、採用したシステムに応じた適切な要素（特定遺伝子の塩基配列に対応したcrRNA、tracrRNA、sgRNA等のRNA、およびCasタンパク質（Cas9、Cas3等）またはそれを発現させるためのmRNA、ベクター等）を、必要に応じて適切な細胞送達手段（リポソーム等）を併用して、適切な手法（注射、エレクトロポレーション、培養液への添加等）により、対象動物の個体、胚、卵等に投与することで、染色体上の特定遺伝子に変異（少なくとも一つの塩基の挿入、欠失、置換、および/または付加）を導入し、その機能を欠損させることができる。上記のようなRNA、ベクター、その他の必要な要素等は、常法に従ってデザインし、作製することができる。なお、特定遺伝子の種類によっては、同じ遺伝子がゲノム中に複数個含まれている（複数の位置に存在する）場合があるが、その場合は複数個の全ての遺伝子の機能を欠損させてもよいし、複数個のうちの一部（少なくとも1つ）を欠損させてもよい。

10

【0029】

特定遺伝子の転写産物（mRNA）の機能を阻害するための手段としては、例えば、RNA干渉法（RNAi法）、従来のアンチセンス法など、特定遺伝子の転写産物を分解したり、その転写産物からタンパク質への翻訳を阻害したりする方法が挙げられる。RNAi法では、特定遺伝子の発現を抑制するために、（a）RNA誘導サイレンシング複合体（RISC）に取り込まれることで、特定遺伝子のmRNA分解を誘導することのできる、特定遺伝子のmRNAの一部の塩基配列およびそれと相補的な塩基配列を含むsiRNA（合成された二本鎖RNA）、（b）siRNAを供給するためのヘアピンRNAである、shRNAを生成するためのベクター、（c）RISCの3末端側に結合することにより、特定遺伝子のmRNAからタンパク質への翻訳を阻害する、miRNAを生成するためのベクター、などを用いる。一方、従来のアンチセンス法では、特定遺伝子のmRNAと相補的な塩基配列を含む核酸を用いる。RNAi法、アンチセンス法などを採用する場合は、採用する方法に応じた上記のような適切な要素を、必要に応じて適切な細胞送達手段（リポソーム等）を併用して、適切な手段（注射等）により、対象動物の個体に投与することができる。上記のようなRNA、ベクター、その他の必要な要素等は、常法に従ってデザインし、作製することができる。

20

30

【0030】

特定遺伝子の翻訳産物（タンパク質）の機能を阻害するための手段としては、例えば、翻訳産物であるタンパク質自体に結合することで、その機能を阻害する化合物、抗体（中和抗体）、アプタマー、その他の阻害剤、または翻訳産物であるタンパク質と相互作用する他のタンパク質（受容体タンパク質、組み合わせさせて複合体を形成するタンパク質等）に結合することで、翻訳産物であるタンパク質の機能を阻害する化合物、抗体（中和抗体）、アプタマー、その他の阻害剤が挙げられる。上記のような化合物、抗体、アプタマー等の阻害剤は、適切な手法（注射、薬浴（水槽中への添加）等）により、対象動物の個体に投与することができる。特定遺伝子のタンパク質の機能を阻害するための化合物、抗体、アプタマー等の阻害剤としては、公知のものを用いてもよい（対象動物とは異なる動物における特定遺伝子等について阻害作用が認められているものであってもよい）し、デザイン、免疫、スクリーニング等の常法に従って新たに作製してもよい。

40

【0031】

特定遺伝子自体の機能を増強するための手段としては、例えば、特定遺伝子が挿入された発現ベクター（ウイルスベクタープラスミド、発現プラスミド等）を用いる、あるいは前述したようなゲノム編集技術等によりゲノム中の特定遺伝子のプロモーター領域に高発現プロモーターを挿入する、またはゲノム中の特定の領域（標的配列）に特定遺伝子を追加で組み込む（例えば、ゲノム中にもともと1個しかない遺伝子を2個以上にすることにより、特定遺伝子を過剰発現させる方法が挙げられる。これらの方法に応じた適切な要素（RNA、タンパク質、mRNA、発現ベクター等）は、常法に従ってデザインし、作

50

製することができ、また必要に応じて適切な細胞送達手段（リポソーム等）を併用して、適切な手法（注射、エレクトロポレーション、培養液への添加等）により、対象動物の個体、胚、卵等に投与し、細胞内に導入することができる。

【0032】

特定遺伝子の転写産物（mRNA）の機能を増強するための手段としては、例えば、そのmRNA自体を、必要に応じて適切な細胞送達手段（リポソーム等）を併用して、適切な手法（注射、エレクトロポレーション、培養液への添加等）により、対象動物の個体、胚、卵等に投与し、導入された細胞内で翻訳されるようにする方法が挙げられる。上記のような発現ベクター、mRNA、その他の必要な要素等は、常法に従ってデザインし、作製することができる。

10

【0033】

特定遺伝子の翻訳産物（タンパク質）の機能を増強するための手段としては、例えば、翻訳産物であるタンパク質と相互作用する他のタンパク質（受容体タンパク質、組み合わさって複合体を形成するタンパク質等）に結合することで、翻訳産物であるタンパク質と同等の機能を担う化合物、抗体（アゴニスト）、アプタマー、その他の増強剤（作動薬）を用いる方法が挙げられる。上記のような化合物、抗体、アプタマー等の増強剤（作動薬）は、適切な手法（注射、薬浴（水槽中への添加）等）により、対象動物の個体に投与することができる。特定遺伝子のタンパク質と同等の機能を担う化合物、抗体、アプタマー等の増強剤（作動薬）としては、公知のものを用いてもよい（対象動物とは異なる動物における特定遺伝子等について増強作用が認められているものであってもよい）し、デザイン、免疫、スクリーニング等の常法に従って新たに作製してもよい。

20

【0034】

対象動物に対して、調節（阻害および/または増強）工程をどのような形態で実施するかは特に限定されるものではなく、対象動物の種類に応じて、適切な状態（卵、胚、個体等）や段階（個体の脱皮のステージ等）において、調節工程を実施することができる。また、調節工程を実施するために必要な要素、例えば、調節が阻害である場合の、RNA干渉法における所定のsiRNA、ベクター等；ゲノム編集技術等によりゲノム中の特定遺伝子を改変（欠損等）するための要素、例えばCRISPR-Casシステムにおける所定のRNA、タンパク質、ベクター等；特定遺伝子のタンパク質またはそれと相互作用する他のタンパク質に対する阻害剤；調節が増強である場合の、特定遺伝子が挿入された発現ベクター；ゲノム編集技術等によりゲノム中の特定遺伝子またはそのプロモーター等を改変（挿入等）するための要素、例えばCRISPR-Casシステムにおける所定のRNA、タンパク質、ベクター等；特定遺伝子のmRNA；特定遺伝子と相互作用する他のタンパク質に対する増強剤（作動薬）等を、対象動物の個体に投与する場合、その投与のタイミング、回数、間隔、投与部位などは、発明の作用効果などを考慮しながら、適宜調節することができる。例えば、上記のような要素の投与は、例えば選択する特定遺伝子の種類に応じて、対象動物のライフサイクルにおける1番目の脱皮の前、2番目の脱皮の前（1番目と2番目の脱皮の間）、3番目の脱皮の前（2番目と3番目の脱皮の間）……などのいずれか1つのタイミングで、または複数のタイミングで行うことができる。投与回数は、例えば発明の作用効果の持続性などを考慮して、タイミングごとに、1回であってもよいし、適切な間隔で複数回行ってよい。投与量（体内への注射量、培養液中または水槽中の濃度等）は、例えば個体の大きさなどを考慮して、所望の成長調節（促進または抑制）効果が奏されるように設定することができる。投与部位（経路）は、特定遺伝子が発現する部位に応じて、全身投与であってもよいし、局所投与であってもよい。

30

40

【0035】

特定遺伝子等の機能を調節（阻害および/または増強）する程度は特に限定されるものではなく、所望の本発明の作用効果が奏されるよう、適切な手段および条件を用いることにより、調節することができる。特定遺伝子等の機能を阻害する場合、例えば、ゲノム編集等により特定遺伝子をノックアウトする、すなわち特定遺伝子等の機能を完全に阻害する（100%抑制する）ようにしてもよいし、ゲノム編集、RNAi法、アンチセンス法

50

等により特定遺伝子をノックダウンする、すなわち特定遺伝子等の機能をおよぼす程度阻害する（0%超、100%未満の範囲で抑制する）ようにしてもよい。例えば、本発明の成長調節（促進または抑制）方法を適用していない対象動物（コントロール群）と比較して、本発明の成長調節方法を適用した対象動物（処理群）において、特定遺伝子の転写産物または翻訳産物の発現量が、（1）統計学的に有意に低下している、および/または（2）1%以下、5%以下、10%以下、20%以下、30%以下、40%以下、50%以下、60%以下、70%以下、80%以下、90%以下、または95%以下に低下していることをもって、特定遺伝子等の機能が阻害されている（すなわち本実施形態における本発明の作用効果が奏されている）と評価することができる。一方、特定遺伝子等の機能を増強する場合、本発明の成長調節（促進または抑制）方法を適用していない対象動物（コントロール群）と比較して、本発明の成長調節方法を適用した対象動物（処理群）において、特定遺伝子の転写産物または翻訳産物の発現量が、（1）統計学的に有意に上昇している、および/または（2）110%以上、120%以上、140%以上、150%以上、160%以上、180%以上、2倍（200%）以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、8倍以上、10倍以上、または100倍以上に上昇していることをもって、特定遺伝子等の機能が増強されている（すなわち本実施形態における本発明の作用効果が奏されている）と評価することができる。

【0036】

「本発明の成長促進方法」または「本発明の成長抑制方法」それぞれの作用効果が奏されていることは、より直接的には、下記（1）または（2）の少なくとも一方が、投与からその後最初に迎える（1回目の）脱皮まで期間、1回目の脱皮とその次に迎える（2回目の）脱皮の間の期間、2回目の脱皮とその次に迎える（3回目の）脱皮の間の期間、...などのいずれか少なくとも1つの期間において、認められればよい。一例として、投与を対象動物のライフサイクルにおける1番目と2番目の脱皮の間に行ったらとすれば、「投与からその後最初に迎える（1回目の）脱皮」は、対象動物のライフサイクルにおける2番目の脱皮を指す。投与から、より後の期満において下記の事項が認められるほど、本発明の作用効果の持続性が高い、と評価することができる。

<成長促進方法>

（1）処理群における脱皮までの（または各脱皮間の）日数が、コントロール群よりも統計学的に有意に短くなる。

（2）処理群における脱皮後の（または各脱皮間の）個体重および/または個体長（全長、甲長等）の増加率が、コントロール群よりも統計学的に有意に高くなる。

<成長抑制方法>

（1）処理群における脱皮までの（または各脱皮間の）日数が、コントロール群よりも統計学的に有意に長くなる。

（2）処理群における脱皮後の（または各脱皮間の）個体重および/または個体長（全長、甲長等）の増加率が、コントロール群よりも統計学的に有意に低くなる。

【0037】

本発明の成長調節（促進または抑制）方法は、必要に応じて、上述したような調節（阻害および/または増強）工程以外の工程を含むことができる。そのような工程としては、例えば、調節工程による成長調節効果を確認したり、成長調節方法が適用された対象動物を実際に得たりするために、調節工程を経た対象動物の卵、胚を培養する工程や、そのような卵、胚から生まれた、またはその他の調節工程を経た、対象動物の個体を飼育（養殖等を含む）する工程が挙げられる。その際の培養、飼育（養殖）等の工程の実施形態は、基本的には、一般的な対象動物についてのそれらの工程の実施形態と同様であり、成長が調節されることに応じて、例えば食餌量、飼育密度等を適宜調節することができる。

【0038】

成長調節（促進または抑制）方法の適用後の対象動物

本発明による、十脚目に属する動物（本明細書において「方法適用済み動物」と呼ぶことがある。）は、上述したような本発明の成長調節（促進または抑制）方法が適用された

後の（適用することにより得られる）対象動物であって、特定遺伝子等特定遺伝子またはその転写産物もしくは翻訳産物）の機能が調節（阻害および/または増強）されているものである。

【0039】

本発明の方法適用済み動物は、適用された本発明の成長調節（促進または抑制）方法を反映した特徴を有する。例えば、本発明の成長調節方法において、前述したような特定遺伝子自体の機能を阻害するための手段（ゲノム編集技術等）が採用された場合には、方法適用済み動物は、特定遺伝子の機能が欠損した染色体を、体内に含んでいる。本発明の成長調節方法において、特定遺伝子の転写産物（mRNA）の機能を阻害するための手段（RNA干渉法等）が採用された場合には、方法適用済み動物は、特定遺伝子の発現抑制用の二本鎖RNA（siRNA）、またはその他の特定遺伝子の発現抑制用の要素（ベクター等）を、体内に含んでいる。本発明の成長調節方法において、特定遺伝子の翻訳産物（タンパク質）の機能を阻害するための手段（RNA干渉法等）が採用された場合には、方法適用済み動物は、タンパク質の機能阻害用の化合物、抗体、アプタマー等の阻害剤を、体内に含んでいる。一方、本発明の成長調節方法において、前述したような特定遺伝子自体の機能を増強するための手段が採用された場合には、方法適用済み動物は、特定遺伝子の発現ベクターを体内に含んでいるか、発現ベクターに由来する特定遺伝子を含む塩基配列が組み込まれた染色体、あるいはゲノム編集技術等により特定遺伝子の高発現プロモーターが挿入されたり、特定遺伝子が追加で組み込まれた染色体を体内に含んでいる。本発明の成長調節方法において、特定遺伝子の転写産物（mRNA）の機能を増強するための手段が採用された場合には、方法適用済み動物は、特定遺伝子のmRNAを（過剰発現の量で）体内に含んでいる。本発明の成長調節方法において、特定遺伝子の翻訳産物（タンパク質）の機能を増強するための手段が採用された場合には、方法適用済み動物は、特定遺伝子のタンパク質と同等の機能を担う化合物、抗体、アプタマー等の増強剤（作動薬）を体内に含んでいる。なお、「体内」は、上記のような各種の実施形態に応じて、方法適用済み動物の「細胞内」であってもよいし、「細胞外」（例えば体液中）であってもよい。

【0040】

上記のような、方法適用済み動物に含まれる、成長調節（促進または抑制）方法を反映した特徴となる物質は、常法に従って定量的または定性的に検出することができる。方法適用済み動物は、特定遺伝子等の機能が阻害または増強されているものであるが、本発明の成長調節方法との関係で前述したことと同様に、特定遺伝子等の機能がどの程度阻害または増強されているかは特に限定されるものではなく、所望の本発明の作用効果が奏されるようであればよい。

【0041】

例えば、十脚目に属する動物のある個体（試験個体）について、好ましくは齢期および脱皮サイクルが同じまたは近似の、本発明の成長調節（促進または抑制）方法を適用していない対象動物（コントロール群、野生群）と比較して、特定遺伝子の転写産物または翻訳産物の発現量が統計学的に有意に低下または上昇していれば、その試験個体は、特定遺伝子等の機能が阻害または増強されている、すなわち本発明の作用効果が奏されている、方法適用済み動物であると判定することができる。

【0042】

特に、（a）天然で（非人為的に）存在することが報告されていない、成長の促進または抑制の作用効果が認められる程度に、特定遺伝子の機能を欠損している染色体や特定遺伝子が組み込まれた染色体を有している個体、胚、卵等、（b）人工的に合成された（場合によっては非天然の核酸を含む）、特定遺伝子のmRNAの機能を阻害するためのsiRNA等のRNA、ベクター等、あるいは特定遺伝子のmRNAの機能を増強するためのmRNAを含んでいる個体、（c）特定遺伝子のタンパク質の機能を阻害するための化合物、抗体、アプタマー等の阻害剤、あるいは特定遺伝子のタンパク質の機能を増強するための化合物、抗体、アプタマー等の増強剤（作動薬）を含んでいる個体などは、本発明の方法適用済み動物であるとみなすことができる。

10

20

30

40

50

【実施例】

【0043】

以下、本発明の成長調節（促進または抑制）方法、方法適用済み動物などのより具体的な実施形態を実施例として開示するが、本発明の技術的範囲は実施例として開示した具体的な実施形態に限定されるものではない。当業者であれば、目的とする用途や作用効果に適應するよう、本明細書全体（図面を含む）の記載やそこから抽出される本発明の技術的思想に基づいて、実施例として開示した実施形態を拡張したり、他の様々な実施形態に改変したりすること、あるいは必要に応じて、従来技術（公知の発明）が備える技術的特徴をさらに組み合わせたり、従来技術（公知の発明）を併用したりできることを、当業者は理解することができる。

10

【0044】

[実施例1]

本実施例では、RNAi法により、特定遺伝子に含まれるTSC2、PDK、Akt、FOXOおよびp27それぞれの遺伝子（機能阻害区）、あるいはGFP遺伝子（対照区（GFP機能阻害区））をノックダウンした。ノックダウンには、それぞれTSC2、PDK、Akt、FOXO、p27およびGFPの下記の塩基配列を標的とするds（二本鎖）RNAである、「dsTSC2」、「dsPDK」、「dsAkt」、「dsFOXO」、「dsp27」および「dsGFP」を用いた。

【0045】

配列番号1：TSC2の標的配列

20

5' - ATACAGCGAGCAATGCGAGTACTTGACCTTATGAGGCATCAAGAACTCACAAA
TAGGGGTATTGTATGTGGCTCAAATCAAACCTTCAGAACAAGAAATTTTAAGGAATTCA
TGTGGTTCACTGCGTTACATGCATTTCTTCAGGGTTTAGGTACAGTCCTTGAGCTGAA
CTCTGTATCACAAAGATGAAGTATTCCTCGGTGGTCTTGACACCAAGGGTAACGATGGCA
AGCTAG -3'

配列番号2：PDKの標的配列

5' - AAACGATCGGACTTGGATTTTATCTTTGGCAAACCTTATAGGAGAAGGAAGTTTCT
CAAGCGTTTACCTTGCAAAGGACATACACAAATCAGGAATATGCAGTTAAGGTTTGT
GAAAAGCAGTTAATTATACGGGAGAAGAAAGTGCAGCAAATAACCAGGGAAAGGGATG
TAATGAACCTACTCAACAGCAACCAGAACCCTACGGCTCCGTTTTTCGTTAACTTTCT
TACGCCTTCCAAGGAGA -3'

30

配列番号3：Aktの標的配列

5' - GGTGGTCCAGGTGATGTAAGAGAGGTTTCAGAGTCATCCCTTCTATGTAACAATCA
ACTGGAACTTCTTGAAGAAAAAAGTTAACTCCACCATTCAAGCCACAAGTAACCAGC
GAGACTGACACCCGGTACTTCGATCGAGAATTCAGTGGAGAGTCTGTGCAGCTTACTCC
ACCTGATCAAGGGGAGCACCTTAATGTTATTGATGAAGAATCAGAATACTTGACTTTCA
ACCACTTCTTTATCAGGACATTTTATCAACTCTTGGCAGCTCACTAGCA -3'

配列番号4：FOXOの標的配列

5' - CCCATGTCCCCTGGTATAGGTGGGTGGGGTGGCGAGTACTGGCCTCACCATGCTC
ACCAACATCCACACCCGCACGACCGCTATGCCGACCAACTGGTAGACTCCATGGGGGAG
GGACTCAAGCTAGGACCGGACTCTTGGGGTGGCCCTGCTCGTCCGCCCAACCATCAGGA
CTGTATGAACTATCCCAGCTCTCCCC -3'

40

配列番号5：p27の標的配列

5' - CAATGGCATGTTTGGATGATGAATACTCGTGGAGCCCGCCTTCAGAAGCGGAACT
CAAAGTTATTGAGGCCAGACGGGAACGTAACAACAAGATATCATCCATAATGGGACAAT
ATCTTCTAAAGGATACAAAATGTTGGCTATAACATGCCAGTTTTCGAGTGCATTTTG
TTAGAGGATCGCATACAAAATAAATATTGCATCGGATGCAGTGAAGTTGATGCTGACAC
ATGGAAGGACAATCCAGCGGTTAGTGAAGAAGCAGCCAGAAGAGCAGTGGAAAGAAATTC
A -3'

配列番号6：GFP（pAcGFP-N1）の標的配列

50

5' - CACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGCTACATCCAGG
 AGCGCACCATCTTCTTCGAGGATGACGGCAACTACAAGTCGCGCGCCGAGGTGAAGTTC
 GAGGGCGATACCCTGGTGAATCGCATCGAGCTGACCGGCACCGATTTCAAGGAGGATGG
 CAACATCCTGGGCAATAAGATGGAGTACAACGCCCACAATG -3'

【0046】

表1に示した各群所定の個体数のミステリークレイフィッシュに、上記各dsRNAを注射により投与し、約1ヶ月間にわたって成長経過（脱皮までの日数および脱皮後個体体重増加率）を観察した。結果を表1および図1に示す。本実施例における5種の遺伝子のうち、TSC2の機能を阻害した場合に、最も安定的な成長促進効果が認められた（図1A）。より具体的には、TSC2の機能阻害は、脱皮の促進と脱皮あたりの成長量の増加の両方を達成し、その相乗効果で成長速度を通常約2倍に向上させることに成功した（図1B、C、D）。その結果、わずか3回の脱皮（飼育下における生涯寿命の5%以下の期間）で、個体重が通常よりも32%増となる顕著な体サイズ増加がみられた（図1E）。TSC2の機能阻害は、最終的にきわめて大きな体サイズの増加を十脚目甲殻類にもたらすものと期待される。また、PDK、FOXOおよびp27の機能阻害によっても、成長促進効果が認められた。一方、Aktの機能を阻害した場合は、脱皮までの日数が長くなり、成長速度が緩やかになった。このことから、Aktについては、逆に機能を増強することにより、成長促進効果を十脚目甲殻類にもたらすものと考えられる。

【0047】

10

20

30

40

50

【表 1】

RNAiを使用した特定遺伝子(TSC2, PDK, Akt, FOXO, p27)の
ノックダウン条件下における成長の変化(n = 5-10)

*: P < 0.05 (Student's t-test or Welch's t-test)

		dsGFP (control)	dsTSC2	dsPDK	dsAkt	dsFOXO	dsp27
インジェクションした dsRNA量(μg)		1	1	1	1	1	1
脱皮 1回目	脱皮までの 日数(日)	11.6±1.5	9.9±1.4*	10.4±0.9	14.0±1.7*	8.7±0.5*	12.0±0.8
	脱皮後個体重 増加率(%)	27.4±7.8	36.8±5.8*	32.8±6.2	22.8±6.4	23.5±9.9	14.1±6.5*
	日間個体重 増加率(%/日)	2.4±0.9	3.8±0.7*	3.2±0.8	1.7±0.6	2.7±1.2	1.2±0.6*
	Controllに 対する比率	1.00	1.56	1.32	0.70	1.13	0.49
脱皮 2回目	脱皮までの 日数(日)	12.6±2.9	7.9±1.0*	8.9±0.9*	12.3±1.3	9.3±2.2*	9.7±1.2*
	脱皮後個体重 増加率(%)	18.5±5.0	31.1±2.7*	34.5±5.8*	30.2±4.7*	26.5±3.2*	36.9±2.7*
	日間個体重 増加率(%/日)	1.5±0.4	4.0±0.7*	3.9±0.5*	2.5±0.6*	3.0±0.8*	3.9±0.6*
	Controllに 対する比率	1.00	2.68	2.60	1.69	2.02	2.60
脱皮 3回目	脱皮までの 日数(日)	10.0±1.2	8.9±0.8	9.8±1.6	12.3±1.2*	8.8±1.2	10.0±0.8
	脱皮後個体重 増加率(%)	25.5±2.0	33.2±5.2*	35.9±5.9*	26.2±2.9	29.3±4.8	28.7±4.9
	日間個体重 増加率(%/日)	2.6±0.4	3.7±0.4*	3.8±1.0*	2.1±0.3	3.4±0.9	2.9±0.6
	Controllに 対する比率	1.00	1.44	1.48	0.82	1.31	1.12

10

20

30

【0048】

本実施例の結果から、当業者であれば、TSC2と複合体を形成して働くTSC1およびTBC1D7についても同様に、本発明の作用効果が奏されるであろうことを理解することができ、TSC1については、次の実施例2においてそのことを確認している。

【0049】

[実施例2]

対象遺伝子をTSC1、AMPKまたはその両方に変更したこと以外は実施例1と同様にして、dsRNAをミステリークレイフィッシュに投与してこれらの対象遺伝子をノックダウンし、成長経過を観察した。ノックダウンには、それぞれTSC1およびAMPKの下記の塩基配列を標的とするdsRNAである、「dsTSC1」および「dsAMPK」を用いた。

40

【0050】

配列番号7：TSC1の標的配列

5' - CCCTGAATCGACACCCTTTACTCACCAATAAAGATCGGAAGCCAGTAANGTTGGC
AGTCGCCGAAGTGTGCTGCATTGTGTAGCCTTAAACTCAACACAAATGTAGGTAAGG
ACAACAGAGCCATCGTCTGCAGAGTTTGTAGAGGCCAGTTCTAGGTCCTTTGTACCTNTA
AAAAGGAACAAACCCCATTCAGTTTTCTGATCAGTGCCAAGACTTGTTTAATAGAGTG
GAAGCGATCTACCCTCCTCAAAGTAAGTTGCAGC - 3'

50

配列番号 8 : AMPK の標的配列

5' - TCAAGATTCTCAACCGCAAAACTATCAAGAATTTGGATATGGTCAGCAAGATAAA
 ACGAGAAATAACAAATCTTAAATTGTTTCGTCATCCACATATCATTAAACTGTACCAGG
 TGATCAGCACACCTACAGATATCTTTATGGTGATGGAATATGCTTCAGGAGGAGAGCTT
 TTTGACTATATTAAGAAAAAAGGAAAGCTGAAGGAATCTGAAGCTCGCAGGTTCTT -3'
 【 0 0 5 1 】

結果を表 2 に示す。dsTSC1 および dsAMPK それぞれを単独 (1 μg) で用いてこれらの遺伝子をノックダウンした場合も成長促進効果が認められたが、両方 (それぞれ 0.5 μg ずつ) を併用した場合には、より少ない投与量で成長促進効果が認められた。TSC1 / TSC2 複合体が貧酸素などの環境悪化をmTOR パスウェイの下流側に伝達する仲介を担うのに対し、AMPK は細胞の利用できるエネルギー状態の悪化をmTOR パスウェイの下流側へと伝達する役割を担う。このことから、AMPK の機能阻害は細胞が利用できるエネルギーが豊富に存在すると細胞に錯覚させる効果があると推測され、これにより成長促進が達成されたと考えられる。また、TSC1 とのダブルノックダウンによって、環境と栄養状態がともに良いと細胞に錯覚させ、さらなる成長促進へとつながったと推測される。本実施例の結果から、当業者であれば、TSC1 に代えてTSC2 をAMPK と共にノックダウンした場合であっても、同様に優れた成長促進効果が認められるであろうことを理解することができる。

【 0 0 5 2 】

【表 2】

RNAiを使用した特定遺伝子(TSC1, AMPKまたはその両方)の
 ノックダウン条件下における成長の変化(n = 8-10)

*: P < 0.05 (Student's t-test or Welch's t-test)

インジェクションした dsRNA量 (μg)		dsGFP (control)	dsTSC1	dsAMPK	dsTSC1 & dsAMPK
1		1	1	1	各0.5
脱皮 1回目	脱皮までの日数(日)	10.6±2.1	11.0±0.9	10.4±1.5	10.4±1.7
	脱皮後個体重増加率(%)	16.2±4.7	23.9±6.7	22.9±5.5	28.5±8.5*
	日間個体重増加率(%/日)	1.5±0.2	2.2±0.6*	2.2±0.5*	2.8±0.9*
	Controlに対する比率	1.00	1.45	1.46	1.85
脱皮 2回目	脱皮までの日数(日)	10.7±0.9	7.7±1.0*	8.0±0.6*	7.6±0.5*
	脱皮後個体重増加率(%)	19.9±2.9	23.8±7.5	19.7±6.3	27.0±9.3
	日間個体重増加率(%/日)	1.9±0.2	3.1±1.1*	2.2±0.9	3.5±1.3*
	Controlに対する比率	1.00	1.66	1.17	1.87

【 0 0 5 3 】

[実施例 3]

対象遺伝子をPTEN およびMIHに変更したこと以外は実施例 1 と同様にして、dsRNA をミステリークレイフィッシュに投与してこれらの対象遺伝子をノックダウンし、成長経過を観察した。ノックダウンには、それぞれPTEN およびMIH の下記の塩基配列を標的とする dsRNA である、「dsPTEN」および「dsMIH」を用いた。

【 0 0 5 4 】

配列番号 9 : P T E N の標的配列

5' - TGGCTACGACCTGGATCTCAGCTATATCACAGATCGTCTTATCGCCATGGGCTTCCC
TGCTCAGAAGTTGGAGGGTGTCTACAGAAACCATATTGATGACGTATGCCGCTTCCTAG
AAGACAGACACAAGGACCATTATAGAATATATAATTTGTGTTCTGAGAGAAATCGATCG
TACGACGTAGCAAGATTCCATAACCGCGTTAGAACGTTCCCATTTGCTGACCACAATCC
ACCTCCTCTGATTGATATCGAGCCACTATGCAAAGATATGGCAGATTGGCTCAATGAAG
ATCAGAAAAATGTAGGCTGTTGTGCA -3'

【 0 0 5 5 】

配列番号 1 0 : M I H の標的配列

5' - CCAGACCTGGAGAGGTTTCATACCTTAAGCTTGGTGCTGAGTTACCAGTAAGAGAA
GAAGGTTCTACGAGTTGCTTGTGGAAGAGCACCAGAGCGGGTGTGAGTAGTGCTTCAAG
ACATGGTTAACCAAGCTGCTCAATGCTTCATTGTACGGAGAGTGTGGCTGGTGGTGGTG
GTTGGGCTGCTGGTACACCAGACAGCGGCAAGGTATGTCTTCGAAGAATGTCCAGGAGT
GATGGGCAACCGAGCCGTCCACGGCAAGGTGACCCGGGTTTGTGAGGATTGCTACAACG
TCTTCAGGGACACTGAAGTCTTGGCTGGATGCAGGAAAGGCTGCTTTTCTAGTGAGATG
TTCAAGCTTTGCCCTTTGGCTATGGAGCGCGTCGAGGAGTTTCCAGACTTCAAGAGATG
GATTGGTATTCTTAACGCCGGTC -3'

【 0 0 5 6 】

結果を表 3 に示す。本実施例の結果、M I Hのみをロックダウンしたところ、1 回目の脱皮時に脱皮間隔の短縮と脱皮成長量の増加傾向がみられた。P T E Nのみをロックダウンした結果、1 回目の脱皮で脱皮成長量が有意に増加したのに対し、2 回目の脱皮で脱皮成長量が有意に低下した。これに対し、P T E NおよびM I Hをともにロックダウンした場合、2 回目の脱皮時の成長抑制が現れず、M I HおよびP T E Nをそれぞれ単独でロックダウンしたときを上回る有意な成長促進効果が得られた。

【 0 0 5 7 】

【表 3】

RNAiを使用した特定遺伝PTEN, MIHまたはその両方)の
ロックダウン条件下における成長の変化(n = 10-15)

		dsGFP (control)	dsPTEN	dsMIH	dsPTEN & dsMIH
インジェクションした dsRNA 量 (μg)		1	1	1	各 1
脱皮 1 回目	脱皮までの 日数(日)	11.5 ± 1.5	13.0 ± 3.5	10.1 ± 1.5*	11.8 ± 3.2
	脱皮後甲長 増加率(%)	9.4 ± 5.6	16.7 ± 4.0*	13.7 ± 6.3	17.2 ± 3.8*
	日間甲長 増加率(%/日)	0.8 ± 0.5	1.4 ± 0.4*	1.3 ± 0.6*	1.6 ± 0.6*
	Controlに 対する比率	1.00	1.62	1.52	1.91
脱皮 2 回目	脱皮までの 日数(日)	9.4 ± 1.2	10.0 ± 2.8	9.6 ± 1.2	9.3 ± 1.2
	脱皮後甲長 増加率(%)	11.8 ± 4.9	4.4 ± 4.1*	12.2 ± 3.8	13.6 ± 5.9
	日間甲長 増加率(%/日)	1.2 ± 0.6	0.43 ± 0.4*	1.3 ± 0.5	1.5 ± 0.6
	Controlに 対する比率	1.00	0.36	1.12	1.25

【 0 0 5 8 】

[実施例 4]

成長に代表される多くの量的形質は、単一の遺伝子のみが関与することは少なく、複数の遺伝子の働きの総体の結果であることが多い。例えば、ある成長促進シグナルが上昇していても、別の成長抑制シグナルがそれを上回るほど強ければ、全体で成長シグナルの強度がマイナスとなり、成長は抑制されると予想される。したがって、成長に関与する遺伝子を明らかにするには、複数の遺伝子の発現パターンの総体をとらえ、成長との関連を分析する必要があると考えられる。

【 0 0 5 9 】

この考えに従い、実施例 4 では、まず、同腹の稚ザリガニの脱皮サイクルを統一してサンプリングを行い、成長データを取得すると共に、リアルタイムPCRを行い成長に関連すると予測される候補遺伝子の発現量を分析した。個別飼育に移すとザリガニの成長が時間経過に伴い抑制されることを利用し、経時的に複数のタイミングでサンプリングすることにより、遺伝的な違いのない同腹のザリガニから成長の程度の異なる稚ザリガニを得た。細胞スケールでみたときに様々な細胞成長・増殖シグナルと環境情報を統合するメカニズムに注目し、実施例 1 ~ 3 に示したように、成長制御に関与していることが実証された因子が含まれている m T O R パスウェイおよび A k t パスウェイの、上流及び下流の因子を中心に候補遺伝子を選択した。

10

【 0 0 6 0 】

次に、リアルタイムPCRの結果に基づき、主成分分析によって発現動態が似通ったものを主成分得点という形でまとめた。この主成分得点が、上述の発現パターンの総体にあたる統計学的に推定された数値となる。最後に、この主成分得点と成長の関連を説明するモデルを、一般化線形モデルによって求めた。成長と相関のある主成分得点に対して高い主成分負荷量を示す遺伝子のうち、直接的または間接的に転写制御機能をもつものは成長関連遺伝子である可能性が高いと推定された。

20

【 0 0 6 1 】

[飼育実験]

実験には、同一日に産卵された卵から得られたミステリークレイフィッシュ *Procambarus virginalis* の稚エビを用いた。脱皮が観察された際には、その翌日に個体重の計測を行った。個体重 20 mg を超えた個体を対象として、成長経過を観察するグループと遺伝子発現の分析用のグループの 2 群にわけ、前者は継続して飼育を行い、後者からは脱皮 3 日後に眼柄を採取し、RNA 抽出用サンプルとした。

30

【 0 0 6 2 】

[RNA 抽出および逆転写]

サンプルから total RNA を抽出し、逆転写して cDNA を合成した。合成した cDNA を 100 倍に希釈し、以降のリアルタイムPCRの分析用のサンプルとして使用した。

【 0 0 6 3 】

[リアルタイムPCR]

サイバーグリーンを含む市販のリアルタイムPCR試薬と各遺伝子特異的にデザインしたプライマーを用いて、リアルタイムPCRを行った。使用したプライマーリストは下記表 4 に示した。スタンダードには、すべての分析サンプルを等量混合し、20 倍または 30 倍から 2 倍ずつ段階希釈した cDNA を用いた。インターナルコントロールには E F - 1 を用い、すべての測定値を相対値として定量した。

40

【 0 0 6 4 】

【表 4】

実施例 4 におけるリアルタイムPCRに使用したプライマーリスト

遺伝子名	Forwardプライマー	配列 番号	Reverseプライマー	配列 番号
Akt	CCGTGACCTGCTTAAAGGTTTGTTA	11	TCTCTTACATCACCTGGACCACCTC	12
FOXO	TGAGTGAGAGTCTGGACCTGTACCC	13	GCTGAAGGCAGGGTGGACTG	14
PDK	GCAAATAACCAGGAAAGGGATGTA	15	AGTTTAACGAAAAACGGAGCCGTAG	16
PI3K	ATTGCTACAAACCCGATCTGCCTA	17	CTCATCGTGTAATCTGTCCGTGATG	18
PTEN	AGCAAGATTCCATAACCGCGTTAGA	19	GATTGTGGTCAGCAAATGGGAAC	20
AMPK	ATTACCATCAACGAGAGCGACTTTG	21	GAGACTGACTGCTCAACGGCTTATC	22
mTOR	ACATTCACGCTTCAAGAGACCAAAG	23	GTCACCTTCTTGATTGTGGCTGAGT	24
PRAS40	GGCATAGCAGAGGGACAGAAGTTTT	25	ATTTGGTGGCAGTTCAGACACTCTC	26
Raptor	AAGAATGGAGGCAGAAAGGCAGTAG	27	TCCACAGGCTCCAAGTTGAATACAT	28
Rheb	AGAAGCTGAAGGTTAGAGGGCAAGA	29	TCCAGCCGTGTCTACTAECTCAAG	30
S6K1	CGATAACGGTGATCCAATCAAGAAA	31	GGTTTAAATGGCGGTTCTAECTTGC	32
TSC1	TGTGAGGAGGTATGTGGCTCATTTT	33	ATTTGGTGGACAAATTCAAAGTTCC	34
TSC2	GAAGTATTCTCGGTGGTCTTGACA	35	TACGTGGAAAACAACCTGCATAACC	36
4EBP	AGAACCCTGCCAGTGATACCAGGAGT	37	CTCCTCTGAAATCGTTCCATTTTCC	38
FGF1	ACATCTACGCCATCTGGAGGTTTCG	39	AAGAGCCCAGCATCAACACCTCTGA	40
ILP	CACCTTGGCTGATATTCAAAGATGG	41	TTGCCAGAGATTGTTTGTAGTTCTCC	42
E75	CGGGAGGCACTTCATACATCTGTTA	43	AGTCAAACATCGAGTCCATCAGGAA	44
EcR	TCAAGAATGTCGCTGAAGAAATGT	45	TTCTGTTCACGTTTTACCTGGCATT	46
Kr-h1	TCGCCTCTTTCAAGTAATTCAGACG	47	ATATTGAGGCTGGTGGAGGTTGGT	48
Met	TTGGCCACAGTCAGGTTGACTTATT	49	ATCGGGATGAATGACGTTGTAGATG	50
MIH	TTGCTACAACGTCTTCAGGGACA	51	CATAGCCAAGAGGCAAAGCTTGA	52
EF-1 α	GCAGATTGTGCCGTGCTGAT	53	CTCGGGTCTGACCGTGCTT	54

【 0 0 6 5 】

[成長の解析]

ある時点での遺伝子発現を調べ、それが成長に寄与しているか判断するには、その時点の個体の状態から直近の個体成長を予測できている必要がある。飼育実験下において、個体の状態は変わりうるものなので、成長が良かった個体が次の脱皮でも必ず良い成長を示すとは限らない。成長においては、遺伝子発現の変化が先にあり、その結果として成長の良否がある。したがって、成長制御遺伝子のスクリーニングには、遺伝子発現の変化が終わった後で結果として成長が良かった個体の遺伝子発現を調べるのではなく、良い成長を示すことが一定以上の精度で予測される個体の遺伝子発現を調べることが必要である。

【 0 0 6 6 】

10

20

30

40

50

この考えに基づき、実施例 4 では、脱皮翌日の個体重、個別飼育移行後経過日数およびこれまでの脱皮回数から次の脱皮の成長を予測するモデルを、次のようにして作成した。十脚甲殻類の成長は脱皮間隔と脱皮当たりの成長量によって決まることから、まず主成分分析によりこれらを主成分得点として1つの変数にまとめた。次に、この主成分得点を1回前の脱皮の時点における脱皮翌日の個体重、その時点の個別飼育開始後経過日数および脱皮回数から予測するモデルを一般化線形モデルにより求めた。以降の分析にあたっては、R software version 4.0.2を用いた。

【 0 0 6 7 】

[遺伝子発現動態の解析]

前述の通り、成長のような量的形質は自然状態の下では単一の遺伝子の制御のみによって決定することは稀であり、多数の遺伝子の発現の総体の産物として成り立っているという考え方が一般的である。この考えに基づき、主成分分析によって発現動態が似た遺伝子の挙動を主成分得点という形で数値化した。

10

【 0 0 6 8 】

なお、この分析に先んじて、Akt パスウェイおよびmTOR パスウェイの上流因子として、受容体を介してこれら2つのパスウェイを活性化させるスイッチの役割をもつリガンド分子の推定を行った。候補分子として、図 4 およびそれに類似した情報が掲載されている既往文献を参考にし、wnt、EGF、FGF およびILP のホモログ遺伝子をすでに作成済みの遺伝子カタログからreciprocal BLAST検索により得た。これらのリアルタイムPCRによる発現定量結果と成長の主成分1の主成分得点を、それぞれ最小二乗法によって線形モデルへと近似した。さらに、これらにおいてピアソンの積率相関係数を算出し、相関係数のt検定を行い、有意な相関がみられたものを、Akt パスウェイおよびmTOR パスウェイを介して成長を制御する有力なリガンド分子とみなし、上述の主成分分析に加えた。

20

【 0 0 6 9 】

[成長と遺伝子発現動態の関係を示すモデルの作成]

最後に、成長の分析により得られた主成分得点を遺伝子発現の分析により得られた主成分得点によって説明するモデルをリンク関数をidentityとする正規分布を用いた一般化線形モデルによって作成した。各変数の偏回帰係数をWald検定によって検定し、偏回帰係数が有意であった主成分を成長の制御に関連する有効な遺伝子発現動態を示すものとみなした。

30

【 0 0 7 0 】

実施例 4 において主成分分析に先んじて行った相関分析により、FGF 1 およびILP に成長の主成分1 (成長PC1) の主成分得点と有意な正の相関がみられ、これらが有力な候補分子として示唆された(図 5 A)。このことから、本発明ではこれら2つを上流の成長因子と位置づけ、主成分分析の対象因子に含めた。

【 0 0 7 1 】

パラメーターの推計および検定を行う上での利便性のため、データの分布の線形化は重要な作業である。主成分得点は正負両方の値をとるが、負の値の場合、指数関数型の推移を示す関係に対数化によって線形化できない。このことから、本研究ではZar (Data transformations. In: Biostatistical analysis. Prentice Hall, Englewood Cliffs, pp 236-243, 1984) に従い、定数項を足したうえで対数化を行いパラメーター推計を行った。その結果を表 5 に示す。

40

【 0 0 7 2 】

【表 5】

一般化線形モデルによって推定されたある個体の脱皮前の状態から脱皮後の成長の程度を成長PC1の主成分得点として予測するモデルのパラメーター

	偏回帰係数 (標準誤差)
切片	1.24 (0.12)***
脱皮回数 M	-4.15 (0.85)***
対数個体重 ln W × 脱皮回数 M	1.25 (0.26)***
経過日数 D × 脱皮回数 M	0.18 (0.03)***
対数個体重 ln W × 経過日数 D × 脱皮回数 M	-0.05 (0.01)***

***P < 0.001 (Wald test)

【0073】

この結果に基づき、脱皮前の個体の状態から以下の式を用いて脱皮後の対数成長PC1主成分得点および成長PC1主成分得点を推定可能である。

【0074】

$$\ln(c - S_{PC1}) = 1.24 - 4.15 M + 1.25 \ln W \cdot M + 0.18 D \cdot M - 0.05 \ln W \cdot D \cdot M$$

【0075】

ここで、 S_{PC1} は成長PC1の主成分得点、Mは個別飼育開始後の脱皮回数、Wは個体重、Dは個別飼育開始後の経過日数、cは絶対値が最大の主成分得点よりも大きな値をとる定数項（今回であれば最大値+1）である。したがって、成長PC1の主成分得点 S_{PC1} は以下の通り求められる。

【0076】

$$S_{PC1} = -\exp(1.24 - 4.15 M + 1.25 \ln W \cdot M + 0.18 D \cdot M - 0.05 \ln W \cdot D \cdot M) + c$$

【0077】

対数化による線形化の有無も含めて複数のモデルを検討したが、AICおよび決定係数 R^2 値の数値からこのモデルが最良と判断された。本モデルを用いて成長PC1の主成分得点 S_{PC1} を飼育履歴から推定した値と実際の値の対応を図4に示した。成長の良否を飼育履歴からある程度の精度で推定可能であることがわかる。

【0078】

これらのことから、本モデルを利用して遺伝子発現解析用にサンプリングされた個体において生じうる成長の程度を、サンプリングまでの飼育履歴から成長PC1の主成分得点 S_{PC1} として評価可能である。この算出される主成分得点と各遺伝子の発現動態を対応させることで、成長と関連した発現量の増減を示す遺伝子を明らかにした。

【0079】

実施例4における主成分分析の結果（主成分負荷量および累積説明率）を表6に示し、成長PC1と関連する遺伝子発現の主成分の分析結果を表7に示す。また、これらの結果に基づき作成した、各遺伝子の発現動態と成長の関係を示したパス図モデルを図6に示す。標準化係数（表7）の大きい遺伝子発現の主成分2（遺伝子発現PC2）および遺伝子発現PC3が、成長への影響が強いことが示されている。また、遺伝子発現PC2および遺伝子発現PC3に対して様々な因子の発現量が正の相関（主成分負荷量0.3以上）または負の相関（主成分負荷量-0.3以下）を有していることが示されている。遺伝子発現PC2または遺伝子発現PC3との関係で発現量が正の相関を有することが示された因子は、その遺伝子の発現を増強することにより成長の促進に寄与する効果を有し、発現量が負の相関を有することが示された因子は、その遺伝子の発現を阻害することにより成長

10

20

30

40

50

の促進に寄与する効果を有し、これらの因子は、複数の組み合わせにより、またはいずれか単独で、成長を促進する本発明の作用効果を奏するものと理解することができる。例えば、Aktの利用（発現阻害による成長抑制効果、つまり発現増強による成長促進効果）、FOXOおよびTSC2の利用（発現阻害による成長促進効果）については、実施例1に示されているとおりである。MIHの利用（発現阻害による成長促進効果）については、実施例3に示されているとおりである。また、mTORパスウェイには成長と高い相関を示す律速因子と予想される分子がある。例えば、Rhebは成長との相関が高く、そのような律速因子と予想される（図5B）。Rhebを抑制するのがTSC1/TSC2複合体であり、TSC1またはTSC2等をRNAiにより阻害することによって成長が促進されるという結果（実施例1および実施例2）も、Rhebが律速因子との予想と整合性がとれる。

10

【0080】

20

30

40

50

【表 6】

異なる成長条件下における遺伝子発現動態の主成分分析の結果
(主成分負荷量および累積説明率)

標的分子メカニズム	遺伝子名	主成分負荷量		
		遺伝子発現 PC1	遺伝子発現 PC2	遺伝子発現 PC3
Aktパスウェイ	Akt	0.755	0.056	0.530
	FOXO	0.598	-0.344	0.146
	PDK	0.903	-0.035	-0.004
	PI3K	0.846	0.088	0.101
	PTEN	0.637	-0.482	0.119
mTORパスウェイ	AMPK	0.880	0.041	-0.168
	mTOR	0.840	-0.292	-0.240
	PRAS40	0.918	0.154	-0.078
	Raptor	0.847	0.093	-0.262
	Rheb	0.632	0.490	0.203
	S6K1	0.457	-0.612	0.486
	TSC1	0.927	0.022	0.141
	TSC2	0.787	0.192	-0.315
4EBP	0.646	-0.604	-0.204	
成長因子	FGF1	0.552	0.443	0.042
	ILP	0.896	0.313	0.015
脱皮制御因子	E75	0.877	-0.293	-0.027
	EcR	0.768	0.445	0.097
	Kr-h1	0.098	-0.576	0.241
	Met	0.513	0.405	0.327
	MIH	0.750	-0.208	-0.510
累積寄与率		0.558	0.682	0.747

一般的に弱い相関といわれる絶対値0.3以上の主成分負荷量を太字で示した。

【 0 0 8 1 】

10

20

30

40

50

【表 7】

成長PC1と相関する遺伝子発現PC1-3の分析結果
 (一般化線形モデルによって推定された標準化係数)

	標準化係数 (標準誤差)
切片	-0.673 (0.129)***
遺伝子発現PC1	0.315 (0.131)*
遺伝子発現PC2	0.708 (0.131)***
遺伝子発現PC3	0.469 (0.131)**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Wald test)

10

20

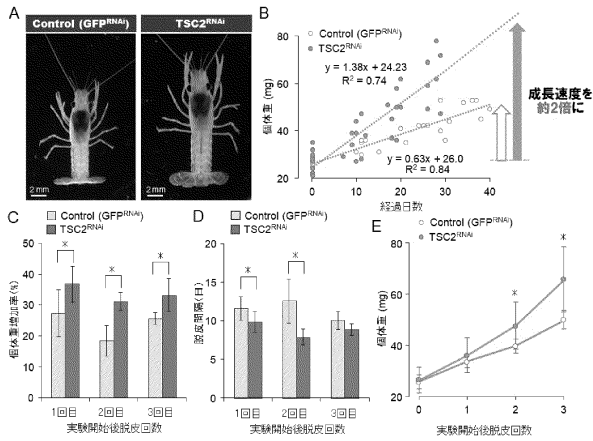
30

40

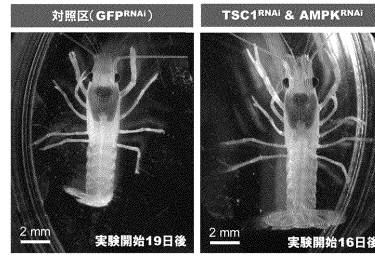
50

【 図 面 】

【 図 1 】

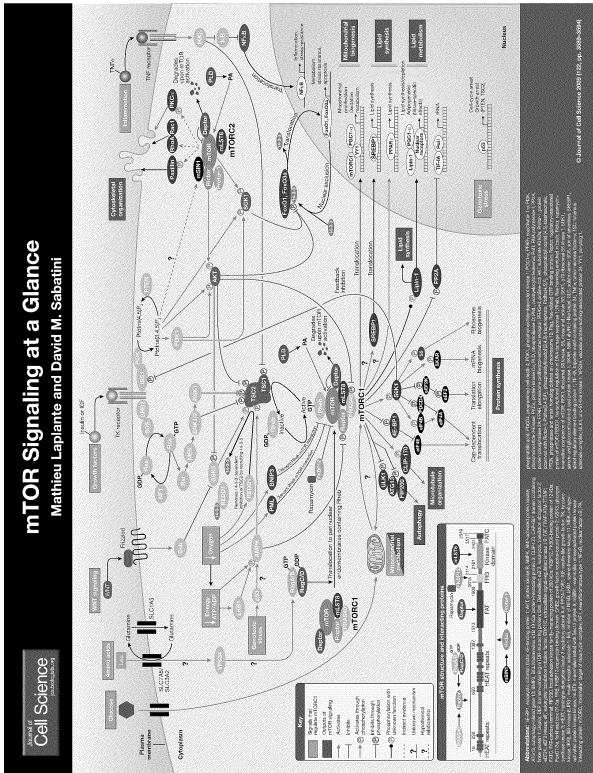


【 図 2 】

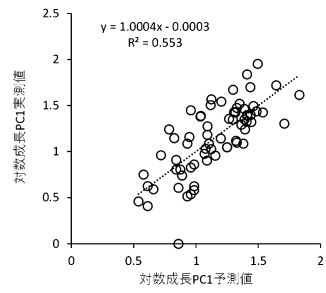


10

【 図 3 】



【 図 4 】



20

30

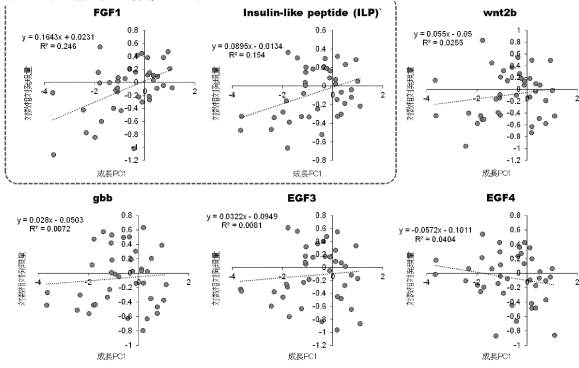
40

50

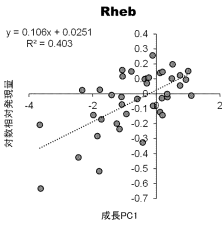
【図5】

A

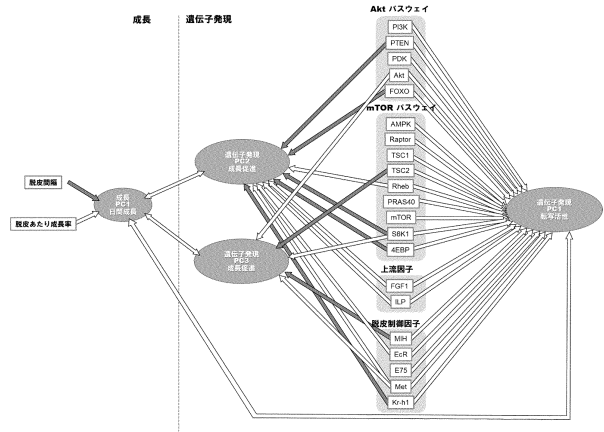
有意だったもの (相関係数のt検定, $P < 0.05$)



B



【図6】



⇒ 各PCに対する正の相関 (主成分負荷量0.3以上)
 ⇨ 各PCに対する負の相関 (主成分負荷量-0.3以下)
 ⇄ 各PC間の正の相関 (一般化線形モデルの結果に準拠)

【配列表】

0007636756000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- 弁理士 今野 智介
 (74)代理人 100144794
 弁理士 大木 信人
 (72)発明者 進士 淳平
 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
 (72)発明者 米北 太郎
 茨城県つくば市緑ヶ原三丁目3番地 日本ハム株式会社中央研究所内
 審査官 山本 匡子
 (56)参考文献 国際公開第2018/084077(WO, A1)
 特開2009-297021(JP, A)
 FANG, H. et al. , Molecular and functional characterization of Raptor in mTOR pathway from *Litopenaeus vannamei* , *Aquaculture Research* , 2020年06月 , Vol. 51, No. 6 , pp.2179-2189 , doi:10.1111/are.14522
 MYKLES D L. et al. , Hormonal control of the crustacean molting gland: Insights from transcriptomics and proteomics , *Gen Comp Endocrinol.* , 2020年04月24日 , 294 , 113493, pp.1-18 , doi: 10.1016/j.ygcen.2020.113493
 ABUHAGR A M. et al. , Mechanistic target of rapamycin (mTOR) signaling genes in decapod crustaceans: cloning and tissue ex , *Comp Biochem Physiol A* , 2013年11月20日 , 168 , pp.25-39 , doi: 10.1016/j.cbpa.2013.11.008
 MACLEA, K S. et al. , Rheb, an activator of target of rapamycin, in the blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*: cloning and effects of molting and unweighting on expression in skeletal muscle , *Journal of Experimental Biology* , 2012年 , Vol. 215, No. 4 , pp. 590-604 , doi:10.1242/jeb.062869
 (58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)
 C12N 15/00 - 90
 A01K
 MEDLINE / BIOSIS / REGISTRY / CAPLUS (STN)
 JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)