HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	魚類卵濾胞における排卵能獲得分子機構に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	石原, 学
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第11779号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58627
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Manabu_Ishihara_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）　　氏名：石原　学

審査委員
主査　教授　荒 井 克 俊
副査　教授　足 立 伸 次
副査　准教授　井 尻 成 保
副査　准教授　東 藤　孝
副査　准教授　平 松 尚 志

学 位 論 文 題 目

魚類卵濾胞における排卵能獲得分子機構に関する研究

有用魚種の種苗生産技術を確立するためには安定的に良質卵を得ることが特に重要であるが、そのためには対象種の卵形成機構を正確に理解する必要がある。一般に、魚類の卵形成過程は卵母細胞とその周囲に存在する濾胞細胞層で構成される卵濾胞内で進行し、卵母細胞は卵成長期および卵成熟期を経た後、排卵されて成熟卵となる。卵成熟とそれに続く排卵（卵成熟過程）は生殖腺刺激ホルモンである黄体形成ホルモン（LH）と卵成熟誘起ステロイド（MIS）により制御される。これまでに、ニホンウナギおよびチョウザメ交雑種であるベステル（オオチョウザメ × コチョウザメ）を用いた生体外卵濾胞培養実験から、卵成熟過程に先立ち、卵母細胞が MIS の刺激により卵成熟し得る能力（卵成熟能; OMC）を獲得した後に、遅れて卵濾胞が MIS の刺激により排卵し得る能力（排卵能）を獲得する事が示唆された。しかし、これらの能力の周年変化と卵質との関係を調べた例は少なく、排卵能獲得の分子機構については全く不明である。そこで本研究では、種苗生産技術開発への応用を最終目的として、卵濾胞の成熟進行度を指標とした採卵適期推定方法の確立と排卵能獲得の分子機構解明を目指した。また、培養系を用いた配偶子生産法を確立し、効率的な種苗生産に応用可能かを調べた。

まず、同一個体のベステルから 2012 年 5 月から 2013 年 5 月にかけて卵濾胞を摘出後、MIS として 17α-hydroxyprogesterone（17αOHP）を、LH としてサケ脳下垂体抽出物（SPE）を単独、あるいは複合添加して培養した。17αOHP 単独添加群の卵成熟率から OMC を、排卵率から排卵能の有無をそれぞれ判断した。その結果、7 月から 8 月にかけて初めて OMC を有する卵母細胞が現れた。卵径および組織学的観察の結果から、これらの月の卵母細胞は卵成長完了前であると考えら

れた。また、8 月には複合添加群でのみ排卵が誘起され、卵濾胞は SPE 中の LH により排卵能を獲得したことが示唆された。本研究の結果は、卵成熟過程に進行するための準備は卵成長完了前に誘導され始めることを示しており、これは他魚種では全く報告が無い新知見である。OMC は 5 月までほとんどの卵母細胞で維持されており、季節的な変化は認められなかった。一方、排卵能は個体ごとに獲得の変化傾向が異なり、大まかに 12 月前後に多くの卵濾胞が有する個体、4–5 月に多くの卵濾胞が有する個体、12 月以降 4–5 月まで保持し続ける個体、通年ほとんど獲得しない個体に分類することが可能であった。さらに、排卵能獲得の傾向とホルモン注射により得られた卵の卵質との関係を調べたところ、排卵能が上昇する傾向にある月に採卵した個体からは良質卵を得られることが示唆された。これらの結果は、排卵能は正確かつ簡便に成熟進行度を評価できる指標であることを示しており、今後は排卵能を用いた採卵適期の特定により良質卵の安定生産が可能となると考えられた。

続いて、排卵能獲得分子機構を解明するため、次世代シーケンサーにより排卵能獲得前後に発現増加する遺伝子を探索した。ニホンウナギおよびコチョウザメから人為的に排卵能獲得誘導した卵濾胞、あるいはその対照群を準備し、各群から EST データベースを構築した。両群間で発現量差の大きい遺伝子を選抜した結果、ニホンウナギでは *slc26a6*、*npr-c* 等の計 7 遺伝子が、コチョウザメでは *rasd1*、*nr4a1*、*star* 等の計 15 遺伝子が排卵能関連遺伝子の候補として同定された。続いて、両種の EST データベースから他魚種で既知の排卵関連遺伝子を探索し、排卵能を有する卵濾胞において発現量が高い遺伝子を選抜した。その結果、ニホンウナギでは計 7 遺伝子が、コチョウザメでは 5 遺伝子が選抜され、その内、コラゲナーゼである *mmp9* およびプロスタグランジン（PG）に関与する *ptgs2* は両種で共に同定された。ベステル濾胞組織における両遺伝子発現は排卵能が獲得された月に急増したことから、特に重要な遺伝子であることが示唆された。

最後に、生体外培養系を用いた仔魚生産法について検討した。良質精液から調製したチョウザメ精漿を用いることで、安定的に受精能を有する精子を得ることに成功した。さらに、排卵能が高い月に培養により排卵された卵との人工授精を行なったところ、世界初の試験管ベビー作出に成功した。仔魚は同一個体から複数回得ることが可能で、かつ正常に稚魚にまで成長したことから培養系を用いた種苗生産が可能であることが示された。

以上、本研究では、排卵能は個体ごとに卵濾胞の成熟進行度を把握できる極めて有効な指標であり、チョウザメ類の採卵適期の特定に利用できることを示した。さらに、排卵能獲得の分子機構について、その概要を初めて明らかにした。構築された EST データベースをさらに精査し、排卵能獲得機構を解明することで、将来的には排卵能関連分子マーカーの発現量を基に、培養を行なわずとも容易に採卵適期を特定することが可能になるであろう。これら排卵能に関する知見は、安定種苗生産が難しい他魚種にも応用可能であり、培養系を用いた配偶子および仔魚生産と併せて利用することで種苗生産技術の確立に大きく貢献できる。よって審査員一同は申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。