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［全文の要約］
Author(s)	石原，学
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/58629
Type	doctoral thesis
File Information	Manabu_Ishihara_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

主論文の要約

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）　　氏名：　石原　学

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、卵母細胞は長い卵成長期と短い期間に起こる卵成熟期を経た後、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（GTH）である黄体形成ホルモン（LH）と、LH の刺激により濾胞細胞層で合成される卵成熟誘起ステロイド（MIS）により制御される。ニホンウナギやチョウザメ類などの飼育下で自発的に卵成熟あるいは排卵が誘起されない魚種に対しては、ホルモン注射により人為的にこれらの過程を誘起する必要がある。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）における生体外卵濾胞培養実験から、卵成熟過程に先立ち、卵母細胞は MIS の刺激により卵成熟し得る能力として卵成熟能（OMC）を、卵濾胞は MIS の刺激により排卵し得る能力（排卵能）、および LH 単独存在下で卵成熟および排卵を誘起し得る能力（GTH 感受性）を有することが明らかになった。さらに、卵母細胞が OMC を獲得した後に、遅れて卵濾胞が排卵能を獲得する事が示唆された。しかし、排卵能を含む各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、主にチョウザメ類を対象に、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、ベステル卵濾胞の成熟進行度の季節的変化を調べた。2012 年 5 月から 2013 年 5 月まで同一個体から通年卵濾胞を摘出し、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た群を設けて卵濾胞培養を行なった。17αOHP 単独添加群の卵成熟率から OMC を、排卵率から排卵能を有する卵濾胞の割合をそれぞれ調べた。また、SPE 単独添加群の卵成熟率および排卵率から GTH 感受性について調べた。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、同じ 8 月には、複合添加群においてのみ排卵が誘起されたが、これは SPE 中の LH により卵濾胞が排卵能を獲得した後、17αOHP が続いて作用したことで誘導されたと考えられた。一般に、卵成長を完了した卵母細胞が初めて卵成熟過程に進行すると考えられるが、本研究により、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が明らかになった。これは他魚種では全く報告の無い新知見である。OMC はその後 5 月までほとんどの卵母細胞で維持されていた。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。これらの結果から、排卵能は個体ごとの卵濾胞の成熟進行度を正確に評価できること、OMC は評価に適さないことが示された。また、SPE 単独添加群における排卵率は排卵能の変化傾向と類似しており、排卵能だけでなく、GTH 感受性も併せて比較することで、より正確な成熟進行度の判定が可能になることが示唆された。培養結果と 5 月に LHRHa 注射により得られた卵の卵質との関係を調べたところ、5 月に排卵能が上昇する傾向にある個体からは良質卵を得られることが示唆された。従って、排卵能は正確に成熟進行度を評価する指標として利用でき、その能力の有無を簡便に判定できることから、今後は排卵能を用いた採卵適期の見極めにより良質卵の安定生産が可能となるであろう。

続いて、排卵能獲得の分子機構を明らかにするため、ニホンウナギおよびコチョウザメを対象に、次世代シーケンサー（NGS）により排卵能獲得前後に発現量が増加する遺伝子を探索した。ニホンウナギではヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン（hCG）を添加あるいは無添加で培養することで、人為的に排卵能獲得を誘導した卵濾胞を含む卵巣片と、無添加で培養した対照群の卵巣片を準備した。それらから cDNA を合成し、NGS シーケンシングにより EST データベースを構築した。まず、リード数および RPKM 値の差から両群間で発現量差の大きい遺伝子を選抜し、複数個体由来の hCG 培養群および対照群における mRNA 発現量を定量 PCR により検定した。その結果、*slc26a6*、*npr-c* 等の計 7 遺伝子が潜在的な排卵能関連遺伝子の候補として同定された。さらに、EST データベースから他魚種において排卵に関与すると報告されている排卵関連遺伝子を探索し、それらの RPKM 値から hCG 培養群において発現量が高い遺伝子を選抜した。その結果、*mmp9* や *ptgs2* 等の計 7 遺伝子が選抜された。コチョウザメでは、SPE 添加培養により、排卵能を有する卵濾胞およびその対照群を得た。ニホンウナギと同様の手法を用いて排卵能関連遺伝子群および既知の排卵関連遺伝子を探索し、定量 PCR により SPE 前培養群において発現量が多い遺伝子を選抜した。その結果、排卵能関連遺伝子として *rasd1*、*nr4a1*、*star* 等の計 15

遺伝子が、排卵関連遺伝子として、ニホンウナギにおいても選抜された *mmp9* や *ptgs2* を含む 5 遺伝子が選抜された。ニホンウナギやチョウザメで LH 添加培養により発現量が増加した上記の遺伝子のうち、排卵能関連遺伝子は卵母細胞の吸水や排卵時のシグナル伝達に、排卵関連遺伝子は濾胞細胞層の結合力の弱化やプロスタグランジン（PG）の産生に関する機能をもつことが示唆された。続いて、卵濾胞の成熟進行度の周年変化が明らかになっているベステルを用いて、卵濾胞、および卵濾胞から卵黄を除去することで調製した濾胞組織から cDNA を合成した。定量 PCR により上記遺伝子の発現動態を調べ、卵濾胞の排卵能の周年変化と比較したところ、コラゲナーゼである *mmp9* および PG 産生酵素である *ptgs2* では卵濾胞が初めて排卵能を獲得した月において濾胞組織における発現が急増したことから、両遺伝子は排卵能獲得に関連する遺伝子であることが強く示唆された。今後、排卵能獲得の分子機構をさらに調べることで、将来的に排卵能に関与する遺伝子を指標とした採卵適期推定法を確立できる可能性は極めて高い。

最後に、培養系を用いた仔魚生産法の確立を目的として、未熟な精巣内精子に運動能を獲得させる培養条件および培養精子の受精能について検討した。その結果、良質精液から調製したチョウザメ精漿を用いることで、安定的に運動能を有する精子を得ることに成功した。さらに、運動能は培養直後に獲得され、受精能は LHRHa 注射によって得られた精子と差がないことが示された。また、排卵能が高い月に培養により排卵された卵と培養精子を用いた人工授精により、世界で初となる試験管ベビーの作出に成功した。仔魚は同一個体から複数回得ることが可能で、一部の個体では 2 度にわたる人工授精から 100 尾以上を得ることができた。仔魚は正常に稚魚にまで成長し、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、卵形成が長期にわたるチョウザメ類を利用して卵濾胞の成熟進行度の変化を詳細に解析した。これまで、排卵能はその現象に関する基礎的な知見すら極めて乏しく、分子機構に関しては全く不明であったが、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、人為的な排卵誘導に応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、将来的には排卵能を評価できる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、チョウザメ類に限らず、ニホンウナギやクロマグロなどの安定した種苗生産が難しい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貢献できるであろう。