HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ニホンウナギの卵質に関わる母性mRNAに関する研究［全文の要約］
Author(s)	泉, ひかり
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12210号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61572
Type	doctoral thesis
File Information	Hikari_Izumi_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：泉　ひかり

学 位 論 文 題 目

ニホンウナギの卵質に関わる母性 mRNA に関する研究

ニホンウナギなど多くの有用魚種において，資源保全しつつ種苗の安定供給といった持続的利用に向け，天然資源に依存しない人工種苗による生産技術の確立が求められている。そのためには，安定的に良質卵を得ることが特に重要であり，人為制御下で生じる卵質悪化の原因を明らかにすることが必要である。しかし，卵質悪化の原因は多様である上，卵質はすべての要因が総合して現れる結果であるために，原因の特定は困難であるのが現状である。したがって，多様な卵質悪化の原因を厳密に識別するためには，それぞれの卵質悪化機構の詳細な理解が必要である。一般に，卵は卵形成過程において胚発生に必要な因子 (卵黄タンパク質，脂質，RNA，ビタミンなど) を母性因子として蓄積している。良質卵ではこれら因子が正しく過不足なく備わっている一方で，不良卵では，何らかの要因により，因子の過不足や質的な異常が生じ，それら因子が胚発生過程において適切に機能できず，結果的に発生異常を引き起こすと考えられる。したがって，良質卵と不良卵に蓄積される正常発生に必要な因子の量や質を比較し，不良卵の特徴を明らかにすることが，卵質悪化機構の理解につながると考えられる。母性 mRNA は，卵形成過程において翻訳抑制状態で卵内に蓄積され，主に受精後に翻訳される転写産物であり，中には局在して蓄積される母性 mRNA も存在する。発生の初期段階では，新たな転写は起こらず，卵内に蓄積されている母性 mRNA がタンパク質に翻訳され，適切に機能することにより胚発生が進行する。したがって，胚発生過程に異常がある不良卵は，卵に蓄積されている母性 mRNA の量の過不足，局在や質の異常などがおこり，良質卵と異なった状態にある可能性が考えられる。そこで本研究では，正常発生に必須の母性因子のうち「母性 mRNA」に着目し，その mRNA 量および局在を良質卵と不良卵で比較することで，ニホンウナギの不良卵の分子生物学的特徴を明らかにすることを目的とした。

まず，母性 mRNA の量に着目し，これまでに機能が明らかとなっている初期発生関連遺伝子に焦点を当て，それら母性 mRNA 量を良質卵と不良卵で比較した。細胞分裂関連遺伝子 74 個，および体軸形成，翻訳，母性胚性転移関連遺伝子 30 個の部分配列を *in silico* クローニングにより単離し, 良質卵 (正常発生して孵化する : 受精率および孵化率 80%以上), 発生不良卵 (桑実胚まで発生するが孵化しない : 受精率 80%以上かつ孵化率 20%以下), 非発生不良卵 (発生しない : 受精率 10%以下かつ孵化率 1%以下) に含まれる mRNA 量を定量 PCR により調べ, 各群間で比較した。その結果, 発生不良卵では細胞分裂関連遺伝子 *lsm7* の mRNA 量のみ良質卵と比較して有意に低値を示した。一方，非発生不良卵では細胞分裂関連遺伝子 11 個 (*cdc26*，*psma7* など) および母性胚性転移関連遺伝子 *hat1* の mRNA 量が良質卵と比較して有意に低値を示した。以上により，非発生不良卵では主に一部の細胞分裂関連遺伝子の母性 mRNA 量が低いことが示された。一方，発生不良卵では細胞分裂，体軸形成，母性胚性転移関連遺伝子の母性 mRNA 量が良質卵と同様に概ね過不足のない状態であることが示唆され，解析した遺伝子以外の母性 mRNA 量に過不足がある可能性が考えられた。

そこで次に, 良質卵および発生不良卵における母性 mRNA 量を次世代シーケンス (NGS) 解析により網羅的に比較し，mRNA 量に差のある新規卵質関連遺伝子を探索した。各卵から全 RNA を抽出後，解析の障害となるリボソーム RNA を除去して NGS 用ライブラリを作製し，シーケンシングした。*de novo* アセンブリにより得た約 62 万コンティグを用いて戻しマッピングを行ない，相対量 (RPKM 値) を良質卵と発生不良卵で比較した結果，発生不良卵の平均 RPKM 値が 0, または良質卵と比較して低いコンティグ 2557 個が得られた。このうち BLASTx によりアノテーションが付いたコンティグは 375 個であった。このうち 152 個を対象とし, 良質卵および発生不良卵の増幅 cDNA (n = 3 each) を用いて定量 PCR を行ない，mRNA 量を比較した結果，良質卵と比較して発生不良卵で有意に低い，または低い傾向にあるコンティグはそれぞれ 26 個および 10 個であった。これらを候補として，サンプル数を増やし (n = 6 each), *in vivo* での詳細な mRNA 量を定量 PCR により調べた結果, 発生不良卵で有意に低値を示した遺伝子は，ストレス応答，細胞生存，形態形成に関わる 8 遺伝子であった。したがって，これら因子の母性 mRNA 量が低いことが発生不良卵の分子生物学的特徴であることが示唆された。

最後に，体軸形成関連因子 *sybu* に焦点を当て，卵内の mRNA 局在を卵質と関連付けて解析した。まず，卵形成過程の卵濾胞および排卵卵における *sybu* mRNA 局在を *in situ* ハイ

ブリダイゼーション法 (ISH) により調べた結果，前卵黄形成期の卵母細胞では細胞質全体に，卵黄形成期以降の卵母細胞および排卵卵では植物極側の表層細胞質に陽性シグナルが認められた。次に，卵質の異なる 6 個体の排卵卵における mRNA 局在を ISH により調べた結果，陽性シグナルが植物極の「表層細胞質にのみ局在」，「表層細胞質とその内側の細胞質に局在」，「表層細胞質とその内側の細胞質に広く局在」の 3 種類の局在様式が認められた。受精率が高い (60%以上) 個体では，「表層細胞質とその内側の細胞質に広く局在」する卵は認められなかった。また，解析した個体の中で最も卵質が良い個体では，「表層細胞質のみに局在」する卵の出現頻度が 7 割以上であった。一方で，受精率が低い (40%以下) 個体においてのみ，「表層細胞質とその内側の細胞質に広く局在」する卵が認められた。中には「表層細胞質のみに局在」する卵が認められない個体も確認された。この個体は受精率および孵化率 0%であり，解析した個体の中で最も卵質が悪い個体であった。また，これら 6 個体の排卵卵における *sybu* mRNA 量を定量 PCR により調べた結果，卵質間で顕著な差はみられなかった。以上の結果から，例数を増やして精査する必要はあるものの，不良卵の中には *sybu* の母性 mRNA 量に差異は認められなくとも，その mRNA 局在が良質卵とは異なる卵が存在することが明らかとなった。また，その局在は卵質悪化に伴い，表層細胞質から内側へと乱れる傾向にあることが推測された。したがって，mRNA 局在の乱れが不良卵の分子生物学的特徴の一つである可能性が示された。

以上本研究では，ニホンウナギにおいて，母性 mRNA 量および局在の差異から，孵化までの胚発生過程で異常が生じる不良卵の分子生物学的特徴の一部を明らかにした。不良卵ではいくつかの遺伝子の mRNA 量が不足状態にある一方で，多くの遺伝子において mRNA 量に差が認められないことも明らかとなった。また，不良卵の中には mRNA 量に差は認められないものの，良質卵と異なる局在を示す卵が存在することを，水産有用魚種において初めて明らかにした。本研究は，多様な卵質悪化の原因を厳密に識別，特定するための技術開発に向けた基礎的知見を提供し，ニホンウナギに限らず，様々な有用魚種の卵質改善に寄与するものと思われる。