



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ニホンウナギの性分化機構に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	堀内, 萌未
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14330号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81875
Type	doctoral thesis
File Information	Moemi_Horiuchi_summary.pdf



主論文の要約

海洋応用生命科学専攻：博士（水産科学）

氏名：堀内 萌未

学 位 論 文 題 目

ニホンウナギの性分化機構に関する研究

ニホンウナギの養殖では天然資源に依存しない安定的な種苗生産技術の確立が求められている。そのためには雌雄の親魚が必要であるが、本種は飼育下では性比が著しく雄に偏ることが知られている。現在は、雌性ホルモンであるエストラジール-17 β (E2) を投与することで雌化を誘導しているが、商業生産を見据えるとステロイドホルモン投与に依存しない雌親魚の安定供給技術の確立が必要である。ウナギの性分化には飼育密度等による環境要因が関与していると考えられているが、飼育下で性比が著しく雄に偏る直接的な要因は不明である。本種は環境依存型あるいは環境感受型性決定をすると考えられるが、その分子機構についてはほとんど調べられていない。そこで本研究では、性分化に関与する遺伝子および性分化に影響を及ぼす環境要因に着目し、ニホンウナギの性分化の分子機構を明らかにすることを目的とした。

まず、先行研究により本種の性分化に重要な時期であるとされた全長 25-35 cm の天然個体の RNA サンプルを確保するため、新たに天然個体を採集し、宮崎および大分天然ニホンウナギ 189 個体の組織学的観察により、詳細な性分化過程を調べた。その結果、形態的性分化の兆候は全長 25 cm 前後からわずかにみられ始め、卵巢様構造あるいは精巣様構造が認められた。その後、全長 30 cm 前後から分化過程の生殖腺が現れ、全長 31-34 cm の非常に短い期間に卵巢あるいは精巣に分化することが示唆された。また、耳石を用いた年齢査定の結果、同じ年齢であっても生殖腺が形態的性分化後の個体は未分化個体に比べて全長が大きかったことから、生殖腺の性分化には年齢よりも体サイズが関与していると考えられた。既知の卵巢形成関連遺伝子の発現は、増殖期の卵原細胞および減数分裂初期の卵母細胞を含むシスト状の構造を有する卵巢で *cyp19a1a*、*foxl2a* の mRNA 量が高く、より発達した卵母細胞を含む卵巢では *figla*、*sox3*、*foxn5*、*zar1*、*zp3* の mRNA 量が高値を示した。このような卵巢における *cyp19a1a* の一時的な発現はニュージーランド天然オーストラリアウナギおよび福島天然ニホンウナギでも同様であると考えられ、*cyp19a1a* およびその転写因子とされる *foxl2a* による E2 産生は卵原細胞増殖に重要な役割を果たしていると考えられた。また、精巣形成関連遺伝子の *gsdf*、*amh*、*foxl2b*、*foxl3b* の mRNA 量は全長 33.7 cm 以降の精巣からより高値を示す傾向がみられ、本種の精巣分化に直接関わる遺伝子がそれらの発現以前に存在する可能性が考えられた。しかし、形態的未分化生殖腺では、既知の性分化関連遺伝子の発現に二型性がみられる個体はほとんど認められなかった。

次に、天然個体との比較を行なうため、飼育個体の性分化過程を調べた。飼育下で卵巢個体を得ることは難しいことから、性分化に飼育密度（他個体の存在）のストレスが影響しているのではないかという仮説のもと、自然環境下での単独および低密度飼育実験を行った。養成ニホンウナギの性分化過程は天然個体とは異なり、全長 20 cm 前後から卵

巢分化、遅れて全長 25 cm 前後から精巢分化を開始する個体が観察され、卵巢への分化が先に起こることが示唆された。さらに、精巢分化過程では精巢卵を持つ個体もいくつか観察されたのに対し、天然個体では観察されなかったことから、飼育環境が影響している可能性が考えられた。既知の性分化関連遺伝子の発現は、*cyp19a1a*、*foxl2a*、*foxn5*、*zar1*、*zp3* は天然個体と同様の発現動態であったが、*gsdf*、*amh* の mRNA 量は卵巢分化過程および分化後の卵巢以外の全ての生殖腺で高値を示す傾向がみられた。また、形態的未分化生殖腺が 9 個体認められたものの、卵巢様構造および卵巢分化過程の生殖腺を含む卵巢が 28 個体、精巢様構造の生殖腺を含む精巢が 27 個体認められ、性比はほぼ 1 : 1 になった。従って、本種は基本的には遺伝的性決定をするが環境（特に他個体の存在）の影響を受ける環境感受型性決定をすると思われる、他個体の影響がない飼育環境下では雌作出が可能であることが明らかになった。加えて、現在行なわれている E2 投与による雌親魚の作出は遺伝子攪乱を招くことも懸念された。

最後に、性分化の分子機構を明らかにするため、卵巢精巢間で発現に差のある遺伝子を次世代シーケンスを用いた RNA-seq 解析により網羅的に探索し、その後定量 PCR により mRNA 量に差のある新規性分化関連遺伝子を絞り込んだ。本研究では卵巢個体間でも既知の卵巢形成関連遺伝子の発現にばらつきがみられたため、*cyp19a1a* の mRNA 量が高値を示す天然個体および単独/低密度飼育個体の卵巢分化過程の生殖腺および卵巢、*cyp19a1a* の mRNA 量が低値を示す単独飼育個体の卵巢、天然個体および単独飼育個体の精巢を用いてシーケンシングを行ない、得られたリードをニホンウナギのドラフトゲノム配列へマッピングした。続いて、マッピングされたリードをもとにコンティグを形成し、それらの相対量（RPKM 値あるいは FPKM 値）を卵巢分化過程の生殖腺および卵巢と精巢で比較することにより候補遺伝子を選抜した。卵巢分化過程の生殖腺および卵巢で相対量が高い 49 遺伝子、精巢で相対量が高い 11 遺伝子をそれぞれ候補とし、実際に定量 PCR により mRNA 量の測定を行なった。その結果、*cyp19a1a* の mRNA 量に関係なく比較的高い発現を維持し続ける可能性のある 5 遺伝子（*zglp1*、*pkp4*、*aurkc*、*sdc1*、*erbb3*）が同定された。特に、*zglp1* はごく最近マウスで卵母細胞の分化に必須な転写因子として同定されており、本種においても同様な役割を果たすことが示唆されたことは特筆される。また、EGF（上皮成長因子）受容体として知られる *erbb3* をはじめとする 4 遺伝子は細胞分裂に関与する遺伝子であり、卵原細胞の増殖に関与すると推察された。さらに、精巢では、9 遺伝子（*colla1*、*pcdha8*、*prkar1a*、*recql*、*map2k5*、*rgs11*、*ednrb*、*arsd*、*Tetraspanin*）が高い mRNA 量を示した。これらはコラーゲン産生、細胞接着および体細胞増殖などに関与する遺伝子であり、精小嚢形成に関与すると思われる。本研究により、既知の卵巢形成および精巢形成関連遺伝子よりも先行して発現する多くの遺伝子を初めて同定できた。

以上本研究では、天然ニホンウナギおよび養成ニホンウナギの両方の生殖腺における詳細な性分化過程と、既知の性分化関連遺伝子の発現動態を初めて明らかにした。これまで、本種は E2 投与個体の卵巢分化過程のみが報告されていたが、本研究では E2 未投与の飼育個体の卵巢および精巢を用いた性分化機構解析が可能となった。また、自然環境下での単独飼育により、得られる生殖腺の性比がほぼ 1 : 1 になり、本種の性は遺伝的に決まることが示唆された。さらに、全ての卵巢分化個体で共通して発現する遺伝子を初めて同定した。これら遺伝子の発現動態から、形態的未分化生殖腺であっても性の予測が可能になると期待される。本研究成果により、不明瞭な点が多かった本種の性分化の分子機構解明が大きく前進した。また、これらの知見は、将来的に本種で未だ実現していないホルモン投与に依存しない性統御技術の確立に貢献できるであろう。