HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	チョウザメ類卵濾胞における排卵能獲得誘導の分子機構に関する研究［全文の要約］
Author(s)	駿河谷, 諒平
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15710号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92464
Type	doctoral thesis
File Information	Ryohei_Surugaya_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：駿河谷　諒平

学 位 論 文 題 目

チョウザメ類卵濾胞における排卵能獲得誘導の分子機構に関する研究

一般に魚類の卵成熟期には、生殖腺刺激ホルモン（GTH）である黄体形成ホルモン（LH）の大量分泌（LH サージ）の刺激により、濾胞細胞（卵母細胞を取り囲む体細胞）層で卵成熟誘起ステロイド（MIS）が産生され、減数分裂再開に伴う卵核胞崩壊（GVBD）の後、排卵が誘導される。GVBD が誘起されるには、卵母細胞が卵成熟能（OMC; MIS の刺激により卵成熟が誘導される能力）を獲得している必要がある。これまでは、卵黄形成が完了した卵母細胞が OMC を獲得した後、LH サージが生じることで卵成熟・排卵が誘導されるというのが定説であった。しかし、一部の魚種では卵濾胞を MIS 存在下で生体外培養すると、GVBD が誘起されるにもかかわらず、排卵は誘起されない場合がある。したがって、排卵過程にも卵濾胞が MIS に対して感受性を獲得する過程が存在すると考えられ、その能力は「排卵能」と呼ばれる。チョウザメ類は、飼育環境下では、卵黄形成は進行するものの、卵成熟および排卵は誘起されないため、現在は低濃度の黄体形成ホルモン放出ホルモンアナログ（LHRHa）のプライミング注射とその翌日に高濃度の本注射を投与することで誘導している。しかし、投与タイミングを逸すると排卵に至らない場合があり、これは多くの場合卵濾胞が排卵能を有していないことが原因である。しかし、排卵能獲得の分子機構は、あらゆる生物で全く不明であり、その存在もほとんど認知されていない。そこで本研究では、チョウザメ類の安定種苗生産技術への応用を最終目的として、排卵、特に排卵能獲得の分子機構の解明を目指した。

まず、アムールチョウザメの排卵誘導に PI（卵母細胞の核の移動度）や外観的特徴による判定法が有効であるかを調べた。欧米諸国のチョウザメ養殖では、PI < 0.1 を指標に排卵誘導を行なっている。本研究で用いた個体のプライミング注射直前における卵母細胞の PI は、未排卵魚では 0.012–0.263 とさまざまであったが、排卵魚では 0.1 未満を示す個体がほとんどであった。以上から、確かにアムールチョウザメの排卵誘導の成功には、PI < 0.1 以下であることが必要条件であるが、十分条件ではないことが明らかとなった。以降、本研究では PI > 0.1 の未排卵魚を未熟未排卵魚、PI < 0.1 の未排卵魚を過熟未排卵魚とした。また、卵濾胞には卵核胞の移動に伴い、チョウザメ類独特の輪状の模様がみられ、成

熟度によってそのパターンは異なる。これを利用すれば適切な排卵誘導マーカーになり得ると考えた。しかし、アムールチョウザメでは、未熟未排卵魚、排卵魚および過熟未排卵魚のいずれにおいても、すべての卵濾胞で輪状の模様がみられ、また同一個体由来の卵濾胞であったとしても、各々の模様パターンが異なっていた。以上より、アムールチョウザメでは PI や卵濾胞の外観のみを指標として、排卵誘導することは困難であることが示唆された。続いて、卵濾胞を 17α-hydroxyprogesterone（17OHP）添加条件で生体外培養し、OMC および排卵能の季節変化を調べた。その結果、アムールチョウザメ、ダウリアチョウザメおよびチョウザメ種間雑種であるカラマムでは OMC は秋季あるいは翌春に獲得した個体もみられたが、ほぼすべての個体で、排卵能は季節変化により獲得されず、LHRHa 注射を施した後にのみ獲得された。このことから、生体外培養により排卵能の有無を判定し、採卵適期を推定することは難しいと思われた。

そこで、上述の判定法に代わる排卵誘導適期推定の分子マーカーを同定することを目的として、プライミング注射前に、未熟未排卵魚、排卵魚および過熟未排卵魚の間で発現差のある遺伝子を RNA-Seq 解析および qPCR 解析により探索した。その結果、最終的に Wnt シグナルに関与する *sfrp2* および *tbx20* の 2 遺伝子が排卵魚のみで高値を示した。また、これら 2 遺伝子の発現動態を調べたところ、排卵魚において *sfrp2* は長い時間をかけて徐々にプライミング注射直前にかけて増加し、その後プライミング注射により急激に発現が減少あるいは消失した。一方、*tbx20* の発現変化は *sfrp2* ほど顕著ではなかった。また、免疫化学染色により、Tbx20 は顆粒膜細胞および莢膜細胞層で発現することが明らかとなった。以上より、特に *sfrp2* の mRNA 量から LHRHa 注射を施さずとも排卵誘導の成否が予測可能となった。

続いて、既知の排卵関連遺伝子に着目し、それらの発現動態を調べた。これまで先行研究において、コチョウザメ卵濾胞を用いた RNA-Seq 解析が行なわれ、排卵能獲得時に発現が上昇する 17 遺伝子が選抜された。これら遺伝子の *in vivo* における発現動態をアムールチョウザメで調べたところ、*atp4a-like*、*rasd1*、*susd6*、*cyr61*、*apoE*、*ankrd9*、*plat* は、未熟未排卵魚および排卵魚に共通して誘導されたが、*acvr1* およびプロスタグランジン合成酵素である *ptgs2* は排卵魚のみで誘導された。したがって、チョウザメ類の場合、プロスタグランジン（PG）合成が不充分なことが排卵不全の一つの原因であり、*ptgs2* が転写されることで排卵能が獲得されることが示唆された。

さらに、脊椎動物の排卵に必要不可欠とされるプロテアーゼ遺伝子に着目した。まず、チョウザメ類卵濾胞において発現するプロテアーゼ遺伝子とそのインヒビター遺伝子を網羅的に探索したところ、14 種の MMP ファミリー、9 種の ADAM ファミリー、10 種の ADAMTS ファミリー、9 種の Cathepsin ファミリー遺伝子が存在した。また、これらプロテアーゼのインヒビターである TIMP ファミリー遺伝子は 3 種存在した。次に、これら遺伝子の発現変化を未熟未排卵魚と排卵魚で比較をしたところ、*mmp16*、*adam23*、

adamts9 および *timp2* の 4 遺伝子が、排卵魚のみでプライミング注射により誘導された。さらに、*in vitro* において特に *adamts9* は、サケ脳下垂体抽出物（SPE）+17OHP により発現が誘導され、SPE 単独条件下よりも誘導が増強された。このことから、チョウザメ類の *adamts9* は排卵の最終局面において、濾胞壁溶解を担う極めて重要な遺伝子である可能性が高く、これら遺伝子の発現が不十分であることが排卵不全の原因の一つであることもわかった。

次に、排卵能の獲得に関与すると考えられた *ptgs2* に着目し、全長 ORF のクローニングと、その発現動態および転写制御について詳細に調べた。その結果、*ptgs2* にはチョウザメ類特有の 2 タイプの *ptgs2*（A type および B type）が存在することがわかり、そのアミノ酸配列は極めて相同性の高いものであったが、5‘ flanking region や UTR 配列はかなり異なっていた。これら 2 タイプの *in vivo* および *in vitro* における発現動態もかなり異なり、排卵期では *ptgs2a* が顕著に LH により誘導された。このことから、*ptgs2a* が転写されることが、排卵能の獲得に必須であることがさらに高まった。次に、Wnt シグナルが *ptgs2* の発現に及ぼす影響を生体外培養により調べた結果、Wnt agonist である塩化リチウム（LiCl）によって *ptgs2a* の卵濾胞での発現が亢進した。さらに、ヒト胎児腎細胞由来 HEK293T 細胞でも、LiCl により *ptgs2a* のプロモーター活性は上昇した。また、卵濾胞で発現する PG/PG 受容体系に関連する遺伝子について着目し、NGS および qPCR 解析により排卵前に発現が増加する PG 合成酵素・PG 受容体遺伝子を探索した。その結果、PGE 受容体である *ptger3* のみが排卵魚の卵濾胞において、本注射 8 時間後に発現が誘導されることを見出した。また、*in vitro* において、*ptger3* の発現は SPE により誘導された。最後にベステル卵濾胞を PG 存在下で生体外培養し、排卵誘導実験を行なった。その結果、$PGF_{2\alpha}$ および PGE_2 が排卵を誘導し、特に $PGF_{2\alpha}$ が即効性を有していた。したがって、チョウザメ類の排卵には、少なくとも PGE_2/Ptger3 の活性化が重要であることが明らかとなった。

本研究により、*sfrp2* が採卵適期推定の分子マーカーとして有効であることを見出した。また、魚類で初めて Wnt/β-catenin シグナルが排卵に関与することも示した。さらに、チョウザメ類の排卵能獲得から排卵に至るまでのメカニズムの全貌を分子レベルから明らかにした。特に、排卵能の獲得機構を明らかにしたのは、脊椎動物では初めてのことである。すなわち、排卵能の獲得過程の前半には基底膜分解に関わるプラスミン産生能（*plat* の発現準備）が獲得され、中後期に濾胞壁溶解に関わるプロテアーゼおよびインヒビター合成能（*mmp16*、*adam23*、*adamts9*、*timp2* の発現準備）や PG/PG 受容体系活性化能（Wnt シグナルを介した *ptgs2a* の転写と *ptger3* の発現準備）が順次獲得されるという機序を示した。この過程は他魚種でも同様に進むと思われるが、進行が非常に遅いチョウザメ類でのみ解析可能であったことは特筆すべきことである。本研究成果は、チョウザメ類の種苗生産の成功をより確実にするのみならず、ニホンウナギなどホルモン投与を必要とする魚類においても良質卵の安定供給に大きく寄与するであろう。