

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：88003

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05838

研究課題名(和文) 卵食共食い型サメ類の栄養供給の理解の深化：栄養卵とは何者なのか？

研究課題名(英文) Understanding of embryonic nutrition in oophagous sharks: what are nutrition eggs?

研究代表者

野津 了 (Nozu, Ryo)

一般財団法人沖縄美ら島財団(総合研究センター)・総合研究センター 動物研究室・主任研究員

研究者番号：70774397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：卵食型サメ類であるネズミザメの各生殖ステージにおける卵巣のトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、妊娠期(栄養卵形成時)における卵巣の遺伝子発現パターンのみが別グループに分けられた。加えて、栄養卵と妊娠前の発達した卵巣をプロテオーム解析に供し、比較した結果、栄養卵において300以上のタンパク質が検出されなかった。これらの結果から妊娠期に形成される栄養卵が単なる未受精卵(受精能力を有する卵)とは異なり、栄養供給に特化した物質であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵食共食い型のサメ類において観察される栄養卵が単なる未受精卵ではなく、胎仔への栄養供給に特化した物質である可能性が示された。人工的に胎仔の育成をサポートすることが可能な胎内環境の再現が試みられている(サメ類の人工子宮)。本研究は人工子宮環境下における栄養供給に関する新たな知見の提供に寄与することが期待される。特に本研究から得られた情報を基に、詳細な成分分析等を行うことでこのことにより、胎仔の栄養供給方法の確立の基盤になると予想される。

研究成果の概要(英文)：Transcriptome analysis of the ovaries of the oophagous shark, *Lamna ditropis*, was conducted at each reproductive stage. As a result, only the gene expression patterns of ovaries during the gestation period (during the formation of nutrient eggs) were divided into different groups. In addition, nutrient eggs and pre-pregnant developed follicles were subjected to proteomic analysis and compared. As a result, more than 300 proteins were not detected in nutrient eggs. These results suggest that the nutrient eggs formed during gestation is not just “unfertilized” eggs, but a material specialized for nutrient supply.

研究分野：魚類生殖生理学

キーワード：板鰐類 卵食共食い 栄養卵 性ホルモン

1. 研究開始当初の背景

繁殖様式に関わらず動物において、胎仔の発育にとって栄養吸収は必要不可欠である。胎生である哺乳類は胎盤を獲得したことにより、胎児(仔)は母体から臍帯を通じて栄養を摂取する。一方で、卵生動物は栄養源となる卵黄を蓄積した卵を産出し、胎仔は卵殻内において孵化まで卵黄嚢からの栄養に依存する。サメ類は卵生、卵胎生、胎生と多様な繁殖様式を示すことが知られているが、近年は、母体から胎仔への栄養供給パターンによってさらに多様な繁殖様式に細別されてきている。その中でも、卵食共食いは栄養供給の観点からも非常に特殊な繁殖様式である。広義の胎生に分類される卵食共食いでは、妊娠時における胎仔の栄養源として、母体が卵巣から、未受精卵とされる“栄養卵”を供給する。この現象は従来から知られているものの、栄養卵の詳細についてはこれまで着目されること無く、その実態は現在も不明なままであった。

卵食共食い型サメ類のほとんどはネズミザメ目に属している。ホホジロザメやシロワニはその代表格である。これらの種は同じ胎生でも卵黄のみに依存する種(卵胎生)に比べ、産仔数が少なく、大きな子どもを産むという特徴がある。一方で、受精卵の卵径は10mm前後と小さいため、数ヶ月から12ヶ月という妊娠期間での胎仔の発育には栄養卵が極めて重要な役割を果たしていると考えられている。先行研究によって、シロワニやニシネズミザメにおいては卵殻に複数のタイプが存在し(卵殻の形や卵殻内の卵の数が異なる)、妊娠経過によって子宮内に出現する卵殻のタイプが変遷することが報告されている。このことから、栄養卵は単に未受精卵ということだけでなく、そもそも配偶子(卵子)とは実態が異なっている可能性が考えられた。

また、栄養卵の存在は胎生種における生殖内分泌学的にも疑問を生じさせる。哺乳類では基本的に妊娠時に排卵が停止し、それは性ステロイドホルモンを始めとする内分泌制御を受けている。一方で、卵食共食いでは胎仔に栄養卵を供給し続けることから妊娠時においても排卵が継続的に起きている。すなわち、卵食共食い型サメ類の排卵を制御する内分泌機構は胎生哺乳類のそれとは異なると予想された。

2. 研究の目的

(1) 卵食共食い型サメ類の栄養卵に焦点を当て、受精卵およびそれらの形成過程を形態学的・組織学的・生化学的・分子生物学的に詳細に比較・検討することで、その実態を明らかにすることを目的とした。

(2) 卵食型に見られる断続的な排卵を制御する内分泌機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 気仙沼魚市場で周年を通して安定的に水揚げされるネズミザメを対象とした。気仙沼魚市場に水揚げされるネズミザメは妊娠個体の出現時期、出産時期が大まかに把握されており、各繁殖ステージ(未成熟、妊娠前、妊娠中、出産後)のサンプルを確保した。各個体から卵巣を採取し、外部形態の観察、組織学的観察、RNAseq、およびプロテオーム解析に供した。

RNAseq解析ではde novo transcriptome assemblyを行い、得られたcontig配列をswiss-protのデータベースを用いてアノテーションを行った。アノテーション付けられた配列をreference配列とし、各サンプルの発現量解析を行った。また、このリファレンス配列を用いて、DIAプロテオーム解析を実施した。

(2) 卵食共食いサメ類の妊娠時における断続的な排卵の制御機構の一端を明らかにするために沖縄美ら海水族館において飼育されている性成熟した雌のオオテンジクザメを研究対象とした。本種は卵食型の繁殖様式を示し、沖縄美ら海水族館では6~7月頃に妊娠が確認され、翌年の1~3月頃に出産することが過去の観察事例から明らかになっている。本種の雌3個体に対し採血と併せて水中において超音波画像診断装置を用いた生殖器官のモニタリングを実施した。採取した血液はELISA法を用いて、性ステロイドホルモンであるエストラジオール17(E2)、テストステロン(T)およびプロゲステロン(P4)を測定した。

4. 研究成果

(1) ネズミザメ卵巣のRNAseqから得られたショートリードを用いて、de novo transcriptome assemblyを行った結果、約55万本のコンティグが得られた(N50: 2214, 平均配列長: 984.1)。このコンティグから妥当なコード領域を絞り込み、高度に類似した配列を除去した結果、35957本の配列を得ることができた。この配列セットをswiss-protに登録されているアミノ酸配列に対して相同性検索を行った結果、28752本の配列に注釈付られた。この配列セットをネズミザメのリファレンス配列とした。

各サンプルから得られたショートリードと作製したリファレンス配列を用いて網羅的な発現量解析を行った。各サンプルの遺伝子発現パターンによってクラスタリングした結果、妊娠中の卵巣(栄養卵形成)のみが別のクラスターに分けられた。遺伝子の発現パターンからも栄養卵形成時の卵巣と妊娠前の卵巣が異なることが示唆された。

プロテーム解析の結果、約 4200 のタンパク質が同定された。さらに、各サンプルを定量的に比較した結果、栄養卵及び栄養卵供給時期の卵巣では検出されず、交尾期の卵胞でのみ検出されるタンパク質を複数確認することができた。これらの中には、精子の先体反応に関わると推測されているタンパク質、生殖細胞の発達に関わるタンパク質が含まれていた。一方、栄養卵と栄養卵供給時期の卵巣にのみで検出されるようなタンパク質は確認されなかった。これらのことから、栄養卵は単なる未受精卵（受精可能な卵）ではなく、交尾期に産生される卵胞（受精後、胚発生が進行する卵）とは異なることが示唆された（図 1）。栄養卵と卵胞では検出されるタンパク質の多くが重複していた上、栄養卵特異的なタンパク質が検出されなかったことから、栄養卵は卵形成の途上で発育を止めたものである可能性が考えられた。

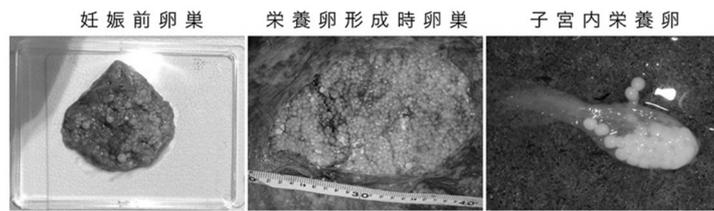


図 1 ネズミザメの各繁殖ステージの卵巣および子宮内の栄養卵

(2) 沖縄美ら海水族館では排卵が全く確認されないオオテンジクザメが観察されており、その個体の性ステロイドホルモンは低値で推移していることが先行研究から明らかとなっていた。2018 年には当該個体が妊娠および栄養卵を供給していたことがエコー観察から明らかとなり、性ステロイドホルモンの値の上昇も認められた。これらのことからオオテンジクザメの断続的な排卵または栄養卵の形成に性ステロイドホルモンが関与していることが強く示唆された（図 2）。

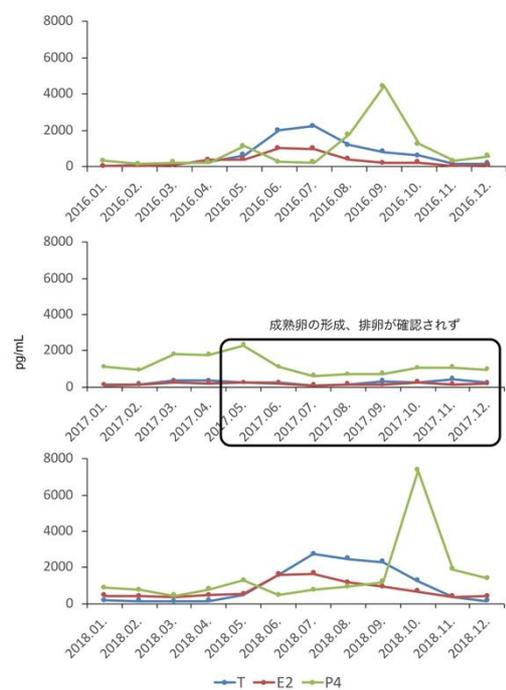


図 2 飼育下における雌オオテンジクザメ (ID:07A5) の性ステロイドホルモン量の月別変動

2019 年 6 月下旬および 9 月下旬に 1 週間程度の連続採血およびエコー検査を行った。また、月に一度エコー検査を行い、生殖器官の観察を行った。2019 年 6 月下旬の実験開始時には 3 個体中 1 個体は妊娠が確認され、1 個体は妊娠は確認されなかった（非妊娠）ものの、卵胞の発達および卵殻卵の排出が認められた（図 3）。また残り 1 個体はシーズンを通して卵胞の発達が確認できなかった（図 3）。9 月下旬の連続採血時には妊娠および非妊娠個体において、子宮への断続的な卵殻卵の排出が確認された。一方、血中の雌性ホルモンおよび雄性ホルモン濃度は低値を示し続けた。このことから、栄養卵を断続的に供給しているが、その都度新たな卵を発達させているのではなく、シーズン初期に発達させた卵を順に排出している可能性が考えられた（図 4）。

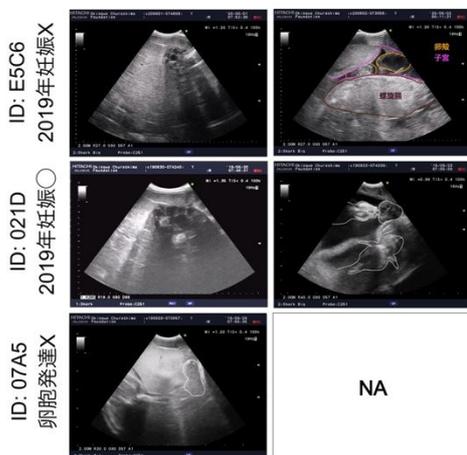


図 3 オオテンジクザメの生殖器官のエコー画像

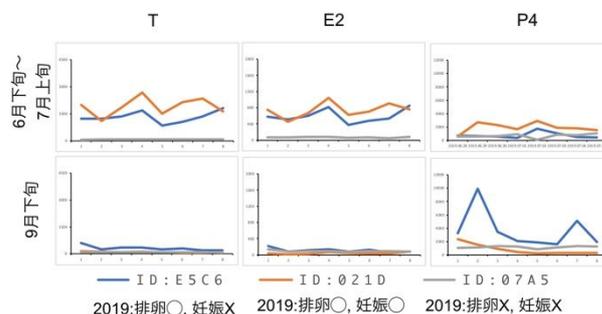


図 4 雌オオテンジクザメの性ステロイドホルモンの日間変動

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野津 了、村雲 清美、松本 瑠偉、辰見 香織、工樂 樹洋、佐藤 圭一
2. 発表標題 板鰓類の繁殖統御に向けたオミクスデータの活用
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 菊池 潔、井尻成保、北野 健	4. 発行年 2021年
2. 出版社 恒星社厚生閣	5. 総ページ数 258
3. 書名 魚類の性決定・性分化・性転換	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	村雲 清美 (Murakumo Kiyomi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------